

IRSNINSTITUT
DE RADIOPROTECTION
ET DE SÛRETÉ NUCLÉAIRE

**Traitement des lésions colorectales
radio-induites par injection de Cellules
Stromales Mésenchymateuses (CSM) :
Implication du processus inflammatoire**

Raphaëlle Bessout

Novembre 2012

LRTE

**THESE DE DOCTORAT DE
L'UNIVERSITE PIERRE ET MARIE CURIE**

Spécialité

Immunologie
(Ecole doctorale)

Présentée par

M^{elle} Raphaëlle Bessout

Pour obtenir le grade de

DOCTEUR de l'UNIVERSITÉ PIERRE ET MARIE CURIE

Sujet de la thèse :

« Traitement des lésions colorectales radio-induites par injection de Cellules
Stromales Mésoenchymateuses (CSM) : Implication du processus
inflammatoire »

soutenue le

devant le jury composé de :

M^{me}. le Docteur Noëlle Mathieu

Directrice de thèse

M^{me}. le docteur Danièle Noël

Rapportrice

M. le Professeur Jean-Jacques Lataillade

Rapporteur

M. le Professeur Jorge Domenech

Examineur

M. le Professeur Norbert-Claude Gorin

Examineur

M^{me}. le Docteur Béatrice Romagnolo

Examinatrice

Laboratoire d'accueil

Institut de Radioprotection et de Sûreté Nucléaire

Laboratoire de Radiopathologie et Thérapies Expérimentales

31, avenue de la Division Leclerc
92260 Fontenay aux Roses

Ce travail a reçu le soutien de la région Ile de France sous la forme d'une bourse DIM-Stem.

« Chaque difficulté rencontrée doit être l'occasion d'un nouveau progrès »

Pierre de Coubertin

Remerciements

Je tiens à remercier les membres du jury d'avoir accepté d'évaluer mon travail de thèse :
Le Pr Norbert-Claude Gorin pour avoir accepté de présider ce jury,
Le Dr Danièle Noël et le Pr Jean-Jacques Lataillade d'avoir bien voulu se pencher sur mon travail en tant que rapporteurs,
Le Dr Béatrice Romagnolo et le Pr Jorge Domenech pour leur examen de cette thèse.

Je tiens à remercier Patrick Gourmelon, Jocelyne Aigueperse et Philippe Voisin de m'avoir accueillie au sein du PRP-hom et du SRBE.

Je remercie mon directeur de thèse, Marc Benderitter. Merci de m'avoir permis de travailler au sein du LRTE et de m'avoir soutenue pendant ces quatre années.

Je remercie Noëlle Mathieu de m'avoir intégrée au sein des « MSC girls ». Merci d'avoir cru en moi et de m'avoir permis de faire évoluer ce projet et ma vision scientifique tout au long de ma thèse. Nos visions complémentaires des choses nous aurons permis de relever le défi de ce projet chronophage.

Je remercie également les deux autres « girls », Alexandra Sémont-Lepaul et Christelle Demarquay.

Alex, merci pour tes conseils scientifiques et la découverte de la physio. Merci aussi pour ton soutien et ton enthousiasme pour mes résultats tout au long de la thèse. Je suis sûre qu'un jour nous finirons par trouver que la glie est au centre de tout !

Christelle, merci infiniment d'avoir pris sous ton aile la pauvre petite chose que j'étais en arrivant et de m'avoir inculqué un peu de ton savoir (quatre ans n'étaient pas suffisant pour tout apprendre). Je n'oublierais ni nos discussions ni nos rires, et surtout pas les séances de chant à l'animalerie le matin !

Je remercie la dernière « MSC girl », Christelle Durand. Merci pour ces deux ans passés ensemble, pour ton aide, ton soutien indéfectible et nos retours communs en bus. Merci de ne jamais te vexer quand j'oublie de répondre à tes messages. Grâce à toi « bad romance » restera toujours un « meumeumage » informe au microscope ! Je te souhaite le meilleur pour la fin de ta thèse, je sais que tu y arriveras.

Un merci tout particulier à mon camarade du premier jour, Jean-Victor Lacavé-Lapalun. Quatre ans passés à travailler, et à vivre, aussi proches l'un de l'autre ne peuvent se résumer en seulement quelques mots. Je vais donc faire court : MERCI. Je pense que tu comprendras tout ce que ce simple petit mot peut cacher de reconnaissance et d'affection.

Un merci spécial à Valérie Holler pour ton enthousiasme à partager tes projets et les miens. Merci d'être restée une étudiante au fond de toi ! Je n'oublierais pas nos fous rires « charmants ».

Un autre merci particulier à Patrick Laloï. Merci d'avoir toujours pris le temps de discuter science et autres sujets avec moi. Merci pour tes conseils et tes idées.

Merci à Alain Chapel d'avoir bien voulu contacter lui-même le Pr Gorin.

Merci également à tous les autres membres du LRTE (sans aucun ordre établi): Carine, Bruno, Sabine, Claire, Agnès, Fabien, Olivier, Valérie, Georges, Radia, Christine et à Emilie, grâce à toi la relève des thésards est assurée.

Merci à Anna Bogdanova pour ton soutien indéfectible à ta « thésarde préférée », ton amour des animaux et des orchidées.

Merci aussi à tous les membres du LRTOX : Jean-Marc, Johanna, Téli, Céline, Line, Clémentine, Clélia, Isabelle, et ceux que j'oublie sûrement !

Merci à toi Guillaume, de m'avoir supportée et soutenue tout au long de ces quatre longues années. Merci de ne pas avoir renoncé et d'avoir fait de moi une nouvelle M^{me} Goudeau.

Enfin celles sans qui tout ceci n'aurait pas existé : les deux fées qui se sont penchées sur mon berceau et ne m'ont plus lâchée. Merci à toutes les deux pour votre amour et vos encouragements tout au long de ces 20 longues années d'étude. Merci d'avoir fait de moi une warrior et d'avoir toujours cru en moi malgré les difficultés.

Résumé

Au cours des dernières décennies, la radiothérapie s'est imposée comme étant un outil majeur dans le traitement des cancers de la zone abdomino-pelvienne. Malgré les évolutions technologiques, la radiothérapie reste associée à des effets secondaires pouvant parfois être très handicapants, principalement dus à la toxicité des rayonnements ionisants pour les tissus sains entourant la tumeur. Dans le cadre des radiothérapies abdomino-pelviennes, ces effets secondaires vont majoritairement toucher le tractus gastro-intestinal, très sensible aux radiations. La mise au point de traitements curatifs est donc devenue une priorité. Les cellules stromales mésenchymateuses (CSM) ont montré leurs capacités de régénération tissulaire et d'immunomodulation dans de nombreux modèles. Durant ma thèse, nous avons voulu mettre en évidence le bénéfice thérapeutique apporté par les CSM dans le traitement des lésions radio-induite, ainsi que les mécanismes sous-jacents. Nos résultats nous ont permis de démontrer l'efficacité de notre traitement, avec un effet à la fois sur la structure et sur les fonctions contractiles coliques. Nous avons pu montrer que cette efficacité thérapeutique dépend de deux processus. La stimulation de la prolifération épithéliale par la voie Wnt permet ainsi d'améliorer la régénération épithéliale. Une sécrétion locale accrue de corticostérone permet quant à elle de diminuer le nombre et l'état d'activation des lymphocytes T. Nos résultats suggèrent également l'existence d'un lien entre les deux phénomènes observés, donnant une nouvelle preuve des effets combinatoires de la thérapie par CSM.

Mots Clés : Radiothérapie, Cellules Stromales Mésenchymateuses, Inflammation, Epithélium, Glucocorticoïdes, Wnt.

Abstract

Throughout the last decades, radiotherapy established as a major tool in the treatment of abdominopelvic cancers. Despite great technological evolutions, radiotherapy remains associated with side effects that can sometimes be really harmful, this being mainly due to the toxicity of ionizing radiations for healthy tissues surrounding the tumor. As part of abdominopelvic radiotherapies, these side effects mainly affect the gastrointestinal tract, which is very sensitive to radiations. The development of curative treatments thus became a priority. Mesenchymal stem cells (MSC) showed their immunomodulatory ability as well as their ability to regenerate tissue in many models. During my thesis, we aimed at giving rise to the therapeutic advantage brought by MSC in the treatment of radioinduced damage as well as the underlying molecular mechanisms. Our results allowed us to demonstrate the efficiency of our treatment with an effect both on the colic epithelial structure and on its contractile functions. We demonstrated that this therapeutical efficiency depends on two processes. Stimulation of the epithelial proliferation through the Wnt pathway allows the epithelial regeneration process to be enhanced. The increased local corticosterone secretion allows the number and the activation state of T lymphocytes to diminish. Our results moreover suggest the existence of a link between the two observed phenomenons thus providing with a new proof of the combinatory effects of MSC therapy.

Key words: Radiotherapy, Mesenchymal stem cells, inflammation, Epithelium, glucocorticoids, Wnt.

Abréviations

3D-CRT : 3 Dimensions-Conformal Radiation Therapy

5-FU : 5-Fluorouracile

α -SMA : *Alpha-Smooth Muscle Actin*

BDNF : Brain Derived Neurotrophic Factor

CFU-F : Colony-Forming Unit-Fibroblast

CMH : Complexe Majeur d'Histocompatibilité

COX-2 : Cyclo-Oxgénase de type 2

CPA : Cellule Présentatrice d'Antigène

CSH : Cellules Souches Hématopoïétiques

CSM: Cellules Souches/Stromales Mesenchymateuses

CTCAE : Common Terminology Criteria for Adverse Event

CTL : Lymphocyte T Cytotoxique

DSS : Dextran Sulfate Sodium

EAE : Encéphalomyélite Auto-immune Expérimentale

EGF : Epidermal Growth Factor

ERN : Espèce Réactive du Nitrate

ERO : Espèce Réactive de l'Oxygène

FGF : Fibroblast Growth Factor

GALT : Gut Associated Lymphoid Tissue

GAP-43 : Growth Associated Protein 43

G-CSF : Granulocyte Colony Stimulating Factor

GFP : Green Fluorescent Protein

GLP2 : Glucagon-Like Peptide 2

GM-CSF : Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor

GvHD : Maladie du Greffon contre l'Hôte

Gy : Gray

HDV : *Histogramme Dose/Volume*

HGF : Hepatocyte Growth Factor

HSP : Heat Shock Proteins

IBD : Inflammatory Bowel Diseases

ICAM -1 : Intercellular Adhesion Molecule 1

IFN- γ : Interferon gamma

IGF-1 : Insulin-Like Growth Factor 1

IL : Interleukine

IL1-RA : Récepteur Antagoniste à l'IL-1

IMRT : Intensity Modulated Radiation Therapy

ISCT : International Society for Cellular Therapy. Société Internationale de Thérapie Cellulaire

IV : Voie intra-veineuse

KGF : Keratinocyte Growth Factor

KO : Knock-out

Lb : Lymphocyte B

LIF : Leukemia Inhibitory Factor

LPS : Lipopolysaccharide

Lt : Lymphocyte T

MAP-2 : Microtubule-associated protein 2

MBL : Mannose Binding Lectin

MCP-1 : Monocyte Chemoattractant Protein 1

M-CSF : Macrophage Colony Stimulating Factor

MICI : Maladies Inflammatoires Chroniques Intestinales

MLR : Réaction Lymphocytaire Mixte

MMP : Métalloprotéinase Matricielle

NFG : Nerve Growth Factor

NF κ B : Nuclear Factor κ B

NK : Natural Killer

NOD-SCID : Non-Obese Diabetic – SCID

NTCP : Normal Tissue Complication Probability

OPG : Ostéoprotégérine

PAMP : Pathogen Associated Molecular Pattern

PDGF : Platelet-Derived Growth Factor

PGE2 : Prostaglandine E2

PIGF : Placenta Growth Factor

PRR : Pattern Recognition Receptor

RANKL : Receptor Activator of Nuclear factor Kappa-B Ligand

SCF : Stem Cell growth Factor

SCID : Severe Combined ImmunoDeficiency

SDF-1 : Stromal cell Derived Factor 1

SEP : Sclérose en plaque

TGF- β : Transforming Growth Factor beta

Th : Lymphocyte T helper

TIMP : Tissue Inhibitor of MetalloProteinases

TLR : Toll Like Receptor

TNBS : Trinitrobenzene Sulfonic Acid

TNF- α : Tumor Necrosis Factor Alpha

TSG-6 : Tumor Necrosis Factor-inducible gene 6 protein

VCAM 1: Vascular Cell Adhesion Protein 1

VEGF : Vascular Endothelial Growth Factor

Publications

Articles soumis

MSC therapy induces local glucocorticoid synthesis and suppresses radiation-activated T cells: New insight into MSC immunomodulation Bessout R, Sémont A, Demarquay C, Charcosset A, Benderitter M and Mathieu N. *Stem Cell*

Mesenchymal Stromal Cells improve colonic epithelial regeneration in rat: New insights to treat pelvic radiation disease Semont A, Demarquay C, Bessout R, Durand C, Benderitter M, Mathieu N. *Gastroenterology*

Article à soumettre

Ad-MSC therapy reduces established radiation-induced colic lesions by inhibition of T lymphocytes Bessout R, Sémont A, Demarquay C, Durand C, Benderitter M and Mathieu N.

Avant-Propos

Au cours des dernières décennies, la radiothérapie est devenue un outil majeur dans la lutte contre le cancer. Bien que les progrès technologiques réalisés permettent une utilisation plus précise et sécurisée des rayonnements, d'importants risques persistent. En effet, comme pour tout traitement médical, les effets secondaires inhérents à la thérapie sont à prendre en compte. Ainsi, bien que le bénéfice de la radiothérapie sur la régression tumorale soit important, les dommages qu'elle provoque sur les tissus sains non-tumoraux environnants la tumeur peuvent être graves, et restent l'un des facteurs limitant majeurs dans le traitement des cancers.

Les cancers de la zone abdomino-pelvienne (prostate, utérus, vessie, ...) sont les cancers le plus souvent traités par radiothérapie et représentent à eux seuls la moitié des protocoles radiothérapeutiques effectués chaque année en France. De par leur localisation, ces tumeurs sont proches d'organes très sensibles aux effets des rayonnements ionisants. En effet, le tractus intestinal, qui est un organe à renouvellement cellulaire très rapide et donc très sensible aux rayonnements ionisants, va se trouver dans le champ d'irradiation lors du traitement de la majeure partie de ces tumeurs. On estime ainsi que 80% des patients qui subissent une radiothérapie abdomino-pelvienne développent des effets secondaires intestinaux aigus aboutissant à une modification durable de leurs fonctions intestinales. Après 10 ans, 5 à 10% de ces patients développent des effets secondaires chroniques sévères, tels que des saignements rectaux, des occlusions, une incontinence et des diarrhées, associés avec une morbidité et une mortalité importantes. Ces symptômes très handicapants et le nombre grandissant de patients atteints ont d'ailleurs abouti à la désignation des effets secondaires intestinaux des radiothérapies comme étant une pathologie à part entière, appelée « pelvic radiation disease ». Malgré cette nouvelle reconnaissance en tant que pathologie, les traitements actuellement disponibles en clinique afin de pallier à ces effets secondaires intestinaux restent malheureusement le plus souvent symptomatiques et non pas curatifs. Ils permettent ainsi de diminuer les signes pathologiques mais pas de soigner la pathologie en elle-même.

Devant ce manque de moyens thérapeutiques réellement efficaces, le laboratoire de Radiopathologie et Thérapies Expérimentales s'est fixé deux buts : comprendre les mécanismes sous-jacents aux effets néfastes des rayonnements ionisants afin de mettre à jour

de nouvelles cibles thérapeutiques potentiellement exploitables en clinique, et développer de nouvelles approches thérapeutiques basées sur l'utilisation de la thérapie cellulaire, et plus particulièrement des Cellules Souches Mésenchymateuses (CSM), afin de lutter efficacement contre les effets secondaires des radiothérapies. C'est dans ce dernier projet que mon travail de thèse a trouvé sa place, avec pour but spécifique de comprendre les mécanismes à l'origine des effets bénéfiques d'ors et déjà observés au sein du laboratoire suite au traitement des lésions intestinales radio-induites par thérapie cellulaire utilisant des CSM. La mise en place et l'évolution d'un processus inflammatoire étant depuis longtemps impliquées dans la réponse tissulaire aux rayonnements ionisants, et les importantes capacités des CSM à moduler ce type de processus, nous ont poussé à orienter mes travaux de thèse vers l'analyse spécifique de l'impact du traitement par CSM sur la réponse inflammatoire radio-induite.

Afin de faciliter la compréhension des résultats issus de nos travaux, l'introduction de ma thèse portera dans un premier temps sur les conséquences d'une exposition abdomino-pelvienne aux rayonnements ionisants. Les deux autres chapitres seront quant à eux consacrés aux CSM, avec une présentation de leurs utilisations en thérapie cellulaire suivie d'une analyse plus approfondie de leurs nombreux modes d'action et de leurs interactions avec le système immunitaire.

Table des matières

Remerciements.....	5
Résumé	7
Abstract	8
Abréviations.....	9
Publications.....	12
Avant-Propos.....	13
Table des matières	15
Table des figures.....	18
Table des tableaux.....	20
Introduction.....	21
1. Les radiothérapies abdomino-pelviennes : bénéfiques et effets secondaires	21
1.1. Utilisation des rayonnements ionisants en cancérologie	21
1.1.1. Origine de la radiothérapie.....	21
1.1.2. Les différents types de radiothérapies	22
1.1.3. Association de la radiothérapie avec d'autres thérapies anti-cancéreuses	25
1.1.4. Risques liés aux radiothérapies anti-cancéreuses.....	27
1.2. Effets secondaires des radiothérapies abdomino-pelviennes	32
1.2.1. Organes sains touchés lors des radiothérapies abdomino-pelviennes....	32
1.2.2. Homéostasie intestinale et réponse à l'irradiation	34
1.2.3. Symptomatologie des effets secondaires intestinaux	38
1.3. Traitements symptomatiques des effets secondaires des radiothérapies abdomino-pelviennes	39
1.3.1. Nutritionnels.....	40
1.3.2. Médicaux	40
1.3.3. Interventionnels.....	41
1.3.4. Chirurgicaux	42
1.4. Problématique	43
2. Thérapie cellulaire et Cellules Souches Mésenchymateuses	45
2.1. La thérapie cellulaire.....	45
2.1.1. Définition et législation.....	45
2.1.2. Médecine régénérative et thérapie cellulaire	46
2.2. La thérapie cellulaire : quelles cellules utiliser ?	48
2.2.1. Cellules différenciées	48

2.2.2.	Cellules souches : Définition	50
2.2.3.	Cellules souches embryonnaires	52
2.2.4.	Cellules souches adultes	56
2.3.	Les Cellules Souches Mésenchymateuses	61
2.3.1.	Définition	61
2.3.2.	Rôles physiologiques des CSM	63
2.3.3.	Potentiel <i>in vitro</i> des CSM	67
2.3.4.	Sources des CSM.....	70
2.4.	Utilisations des CSM en médecine régénérative	73
2.4.1.	Régénération du système hématopoïétique	74
2.4.2.	Régénération de l'os et du cartilage.....	75
2.4.3.	Régénération cardio-vasculaire.....	78
2.4.4.	Régénération du système nerveux	79
2.4.5.	Régénération des épithéliums	80
2.5.	Mécanismes impliqués dans l'amélioration de la régénération par les CSM	82
2.5.1.	Mobilisation et homing vers les sites lésionnels	83
2.5.2.	Différenciation et transdifférenciation.....	88
2.6.	Effets trophiques paracrines.....	90
3.	Cellules Stromales Mésenchymateuses et immunité	92
3.1.	Physiologie de l'inflammation.....	92
3.1.1.	Rôle physiologique.....	92
3.1.2.	Déroulement normal de l'inflammation	93
3.2.	Les médiateurs de l'inflammation	95
3.2.1.	Les cellules impliquées dans l'inflammation	95
3.2.2.	Les médiateurs chimiques de l'inflammation	100
3.3.	Résolution des réponses inflammatoires.....	107
3.3.1.	Résolution physiologique	107
3.3.2.	Résolution pathologique et inflammation chronique	109
3.4.	Immunité intestinale physiologique et pathologique	111
3.4.1.	Le système immunitaire intestinal	111
3.4.2.	Pathologies inflammatoires intestinales.....	114
3.4.3.	Cas particulier de l'inflammation intestinale radio-induite	116
3.4.4.	Fibrose intestinale radio-induite : rôle du processus inflammatoire....	117
3.5.	Interactions entre les CSM et l'immunité.....	121
3.5.1.	Interactions entre CSM et immunité innée.....	121
3.6.	Mécanismes de régulation des maladies inflammatoires par les CSM	129

3.7. Exemples de pathologies inflammatoires traitées par CSM	131
3.7.1. La polyarthrite rhumatoïde.....	131
3.7.2. La sclérose en plaque	132
3.7.3. Greffes d'organes et maladie du greffon contre l'hôte.....	134
3.7.4. Maladies inflammatoires chroniques intestinales	135
Modèle expérimental	139
1. Structure colique	139
1.1. Fonction colique.....	139
1.2. Structure de la paroi colique	139
1.2.1. La muqueuse colique	139
1.2.2. La sous-muqueuse	140
1.2.3. La musculaire externe (<i>Muscularis propria</i>)	141
1.2.4. La séreuse ou adventice	141
2. Analyse anatomopathologique du colon-rectum irradié	142
3. Irradiation colorectale chez le rat	143
4. Traitement par CSM	145
4.1. Isolement et culture des CSM	145
4.1.1. Cellules de la moelle osseuse	145
4.1.2. Cellules du tissu adipeux	145
4.2. Vérification phénotypique des CSM cultivées	145
4.3. Protocoles d'irradiation et de traitement des animaux par CSM.....	146
4.3.1. Protocole de traitement précoce.....	146
4.3.2. Protocole de traitement tardif	147
Objectifs et Résultats	149
Article 1	152
Article 2	189
Résultats 3	219
Discussion / Perspectives	245
Conclusion.....	269
Références bibliographiques	270

Table des figures

Figure 1 : Anatomie intestinale chez l'Homme	33
Figure 2 : schéma de la crypte intestinale et des cellules environnantes	35
Figure 3 : Exemples d'utilisation de cellules différenciées en Thérapie Cellulaire.....	49
Figure 4 : Les différentes catégories de cellules souches et leurs sources au cours du développement	52
Figure 5 : Descendance des cellules souches embryonnaires	54
Figure 6 : Anatomie de la moelle osseuse	65
Figure 7: Multipotence des CSM	68
Figure 8 : Organes adultes à partir desquels ont été isolées des CSM.....	71
Figure 9 : Tissus fœtaux et extra-fœtaux contenant des CSM	72
Figure 10 : Capacités biologiques des CSM mises à profit en thérapie cellulaire.....	73
Figure 11 : Représentation schématique du homing leucocytaire.....	86
Figure 12 : Molécules trophiques sécrétées par les CSM et leur participation aux différents processus impliqués dans la régénération tissulaire.....	91
Figure 13 : Chronologie des phases inflammatoires	94
Figure 14 : Déroulement de l'inflammation. Le stimulus inflammatoire, qu'il soit endogène où exogène, active les cellules immunitaires	95
Figure 15 : Les différentes voies d'activation du complément.	101
Figure 16 : Activation du système des kinines.....	102
Figure 17 : Interactions entre la voie de la coagulation et le système de la plasmine.....	103
Figure 18 : Phases d'une cicatrisation normale et du développement d'une fibrose radio-induite	119
Figure 19 : Hypothèse de l'orientation différentielle des CSM en fonction du contexte pathologique	124
Figure 20 : Interactions <i>in vitro</i> entre CSM et cellules de l'immunité innée.....	126
Figure 21 : Interactions <i>in vitro</i> entre CSM et cellules de l'immunité adaptative	128
Figure 22 : Structure de la paroi colique	142
Figure 23 : Coupes histologiques représentatives des lésions coliques induites par l'irradiation chez l'Homme et le rat.	144
Figure 24 : Photographies représentatives de la différenciation <i>in vitro</i> des CSM de rat en ostéoblastes, adipocytes et chondrocytes.	146

Figure 25 : Irradiation colorectale localisée chez le rat et cinétique d'analyse des effets du traitement précoce par CSM.....	147
Figure 26 : Irradiation colorectale localisée chez le rat et cinétique d'analyse des effets du traitement tardif par CSM. .	148
Figure 27 : Réparation cutanée d'un patient accidentellement irradié à forte dose (plus de 30Gy) et ayant de ce fait un mauvais pronostic vital.	247
Figure 28 : Evolution des bénéfices lésionnels et inflammatoires au cours du temps	258

Table des tableaux

Tableau 1 : Radioéléments utilisés en curiethérapie et leurs principales applications cliniques	24
Tableau 2 : Doses de tolérance des principaux organes à risque et des tissus sains calculées à partir de l'HDV	29
Tableau 3 : Radiosensibilité des organes à risque et complications cliniques observées suite au dépassement de leur dose de tolérance.....	30
Tableau 4 : Types de cancers donnant le plus souvent des complications intestinales tardives radio-induites et prévalence chez les patients traités pour ces cancers	34
Tableau 5 : Cellules immunitaires et leur rôle dans le processus inflammatoire.....	97
Tableau 6 : Caractéristiques des principales polarisations des lymphocytes T CD4+	99
Tableau 7 : Médiateurs inflammatoires d'origine cellulaire	104
Tableau 8 : Exemples de cytokines impliquées dans la mise en place et déroulement de l'inflammation.....	105
Tableau 9 : Marqueurs phénotypiques des CSM vérifiés par cytométrie en flux	146

Introduction

1. Les radiothérapies abdomino-pelviennes : bénéfiques et effets secondaires

La radiothérapie est l'une des armes thérapeutiques majeures dans la lutte contre le cancer. Les spécialistes estiment ainsi que deux tiers des malades atteints d'un cancer recevront des séances de radiothérapie au cours de leur prise en charge.

1.1. Utilisation des rayonnements ionisants en cancérologie

1.1.1. Origine de la radiothérapie

La radiothérapie est définie comme l'utilisation thérapeutique des radiations ionisantes. Elle est majoritairement utilisée afin de traiter les cancers de façon locorégionale. Le but du traitement par rayonnements ionisants va alors être de détruire l'intégralité des cellules cancéreuses tout en préservant au maximum les tissus sains qui les entourent.

L'origine de la radiothérapie remonte à la fin du XIX^{ème} siècle et est liée à trois découvertes scientifiques majeures : les rayons X par Wilhelm Röntgen en 1895, la radioactivité par Antoine Henry Becquerel en 1896 et le radium 226 par Pierre et Marie Curie en 1898. L'observation des effets des rayons X et du radium sur les tissus a été extrêmement rapide à la suite de leur découverte. Les premiers essais de thérapie anti-tumorale par rayons X ont ainsi eu lieu moins d'un an après leur découverte. Les premiers essais de curiethérapie par le radium ont quant à eux été pratiqués en 1901 par le docteur Henri-Alexandre Danlos à l'hôpital St Louis. Au cours des premières dizaines d'années d'utilisation, les protocoles de radiothérapie étaient principalement basés sur l'utilisation des rayons X en exposition externe et du radium en application directe, notamment pour les cancers cutanés. Malgré une utilisation déjà importante en Europe et aux Etats-Unis au cours de la première moitié du XX^{ème} siècle, c'est au cours des années 1950 que la radiothérapie va réellement prendre son essor grâce à l'apparition des bombes au Cobalt (1951) et des accélérateurs linéaires de rayons X (1952). Ces nouveaux appareils sont manipulables à distance et permettent de pallier à l'irradiation non contrôlée des personnels médicaux suite à la manipulation directe des

sources, qui a causé de nombreux décès au cours de la première moitié du siècle. Depuis lors, les évolutions technologiques n'ont pas cessé de faire avancer la radiothérapie, notamment grâce à l'apparition de nouvelles techniques d'imagerie (scanner, IRM, PET-Scan) qui permettent un meilleur ciblage des tumeurs ainsi qu'une meilleure protection des tissus sains environnant.

1.1.2. Les différents types de radiothérapies

En 2010, parmi les 906 735 patients pris en charge en France pour le traitement de leur cancer, 173 852 ont été traités par radiothérapie (source Institut National du Cancer « Situation de la radiothérapie en 2011 », juin 2012).

Le terme « radiothérapie » regroupe trois types de thérapies différentes : la radiothérapie externe, la curiethérapie et la radiothérapie métabolique.

La radiothérapie externe : il s'agit de la méthode la plus connue du grand public et la plus utilisée par les radiothérapeutes. Dans ce type de traitement, la source du rayonnement (accélérateur linéaire ou, de moins en moins, appareil au Cobalt 60) se trouve à l'extérieur du patient et en est éloignée d'environ 80 centimètres. Cette distance oblige les rayons à traverser la peau et les tissus normaux entourant la zone à traiter. Cela va entraîner des atteintes aux tissus sains qui peuvent être importantes. Afin de pallier au maximum à ces atteintes, des techniques d'irradiation multifaisceaux, appelées radiothérapie conformationnelle, ont vu le jour. La dose délivrée à la tumeur ne provient alors non plus d'une seule source mais de 4 à 6 faisceaux de moindre énergie qui convergent sur la tumeur. Les radiothérapeutes peuvent ainsi délivrer une forte dose de rayonnements à la tumeur tout en n'irradiant que faiblement les zones saines traversées par les rayons. De nombreuses améliorations ont pu être apportées aux protocoles de radiothérapie conformationnelle grâce à son couplage avec les techniques d'imagerie. Ainsi, la radiothérapie conformationnelle en 3 dimensions (3D-CRT : 3 Dimensions - Conformal Radiation therapy) permet d'administrer une dose précise de radiations à un volume cible donné grâce à la reconstruction en 3 dimensions du volume tumoral et des tissus sains l'environnant. La 3D-CRT peut également être combinée à une modulation de l'intensité de l'irradiation (IMRT : Intensity Modulated Radiation Therapy). Dans ce cadre, l'intensité des faisceaux d'irradiation va être modulée au cours des séances afin d'adapter la dose reçue à la forme et à la taille du volume tumoral tout en limitant les

atteintes aux tissus sains environnants. Enfin, la tomographie, ou radiothérapie hélicoïdale, couple l'imagerie par rayons X à la radiothérapie. Cette technique, associée ou non à la 3D-CRT ou à l'IMRT, permet de vérifier le positionnement du patient ainsi que l'évolution du volume tumoral avant chaque séance. Les faisceaux de rayonnements vont également pouvoir être orientés tout au long de la séance afin de s'adapter au mieux à la forme des zones à traiter mais aussi à celles à éviter. Ces nouvelles méthodes de traitement ont toutes un but commun : améliorer la destruction tumorale tout en préservant au maximum les tissus sains environnants afin de limiter autant que possible les effets secondaires des radiothérapies. En 2010, presque 90% des traitements radiothérapeutiques ont été réalisés à l'aide d'un protocole de radiothérapie conformationnelle. Toutes techniques confondues, la radiothérapie externe représentait quant à elle un peu moins de 93% des traitements délivrés, soit 1 662 654 séances (source Institut National du Cancer).

La curiethérapie : également appelée brachythérapie, est l'une des plus anciennes applications thérapeutiques de la radioactivité. Cette technique consiste à appliquer directement une source radioactive au niveau de la tumeur à traiter. Pour ce faire, une source scellée contenant un radioélément (voir tableau 1) est directement implantée au sein de la masse cancéreuse (curiethérapie interstitielle) ou dans une cavité naturelle de l'organisme située à proximité (curiethérapie endocavitaire). Dans le cas des tumeurs cutanées, l'application de la source peut être réalisée directement sur la zone à traiter (curiethérapie de surface). De par le positionnement précis des sources radioactives au sein ou à proximité directe de la tumeur à irradier, les rayonnements n'affectent qu'une zone très localisée autour de la source, permettant ainsi de fortement limiter la dose reçue par les tissus sains environnant. Les applications de la curiethérapie sont nombreuses, avec une utilisation fréquente dans le cadre des cancers gynécologiques tels que les cancers du col de l'utérus et de l'endomètre. Elle est également utilisée comme traitement préférentiel dans le cas des cancers de la prostate, et est le traitement le plus adapté au soin des cancers de la tête et du cou, qui nécessitent une bonne efficacité anti-tumorale associée à une forte préservation des tissus avoisinant.

Radionucléide	Cancers traités
Iridium 192 (¹⁹²I)	Radioélément le plus utilisé
Iode 125 (¹²⁵I)	Cancer de la prostate et du col de l'utérus
Césium 137 (¹³⁷Cs)	Cancer de l'utérus et du vagin
Cobalt 60 (⁶⁰Co)	Cancer des bronches, de l'œsophage et de la prostate
Palladium 103 (¹⁰³Pd)	Cancer de la prostate
Ruthénium 106 (¹⁰⁶Ru)	Cancers ophtalmiques

Tableau 1 : Radioéléments utilisés en curiethérapie et leurs principales applications cliniques

La radiothérapie métabolique : également appelée radiothérapie interne vectorisée, elle consiste à irradier des cibles tumorales de petite taille, souvent disséminées dans l'organisme, à l'aide de médicaments radioactifs. Cette technique est initialement basée sur la capacité accrue que possèdent certaines tumeurs à capter certaines substances. Ainsi, la première application de la radiothérapie métabolique fut le traitement des cancers de la thyroïde par administration d'iode 131. Cependant, l'administration systémique d'un vecteur radioactif pose le problème de la toxicité aux tissus sains, qui vont eux aussi capter et métaboliser ce vecteur. Il faut donc trouver le compromis idéal entre la dose nécessaire à l'éradication des cellules tumorales et la dose supportée par les tissus sains. Cette limitation dans la dose administrable a fait émerger un nouveau concept : le ciblage thérapeutique. Le but ici est de traiter plus sélectivement les cellules tumorales tout en préservant les cellules saines. Grâce à leur reconnaissance spécifique de leur cible, les anticorps monoclonaux anti-cancéreux couplés à des radionucléides permettent ainsi de limiter les effets secondaires liés à la destruction des tissus sains tout en assurant une bonne efficacité thérapeutique sur les cellules tumorales. D'autres vecteurs ciblés, tels que les analogues radiomarqués de la somatostatine (par exemple le In-111 pentetrotide), sont également en bonne voie de développement. Les études cliniques menées sur ce type de traitement montrent un taux de réponse élevée, bien que l'impact sur la survie des patients ne soit pas encore complètement satisfaisant. La radiothérapie interne vectorisée semble cependant appelée à se développer et à prendre une part de plus en plus importante dans le traitement des cancers.

Le choix de la méthode employée afin de traiter un cancer donné repose sur trois critères majeurs : la profondeur de la tumeur, le volume tumoral et les organes sains avec lesquelles la zone à traiter est en contact. Ces trois informations vont permettre aux équipes médicales de

choisir la technique qui permettra d'obtenir la meilleure éradication tumorale tout en offrant le moins de risques de complications possible.

1.1.3. Association de la radiothérapie avec d'autres thérapies anti-cancéreuses

A l'exception de certaines tumeurs très localisées traitées par curiethérapie (sphère ORL, col de l'utérus, prostate, peau), la radiothérapie est le plus souvent utilisée en association avec l'une des autres thérapies anti-cancéreuses à disposition des oncologues. En effet, il faut garder à l'esprit que toute tumeur cancéreuse, aussi localisée qu'elle puisse être, est une maladie systémique potentielle. Le risque que des cellules cancéreuses quittent la tumeur et aillent former des métastases est invariablement présent. Les traitements locorégionaux tels que la chirurgie et la radiothérapie permettent l'élimination de la tumeur primaire et des ganglions environnants, mais ne permettent ni de traiter ni de prévenir les métastases potentielles. C'est pourquoi ces méthodes locales sont généralement associées à des traitements à visée systémique comme la chimiothérapie.

Associations radio-chirurgicales : différentes approches chirurgicales sont utilisées afin d'aboutir à une exérèse totale (chirurgie radicale) ou partielle (chirurgie de cytoréduction) de la tumeur. De par son action locorégionale, la radiothérapie constitue une technique très complémentaire de la chirurgie. Différents schémas d'associations ont de fait été établis en fonction de la chronologie d'administration de chaque traitement. Lorsque la radiothérapie est appliquée après l'acte chirurgical, on parle de radiothérapie adjuvante. Le but de l'irradiation est alors d'éliminer les cellules cancéreuses qui n'ont pas été éliminées lors de la chirurgie afin de diminuer les risques de reprise de la tumeur primaire. Elle permet également d'obtenir l'éradication finale de la tumeur à la suite d'une chirurgie de cytoréduction. La radiothérapie néo-adjuvante est quant à elle utilisée en amont de l'acte chirurgical. Le but est ici de diminuer la taille de la tumeur afin de rendre opérables certaines masses trop volumineuses et considérées comme inextirpables en l'état. En outre, son utilisation peut permettre de pratiquer une chirurgie conservatrice à la place d'une chirurgie mutilante, notamment dans le cas des cancers du rectum. Une nouvelle technique émerge également de plus en plus : la radiothérapie intra-opératoire. Cette technique consiste à irradier une tumeur profonde (rectum, pancréas) au cours de l'intervention permettant son exérèse chirurgicale. Elle permet ainsi de délivrer au volume cible une dose élevée de radiations tout en épargnant les organes

sains environnants (intestins, reins) qui auront été préalablement éloignés par le chirurgien, et seront par la suite remis en place. Cette technique reste cependant associée à une radiothérapie externe post-opératoire et n'est utilisée qu'afin de délivrer une dose supplémentaire au volume cible tout en préservant les tissus sains.

Associations radio-chimiothérapiques : la chimiothérapie est l'outil roi dans le traitement des cancers disséminés. Le terme « chimiothérapie » regroupe un grand nombre de molécules différentes qui vont toutes interférer avec le métabolisme cellulaire normal. De ce fait, ces molécules vont agir comme des agents cytotoxiques et provoquer la mort des cellules cancéreuses, aboutissant ainsi à une inhibition de la croissance tumorale suivie d'une réduction de la taille de la tumeur.

A l'inverse de la radiothérapie et de la chirurgie, la chimiothérapie est un traitement systémique. Elle va donc avoir une action sur toutes les cellules cancéreuses présentes dans l'organisme, permettant ainsi de limiter le développement des métastases. La radiothérapie et la chimiothérapie fonctionnent de façon complémentaire et sont donc fréquemment associées. Le plus souvent, les protocoles font intervenir les deux traitements de façon séquentielle. Le patient va alors généralement recevoir plusieurs cures de chimiothérapie qui seront suivies quelque temps plus tard par un protocole de radiothérapie. Cet enchaînement thérapeutique sera le plus souvent répété plusieurs fois jusqu'à l'obtention d'une réponse clinique satisfaisante. Dans d'autres cas, les deux thérapies seront associées de façon concomitante. Les oncologues et les radiothérapeutes vont alors tirer profit de la capacité qu'ont les molécules de chimiothérapie à fragiliser l'ADN des cellules (inhibition de la réplication et de la transcription par le Cisplatine, inhibition de la synthèse d'ADN par le Fluorouracile, ou 5-FU), les rendant ainsi plus sensibles à l'effet des rayonnements ionisants. Cette sensibilisation va alors permettre de faciliter l'élimination de certaines tumeurs réputées radio-résistantes. Cependant, ce genre d'association n'est pas sans risques. En effet, si la chimiothérapie interfère avec le métabolisme des cellules cancéreuses, elle impacte aussi le fonctionnement des cellules saines. Cette sensibilité des cellules saines est d'ailleurs, tout comme pour la radiothérapie, en grande partie à l'origine des effets secondaires liés aux chimiothérapies. L'association de ces deux thérapies doit donc être réalisée avec prudence afin de ne pas induire une trop grande toxicité aux tissus sains et de préserver l'équilibre entre le bénéfice thérapeutique et les risques d'effets secondaires. Plusieurs cas de toxicité accrue lors de combinaisons radio-chimiothérapiques ont déjà été rapportés (pour revue voir (Niyazi et al.

2011)). Par exemple, Lordick *et al* ont rapporté trois cas de toxicité intestinale suite à l'administration de bevacizumab, un anticorps monoclonal dirigé contre le récepteur au VEGF, après la fin du protocole de radiothérapie (Lordick et al. 2006). Deux de ces patients souffraient de colite ischémique sévère alors que le troisième présentait une perforation du cæcum associée à des lésions ulcératives du colon. Ce dernier patient est d'ailleurs malheureusement décédé des suites de ses complications gastro-intestinales.

1.1.4. Risques liés aux radiothérapies anti-cancéreuses

Dans le cas d'une exposition aux rayonnements ionisants à visée anti-cancéreuse, l'un des risques de complications le plus important est lié à l'irradiation des tissus non tumoraux situés dans l'entourage du site tumoral et dans le champ d'irradiation. L'objectif de tout protocole de radiothérapie va donc être de trouver l'équilibre idéal entre le bénéfice apporté par la réduction et le contrôle de la tumeur et le risque de développer des effets secondaires suite à l'exposition des tissus sains.

L'utilisation des rayonnements ionisants en cancérologie repose sur la sensibilité aux rayonnements des cellules en division. Ainsi, les cellules tumorales, qui ont un cycle de division accéléré par rapport aux cellules saines, seront particulièrement sensibles aux effets de la radiothérapie. Les rayonnements vont occasionner des lésions à l'ADN des cellules en cours de division, ce qui va entraîner leur mort à plus ou moins court terme. L'irradiation n'est pas le seul phénomène à l'origine de lésions à l'ADN, qui sont courantes au cours de la vie d'une cellule. C'est pourquoi toutes les cellules sont équipées d'enzymes spécialisées dans la réparation des lésions à l'ADN. Suite à une irradiation, ces enzymes vont être activées et vont tenter de réparer les lésions créées par les rayonnements. Or il est intéressant de noter que les cellules saines ont une capacité de réparation des lésions radiques à l'ADN beaucoup plus importante que celle des cellules tumorales.

Le premier axe d'optimisation des protocoles de radiothérapie a donc été de jouer sur le facteur temps. En fractionnant la délivrance de la dose en plusieurs doses réduites et étalées dans le temps, les atteintes aux tissus sains sont limitées tout en permettant aux cellules saines de réparer leur ADN entre deux fractions. La mise au point de ces protocoles de fractionnement a nécessité l'obtention d'un équilibre subtil entre le temps de récupération des tissus sains et le temps de reprise de la croissance tumorale. En effet, si le temps laissé entre deux fractions est trop long, la tumeur peut reprendre sa croissance. A l'inverse, s'il est trop

court, ou si la dose administrée par fraction est trop importante, les atteintes aux tissus sains seront exacerbées. Tout est donc une fois de plus une question d'équilibre de la balance bénéfiques / risques.

La dose totale délivrée, l'intervalle de temps entre les fractions et la dose reçue par fraction vont ainsi être définies en fonction de deux critères majeurs, qui sont la dose de contrôle tumoral et la dose de tolérance des organes à risques.

La **dose de contrôle tumoral** est la dose d'irradiation nécessaire pour obtenir la destruction complète de la tumeur dans 90% des cas. Elle dépend directement de la sensibilité de la tumeur à l'irradiation. La sensibilité aux rayonnements ionisants dépend :

- du type histologique de la tumeur : un cancer de type ovarien ou testiculaire (séminomes) nécessitera une dose plus faible qu'un adénocarcinome (cancer épithélial) ;
- du volume tumoral : plus une tumeur est grosse et plus la dose délivrée devra être importante ;
- de l'aspect anatomique de la tumeur : les tumeurs infiltrantes, dont les cellules cancéreuses sont profondément ancrées dans les tissus, nécessitent de plus fortes doses que les tumeurs dites végétantes qui restent superficielles.

La **dose de tolérance des organes à risque** est la dose d'irradiation maximale tolérée par un tissu sain au cours de la radiothérapie. Cette dose de tolérance est le plus souvent associée à un volume d'irradiation à ne pas dépasser. On prend ainsi en compte la dose totale reçue mais également la proportion irradiée au sein d'un organe donné. La dose de tolérance des organes à risque est calculée en fonctions d'algorithmes tels que le NTCP (Normal Tissue Complication Probability) ou encore l'HDV (Histogramme Dose/Volume). Le NTCP permet de calculer la probabilité de survenue d'une complication en ramenant l'ensemble des doses non-uniformes reçues par un organe à une dose uniforme reçue par 1/3, 2/3 ou la totalité de l'organe. Le résultat est alors exprimé en pourcentage du risque d'apparition d'une complication sévère à 5 ans. L'HDV prend quant à lui en compte la dose maximale tolérée par l'organe mais également son architecture et permet de connaître la dose maximale tolérée ainsi que le volume irradié à ne pas dépasser afin d'éviter l'apparition de complications.

Les organes sains impliqués lors des radiothérapies, appelés organes à risque, sont classés en trois catégories : très radiosensibles (gonades, œil), moyennement radiosensibles (intestin grêle, cœur, poumons) et peu radiosensibles (os, muscle). Les complications cliniques

imputables à l'irradiation dépendent de la capacité des organes à continuer à assurer leur fonctionnement normal après l'exposition. Ainsi, les organes présentant une architecture dite en série, comme la moelle épinière ou l'intestin, verront leur fonction complètement altérée alors même qu'une seule sous-unité sera atteinte. Les organes structurés en parallèle, comme les poumons ou les reins, n'auront leur fonction altérée que lorsqu'un certain volume sera atteint. Ainsi, l'organe dans son ensemble va être très sensible à l'irradiation mais son exposition sur une zone limitée sera sans effet notable sur sa fonction. Les tableaux 2 et 3 reprennent les doses de tolérances de différents organes à risques, la classification de ces organes en fonction de leur radiosensibilité ainsi que les complications cliniques observées lors de leur irradiation au-delà de leur dose de tolérance (source SFRO, 2007).

Organe à risque	Dose et volume de tolérance
Tronc cérébral	Dose maximale de 50 Gy
Moelle épinière	Dose maximale de 45 Gy
Larynx	Dose maximale de 20 Gy
Conduit auditif, oreille moyenne et interne	Dose maximale de 50-55 Gy
Œil	Dose moyenne < 35 Gy
Poumon sain	Dose maximale de 20 Gy sur 35% du volume Dose maximale de 30 Gy sur 20% du volume
Œsophage	Dose maximale de 40 Gy sur une hauteur de 15 cm
Foie	Dose maximale de 30 Gy sur 50% du volume Dose inférieure à 26 Gy dans le foie total
Cœur	Dose maximale de 35 Gy dans l'ensemble du cœur
Rein	Dose maximale de 20 Gy dans un volume cumulé équivalent à un rein entier fonctionnellement normal
Intestin grêle	Dose maximale de 50 Gy Dose maximale de 40 Gy sur un grand volume
Estomac, Duodénum	Dose maximale de 45 Gy Dose maximale de 54 Gy dans un petit volume
Vessie	Dose maximale de 60 Gy sur 50% du volume Dose maximale de 70 Gy sur 25% du volume
Cols, têtes fémorales	Dose maximale de 50 Gy sur 10% du volume
Rectum (paroi rectale)	Dose maximale de 60 Gy sur 50% du volume Dose maximale de 70 Gy sur 25% du volume Dose maximale de 74 Gy sur 5% du volume

Tableau 2 : Doses de tolérance des principaux organes à risque et des tissus sains calculées à partir de l'HDV (source Guide des procédures de radiothérapie externe 2007, SFRO)

Organe à risque	Principales lésions radiques
Organes très radiosensibles : lésions sévères pour des doses faibles	
Ovaire	Stérilité et castration temporaire ou définitive
Testicule	Stérilité temporaire ou définitive selon la dose
Cristallin	Cataracte
Cartilage de conjugaison	Retard ou arrêt de croissance
Rein	Néphrite radique
Foie	Hépatite radique
Moelle hématopoïétique	Aplasie médullaire plus ou moins profonde et prolongée
Organes radiosensibles : lésions sévères pour des doses moyennes	
Poumon	Insuffisance respiratoire
Ganglion - Rate	Atrophie ganglionnaire ou splénique
Cœur	Péricardite constrictive si un large volume est irradié
Intestin grêle	Grêle radique, perforation
Estomac	Ulcération gastrique sévère
Moelle épinière	Myélite radique aboutissant à une paraplégie ou une tétraplégie selon le niveau irradié
Colon	Sténose ou perforation
Rectum	Rectite radique, perforation
Cerveau	Encéphalite radique, démence
Thyroïde	Insuffisances thyroïdiennes
Oreille moyenne	Hypoacousie
Œsophage	Œsophagite, perforation
Muqueuse ORL	Mucite, dysphagie
Peau	Radiodermite, fibrose, télangiectasie
Organes peu radiosensibles : lésions sévères pour des doses importantes	
Utérus – Vagin	Sténose vaginale
Os	Fracture possible sur os fragilisé
Muscle	Sclérose et rétraction du volume musculaire en fonction du volume irradié
Grosses artères	Sténose responsable d'accidents ischémiques
Tissu conjonctif	Fibrose radique

Tableau 3 : Radiosensibilité des organes à risque et complications cliniques observées suite au dépassement de leur dose de tolérance (source Guide des procédures de radiothérapie externe 2007, SFRO)

Les toxicités aux tissus sains ont été largement étudiées, ce qui a abouti à l'élaboration du Common Terminology Criteria for Adverse Event (CTCAE). Ce recueil, établi par l'Institut National du Cancer américain, a pour but de permettre à tous les praticiens de décrire et de classer les effets secondaires des radiothérapies de façon homogène. On y trouve donc une description ainsi qu'une classification des effets secondaires des radiothérapies en fonction des organes à risques et de la gravité des effets observés. Cinq grades de sévérité ont été établis (source CTCAE v4.03, 14 juin 2010). Ils prennent en compte la gravité des symptômes

et des lésions mais aussi les modifications de l'activité quotidienne qu'ils provoquent chez les patients.

Grade 1 : Léger. Symptômes légers voire inexistants ; observations cliniques ou diagnostiques seulement ; pas d'indication d'intervention. Aucune modification de la vie quotidienne du patient.

Grade 2 : Moyen. Modifie l'activité quotidienne habituelle du patient. Des interventions minimales, locales et non-invasives peuvent être nécessaires.

Grade 3 : Sévère. Effet médicalement significatif mais ne menaçant pas la vie du patient. Nécessite généralement une hospitalisation qui va empêcher le patient d'avoir une activité quotidienne normale.

Grade 4 : Très sévère. Effet menaçant la vie du patient. Implique la pratique de mesures d'urgence telle que l'hospitalisation en soins intensifs.

Grade 5 : Complication mortelle.

Tous les effets secondaires ne sont pas gradés dans toutes les catégories. En effet, si certains ne seront jamais classés comme légers, d'autres ne mettront jamais en péril la vie du patient. La classification est donc adaptée pour chaque type d'effet secondaire répertorié.

Un autre risque lié à l'utilisation des rayonnements ionisants pour traiter les cancers est le risque de surdosage accidentel. Ce surdosage peut provenir d'une défaillance matérielle, d'une défaillance humaine ou d'une combinaison de ces deux paramètres.

Le cas de surdosage accidentel le plus tristement connu, et le plus grave ayant jamais eu lieu en France, est celui ayant été découvert en 2006-2007 au sein du centre hospitalier Jean Monnet d'Epinal. Tous les patients concernés par ce surdosage ont été traités par radiothérapie conformationnelle pour un cancer prostatique. Entre mai 2004 et août 2005, 24 malades ont reçu une dose de rayonnement 20% trop élevée par rapport à la dose de 70 à 78Gy initialement prescrite (Peiffert et al. 2007). Ce surdosage provient d'une erreur dans le calcul de la dose d'irradiation délivrée lors des séances de radiothérapie. Une autre erreur de dosage s'élevant à 10% de la dose prescrite a également été mise en évidence. Il s'agissait cette fois d'une surdose de rayonnements due à l'utilisation de l'imagerie portale, qui permet de vérifier le bon positionnement des faisceaux d'irradiation lors des séances de radiothérapie conformationnelle. Cette imagerie induit en effet une irradiation de 0,2Gy par exposition (source IRSN) qui doit systématiquement être déduite de la fraction radiothérapeutique administrée. Une autre procédure, appelée « matching » et visant à vérifier le bon

positionnement des patients, a quant à elle entraîné un surdosage de 0,15Gy par « matching ». C'est l'absence de déduction de ces deux doses additionnelles qui a entraîné ce nouveau surdosage de 10%. En plus des 24 patients déjà accidentés qui ont donc reçu une surdose totale de 30%, cette nouvelle surdose a affecté 397 patients traités dans ce centre de 2001 à 2006.

Les 24 patients ayant reçu le surdosage de 30% ont par la suite souffert de très sévères lésions radio-induites. Un grand délabrement tissulaire associé à des nécroses importantes ainsi qu'à des fistules uro-digestives reliant le rectum et la vessie ont de fait été observés. Les douleurs associées étaient par ailleurs intenses et résistantes aux traitements morphiniques.

Malgré une incidence plus élevée des effets secondaires habituellement observés suite à une radiothérapie prostatique (rectites et cystites radiques), les 397 patients ayant reçu 10% de surdose n'ont quant à eux pas subi de dommages extrêmes suite à leur sur-irradiation.

1.2. Effets secondaires des radiothérapies abdomino-pelviennes

1.2.1. Organes sains touchés lors des radiothérapies abdomino-pelviennes

Les cancers de la zone abdomino-pelvienne représentent une part très importante au sein de l'ensemble des nouveaux cas de cancers diagnostiqués chaque année. Ainsi, parmi les 365 500 nouveaux cas de cancers diagnostiqués en France en 2011, 55,9% de ceux de l'homme et 27,3% de ceux de la femme étaient localisés dans la zone abdomino-pelvienne (source Institut national du cancer). Chez l'homme, le cancer de la prostate est celui qui a la plus forte prévalence avec 71 000 nouveaux cas diagnostiqués en 2011, suivi de près par le cancer colorectal (21 500 nouveaux cas, 3^{ème} cancer le plus fréquent) et le cancer de la vessie. Chez la femme, le cancer colorectal est le deuxième cancer le plus incident (19 000 nouveaux cas), suivi de plus loin par le cancer du col de l'utérus et celui de l'ovaire (respectivement 6 800 et 4 620 nouveaux cas).

La thérapie la plus fréquemment employée pour traiter les différents cancers de la zone abdomino-pelvienne est la radiothérapie, qu'elle soit externe, comme pour le cancer colorectal, ou sous forme de curiethérapie, comme pour la prostate ou le col de l'utérus. La radiothérapie trouve d'ailleurs sa plus forte utilisation dans le cadre du traitement de ces cancers. L'exposition de la zone abdomino-pelvienne aux radiations nécessite la prise en compte d'organes à risque spécifiques. En effet, l'abdomen regroupe plusieurs organes classés très radiosensibles, tels que les ovaires et le foie, mais aussi des organes considérés comme

étant très radiosensibles, tels que l'intestin grêle, le côlon et le rectum. La vessie est également un organe fortement à risque lors du traitement des cancers prostatiques.

Les organes à risque qui seront affectés par les rayonnements dépendent de la localisation de la tumeur à traiter. Ainsi, l'intestin grêle sera particulièrement touché lors du traitement des cancers du pancréas, du canal anal, du rectum et de la vessie. Le rectum quant à lui sera l'organe le plus affecté par l'irradiation des cancers de la prostate, de la vessie, du col de l'utérus et de l'endomètre. Le colon sigmoïde, qui est le segment le plus proche du rectum (voir figure 1) est classé comme un organe « à contourner » dans les cancers du col utérin, de la vulve, de la vessie et de l'endomètre. Malgré cette volonté de contournement, le colon sigmoïde est souvent atteint lors de l'irradiation de ces cancers, au même titre que le rectum (source Guide des procédures de radiothérapie externe 2007, SFRO). De par la prévalence des cancers abdomino-pelviens et la difficulté de contourner les organes à risque abdominaux lors du ciblage tumoral du fait de leur proximité anatomique avec l'organe porteur de la tumeur, les patients traités par radiothérapie pour ce type de cancers ont un risque élevé de développer des effets secondaires liés à l'irradiation des tissus sains.

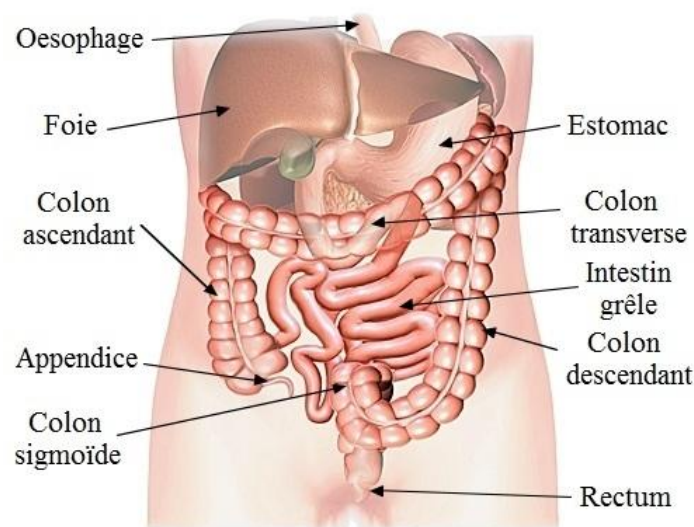


Figure 1 : Anatomie intestinale chez l'Homme

De par le renouvellement cellulaire rapide de la muqueuse qui les constitue, les différents segments intestinaux vont tous être des organes à risque lors des expositions abdomino-pelviennes. Les symptômes gastro-intestinaux sont donc ceux qui se manifestent le plus souvent chez les patients ayant subi ce type d'irradiation (voir tableau 4).

Type de cancer	Prévalence des atteintes radiques intestinales chroniques
Tumeurs génitales	> 90% des cas
Carcinome utérin	30-70% des cas
Carcinome ovarien	10-30% des cas
Carcinome endométrial	10-20%
Carcinome de la vessie	La plupart des hommes et 10 à 30% des femmes
Carcinome prostatique	Rare mais en quantité croissante
Maladie de Hodgkin	5%
Carcinome colique	Environ 2% mais en augmentation

Tableau 4 : Types de cancers donnant le plus souvent des complications intestinales tardives radio-induites et prévalence chez les patients traités pour ces cancers

On estime que seulement 10 à 20 % des patients ayant subi une irradiation abdomino-pelvienne n'auront aucune séquelle à long terme en ce qui concerne leur fonction intestinale. (Andreyev 2007)

1.2.2. Homéostasie intestinale et réponse à l'irradiation

Homéostasie intestinale

L'épithélium intestinal se compose d'une monocouche de cellules épithéliales qui se renouvellent intégralement en 4 à 5 jours. Ce renouvellement est assuré par un pool de cellules souches présentes à la base des cryptes intestinales, ainsi que par les progéniteurs situés dans le tiers inférieur des cryptes (voir figure 2). Les cellules progénitrices issues des cellules souches migrent le long de la crypte et se transforment en cellules de transition et d'amplification (cellules TA). Ces cellules TA vont se diviser et se différencier en cellules fonctionnelles au cours de leur migration vers le sommet de la crypte. En conditions physiologiques, la mort normale des cellules différenciées est compensée par la production de nouvelles cellules par les cellules progénitrices. L'homéostasie de l'épithélium colique est assurée par les cellules souches de la crypte mais également par leurs interactions avec les cellules qui constituent leur environnement direct. Ainsi, les cellules épithéliales sont en contact étroit avec les myofibroblastes péricryptaux, qui assurent le soutien de la crypte grâce à la sécrétion de fibres matricielles. Ces cellules sont en outre capables d'influencer la prolifération, la différenciation et l'activité des cellules épithéliales via la sécrétion de divers facteurs moléculaires (TNF- α (Tumor Necrosis Factor α) et KGF (Keratinocyte Growth Factor) dans le cadre d'une inflammation par exemple). L'homéostasie intestinale est

également fortement influencée par les cellules immunitaires présentes au sein de l'intestin (voir paragraphe 3.4.1 « système immunitaire intestinal »).

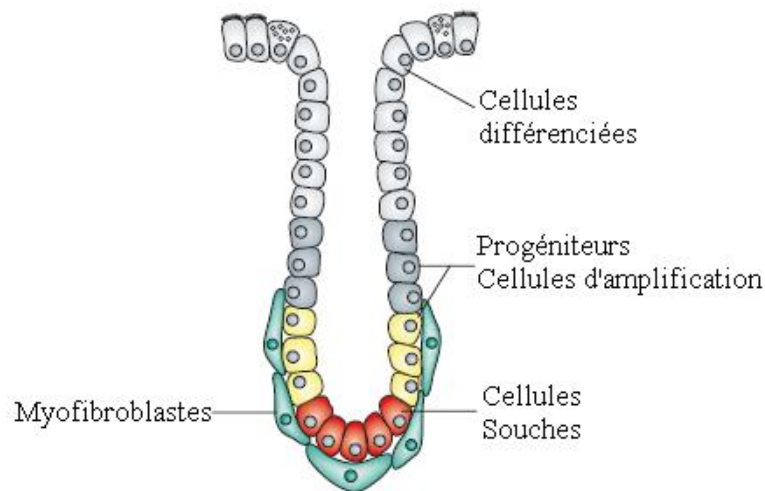


Figure 2 : schéma de la crypte intestinale et des cellules environnantes

L'un des principaux rôles de l'épithélium intestinal est de protéger l'organisme vis-à-vis des pathogènes, commensaux ou non, présents dans la lumière intestinale. L'épithélium intestinal sert donc de barrière antimicrobienne. Cette barrière est composée de deux éléments : le mucus et l'épithélium lui-même. Le mucus est un gel hydraté composé de protéines hautement glycosylées : les mucines. Si le mucus sert de barrière physique entre les pathogènes et l'épithélium, il permet également d'inhiber l'adhésion des bactéries aux cellules épithéliales. Enfin, sa production va être augmentée lors d'une infection intestinale afin de favoriser l'élimination des pathogènes par voie fécale. La barrière épithéliale est quant à elle composée d'une monocouche de cellules épithéliales polarisées, reliées entre elles par des jonctions serrées et adhérentes. Cette barrière est imperméable aux composés hydrophiles s'ils ne sont pas transportés par les transporteurs spécifiques exprimés à la surface des cellules épithéliales. Les jonctions adhérentes assurent la cohésion des cellules épithéliales entre elles et jouent également un rôle dans la polarisation, la différenciation et la survie des cellules. Ces jonctions adhérentes sont nécessaires à la formation des jonctions serrées, qui vont réguler les flux existant entre la muqueuse et le milieu externe. Une augmentation de la perméabilité intestinale, notamment lors d'une inflammation, va induire une rupture de la protection épithéliale et ainsi permettre le passage de pathogènes au sein de l'organisme.

Le renouvellement des cellules constitutives de l'épithélium ainsi que le maintien des fonctions épithéliales dépendent de l'équilibre existant entre la perte et le renouvellement

cellulaire. Tout stress compromettant la régénération cellulaire va ainsi remettre en cause la capacité de la muqueuse colique à assurer ses fonctions, et également provoquer l'exposition des structures intestinales sous-jacentes aux pathogènes microbiens.

Réponse colique à l'irradiation

Trois à six heures après l'exposition aux rayonnements ionisants, une augmentation de l'apoptose cellulaire apparaît au sein du compartiment souche de la crypte intestinale (Potten et al. 1990). Les lésions à l'ADN des cellules en cours de division viennent s'ajouter à cette augmentation de la mort cellulaire. Ces lésions vont entraîner un arrêt temporaire de la mitose, ce qui va aboutir au mieux à un retard dans la régénération cellulaire et dans le pire des cas à la mort mitotique des cellules. Le déficit cellulaire induit par la mort des cellules souches et des cellules progénitrices va altérer le remplacement des cellules différenciées normalement éliminées à l'apex des cryptes, induisant l'apparition d'une atrophie de la muqueuse intestinale. On observe alors une altération de la fonction de la barrière intestinale suivie d'une rupture physique de la barrière qui va initier l'ulcération muqueuse ainsi que le développement d'un processus inflammatoire (détaillé au paragraphe 3.4.3 : cas particulier de l'inflammation intestinale radio-induite). La progression des lésions muqueuses radiques comporte 5 phases : l'initiation, l'activation cellulaire, l'amplification, l'ulcération et la cicatrisation.

Initiation : elle est due à l'action directe des rayonnements ionisants sur les cellules. Les rayonnements vont induire la formation d'espèces réactives de l'oxygène qui vont provoquer des dommages à l'ADN et aux macromolécules cellulaires (majoritairement les protéines).

Activation cellulaire : elle découle de la réponse cellulaire à l'irradiation. Les lésions à l'ADN vont entraîner l'activation de facteurs de transcription tels que P53 et NFκB (Nuclear Factor Kappa B). La peroxydation des lipides induite par l'irradiation va quant à elle activer des voies de réponse au stress (JNK, c-jun,...). L'activation de ces voies de signalisation et de ces facteurs de transcription va induire la production par les cellules irradiées de cytokines inflammatoires telles que le TNF-α, l'interleukine 1β (IL-1β) et l'interleukine 6 (IL-6). La balance entre les signaux pro et anti-apoptotiques à laquelle vont être soumises les cellules épithéliales va déterminer leur survie ou leur entrée en apoptose. En outre, l'activation cellulaire des fibroblastes intestinaux va être responsable de la production de

métalloprotéinases matricielles (MMP) qui vont dégrader la lame basale épithéliale et la matrice de collagène subépithéliale, contribuant ainsi aux dommages muqueux radio-induits (Sonis 2004).

Amplification : elle va être due à une stimulation secondaire des voies de signalisation inflammatoires et apoptotiques par les médiateurs sécrétés en réponse à l'irradiation.

Ulcération : elle est liée à la rupture de la barrière épithéliale suite à l'apoptose radio-induite des cellules souches. L'apoptose des cellules souches de la crypte dépend de la dose d'irradiation reçue. Ainsi, de fortes doses d'irradiation vont aboutir à une perte totale des cellules souches de la crypte qui va elle-même induire une disparition de la crypte suite à la migration et à l'exfoliation des cellules différenciées. A des doses plus faibles, il n'y a pas de stérilisation des cryptes mais la perte d'une partie des cellules souches entraîne l'apparition d'une désorganisation structurelle associée à une perte de fonction de la barrière muqueuse. Cette perte de fonction de la barrière épithéliale va permettre la prolifération ainsi que l'infiltration dans la muqueuse des bactéries lumineales. Cette invasion bactérienne va provoquer des lésions secondaires en induisant directement l'apoptose des cellules épithéliales ainsi qu'une forte réaction inflammatoire, elle-même à l'origine de lésions cellulaires.

Cicatrisation : elle correspond à une résorption progressive de l'inflammation et est orchestrée par les cellules mésenchymateuses intestinales. Ces dernières vont, via la sécrétion de facteurs de croissance, induire la prolifération et la différenciation des cellules souches survivantes. Cette stimulation de la multiplication cellulaire va permettre de restaurer la barrière muqueuse, et ainsi le contrôle de la flore bactérienne. Cette restauration va permettre la diminution des stimuli pro-inflammatoires et ainsi permettre au tissu de retrouver une organisation normale. Cependant, après irradiation, la mise en place d'une cicatrisation pathologique est observée, dont la chronicité est en outre associée à un processus inflammatoire lui aussi chronique.

La phase de cicatrisation est cruciale pour la guérison des lésions, qu'elles soient radiques ou non. Les complications aiguës des radiothérapies correspondent aux 4 premières phases de développement des lésions radiques. Les complications tardives, en revanche, découlent d'une phase de cicatrisation anormale, qui devient chronique au lieu d'être transitoire (voir paragraphe 3.4.4 sur l'inflammation et la fibrose intestinales radio-induites)

1.2.3. Symptomatologie des effets secondaires intestinaux

L'altération de l'intégrité intestinale causée par l'exposition d'un segment sain aux rayonnements ionisants va provoquer l'apparition de différents symptômes plus ou moins handicapants pour le patient. Le plus souvent, ces atteintes sont rapidement réparées et le patient ne garde aucune séquelle à long terme. Cependant, on estime que 5 à 10% des patients vont souffrir de lésions à long terme qui pourront avoir un impact important sur leur qualité de vie, et parfois même engager leur pronostic vital. Deux types d'effets secondaires intestinaux suite à une radiothérapie ont donc été définis : les effets secondaires aigus, qui se manifestent au cours du traitement radiothérapeutique et disparaissent généralement en quelques semaines, tout au plus 3 mois après l'arrêt du traitement, et les effets secondaires tardifs, qui apparaissent plus de 3 mois après la fin du traitement et perdurent au cours du temps.

Effets secondaires aigus : Ils concernent environ 80% des patients recevant une radiothérapie abdomino-pelvienne. Les symptômes liés aux effets secondaires aigus se manifestent généralement au cours de la deuxième semaine de traitement radiothérapeutique et atteignent leur pic d'intensité entre la 4^{ème} et la 5^{ème} semaine (Andreyev 2007). Les symptômes décrits par les patients comprennent des douleurs abdominales associées à des crampes, des vomissements, des ballonnements, des épisodes de diarrhée et parfois des saignements (Kountouras et al. 2008). Il est également à noter que les patients souffrent de malabsorption des nutriments ainsi que d'infections bactériennes causées par la dénudation de la muqueuse intestinale suite à l'exposition aux rayonnements ionisants. Ces symptômes aigus sont généralement transitoires et peuvent être palliés grâce à des traitements symptomatiques. Il est cependant à noter que leur intensité peut nécessiter un arrêt transitoire du protocole radiothérapeutique, mettant en péril l'efficacité du traitement anti-cancéreux.

Effets secondaires tardifs / chroniques : ils se développent des mois et même des années après la fin du traitement par radiothérapie. On estime que 5 à 20% des patients traités par radiothérapie abdomino-pelvienne développeront ce type d'effets secondaires dans les 5 à 20 années suivant l'arrêt de leur traitement. Ils souffrent alors de différents symptômes tels que des diarrhées, une incontinence, des saignements pouvant nécessiter le recours à des

transfusions sanguines et des difficultés de transit pouvant aller jusqu'à l'obstruction complète. Ces symptômes s'accompagnent généralement d'une perte de poids, signe d'une perturbation des fonctions motrices et d'absorption intestinales. On observe également la formation de fistules dans 1 à 2% des cas. Les causes de ces symptômes sont multiples et souvent difficile à déterminer de façon individuelle. Il est par exemple reporté 13 mécanismes différents pouvant induire une diarrhée, allant de la surcroissance bactérienne au rétrécissement d'une partie de l'intestin (Andreyev 2007).

1.3. Traitements symptomatiques des effets secondaires des radiothérapies abdomino-pelviennes

La prise en charge par les gastroentérologues des patients souffrant de désordres gastro-intestinaux liés aux radiothérapies est compliquée par l'apparition tardive de ces symptômes. En effet, si les effets secondaires aigus sont généralement traités directement par les radiothérapeutes et les oncologues au cours du traitement radiothérapeutique, les effets secondaires tardifs sont quant à eux plus difficilement identifiables comme tels, et de ce fait difficilement curables.

Aucun traitement curatif n'est actuellement disponible afin de soigner les effets secondaires des radiothérapies abdomino-pelviennes. En effet, l'arsenal thérapeutique dont disposent les médecins permet de diminuer, voire de faire disparaître complètement, certains symptômes liés aux effets secondaires des radiothérapies. Cependant, la disparition des symptômes ne signifie pas la disparition de leurs causes. La plupart des symptômes vont ainsi réapparaître dès l'arrêt des traitements et de nouvelles manifestations vont venir se greffer aux autres au fur et à mesure de l'évolution de la maladie. Malgré l'absence de traitement permettant de résoudre totalement les conséquences de l'irradiation des tissus sains au cours des radiothérapies, les options de traitements pour soulager les symptômes des patients sont cependant nombreuses, même si les preuves de leur efficacité restent pauvres de par un manque d'études cliniques standardisées et à large échelle. Le but ici n'est pas de réaliser une liste exhaustive des différentes études menées mais de présenter les quatre grand types de traitements, ainsi que les techniques et molécules les plus prometteuses en terme de soin des symptômes gastro-intestinaux associés aux radiothérapies (Henson 2010) (Kountouras et al. 2008) (Andreyev 2007) (Theis et al. 2010).

1.3.1. Nutritionnels

Ce type de traitement est généralement mis en place dans les cas de diarrhée modérée, le plus souvent en association avec des anti-diarrhéiques chimiques. Les principes utilisés sont les mêmes que dans d'autres pathologies inflammatoires chroniques de l'intestin telles que la maladie de Crohn et la rectocolite hémorragique. On utilise généralement un régime pauvre en résidus afin de limiter l'activité intestinale ainsi qu'une réduction de la consommation de lactose et de graisse. L'utilisation de probiotiques (*Lactobacillus bulgaricus*), d'acides gras à chaîne courte ainsi que la mise en place d'une supplémentation en glutamine et/ou en arginine ont également été testées, semble-t-il avec succès à plus ou moins moyen terme, mais il n'existe pour l'instant aucune étude robuste confirmant leur efficacité réelle et durable.

Dans les cas où la régulation de la nutrition orale échoue à diminuer les diarrhées ainsi que dans les cas d'obstruction sévère, la nutrition par voie parentérale est mise en place. Cependant, cette solution, bien que permettant d'éviter la malnutrition des patients et de faciliter certaines futures chirurgies, n'empêche ni le développement normal de la pathologie ni les rechutes. Il n'existe à l'heure actuelle aucune preuve en faveur des interventions nutritionnelles pour prévenir ou gérer les symptômes intestinaux attribuables aux radiothérapies.

1.3.2. Médicaux

Différentes classes de molécules sont couramment utilisées dans le traitement des désordres gastro-intestinaux liés aux radiothérapies. Leur utilisation seule ou en combinaison dépend de la multiplicité des symptômes présentés ainsi que de leur gravité.

Les principales familles de molécules dont l'utilisation a été reportée sont :

Les anti-diarrhéiques : ils sont le plus souvent utilisés en combinaison avec un traitement nutritionnel. Les molécules les plus couramment utilisées sont des opiacés de type Lopéramide qui ralentissent le transit intestinal et favorisent la réabsorption de l'eau. Le traitement permet l'arrêt des symptômes mais ne soigne pas leur cause et n'empêche pas l'évolution de la pathologie

Les antibiotiques : ils sont principalement utilisés dans les cas avérés de diarrhées dues à une croissance démesurée des bactéries intestinales suite à la rupture de la barrière

épithéliale. L'efficacité du traitement par molécules spécifiques des bactéries gramm négatives a largement été démontrée, le plus souvent en association avec des anti-inflammatoires. Cependant, l'efficacité des antibiotiques disparaît à plus ou moins court terme suite à leur arrêt, nécessitant une reprise intermittente voir même continue du traitement. Là encore, cette thérapeutique, bien qu'ayant démontré une efficacité réelle, permet uniquement la disparition des symptômes et ne permet en aucun cas de soigner réellement le patient, i.e. il ne répare pas la lésion de la barrière épithéliale mais annule la croissance bactérienne qui en découle.

Les anti-inflammatoires : Les anti-inflammatoires, stéroïdiens et non-stéroïdiens, représentent le traitement le plus couramment utilisé. En effet, leur utilisation est déjà largement reconnue dans le cadre des maladies intestinales chroniques comme la maladie de Crohn. Les molécules les plus souvent testées sont l'acide 5-aminosalicylique, ou 5-ASA, par voie orale et différents glucocorticoïdes par voie rectale. Malgré l'absence d'études cliniques standardisées à large échelle, il semble que ces différents traitements anti-inflammatoires aient une bonne efficacité aussi bien seuls que combinés, et permettent la diminution des diarrhées et des saignements rectaux avec des effets persistant à plus ou moins long terme.

Les molécules cytoprotectrices : la molécule la plus utilisée est le sucralfate, un disaccharide polyanionique hautement sulfaté. Son mécanisme d'action supposé passerait par la stimulation de la régénération épithéliale ainsi que la formation d'une barrière protectrice (Denton et al. 2002). Les études menées ont montré une réelle amélioration aussi bien en ce qui concerne l'atteinte muqueuse que la fréquence et l'intensité des symptômes. Les effets du sucralfate semblent persister au cours du temps avec une efficacité maintenue à 4 mois.

1.3.3. Interventionnels

Les traitements interventionnels consistent à interférer de façon directe avec le tissu lésé. Ils sont principalement utilisés afin de limiter les saignements dus aux lésions radiothérapeutiques. Trois grands traitements sont utilisés :

Le formaldéhyde : utilisé en application directe afin de cautériser les zones hémorragiques. Il agit comme un agent sclérosant sur les vaisseaux sanguins, diminuant ainsi les pertes de sang. Cependant, ce traitement est loin d'être sans risque et peut causer de nombreux effets secondaires tels qu'une colite aiguë due à une altération non souhaitée de la muqueuse lors de l'application. Certaines études ont en outre suggéré que la cautérisation des

vaisseaux pourrait augmenter l'hypoxie déjà créée par l'irradiation et de ce fait aggraver des effets secondaires plus tardifs.

La coagulation thermique : on utilise alors la technique du plasma argon, qui consiste à délivrer ce gaz par endoscopie au niveau de la surface de la muqueuse où il est ionisé par un filament électrique de haut voltage. Ceci aboutit à une élévation locale de la température de la muqueuse et à la coagulation des vaisseaux sanguins. Cette technique est facilement disponible et « simple », cependant elle présente un risque élevé ainsi qu'une efficacité non avérée dans les cas de saignements très importants.

L'oxygène hyperbare : il s'agit de la seule thérapie ayant pour effet d'augmenter le nombre de vaisseaux au sein de la muqueuse lésée, avec une vascularisation 8 à 9 fois plus importante au sein des tissus mous suite au traitement. Le principe de cette thérapie est de créer un gradient d'oxygène dans les tissus hypoxiques afin de stimuler la création de nouveaux vaisseaux. La néo-angiogenèse va alors permettre d'augmenter l'apport en sang au tissu et de réduire de ce fait l'ischémie et la nécrose muqueuses, toutes deux responsables de complications sévères. L'augmentation locale de l'oxygène au sein du tissu va également permettre de stimuler la synthèse de collagène au niveau des bords de plaies, et ainsi permettre la création *de novo* de micro-vaisseaux et aboutir à une ré-épithélisation des zones lésées. Cette méthode n'a que très peu d'effets secondaires connus et offre de bons résultats aussi bien en ce qui concerne l'arrêt des saignements que la réparation des zones lésées. Cependant, ce traitement reste cher et peu accessible de par le faible nombre d'appareillages disponibles et la longueur du traitement (8 semaines de traitement quotidien).

1.3.4. Chirurgicaux

Lorsque les atteintes post-radiothérapeutiques sont trop importantes et que les thérapies non-invasives sont inefficaces à soulager les patients, il est parfois indispensable de recourir à une intervention chirurgicale afin de supprimer les tissus lésés. Certains praticiens estiment qu'environ un tiers des patients souffrant d'entérite radique chronique devront à un moment ou à un autre subir une chirurgie. L'intervention chirurgicale est indiquée dans les cas d'obstruction intestinale, de perforation, de fistules et de saignement sévère. Ces interventions sont hautement risquées de par le processus fibrotique post-radique et les lésions diffuses présentes au niveau de l'intestin et du mésentère. En outre, le risque de fuite au niveau de l'anastomose est important si l'une des deux parties jointes est irradiée. En effet, il est très

difficile de différencier *in situ* les zones saines, qui vont cicatriser normalement, des zones irradiées, qui vont continuer à dégénérer et entraîner une mauvaise cicatrisation. Un autre risque lorsque la résection chirurgicale de la totalité de l'intestin lésé est nécessaire est de créer un syndrome de l'intestin court, hautement handicapant et aboutissant le plus souvent à une obligation de nutrition par voie parentérale. Bien que n'étant réalisées qu'avec les plus grandes précautions et par les meilleurs chirurgiens, les interventions chirurgicales impliquant l'intestin irradié présentent des risques particulièrement élevés de complications, ainsi qu'un fort taux d'échecs.

1.4. Problématique

Grâce à l'amélioration des traitements anti-cancéreux et du suivi des patients, le nombre de cas de rémission cancéreuse à long terme n'a pas cessé d'augmenter au cours des dernières décennies. Le nombre de patients souffrant d'effets secondaires tardifs des radiothérapies a lui aussi augmenté, suivant en cela l'évolution de la courbe de survie des patients. Andreyev *et al* estiment ainsi que le nombre de patients souffrant de symptômes gastro-intestinaux liés aux radiothérapies sera bientôt équivalent à celui des patients atteints de la maladie de Crohn (Andreyev et al. 2011). Ils soulèvent également le problème de la classification des effets secondaires intestinaux. En effet, à l'inverse d'autres pathologies intestinales telles que la maladie de Crohn ou la recto-colite hémorragique, les conséquences tardives des radiothérapies ne sont à l'heure actuelle pas considérées comme une maladie à part entière mais comme une association de différents symptômes plus ou moins bien définis.

Ce manque de reconnaissance des effets secondaires des radiothérapies en tant que maladie est en partie à l'origine de la mauvaise prise en charge des patients. En effet, là où la plupart des cliniciens confrontés à une maladie de Crohn vont se baser sur leur connaissance du fonctionnement de la maladie afin de proposer un traitement adapté, ils vont être démunis face aux complications des radiothérapies et vont tenter de traiter un symptôme au lieu d'envisager la pathologie dans son ensemble. Or une maladie est définie comme étant « une altération des fonctions ou de la santé d'un organisme vivant ». Selon cette définition, les effets secondaires des radiothérapies devraient donc être considérés comme une maladie à part entière. Andreyev propose d'appeler cette maladie « pelvic radiation disease » et de la définir comme suit : « des problèmes transitoires ou persistant, allant de modérés à très sévères, survenant dans des tissus non-cancéreux et résultant du traitement par radiothérapie d'une tumeur

localisée au niveau du pelvis » (Andreyev et al. 2011). Cette nouvelle maladie nécessite la mise au point d'un traitement qui ne soit plus uniquement symptomatique mais curatif afin de pouvoir non plus soulager mais réellement soigner les patients qui en sont atteints.

Différents traitements à visée préventive ou curative sont actuellement en cours d'études précliniques et cliniques afin de prévenir l'apparition des effets secondaires des radiothérapies et de les soigner le cas échéant.

Analogues de la Somatostatine : les analogues de la somatostatine ont pour effet de diminuer la sécrétion des enzymes pancréatiques. Suite à la destruction d'une partie de la muqueuse intestinale lors de l'irradiation, les enzymes pancréatiques normalement présentes au sein de la lumière intestinale entrent en contact avec les tissus sous-épithéliaux, induisant leur destruction par autodigestion. La diminution de la production des enzymes pancréatiques par les analogues de la somatostatine s'est révélée une thérapie efficace afin de réduire la toxicité radio-induite intestinale dans des modèles animaux (Wang et al. 1999; Abbasoglu et al. 2006) et également dans des études précliniques (Petersenn et al. 2012).

Facteurs de croissance : les facteurs de croissances et les molécules ayant des effets analogues sont utilisés afin de favoriser la régénération épithéliale post-radique. Ainsi, le GLP2 (Glucagon-Like Peptide 2), le KGF ou encore le FGF (Fibroblast Growth Factor) ont permis d'améliorer la régénération des lésions post-radiques dans plusieurs modèles animaux (Torres et al. 2007). Récemment, un recombinant humain de l'EGF (Epidermal Growth Factor) ainsi que la R-spondine 1 (un facteur de croissance spécifique des cellules souches intestinales) ont montré leur capacité à réduire l'apoptose radio-induite et à améliorer la régénération épithéliale (Zhao et al. 2009; Oh et al. 2010) (Bhanja et al. 2009).

Activateurs des Toll Like Recepteurs (TLR) : les TLR sont des membres essentiels du système immunitaire intestinal. L'activation de la voie du TLR5 par son ligand naturel, la Flagelline, ainsi que par son dérivé synthétique moins toxique, le CBLB502, a montré une action radio-protectrice aussi bien chez la souris que chez le singe (Vijay-Kumar et al. 2008) (Burdelya et al. 2008).

Analogues de la vitamine E : les analogues de la vitamine E, tels que le γ -tocotrienol, sont de puissants antioxydants et sont donc des candidats intéressants dans le développement de stratégies radio-protectantes. L'administration d'une seule dose de γ -tocotrienol avant l'exposition aux rayonnements ionisants permet de diminuer les atteintes radio-induites de plusieurs organes, dont l'intestin (Berbee et al. 2009). Le traitement par γ -tocotrienol permet

d'améliorer la survie des cellules de la crypte intestinale ainsi que la régénération de la muqueuse intestinale.

La plupart des traitements actuellement à l'essai ont une visée principalement préventive. Le but de ces thérapies va être de limiter la survenue des dommages radio-induits aux tissus sains. Cependant, ces traitements doivent être débutés avant ou pendant l'exposition aux rayonnements ionisants. Leur utilisation dans le cadre des lésions provoquées par une exposition accidentelle ou par des radiothérapies datant de plusieurs années semble de ce fait compromise. De nouvelles pistes thérapeutiques doivent donc être explorées afin de soigner les lésions tardives dues à l'irradiation des tissus sains.

De par son caractère innovant et son efficacité démontrée dans de nombreuses autres pathologies, la thérapie cellulaire s'est imposée comme une thérapie à même d'aboutir à une guérison efficace des effets secondaires des radiothérapies. En effet, la thérapie cellulaire permet de remplacer les cellules détruites ou endommagées dans différentes pathologies telles que les défauts osseux ou le diabète. Son utilisation dans le cadre des lésions intestinales radio-induites pourrait contribuer à restaurer l'intégrité de la structure et de la fonction intestinales perdues suite à l'irradiation.

2. Thérapie cellulaire et Cellules Souches Mésenchymateuses

2.1. La thérapie cellulaire

2.1.1. Définition et législation

Contrairement aux traitements pharmacologiques qui utilisent des molécules chimiques, la thérapie cellulaire est basée sur l'utilisation de cellules vivantes afin de prévenir, traiter ou atténuer une maladie. Les cellules utilisées sont prélevées dans l'organisme d'un donneur volontaire avant d'être administrées au patient à traiter. Le donneur peut être le patient lui-même (greffe autologue) ou une autre personne volontaire (greffe allogénique).

L'émergence de la thérapie cellulaire a nécessité la mise en place d'un cadre légal qui lui est propre. Celui-ci définit aussi bien ce que l'on entend par « produit de thérapie cellulaire » que l'utilisation qui en est faite. Ces deux questions trouvent leur réponse aux articles L 1243-1 et

L 1243-5 du Code de la Santé Publique. L'article L 1243-1 fixe ainsi que « A l'exception des produits sanguins labiles, sont des produits cellulaires à finalité thérapeutique les cellules humaines utilisées à des fins thérapeutiques autologues ou allogéniques, quel que soit leur niveau de transformation, y compris leurs dérivés ». Les produits sanguins labiles sont quant à eux définis par l'agence nationale de sécurité du médicament et des produits de santé (ANSM) comme étant « des produits issus du sang d'un donneur, destinés à être transfusés à un patient. Il s'agit notamment du sang total, du plasma et des cellules sanguines d'origine humaine ». Les transfusions sanguines sortent donc du champ de la thérapie cellulaire.

L'article L 1243-5 fixe quant à lui que « les tissus ainsi que leurs dérivés utilisés à des fins thérapeutiques et les préparations de thérapie cellulaire font l'objet d'une autorisation de l'agence nationale de sécurité du médicament et des produits de santé après évaluation de leurs procédés de préparation et de conservation ainsi que de leurs indications thérapeutiques ». Les cellules utilisées à des fins de thérapie cellulaire sont donc considérées comme étant des médicaments à part entière, et font de ce fait l'objet des mêmes impératifs de contrôle et d'autorisation par l'ANSM que les molécules thérapeutiques chimiques.

2.1.2. Médecine régénérative et thérapie cellulaire

Le terme « médecine régénérative » est généralement utilisé afin de définir le remplacement, la réparation ou l'amélioration fonctionnelle des tissus et organes atteints d'une défaillance de naissance ou victimes de problèmes dus à une maladie ou à une blessure.

Différentes stratégies sont actuellement à la disposition des praticiens afin d'obtenir la meilleure régénération tissulaire possible. La plus ancienne consiste à substituer une partie du corps par une autre. L'utilisation la plus connue de cette technique est la greffe de peau, notamment chez les personnes brûlées, où de la peau saine est prélevée sur une partie non-atteinte du corps puis greffée sur la zone endommagée, et ce au cours de la même intervention.

Lorsque ce genre de substitution n'est techniquement pas réalisable, les chirurgiens peuvent avoir recours à une greffe d'organe. Dans ce cas, l'organe déficient sera remplacé par un organe fonctionnel provenant d'un donneur sain. Bien que ces greffes d'organes soient généralement efficaces, les risques de rejet du greffon nécessitent la mise en place préventive d'un traitement immunosuppresseur dont les effets secondaires potentiels peuvent altérer la vie quotidienne du patient. Elles soulèvent en outre le problème de la disponibilité des

organes éligibles pour la greffe. Ce dernier obstacle pourrait à l'avenir être surmonté en pratiquant une greffe dite xénogénique, où l'organe transplanté ne provient pas d'un autre être humain mais d'un animal, tel que le porc. Bien que prometteuse et souvent efficace, la greffe xénogénique se heurte cependant au risque de rejet du greffon, qui est fortement amplifié lors d'une greffe inter-espèce.

Lorsque la greffe n'est pas possible, ou lorsque le patient est en attente de greffe, les médecins peuvent utiliser des appareils externes ou des molécules exogènes afin de remplacer la fonction de l'organe défaillant. Ce type de pratique thérapeutique est largement utilisé chez les patients diabétiques insulino-dépendant ainsi que chez les patients souffrant d'une déficience rénale, chez qui le recours à la dialyse est extrêmement courant.

Enfin, la thérapie cellulaire a permis d'ajouter une nouvelle arme à l'arsenal thérapeutique à disposition des praticiens, puisqu'elle permet d'utiliser des cellules vivantes afin de restaurer, maintenir ou augmenter la fonctionnalité des tissus et des organes. Conceptuellement, aucun domaine d'étude ni aucune application ne sont interdits en thérapie cellulaire.

L'utilisation la plus ancienne, et la mieux maîtrisée, de la thérapie cellulaire est la greffe de moelle osseuse dans le traitement des cancers du sang. La moelle du patient est alors détruite par radiothérapie puis remplacée par une moelle saine provenant d'un donneur. Bien qu'assimilable à une greffe d'organe, cette technique est rattachée à la thérapie cellulaire puisque ce n'est pas un organe structuré qui est transplanté mais un ensemble de cellules.

Bien que l'extrême complexité structurelle et fonctionnelle du corps humain et des organes et cellules qui le composent impose d'elle-même des limitations aux applications de la thérapie cellulaire, son utilisation pourrait constituer une alternative efficace dans les cas où les greffes d'organes et de tissus ne sont pas envisageables. L'utilisation de cellules provenant du donneur lui-même permettrait en outre de limiter le risque de rejet du greffon. De même, l'utilisation de cellules pouvant être amplifiées *in vitro* permettrait de pallier au manque de greffons disponibles.

Les avancées et améliorations déjà réalisées depuis les premiers essais de thérapie cellulaire sont nombreuses. De même, les preuves de principe de son efficacité dans le traitement de diverses pathologies, aussi bien au niveau préclinique que clinique, en font une thérapie d'avenir qui ne cesse de se développer et qui pourrait offrir des possibilités thérapeutiques nouvelles pour des pathologies à l'heure actuelle incurables.

2.2. La thérapie cellulaire : quelles cellules utiliser ?

Deux grandes familles de cellules peuvent être utilisées en thérapie cellulaire : les cellules matures, spécialisées, présentes au sein des organes, dites cellules différenciées, et les cellules immatures présentes au sein de niches spécifiques, dites cellules souches. Chacun de ces deux types cellulaires possède ses propres avantages et inconvénients, ainsi que ses utilisations préférentielles.

2.2.1. Cellules différenciées

Les cellules différenciées sont les cellules constitutives des organes. Elles sont pleinement matures et jouent un rôle spécifique dans la fonction globale de l'organe dont elles font partie. Leur utilisation en thérapie cellulaire afin de rétablir la fonctionnalité d'un organe lésé semble donc être la méthode la plus à même de donner des résultats puisque les cellules greffées seront déjà adaptées à cet organe.

Ce type de greffe est d'ores et déjà utilisé dans diverses pathologies dont des exemples sont présentés figure 3.

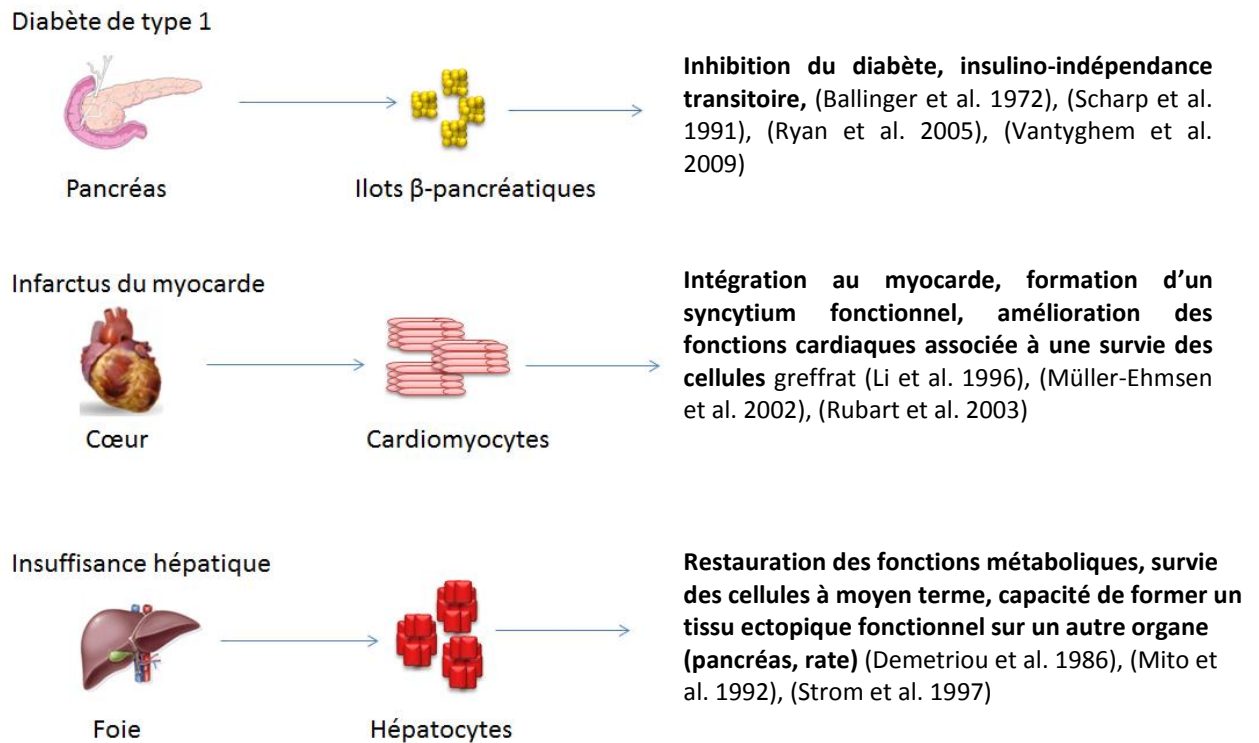


Figure 3 : Exemples d'utilisation de cellules différenciées en Thérapie Cellulaire

Malgré les résultats encourageants obtenus lors des essais menés en utilisant les cellules différenciées, plusieurs obstacles majeurs s'opposent à leur utilisation à grande échelle. En effet, les protocoles thérapeutiques requièrent l'utilisation de plusieurs dizaines de millions de cellules pour chaque intervention. Or les cellules différenciées doivent être prélevées au sein d'organes matures. Leur obtention nécessite donc des prélèvements invasifs et mutilants pour l'organe, allant même parfois jusqu'à nécessiter la destruction complète de cet organe afin d'en extraire les cellules. En outre, les techniques actuelles ne permettent pas d'amplifier *in vitro* les cellules prélevées tout en conservant leur état différencié, ce qui impose l'obtention d'un grand nombre de cellules directement à partir des organes donneurs. Enfin, la plupart des pathologies nécessitant le recours à une greffe de cellules différenciées, notamment les pathologies métaboliques telles que les insuffisances hépatiques, ne permettent pas de pratiquer des autogreffes. Les greffons doivent donc être allogéniques, imposant le traitement des patients par immunosuppresseurs afin de limiter le risque de rejet de la greffe. Certaines études menées afin de traiter le diabète de type I ont d'ailleurs montré que l'effet bénéfique de la greffe cellulaire n'est que transitoire, suggérant une mauvaise prise de la greffe due soit à un rejet du greffon allogénique par l'organisme receveur, soit à la toxicité des traitements

anti-rejets (Blondet et al. 2007). Nous sommes donc en présence des mêmes problèmes que ceux rencontrés dans le cadre des greffes d'organes, avec un manque de « matière première » et un risque élevé de rejet du greffon lors des greffes allogéniques.

La nécessité de trouver d'autres sources de cellules, plus abondantes et moins rejetées, est donc nécessaire afin d'améliorer et de diversifier les protocoles de thérapie cellulaire. Différentes solutions sont proposées, telles que le prélèvement d'organes post-mortem pour en isoler les cellules ou les greffes xénogéniques. Cependant, la piste la plus prometteuse semble être celle des cellules souches, qui pourraient être utilisées sous leur forme native ou sous forme différenciée.

2.2.2. Cellules souches : Définition

Les cellules souches sont à l'origine de tous les tissus et organes dont est composé l'organisme. Tout au long du développement et de la vie, ce sont elles qui vont permettre la mise en place des organes et le renouvellement des tissus qui les composent. Toutes les cellules souches présentes dans l'organisme dérivent d'un petit pool de cellules souches initiales formées au cours du développement embryonnaire précoce (voir paragraphe 2.2.3 sur les cellules souches embryonnaires).

Le terme « cellule souche » ne peut être appliqué que dans le cas de cellules répondant aux deux critères suivant :

- 1- Autorenouvellement : les cellules doivent avoir la capacité de se multiplier à l'identique et à l'infini sans se différencier.
- 2- Différenciation : les cellules doivent, suite à certains signaux spécifiques, avoir la capacité de donner naissance à d'autres types cellulaires matures composant les tissus et les organes.

Toute cellule ne répondant pas à ces deux critères ne pourra pas être classée parmi les cellules souches. Il existe cependant des cellules qui répondent partiellement à ces deux caractéristiques. En effet, certaines cellules indifférenciées ont la capacité de donner naissance à d'autres types cellulaires matures tout en maintenant un pool de cellules indifférenciées. Cependant, cette capacité d'autorenouvellement est limitée et ne correspond pas au critère de renouvellement infini nécessaire pour être considéré en tant que cellules souches. On parle alors de cellules progénitrices. Bien que de nombreux tissus renferment un ou plusieurs types de progéniteurs, l'exemple le plus connu est celui des progéniteurs lymphoïdes et myéloïdes

de la moelle osseuse. Ce sont en effet ces progéniteurs, directement issus des cellules souches hématopoïétiques, qui vont donner naissance aux différentes cellules des lignées lymphoïdes et myéloïdes, et non pas directement les cellules souches.

Bien que répondant toutes aux deux critères essentiels d'autorenouvellement et de capacité de différenciation, toutes les cellules souches ne sont pas équivalentes. En effet, si toutes les cellules souches possèdent la même capacité d'autorenouvellement infini, leur capacité de différenciation varie d'une cellule à une autre. Il a donc fallu établir une nouvelle terminologie afin de classer les différentes cellules souches en fonction du nombre de cellules différenciées auxquelles elles peuvent donner naissance. Cette classification comporte quatre niveaux, allant de la cellule donnant naissance au plus grand nombre de types cellulaires à celle en donnant le moins (voir figure 4).

1- Cellules souches totipotentes : il s'agit des cellules capables de donner naissance à un nouvel individu complet. Elles sont issues des stades extrêmement précoces du développement embryonnaire et peuvent théoriquement être différenciées en n'importe quel type cellulaire de l'organisme.

2- Cellules souches pluripotentes : il s'agit de cellules incapables de donner naissance à un organisme dans son entier mais qui peuvent se différencier en n'importe quelle cellule issue de l'un des trois feuillet embryonnaires primitifs, y compris les cellules germinales.

3- Cellules souches multipotentes : il s'agit de cellules capables de se différencier en plusieurs types cellulaires différents mais déjà engagées dans une certaine voie. Elles ne donneront en effet naissance qu'à un nombre limité de types de cellules différenciées, toutes issues d'un unique feuillet embryonnaire primitif.

4- Cellules souches unipotentes : ces cellules ne peuvent donner naissance qu'à un seul type de cellules différenciées mais conservent leur propriété d'autorenouvellement. Les cellules souches de la peau font par exemple partie de ce groupe de cellules.

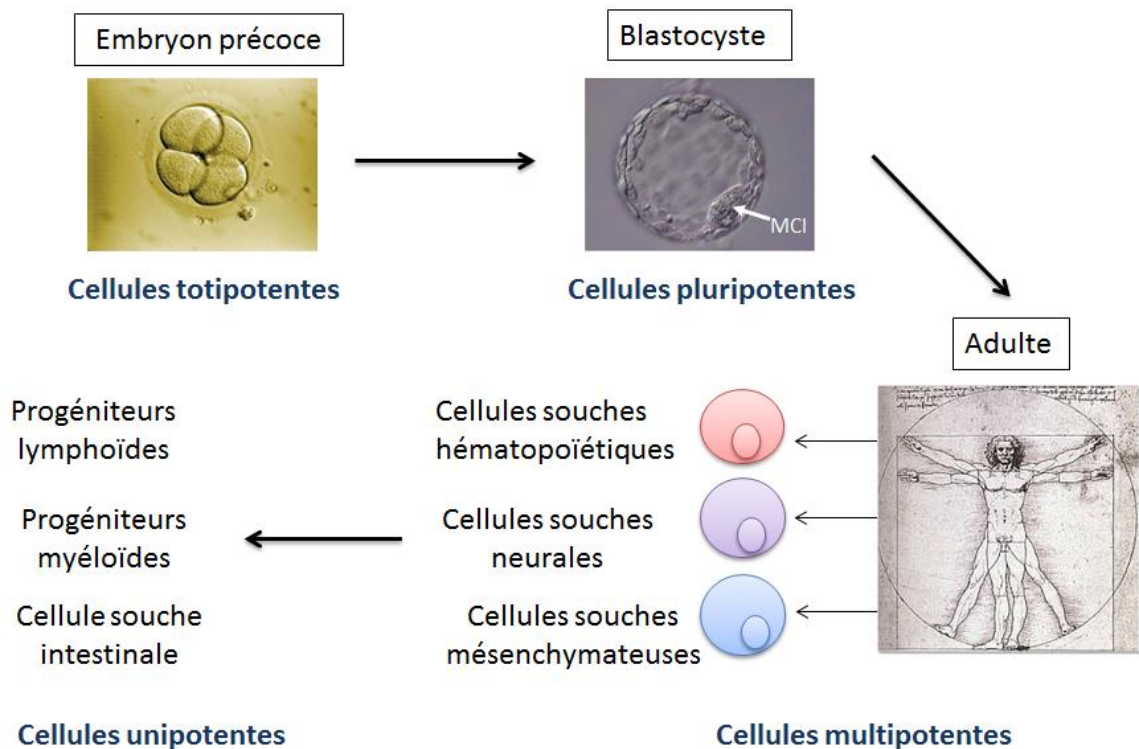


Figure 4 : Les différentes catégories de cellules souches et leurs sources au cours du développement (MCI : Masse Cellulaire Interne. Partie du blastocyste renfermant les cellules souches pluripotentes)

Cette différence de potentialité des cellules souches est fortement liée à leur origine. En effet, les cellules souches totipotentes sont exclusivement présentes au sein de l'embryon primitif. De même, les cellules pluripotentes sont elles aussi dérivées de l'embryon mais à un stade plus tardif que les cellules totipotentes. Ces deux types cellulaires sont donc totalement absents de l'organisme adulte. En revanche, les cellules multipotentes et unipotentes vont être présentes dans l'organisme tout au long de son développement et de sa vie adulte.

2.2.3. Cellules souches embryonnaires

Les cellules souches embryonnaires utilisées à des fins de médecine régénérative sont des cellules pluripotentes. Elles sont généralement issues de la masse cellulaire interne du blastocyste, stade particulier du développement correspondant à la période allant de 5,5 à 7,5 jours après la fécondation chez l'homme.

Les premières lignées de cellules souches embryonnaires ont été dérivées de l'embryon de souris en 1981 par les équipes d'Evans et Martin. En 1995, Thomson et son équipe sont

parvenus à obtenir une lignée de cellules souches embryonnaires dérivée du singe rhésus (Thomson et al. 1995). En 1998, cette même équipe est parvenue à isoler les premières lignées de cellules souches embryonnaires humaines (Thomson 1998). Les 5 lignées cellulaires alors obtenues ont été isolées à partir de la totalité de la masse cellulaire interne de 5 embryons au stade du blastocyste. Les 5 lignées établies avaient un caryotype normal et ont été maintenues en culture tout en conservant leurs capacités de cellules souches pendant 5 à 8 mois.

A l'inverse des cellules différenciées, les cellules souches embryonnaires peuvent être amplifiées *in vitro* suite à leur obtention. On peut donc disposer d'une quantité importante de cellules utilisables en thérapie cellulaire sans avoir besoin de recourir à des prélèvements multiples. Les cellules peuvent également être congelées afin d'être conservées et être ensuite décongelées et amplifiées lorsque les thérapeutes souhaitent les utiliser. On peut donc disposer de réserves conséquentes de cellules facilement utilisables.

L'une des caractéristiques majeures des cellules souches embryonnaires est leur capacité à donner naissance à des cellules issues des trois feuillets embryonnaires primitifs (voir figure 5). Afin de vérifier la pluripotence des lignées de cellules souches embryonnaires, le test classique consiste à les injecter à des souris immunodéficientes de type SCID (Severe Combined ImmunoDeficiency). Cette injection aboutit à la formation d'un tératome, c'est-à-dire à une tumeur hétéroclite composée de tissus issus des différents feuillets embryonnaires. Ainsi, Thomson *et al* ont rapporté la présence au sein des tératomes formés avec les lignées ES humaines de cellules d'épithélium intestinal (endoderme), de cartilage, d'os et de muscle (mésoderme) et enfin de cellules neurales (ectoderme) (Thomson 1998).

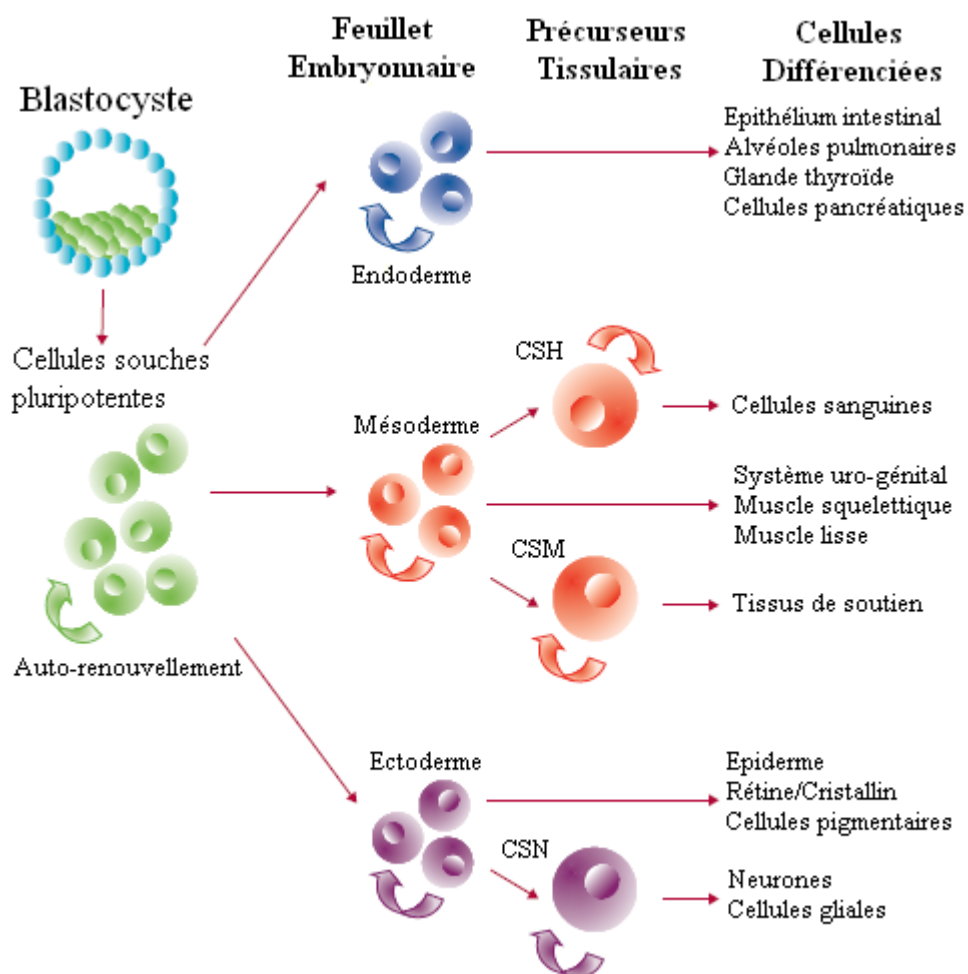


Figure 5 : Descendance des cellules souches embryonnaires (d'après (Corsten et al. 2008)).
 CSH : cellules souches hématopoïétiques, CSM : Cellules souches mésenchymateuses, CSN :
 cellules souches neurales.

Cette capacité des cellules souches embryonnaires pluripotentes à donner naissance *in vivo* à des cellules issues indifféremment de l'un ou l'autre des trois feuilletts embryonnaires a poussé les équipes souhaitant les utiliser à des fins thérapeutiques à les différencier *in vitro* avant de les réimplanter *in vivo*. Cette différenciation préalable permet d'optimiser les protocoles de thérapie cellulaire puisque les cellules utilisées ne sont plus pluripotentes mais sont d'ores et déjà programmées pour s'intégrer à l'organe déficient, tout comme le sont les cellules différenciées.

La capacité des cellules souches embryonnaires à se différencier *in vitro* en cellules issues des trois lignées embryonnaires a été démontrée en 2000 (Itskovitz-Eldor et al. 2000). Par la suite, de nombreuses équipes ont réussi à obtenir des cellules différenciées à partir de cellules souches embryonnaires, et certaines ont même expérimenté leur utilisation *in vivo* afin de traiter diverses pathologies dans des modèles animaux. Parmi les études menées, on peut citer

celles portant sur la différenciation en cardiomyocytes (Laflamme et al. 2007), en cellules pulmonaires différenciées (Wang et al. 2007) ou progénitrices (Rippon et al. 2006), en cellules sécrétrices d'insuline (Segev et al. 2004) et celles ayant abouti à la création de cellules souches neuronales (Corti et al. 2010) et de neurones dopaminergiques différenciés (Myung et al. 2008).

Malgré une efficacité démontrée des cellules différenciées issues de cellules souches embryonnaires dans la plupart des modèles expérimentaux où elles ont été testées, il faut souligner que, comme pour les cellules différenciées, les protocoles de thérapie cellulaire utilisant les cellules souches embryonnaires sont des protocoles allogéniques. Le risque de rejet du greffon est donc tout autant présent dans ces protocoles que dans ceux utilisant des cellules différenciées. L'efficacité thérapeutique des cellules souches embryonnaires pourrait de ce fait être amoindrie suite à un rejet du greffon ainsi que par la toxicité des traitements immunosuppresseurs.

Un autre obstacle à l'utilisation des cellules souches embryonnaires est le risque de cancérisation qui leur est associé. En effet, les cellules souches embryonnaires non différenciées forment des tératomes, i.e. des tumeurs, lorsqu'elles sont injectées *in vivo*. Or ces tumeurs, initialement bénignes, peuvent dériver en tumeurs cancéreuses. De ce fait, et bien que le taux de différenciation des cellules différenciées utilisées en thérapie cellulaire soit généralement excellent, le risque qu'il reste des cellules souches embryonnaires non différenciées, et donc potentiellement cancérigènes, au sein des cellules injectées est à prendre en compte. Ce risque peut être limité en pratiquant un tri cellulaire via des marqueurs spécifiques des cellules différenciées, afin d'en enrichir la population injectée et ainsi limiter le nombre de cellules souches présentes dans le greffon cellulaire. Cependant, les études ayant analysé l'apparition de tératomes suite à l'injection de cellules différenciées à partir de cellules souches embryonnaires donnent des résultats contradictoires. En effet, si Kim *et al* et Ben-Hur *et al* n'ont pas observé de tératome suite à leur transfert de neurones issus de cellules souches embryonnaires (Kim et al. 2002) (Ben-Hur et al. 2004), Fujikawa *et al* ont quant à eux dû interrompre leur étude sur les cellules sécrétrices d'insuline suite à l'apparition de tératomes chez leurs souris greffées (Fujikawa et al. 2005). Dans ce cas précis, les tumeurs ont inhibé l'effet de la greffe, aboutissant à la mort des animaux 30 jours après administration des cellules produites à partir de cellules souches embryonnaires. A l'heure actuelle, l'incertitude concernant ce risque de carcinogenèse a amené les autorités sanitaires à refuser le

développement d'études cliniques utilisant des cellules dérivées de cellules souches embryonnaires.

Enfin, l'utilisation de ces cellules pose également un important problème éthique. En effet, l'isolement de lignées de cellules souches embryonnaires est généralement obtenu par la destruction de l'embryon afin de prélever sa masse cellulaire interne. Cette destruction d'un embryon humain pose le problème du statut de cet embryon. En effet, de nombreuses personnes s'opposent à sa destruction à des fins médicales. Bien que plusieurs pays autorisent leurs équipes à travailler sur les embryons, la question de la recherche sur les cellules souches embryonnaires reste un sujet de bioéthique particulièrement délicat.

2.2.4. Cellules souches adultes

Les cellules souches adultes ont pour rôle d'assurer l'homéostasie tissulaire de l'organe où elles résident tout au long de la vie de l'organisme. Elles sont donc responsables du maintien physiologique de l'organe et doivent assurer le remplacement des cellules qui y meurent, aussi bien dans le cas d'une mort physiologique qu'après une lésion.

Cette fonction de remplacement cellulaire est assurée grâce à la multipotence des cellules souches adultes. Une cellule souche d'un organe donné va de ce fait pouvoir donner naissance aux cellules différenciées constituant cet organe, et ainsi assurer le remplacement des cellules arrivées en fin de vie ou manquantes à la suite d'une lésion. En outre, la cellule souche va également être capable de se multiplier à l'identique afin de maintenir un pool constant de cellules indifférenciées capables, si besoin est, d'entrer en différenciation afin de renouveler les cellules de l'organe.

L'existence des cellules souches adultes est connue depuis longtemps au sein de certains tissus à renouvellement rapide tels que le sang, la peau et l'intestin. De nombreux autres organes à régénération plus lente renferment également des cellules souches adultes tels que le foie, l'os, le muscle,...

Bien que l'obtention de ces cellules souches soit compliquée par leur rareté au sein des tissus dans lesquels elles résident, ainsi que par la difficulté de les maintenir en culture à un stade indifférencié afin de les amplifier, leur utilisation en thérapie cellulaire présente de nombreux avantages :

- elles sont issues d'organismes adultes, permettant ainsi d'outrepasser les problèmes éthiques rencontrés avec les cellules souches embryonnaires ;

- elles sont conditionnées par leur organe d'origine à donner naissance à certains types cellulaires uniquement, ce qui pourrait permettre de limiter le risque de formation de tératomes malins comme ceux observés lors de l'utilisation de cellules souches embryonnaires
- elles peuvent dans certains cas être isolées à partir de prélèvements réalisés chez le patient lui-même et être greffées dans un cadre autologue, permettant ainsi d'annuler le risque de rejet de greffe et le traitement immunosuppresseur.

Les cellules souches adultes sont utilisées en clinique depuis de nombreuses années afin de traiter des pathologies variées, telles que les atteintes physiques aux organes, les cancers ou encore les maladies génétiques.

Régénération des organes

Utilisation des myoblastes dans la réparation cardiaque

Les myoblastes squelettiques sont les cellules souches présentes dans le muscle. Leur capacité à se contracter, ainsi que leur facilité d'accès et leur forte capacité d'amplification *in vitro*, en ont rapidement fait les candidates idéales pour la réparation cardiaque à la suite d'un infarctus du myocarde.

En 1993, Gou Young *et al* ont apportés la première preuve de concept validant la capacité des myoblastes à s'intégrer au sein du myocarde, à y former une structure fonctionnelle (myotubes) et à y persister au cours du temps (Gou Young et al. 1993). La capacité des myoblastes à régénérer la structure ainsi que la fonctionnalité du muscle cardiaque a quant à elle été démontrée par la suite dans différents modèles animaux (Murry et al. 1996) (Taylor et al. 1998).

Suite aux bons résultats obtenus en utilisant les modèles animaux, de nombreux essais cliniques ont été réalisés à l'aide de myoblastes squelettiques. Le premier, pratiqué en 2000 par l'équipe du Pr Ménasché sur un unique patient, a prouvé la faisabilité d'une greffe de myoblastes chez l'homme (Menasché et al. 2001).

Cependant, malgré les résultats encourageants fournis par les premières études cliniques (Menasché et al. 2003; Siminiak et al. 2004; Hagège et al. 2006) ainsi que la multiplication des succès de cette thérapie dans les modèles animaux (Jain et al. 2001 ; Léobon et al. 2003;

He et al. 2005), il semblerait que la greffe de myoblastes soit moins efficace que ce que pensaient les médecins. En effet, la première étude clinique de phase II a conclu que, bien que les patients aient présenté une amélioration macroscopique de leur état avec une meilleure résistance à l'effort, le bénéfice apporté par la greffe sur la fonction cardiaque à proprement parlé n'était pas significatif (Duckers et al. 2011). Il semble donc que les protocoles de thérapie par greffe de myoblastes squelettiques doivent encore être modifiés afin de permettre une réparation complète du myocarde à la suite d'un infarctus.

Reconstruction médullaire post-leucémie

Les cellules souches hématopoïétiques sont les cellules souches assurant la formation de toutes les cellules sanguines. On les trouve au sein de la moelle osseuse chez l'individu adulte mais également dans le sang de cordon ombilical au moment de la naissance.

Bien que les greffes de moelle osseuse soient pratiquées depuis les années 60 (Thomas et al. 1957) (Gatti et al. 1968) (Gorin et al. 1977), l'existence des cellules souches hématopoïétiques n'a été démontrée qu'en 1988 (Spangrude et al. 1988).

La greffe de moelle osseuse est actuellement le traitement de référence dans le cadre de la reconstruction médullaire chez les patients leucémiques suite à leur irradiation « corps entier » afin de détruire les cellules médullaires à l'origine du cancer. La greffe de moelle osseuse est donc un processus allogénique qui nécessite le prélèvement d'une partie de la moelle d'un donneur compatible. Ce prélèvement médullaire est une intervention invasive présentant de nombreux risques. C'est pourquoi des traitements à base de G-CSF (Granulocyte Colony Stimulating Factor), un facteur de croissance stimulant la production et le relargage sanguin de cellules souches par la moelle osseuse, ont été mis en place afin de pouvoir isoler les cellules souches nécessaires à la reconstruction médullaire grâce à un tri des cellules sanguines par cytophérèse, moins invasif. En outre, la découverte de marqueurs spécifiques des cellules souches hématopoïétiques, notamment le marqueur CD34, a permis de les isoler de façon spécifique et de transférer non plus un mélange de cellules médullaires mais une population enrichie en cellules souches possédant les mêmes capacités de reconstitution de l'hématopoïèse que la moelle totale (Baum et al. 1992; Osawa et al. 1996).

Régénération intestinale par greffe de moelle osseuse

Les capacités de différenciation de nombreux types cellulaires ont longtemps été sous-estimées. Les cellules souches de la moelle osseuse ont par exemple fait preuve d'une étonnante plasticité en montrant leur capacité à se différencier non plus en cellules hématopoïétiques mais en différents types cellulaires, et notamment en cellules épithéliales gastro-intestinales (Komori et al. 2005). Ces observations ont permis d'envisager l'utilisation des cellules issues de la moelle osseuse comme nouvelle thérapie potentielle afin de traiter des maladies telles que la maladie de Crohn, les lésions intestinales dues à une maladie du greffon contre l'hôte ou encore celles dues à l'irradiation.

La greffe de moelle osseuse requiert l'élimination de la moelle du receveur afin de supprimer toutes les cellules immunitaires qui pourraient réagir contre le greffon. La moelle osseuse étant un tissu à régénération rapide, sa destruction s'effectue généralement via une irradiation corps entier du receveur. Cette irradiation va permettre d'éliminer totalement les cellules de la moelle afin de préparer le receveur au transfert de la nouvelle moelle, mais va également avoir des effets secondaires importants, tels que des dommages gastro-intestinaux radio-induits. Des études menées sur des modèles animaux de transfert de moelle osseuse ont permis de montrer que des cellules issues de la moelle du donneur sont présentes au sein du tractus gastro-intestinal dès 7 jours après la transplantation (Brittan et al. 2002). Liu *et al* ont montré que les cellules du donneur persistent au sein de l'intestin jusqu'à 14 mois après la transplantation, et qu'elles se différencient en cellules épithéliales intestinales (16.11% de cellules du donneur à 6 mois post-greffe) ainsi qu'en cellules entéroendocrines (Liu et al. 2010).

Des études portant sur des biopsies de patientes ayant reçu une greffe de moelle osseuse provenant de donneurs masculins ont également été menées. Les prélèvements étudiés ont tous montré une présence de cellules XY, i.e mâles, au sein de l'épithélium gastro-intestinal, aussi bien dans le cas de patientes souffrant de dommages dus à une maladie du greffon contre l'hôte (Brittan et al. 2002) que dans le cadre d'ulcères ou d'inflammation (Okamoto et al. 2002). Enfin, Matsumoto *et al* ont pu montrer que les cellules épithéliales dérivées de la moelle osseuse sont créées par un processus autre que la fusion cellulaire et que, bien qu'une part importante d'entre elles expriment des marqueurs de prolifération, elles ne donnent que très rarement naissance à des cellules souches intestinales (Matsumoto et al. 2005). La majorité des cellules sont donc présentes au sein de l'intestin à l'état différencié, notamment

sous forme de cellules sécrétoires, et participent ainsi à la restauration de la structure et de la fonction épithéliale.

Traitement anti-cancéreux

L'efficacité anti-cancéreuse du transfert de cellules souches hématopoïétiques est bien connue et est depuis longtemps mise à profit dans le traitement des leucémies, où la réaction dite du greffon contre la leucémie est l'un des effets recherchés (Weiden et al. 1981) (Horowitz et al. 1990). Certaines équipes ont donc exploité cette capacité anti-tumorale des cellules souches hématopoïétiques afin de traiter non plus des tumeurs sanguines mais des tumeurs solides présentes dans des cancers métastatiques du sein, des reins (Tykodi et al. 2004) (Childs et al. 1999), du pancréas et du colon (Hentschke et al. 2003) (Zetterquist et al. 2001). Ces études ont toutes montré une réaction de type greffe contre le cancer, avec dans certains cas une réduction, et parfois même une disparition complète, des métastases (Barkholt et al. 2006).

Traitement des maladies génétiques

L'utilisation des cellules souches hématopoïétiques, purifiées ou non, dans le cadre du traitement de pathologies non-cancéreuses a également été mise en œuvre, notamment afin de traiter des maladies d'origine génétique. Ainsi, l'épidermolyse bulleuse, qui regroupe différentes pathologies génétiques affectant la peau et donnant naissance à des lésions douloureuses et handicapantes, semble pouvoir être soignée grâce à un transfert de cellules souches hématopoïétiques provenant d'un donneur sain. Plusieurs études concluantes sur des modèles animaux (Tolar et al. 2009) (Fujita et al. 2010) ont ainsi abouti à un essai clinique de phase I au cours duquel les médecins ont pu observer un meilleur dépôt de collagène 7, déficient chez les patients souffrant d'épidermolyse bulleuse, au niveau de la peau des enfants greffés, ainsi qu'une diminution de la formation des cloques (Wagner et al. 2010). Ce traitement présente cependant un fort risque de développement d'une maladie du greffon contre l'hôte, qui a entraîné la mort de l'un des patients inclus dans l'étude.

Les thérapies basées sur l'utilisation des cellules souches adultes sont prometteuses mais présentent elles aussi des faiblesses. En effet, le risque de rejet du greffon est toujours présent

lorsque la greffe autologue est impossible, de même que la nécessité de suivre un traitement immunosuppresseur à vie. La greffe de cellules souches hématopoïétiques comporte en outre des obstacles qui lui sont propres. En effet, l'utilisation thérapeutique de ces cellules nécessite une élimination complète du système hématopoïétique afin d'éviter la destruction du greffon par les cellules immunitaires du patient. Cette élimination est possible grâce à l'action combinée de la chimiothérapie et d'une irradiation corps entier, qui présentent toutes les deux des risques pour le patient et ne sont pas dépourvues d'effets secondaires. Un autre problème lié à l'utilisation des cellules souches hématopoïétiques est la réaction dite « du greffon contre l'hôte ». C'est alors le greffon qui va attaquer les cellules endogènes du patient greffé, et non plus celles du patient qui vont détruire le greffon. Cette réaction du greffon contre l'hôte va avoir des conséquences tissulaires graves, allant parfois jusqu'à nécessiter la destruction du greffon par radiothérapie afin d'inhiber ses effets nocifs.

Chacun des différents types cellulaires utilisés en thérapie cellulaire possède des avantages et des inconvénients qui lui sont propres. Cependant, deux inconvénients majeurs sont retrouvés quel que soit le type cellulaire utilisé. En effet, le manque de disponibilité et d'accessibilité des cellules est un problème commun aux cellules différenciées et aux cellules souches adultes. Le second problème rencontré est le rejet du greffon. Les cellules utilisées étant, faute d'accessibilité chez les patients, le plus souvent isolées à partir de donneurs, le risque de rejet du greffon est le même que lors d'une greffe d'organe. Ces problèmes ont poussé les équipes de thérapie cellulaire à chercher un nouveau type cellulaire exploitable en clinique. Ces cellules doivent être disponibles, amplifiables *in vitro*, ne pas être rejetées et ne pas provoquer de maladie du greffon contre l'hôte. Les cellules retenues sont les Cellules Souches Mésoenchymateuses (CSM).

2.3. Les Cellules Souches Mésoenchymateuses

2.3.1. Définition

Les cellules souches non-hématopoïétiques présentes au sein de la moelle osseuse ont été décrites pour la première fois dans les années 1970 par Friedenstein *et al* (Friedenstein et al. 1974; Friedenstein et al. 1974). La purification de ces cellules a été réalisée grâce à leur capacité d'adhérence au plastique de culture, méthode qui est toujours utilisée à l'heure

actuelle pour les isoler. Ces cellules ont alors été décrites comme étant des cellules adhérentes, clonogéniques, non-phagocytaires et de type fibroblastique, possédant en outre la capacité de donner naissance à des colonies fibroblastiques (CFU-F).

Ces cellules non hématopoïétiques de la moelle osseuse ont par la suite montré leur capacité à se différencier *in vitro* en différents types cellulaires issus du feuillet mésodermique : ostéoblastes (Kassem et al. 1993), adipocytes (Justesen et al. 2002) et chondrocytes (Johnstone et al. 1998; Mackay et al. 1998). C'est pourquoi le nom de Cellules Souches Mésenchymateuses (CSM) leur a été attribué.

Cependant, de nombreuses équipes estiment que le terme de cellules souches mésenchymateuses est inadéquat, et ce pour plusieurs raisons. Tout d'abord, une cellule souche a pour caractéristique de pouvoir être amplifiée indéfiniment *in vitro* tout en conservant son statut indifférencié. Or il s'est révélé impossible de conserver indéfiniment les CSM en culture tout en maintenant leur potentiel souche. En effet, dans les conditions actuelles de culture, les CSM humaines obtenues à partir d'un donneur jeune sont capables de réaliser environ 40 doublements de population et celles issues de donneurs âgés seulement 25 (Stenderup et al. 2003). Cette limitation de la capacité de prolifération *in vitro* des CSM est le résultat d'un arrêt de la croissance associé à la sénescence des cellules, appelée sénescence répllicative (Kassem et al. 1997). Cette forme de sénescence est due à différents phénomènes, notamment un raccourcissement progressif des télomères pendant la culture *in vitro* (Baxter et al. 2004; Bonab et al. 2006), attribuable à une absence d'activité de la télomérase, enzyme chargée de réparer les télomères endommagés au cours des réplifications de l'ADN (Simonsen et al. 2002; Zimmermann et al. 2003). L'absence d'activité télomérase au sein des CSM reste cependant discutée puisque certaines équipes ont réussi à isoler des CSM possédant cette activité (Gronthos et al. 2003). Il se pourrait donc que cette inactivité ainsi que la sénescence qui en découle soient simplement le reflet de conditions de cultures non-optimales.

Il faut également considérer que le terme de Cellules Souches Mésenchymateuses s'applique à deux populations de cellules : les CSM présentes *in vivo* au sein de la moelle osseuse et les CSM cultivées *in vitro*. Dans le cas de ces dernières, la population présente en culture ne peut pas être caractérisée par la présence d'un marqueur cellulaire seul et unique mais par une combinaison de marqueurs plus ou moins exprimés. En outre, le temps de culture nécessaire à l'obtention du nombre requis de CSM est important, ce qui favorise la dérive des cellules cultivées par rapport aux cellules présentes *in vivo*. Les cellules étudiées *in vitro* ne seraient donc plus totalement les mêmes que celles prélevées initialement et seraient

en fait un mélange de cellules souches et de cellules stromales différenciées. C'est pourquoi il a été proposé d'utiliser le terme de Cellules Stromales Mésoenchymateuses lorsqu'il est question de cellules en culture, et de réserver le terme de Cellules Souches Mésoenchymateuses aux seules cellules présentes *in vivo*. L'acronyme CSM reste ainsi le même, que l'on parle de cellules *in vivo* ou *in vitro*.

En 2006, la Société Internationale de Thérapie Cellulaire (ISCT) a déterminé les critères minimaux pour définir les Cellules Stromales Mésoenchymateuses cultivées *in vitro* (Dominici et al. 2006). Pour être reconnues en tant que CSM, les cellules étudiées doivent remplir trois critères :

- Adhérer au plastique dans les conditions standards de culture ;
- Présenter le phénotype membranaire suivant : être CD73, CD90 et CD105 positives à plus de 95%, et être CD45, CD34, CD14 ou CD11b, CD79 α ou CD19 et HLA-DR négative à au moins 98% ;
- Etre capables de se différencier *in vitro* en ostéoblastes, adipocytes et chondrocytes.

Cependant, bien que ces trois critères s'appliquent uniformément à toutes les CSM en culture, certaines différences d'expression des marqueurs membranaires sont admises car elles semblent être liées au tissu d'où sont extraites les CSM ainsi qu'aux conditions de culture employées, actuellement non-uniformisées et propres à chaque laboratoire.

2.3.2. Rôles physiologiques des CSM

Les CSM ont montré qu'elles possèdent de nombreuses capacités qui leur sont propres, aussi bien *in vitro* qu'*in vivo*. Cependant, l'étude de leur comportement *in vivo* et *in situ* dans leur tissu d'origine reste très complexe, notamment à cause de l'absence d'un marqueur unique et spécifique qui permettrait de les identifier au sein du tissu où elles résident.

Soutien de l'hématopoïèse

Le premier organe au sein duquel les CSM ont été localisées est la moelle osseuse. C'est donc sur cet organe particulier que se sont concentrées la plupart des études visant à comprendre leur rôle physiologique.

La moelle hématopoïétique est emprisonnée à l'intérieur des os. Chez l'enfant de moins de 5 ans, tous les os contiennent de la moelle hématopoïétique active, mais elle se limite par la

suite au niveau des os du crâne, des clavicules, des vertèbres, des côtes, du sternum, du bassin et des extrémités proximales du fémur et de l'humérus. Lorsque l'on observe une coupe d'os renfermant de la moelle hématopoïétique, quatre compartiments se distinguent (Voir figure 6) :

- l'os à proprement parler, qui renferme les cellules qui assure l'homéostasie osseuse (ostéoblastes, ostéoclastes) ;

- le compartiment vasculaire, qui permet l'irrigation de la moelle et l'extravasation des cellules hématopoïétiques différenciées vers le reste de la circulation sanguine ;

- le tissu conjonctif de soutien de l'hématopoïèse, ou stroma, qui permet de maintenir l'homéostasie médullaire en régulant les capacités d'autorenouvellement, de différenciation et de prolifération des cellules souches hématopoïétiques ;

- le parenchyme hématopoïétique, qui contient les cellules sanguines et leurs précurseurs. C'est au sein de cette structure que les cellules hématopoïétiques pluripotentes vont se différencier en progéniteurs qui seront à l'origine des lignées sanguines et donneront naissance aux différentes cellules hématopoïétiques (hématies, plaquettes, monocytes, macrophages, lymphocytes).

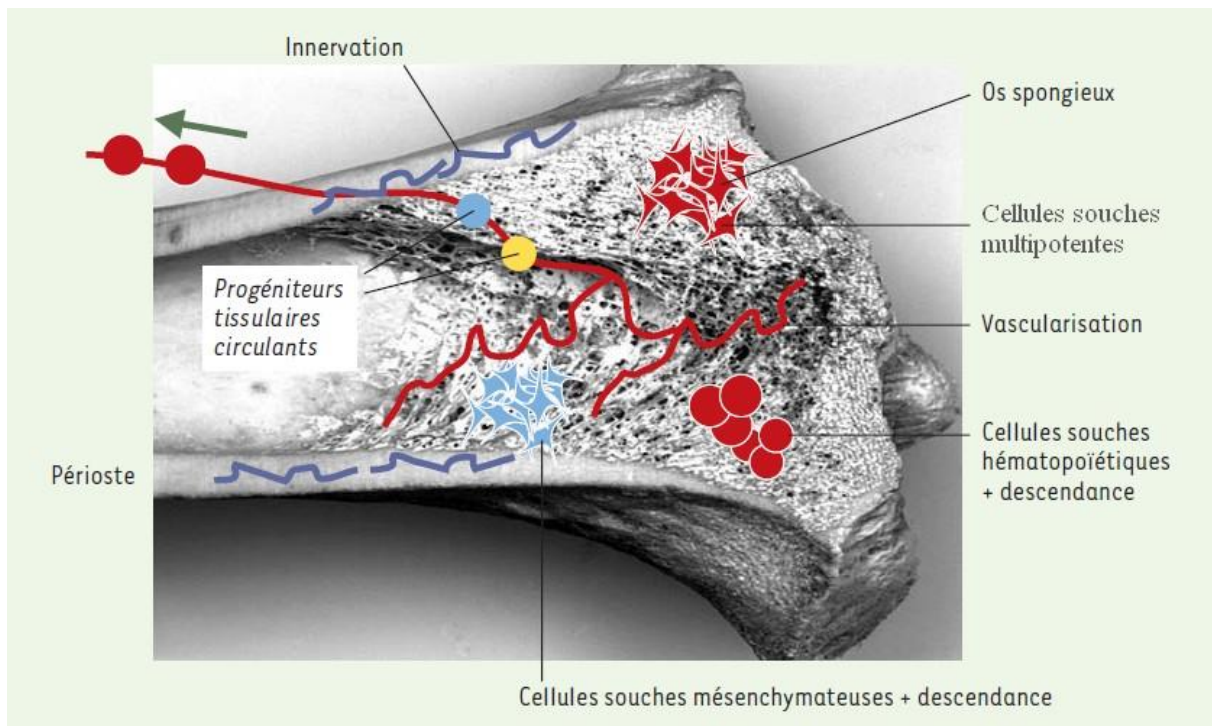


Figure 6 : Anatomie de la moelle osseuse (d'après (Coulombel 2003)). Le tissu médullaire présent dans la cavité médullaire des os longs est très vascularisé (vaisseaux représentés en rouge), et de nombreuses populations cellulaires, dont des cellules souches, y circulent en permanence. Dans le parenchyme extravasculaire, on trouve au moins trois populations de cellules souches, les cellules souches multipotentes, les cellules souches mésenchymateuses et les cellules souches hématopoïétiques. Ces cellules sont extrêmement minoritaires par rapport à leur descendance, représentée par les progéniteurs et les précurseurs.

Les CSM sont des cellules souches stromales et se trouvent donc au sein du tissu conjonctif qui soutient l'hématopoïèse. De ce fait, les premières études portant sur leur rôle physiologique ont conclu que leur rôle était d'assurer le maintien du pool de cellules stromales différenciées nécessaire au bon fonctionnement des Cellules Souches Hématopoïétiques (CSH), ainsi que de produire la matrice extracellulaire dans laquelle viennent se loger les cellules hématopoïétiques (Chichester et al. 1993). Les CSM sécrètent également un grand nombre de cytokines et de facteurs de croissance impliqués dans la différenciation ainsi que l'autorenouvellement des CSH, tels que l'IL-6, l'IL-7, l'IL-8, l'IL-11, l'IL-14, l'IL-15, le M-CSF (Macrophage Colony-Stimulating Factor), le SCF (Stem Cell Factor) et le flt-3 ligand (Haynesworth et al. 1996; Majumdar et al. 1998; Cheng et al. 2000; Neuss et al. 2004).

Cependant, les CSM et les cellules stromales qui en sont issues assurent également d'autres fonctions au sein de la moelle osseuse. Tout d'abord, les CSM expriment différents récepteurs membranaires qui vont reconnaître des molécules présentes à la surface des CSH et ainsi

permettre à ces dernières de venir adhérer aux CSM (Majumdar et al. 1998). Cette adhérence va permettre aux CSM de constituer le support physique dont les CSH ont besoin pour survivre (Cheng et al. 2000). Enfin, de plus en plus d'études tendent à montrer que les CSM sont des composants clé de la niche hématopoïétique. Ainsi, Muguruma *et al* ont démontré que lors d'une transplantation intra-médullaire de CSM humaines chez une souris NOD-SCID (Non-Obese Diabetic -Severe Combined ImmunoDefficiency), les cellules greffées sont capables de se fondre au sein du microenvironnement hématopoïétique dans lequel elles se différencient en péricytes vasculaires, myofibroblastes, cellules stromales, ostéocytes, ostéoblastes et en cellules endothéliales, qui constituent tous les composants fonctionnels de la niche hématopoïétique (Muguruma et al. 2006).

Réparation des lésions tissulaires

La migration des cellules souches est un élément essentiel au cours du développement embryonnaire mais également au sein de l'organisme adulte. Elle est en effet indispensable afin d'assurer le renouvellement continu des cellules différenciées ainsi que la régénération des tissus lésés accidentellement.

L'exemple le plus connu de circulation des cellules souches adultes est celui des CSH. En effet, bien que la majorité des CSH adultes soient localisées au sein de la moelle osseuse, elles sont également faiblement présentes dans le sang (Wright et al. 2001) (Abkowitz et al. 2003). Massberg *et al* ont réussi à décrypter la totalité du chemin parcouru par les CSH en dehors de la moelle osseuse (Massberg et al. 2007). Ils ont ainsi pu montrer que les CSH passent de la moelle osseuse dans le sang, puis du sang à différents organes (foie, reins, poumons), puis des organes à la lymphe et aux ganglions lymphatiques d'où elles repassent dans le sang, à partir duquel elles retournent à la moelle osseuse ou recommencent un nouveau circuit de migration. La raison biologique de cette migration des CSH n'est pas totalement claire, cependant Massberg *et al* proposent que ces cellules permettraient de produire localement des cellules immunitaires en cas d'agression tissulaire.

Cette circulation sanguine observée chez les CSH existe également pour les CSM. En effet, dès 1997, Fernandez *et al* ont détecté des cellules ressemblant à des CSM dans le sang de patients atteints de cancer du sein et traités par facteurs de croissance (Fernandez et al. 1997). Depuis, de nombreuses études ont confirmé la présence dans le sang de cellules fibroblastiques capables de donner naissance, de la même façon que les CSM, à des

ostéoblastes ou à des adipocytes lorsqu'elles sont cultivées dans les conditions appropriées (Kuznetsov et al. 2001) (Zvaifler et al. 2000). En outre, deux études menées par Mansilla *et al* et par Wang *et al* ont démontré une variation de la quantité de CSM sanguines en fonction de la condition physiologique du donneur. En effet, dans leur étude, Mansilla *et al* ont trouvé un nombre plus élevé de CSM dans les échantillons sanguins provenant de patients souffrant de brûlure thermique par rapport à ceux provenant de donneur sains (Mansilla et al. 2006). Le nombre de CSM circulantes était en outre corrélé à la gravité de la brûlure, suggérant un lien entre le nombre de CSM circulantes et le processus de régénération tissulaire. De leur côté, Wang *et al* ont quant à eux constaté une diminution des CSM circulantes 7 jours après un infarctus du myocarde, qu'ils supposent être due à un recrutement accru des CSM circulantes au niveau du myocarde infarcté afin de faciliter sa réparation (Wang et al. 2006). Ces études suggèrent donc que les CSM pourraient avoir un rôle extra-médullaire de réparation des tissus lésés.

2.3.3. Potentiel *in vitro* des CSM

Outre leurs fonctions physiologiques de soutien à l'hématopoïèse et de régénération tissulaire, les CSM ont également montré de nombreuses capacités lors de leur étude *in vitro*, qui ont ouvert la voie à leur utilisation en médecine régénérative.

Différenciation en cellules non mésodermiques

La différenciation des cellules souches en cellules progénitrices ou en cellules différenciées est un processus physiologique normal permettant d'assurer l'homéostasie tissulaire. Les cellules souches, multipotentes ou unipotentes, présentes au sein des tissus sont programmées pour donner naissance à certains types cellulaires définis. Cependant, il arrive parfois que certaines cellules souches ne se différencient pas de façon normale et donnent naissance non pas aux cellules en lesquelles elles se différencient normalement mais à des cellules spécifiques de l'organe dans lequel elles se trouvent. On parle alors de transdifférenciation.

Depuis leur découverte, de nombreuses études se sont intéressées à la capacité des CSM à se différencier en différents types cellulaires. Il est très vite apparu que ces cellules, fortement impliquées dans l'homéostasie des lignées mésenchymateuses, étaient capables de se différencier en de multiples types cellulaires affiliés au mésoderme embryonnaire, tels que les

ostéoblastes, les adipocytes, les chondrocytes, les myoblastes et les fibroblastes du stroma hématopoïétique (Pittenger et al. 1999).

De façon surprenante, différentes études ont également montré que les CSM étaient capables de se différencier non plus en cellules d'origine mésodermique mais en cellules issues de l'endoderme et de l'ectoderme embryonnaire. Les CSM peuvent ainsi se différencier en neurones et en cellules épithéliales mais aussi en hépatocytes et en cellules musculaires ((Jiang et al. 2002) (Kadivar et al. 2006) (Hung et al. 2002) (Petersen et al. 1999) (Kopen et al. 1999)). La figure 7 résume les capacités de différenciation et de transdifférenciation des CSM

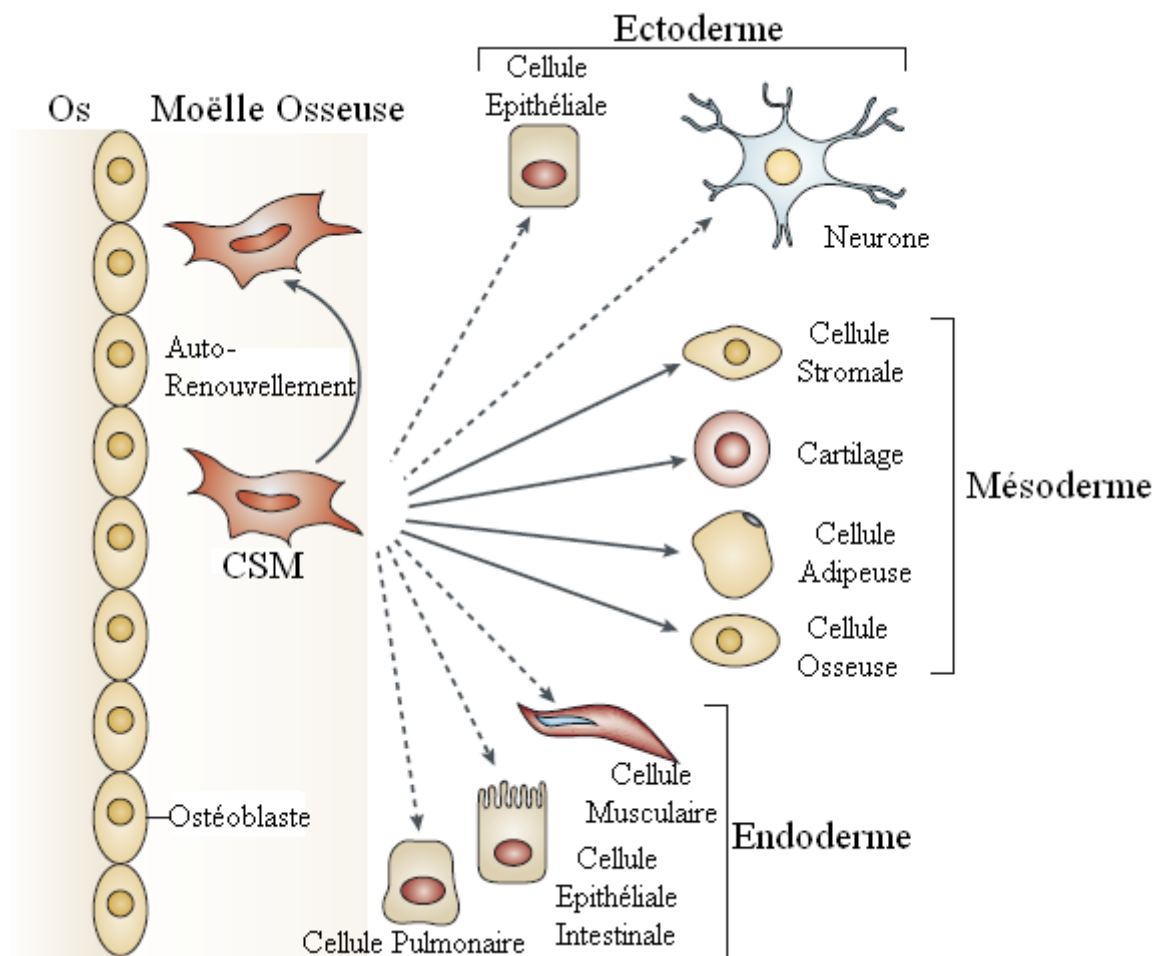


Figure 7: Multipotence des CSM (d'après (Uccelli et al. 2008))

Bien que la plupart de ces observations de transdifférenciation aient été faites lors d'études *in vitro*, elles ouvrent la voie à de nombreuses questions concernant à la fois l'origine de cette capacité de transdifférenciation ainsi que la réalité de son existence *in vivo*.

Ces deux questions semblent étrangement liées. En effet, les CSM adultes sont communément considérées comme dérivant du mésoderme (Dennis et al. 2002). Cependant, de façon surprenante, une nouvelle source embryonnaire de CSM a été découverte au sein de la crête neurale crânienne. Grâce à l'utilisation de protéines rapportrices fluorescentes, Takashima *et al* ont pu démontrer qu'une vague de cellules provenant du neuroépithélium, positives pour le marqueur Sox-1, donne naissance à des CSM, via une étape intermédiaire au sein de la crête neurale (Takashima et al. 2007). Cette origine neuroépithéliale expliquerait la capacité des CSM à se différencier en neurones, ainsi que leur expression basale de protéines neurales (Blondheim et al. 2006; Deng et al. 2006). On ne sait actuellement pas si toutes les CSM adultes ou seulement une partie dérivent de cette première vague neurale. Cependant, certains chercheurs pensent que le manque de signes évidents de la capacité de transdifférenciation des CSM *in vivo* serait dû au nombre limité de CSM adultes dérivant des lignées non mésodermiques, se basant pour cela sur les travaux de Takashima *et al* qui montrent que le nombre de cellules d'origine neuroépithéliale au sein de la moelle osseuse décroît rapidement après la naissance.

Faible immunogénicité

En plus de leur capacité à se différencier en cellules issues des trois feuilletts embryonnaires, les CSM ont également montré une forte capacité de modulation de l'activité des cellules immunitaires. Cette capacité d'immunomodulation, fortement impliquée dans les actions bénéfiques des CSM, sera développée par la suite (voir partie 3 : CSM et immunité). Cependant, cette capacité immunomodulatrice est liée à une autre caractéristique majeure des CSM : leur faible immunogénicité.

En effet, les CSM humaines expriment faiblement les antigènes du Complexe Majeur d'Histocompatibilité (CMH) de classe I et n'expriment pas les molécules de co-stimulation du CMH de classe II, telles que CD40, CD80 et CD86 (Tse et al. 2003) (Le Blanc et al. 2003) (Majumdar et al. 2003). La faible expression du CMH de classe I par les CSM les protège de la lyse médiée par les Natural Killer (NK) alloréactifs (Ryan et al. 2005), alors que l'absence de molécules de co-stimulation leur permet d'induire l'anergie des lymphocytes T (Rasmusson et al. 2003), leur assurant ainsi d'échapper au système immunitaire de l'hôte. En outre, les CSM humaines expriment HLA-G, un antigène non-classique du CMH de classe I, qui serait impliqué dans l'inhibition de la réponse immune contre les CSM (Nasef et al.

2007). Enfin, les CSM sont également capables d'échapper à l'élimination normale des pathogènes par le système du complément. En effet, Tu *et al* ont démontré que les CSM, via la sécrétion du facteur H qui est un puissant inhibiteur de l'activation du complément, peuvent inhiber la réactivité du complément et ainsi limiter leur élimination par ce biais (Tu et al. 2010). Cet effet inhibiteur des CSM sur le système du complément est également très probablement soutenu par leur expression des protéines de contrôle du complément CD55, CD46 et CD59 (Komoda et al. 2010).

Du fait de cette faible immunogénicité, plusieurs études ont pu démontrer que des CSM allogéniques non compatibles transplantées chez le rongeur, le poulet (Pochampally et al. 2004), le porc (Hill et al. 2003) ou encore le babouin (Devine et al. 2003) n'induisent pas de signes visibles de rejet immunitaire. En outre, lors d'une implantation de CSM humaines à un mouton *in utero*, les cellules s'intègrent à l'animal et persistent au cours du temps (Liechty et al. 2000). Cette absence de rejet des CSM HLA incompatibles a également été observé *in vivo* lors de différents essais cliniques (Horwitz et al. 1999) (Koç et al. 2002).

Cependant, des résultats remettant en doute la faible immunogénicité des CSM ont été obtenus dans plusieurs modèles utilisant des cellules non plus humaines mais animales. En effet, il a été montré à la fois *in vivo* et *in vitro* que les CSM murines peuvent établir une réaction immunitaire lorsqu'elles sont transférées chez un animal immunocompétent (Eliopoulos et al. 2005) (Nauta et al. 2006). Ce rejet n'a en revanche pas été retrouvé en clinique, puisque les patients ayant reçu des CSM allogéniques n'ont montré aucun signe de rejet, avec une absence de détection d'anticorps dirigés contre les CSM greffées et une absence d'activation des lymphocytes T (Sundin et al. 2007).

2.3.4. Sources des CSM

Bien qu'ayant été initialement isolées à partir de la moelle osseuse, les CSM ont également été retrouvées au sein de nombreux organes. Cette recherche de nouvelles sources de CSM dans le corps a été initiée afin de trouver de nouvelles sources qui seraient plus facilement accessibles que la moelle osseuse, dont la ponction requiert une intervention lourde comportant des risques.

Chez l'adulte, les CSM semblent être présentes dans de très nombreux organes (Voir figure 8).

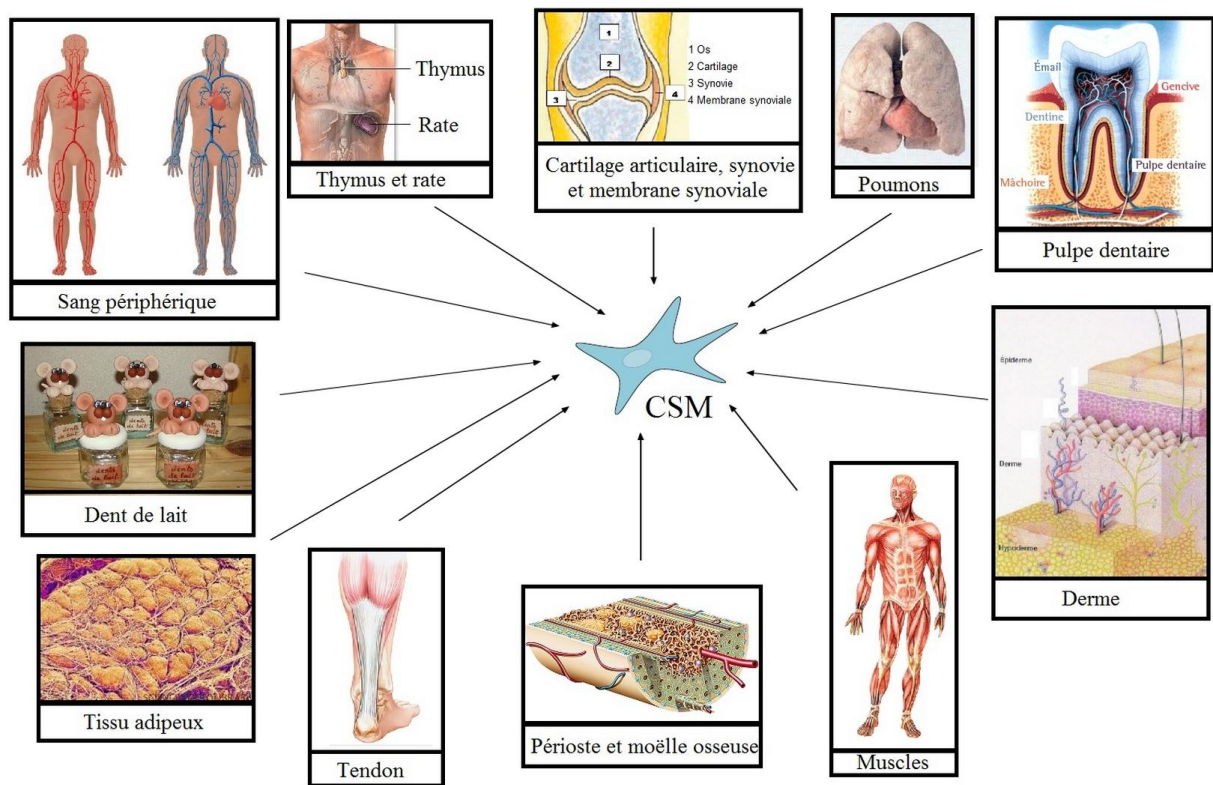


Figure 8 : Organes adultes à partir desquels ont été isolées des CSM (Zvaifler et al. 2000) (Gronthos et al. 2001) (Otaki et al. 2007) (Miura et al. 2003) (Martin et al. 2008) (De Bari et al. 2001) (De Bari et al. 2001) (Young et al. 2001) (Zuk et al. 2002)

Outre les tissus adultes, les CSM sont également présentes au sein des tissus fœtaux, notamment au niveau du foie fœtal (Campagnoli et al. 2001). Bien que présentant une source abondante de CSM, l'utilisation de dérivés fœtaux se heurte aux mêmes problèmes éthiques que les cellules souches embryonnaires. En revanche, plusieurs études ont démontré la présence de CSM au sein de tissus d'origine fœtale indépendante du fœtus. Ainsi, le sang de cordon ombilical, le cordon ombilical lui-même, le liquide amniotique mais aussi le placenta (membrane amniotique et chorion) se sont révélés contenir de grandes quantités de CSM, facilement accessibles et ne posant aucun problème éthique puisque faisant partie des déchets opératoires (Voir figure 9)

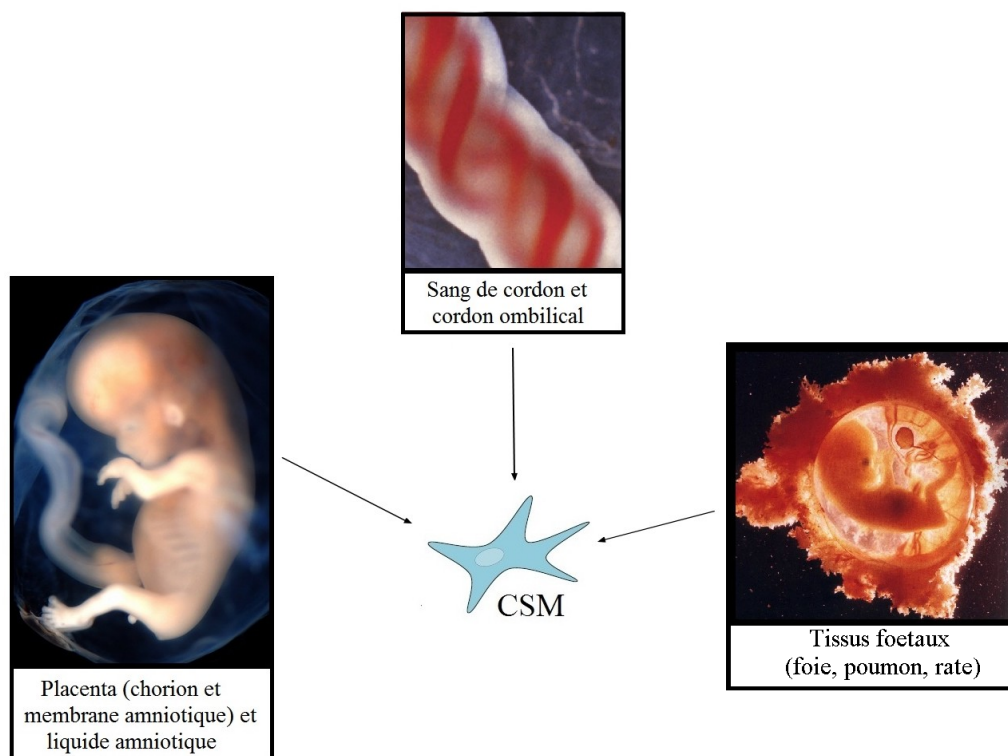


Figure 9 : Tissus foetaux et extra-foetaux contenant des CSM (Lee et al. 2004) (in 't Anker et al. 2003) (In 't Anker et al. 2003) (Erices et al. 2000) (Battula et al. 2008) (Chang et al. 2006) (Alviano et al. 2007)

Bien que les CSM issues de différents tissus adultes et foetaux présentent beaucoup de caractéristiques similaires, différentes études ont récemment pointé du doigt des différences existant entre elles (Djouad et al. 2005) (Wagner et al. 2005) (Yamada et al. 2006) (Kern et al. 2006). Ces différences, notamment en ce qui concerne leur capacité de différenciation, pourraient être dues à une prédestination des cellules par leur tissu d'origine.

A l'heure actuelle, et malgré le grand nombre de sources potentielles de CSM découvertes au cours des dernières années, les cellules issues de la moelle osseuse, du tissu adipeux, du sang de cordon ombilical et du cordon ombilical lui-même sont les seules à être considérées comme utilisables en clinique.

2.4. Utilisations des CSM en médecine régénérative

Les multiples capacités biologiques dont ont fait preuve les CSM aussi bien *in vivo* qu'*in vitro* ont poussé les chercheurs à les exploiter afin de traiter des pathologies nécessitant une réparation tissulaire, mais également dans des pathologies de type inflammatoires. La figure 10 reprend les propriétés biologiques des CSM exploitées en thérapie cellulaire.

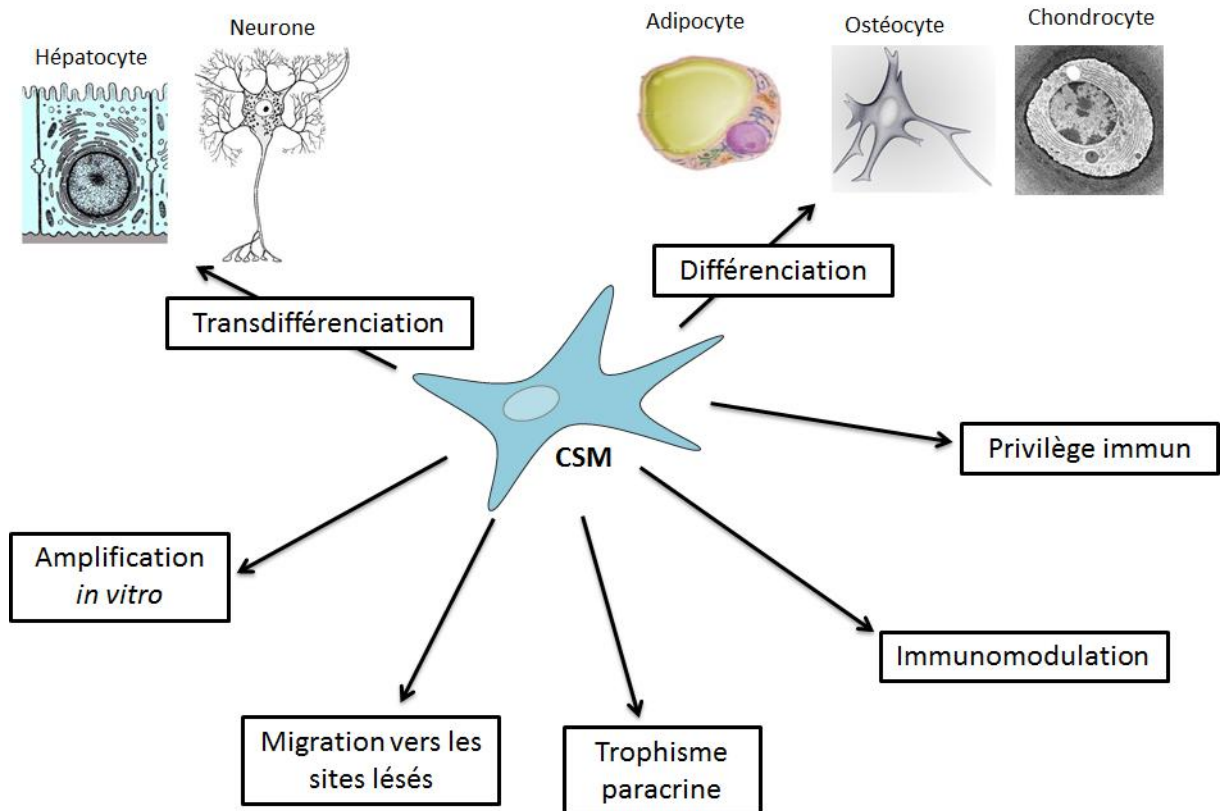


Figure 10 : Capacités biologiques des CSM mises à profit en thérapie cellulaire

Différents exemples d'utilisation des capacités biologiques des CSM au sein des protocoles de thérapie cellulaire vont maintenant être traités. Leur capacité d'amplification *in vitro* est évidemment mise à profit dans chaque protocole thérapeutique afin de permettre l'obtention d'un nombre suffisant de cellules pour réaliser les traitements. Leurs autres capacités sont quant à elles utilisées diversement en fonction des pathologies :

- **Effet trophique** : régénération du système hématopoïétique
- **Différenciation** : régénération de l'os et du cartilage
- **Transdifférenciation** : régénération cardiaque, nerveuse et épithéliale

Il faut tout de même noter que, le plus souvent, le bénéfice thérapeutique découle de la combinaison de plusieurs effets biologiques des CSM. Les phénomènes de différenciation et de transdifférenciation sont ainsi généralement associés à des effets trophiques.

Les mécanismes d'action sous-jacents aux différentes capacités des CSM seront détaillés au paragraphe 2.5. Les fonctions immunomodulatrices des CSM ne seront quant à elles pas abordées ici puisque faisant l'objet du troisième chapitre de cette introduction.

2.4.1. Régénération du système hématopoïétique

La fonction première des CSM *in vivo* est de maintenir l'homéostasie de la niche hématopoïétique et de permettre le bon déroulement de l'hématopoïèse. De fait, il a été montré que les CSM facilitent la croissance des cellules hématopoïétiques, à la fois *in vitro* (Mourcin et al. 2005) et *in vivo* (Angelopoulou et al. 2003) (Maitra et al. 2004). L'utilisation principale des greffes de moelle osseuse est réalisée dans le cas des irradiations anti-cancéreuses afin de reconstituer la moelle qui a été détruite, intentionnellement ou non, lors de l'irradiation. Bien que l'on ait longtemps considéré que seules les CSH étaient importantes lors du transfert de moelle osseuse, la découverte des CSM a fait évoluer le schéma thérapeutique. En effet, lors de l'administration d'une forte dose de radiothérapie pré-greffe, le stroma de la moelle osseuse est endommagé au même titre que les CSH, et ne se reconstitue que lentement après la fin de l'exposition (O'Flaherty et al. 1995) (Galotto et al. 1999). En outre, au sein de la moelle osseuse, moins d'une cellule sur 10 000 est une CSM, et un greffon classique de moelle osseuse n'en contient que 10 000 pour un kilo du receveur (Jones et al. 2002). Enfin, les CSM n'ont qu'une capacité limitée de reconstitution du stroma hématopoïétique, et il a été observé que les progéniteurs stromaux à la suite d'une greffe classique dérivent majoritairement du receveur et non pas du donneur (Koc et al. 1999). Malgré tout, les CSM humaines ont prouvé leur capacité à promouvoir la prise de greffe de CSH. Maitra *et al* ont ainsi pu démontrer que la prise de greffe de CSH passe de 2 souris sur 10 sans CSM à 8 sur 10 lors d'une co-greffe (Maitra et al. 2004).

En 2000, Koc *et al* ont mené une étude sur 28 patients souffrant de cancers du sein. Suite à un protocole accru de chimiothérapie (précédé ou non de radiothérapie en fonction des patients), les patients ont dû subir une greffe de cellules de moelle osseuse. L'étude a permis de montrer qu'une co-greffe autologue de cellules progénitrices sanguines avec des CSM est

efficace, avec un retour à une quantité normale de neutrophiles dans le sang seulement 8 jours après la greffe, et une normalisation des plaquettes 8.5 jours après (Koc et al. 2000). Aucun effet secondaire n'a été observé suite à la greffe de CSM.

Cette étude montrant un bénéfice notable sans aucun effet secondaire associé, a ouvert la voie à de nombreux autres essais cliniques de co-greffes CSH/CSM. Différentes pathologies ont ainsi été abordées, ainsi que la greffe de CSM non plus autologues mais hétérologues, avec ou sans identité HLA. Les résultats obtenus ont tous montré une amélioration de la prise de la greffe hématopoïétique lors d'une co-injection de CSM, qu'elles soient ou non HLA compatibles entre le patient traité et le donneur (Lee et al. 2002) (Kim et al. 2004) (Le Blanc et al. 2007). Il est à noter qu'aucun effet secondaire lié à l'administration de CSM n'a été observé au cours de ces différentes études.

2.4.2. Régénération de l'os et du cartilage

L'homéostasie osseuse est régulée par la balance existant entre les cellules productrices d'os, les ostéoblastes, et les cellules destructrices de l'os, les ostéoclastes. Les CSM sont directement impliquées dans le métabolisme osseux puisque les ostéoblastes sont directement issus de leur différenciation. Les CSM produisent en outre des molécules impliquées dans la balance ostéoblastes/ostéoclastes, telles que RANKL (receptor activator of nuclear factor kappa-B ligand), qui active les ostéoclastes, et l'ostéoprotégérine (OPG), qui inhibe les ostéoclastes. Dans certaines conditions pathologiques, telles que le grand âge ou des traumatismes importants, l'homéostasie osseuse est rompue, menant à une fragilisation de l'os et à une cicatrisation compromise. Une perte de fonctionnalité des CSM pourrait être l'un des facteurs responsables de ces conditions pathologiques (Murphy et al. 2002) et en font donc d'excellentes candidates pour un traitement par greffe de CSM.

Régénération des traumatismes osseux non-jointifs

A l'heure actuelle, le traitement de référence pour les traumatismes osseux non-jointifs dus à un traumatisme ou à une résection chirurgicale nécessaire est l'autogreffe osseuse. Cependant, ce traitement présente d'importants désavantages. En effet, le tissu osseux disponible est limité en quantité, et les études réalisées ont montré que la vascularisation et le remodelage osseux de la greffe sont insuffisants pour assurer une parfaite fonctionnalité du greffon

(Gazdag et al. 1995). L'utilisation de CSM pour améliorer la prise de greffe osseuse ainsi que pour créer un os artificiel au sein d'une matrice synthétique a donc été testée afin de pallier aux inconvénients du traitement actuel.

De nombreuses études ont ainsi été menées sur des modèles animaux afin de déterminer la faisabilité de la greffe de CSM. Dans tous ces modèles, les CSM implantées au sein d'une matrice artificielle ont permis d'améliorer le processus de réparation osseuse, aussi bien dans le cas de greffe de CSM autologues qu'allogéniques (Arinzeh et al. 2003) (Bruder et al. 1998) (Kon et al. 2000).

Cette utilisation des CSM en association avec une matrice artificielle a également été utilisée en clinique. Quarto *et al* ont ainsi pu démontrer chez trois patients que la greffe d'une matrice artificielle contenant des CSM permet d'obtenir la formation de cals osseux conséquents, signes de la réparation osseuse, ainsi qu'une bonne intégration des implants au niveau des jonctions avec l'os endogène, seulement deux mois après la greffe, alors qu'une greffe classique d'os ne donne ce genre de résultat que 12 à 18 mois après sa réalisation (Quarto et al. 2001).

Traitement de l'ostéogenèse imparfaite

Les CSM ont prouvé dans des modèles animaux leur capacité intrinsèque à s'intégrer à l'os et ont ainsi ouvert la voie à leur utilisation thérapeutique dans le traitement de maladies génétiques osseuses. Cette capacité de migration dans l'os, ainsi que le potentiel ostéoblastique des CSM, ont été mis à profit dans le cadre du traitement d'une maladie génétique osseuse rare : l'ostéogenèse imparfaite. Cette maladie est due à un défaut du collagène de type I, protéine structurale majeure de l'os, et donne naissance notamment à une fragilité osseuse, à des difformités du squelette ainsi qu'à un retard de croissance. Actuellement, aucun traitement médicamenteux réellement efficace n'existe pour traiter les patients atteints d'ostéogenèse imparfaite. Les traitements disponibles, tels que les bisphosphonates, permettent de diminuer le risque de fracture via une amélioration de la minéralisation osseuse, mais ne permettent de soigner ni les autres symptômes ni la cause génétique de la maladie (Devogelaer et al. 2006). Les études utilisant des CSM autologues dans des modèles animaux d'ostéogenèse imparfaite ont en revanche montré une amélioration de la croissance et de la minéralisation osseuse (Pereira et al. 1998).

Plusieurs études cliniques ont également été menées afin de traiter des patients souffrant d'ostéogenèse imparfaite. En 2001, Horwitz *et al* ont tout d'abord montré qu'un transfert de moelle totale HLA-compatible chez des patients atteints d'ostéogenèse imparfaite permettait d'accroître la vitesse de croissance et la minéralisation osseuse (Horwitz et al. 2001). En 2002, ce même groupe a démontré qu'une greffe de CSM provenant du même donneur HLA-compatible que les CSH greffées pouvaient s'implanter chez les patients traités, là encore avec une amélioration marquée de la vitesse de croissance et de la minéralisation des os pendant les 6 mois d'observation post-greffe (Horwitz et al. 2002). Enfin, dans une étude portant sur un unique cas, Le Blanc *et al* ont réalisé une greffe *in utero* de CSM allogéniques issues de foie fœtal sur un fœtus atteint d'ostéogenèse imparfaite (Le Blanc et al. 2005). Dans ce cas précis, les CSM se sont intégrées aux os, qui ont alors montré un développement trabéculaire normal.

Régénération du cartilage

Actuellement, les capacités de réparation des lésions dues à un défaut du cartilage ou à l'arthrose sont très limitées, et la seule thérapie efficace reste souvent le remplacement du cartilage défectueux par une prothèse artificielle. Cependant, cette intervention est lourde et comporte des risques élevés. Beaucoup de problèmes articulaires sont liés à l'âge, probablement à cause de la diminution du nombre de CSM présentes au sein de la moelle osseuse (Murphy et al. 2002). L'utilisation des CSM dans le traitement de l'arthrose est donc apparue comme une solution thérapeutique valable. La première étude clinique de thérapie cellulaire réalisée par Brittberg *et al* utilisait non pas des CSM mais des chondrocytes autologues en injection locale, et a montré une bonne efficacité, avec une amélioration durable (3 ans post-greffe) de la fonctionnalité des genoux greffés chez 14 des 16 patients traités (Brittberg et al. 1994). Les études utilisant les CSM ont été réalisées par la suite. Murphy *et al* ont démontré dans un modèle caprin que la greffe de CSM après une résection partielle ou totale du ménisque du genou permet d'augmenter la régénération du cartilage (Murphy et al. 2003). De leur côté, Augello *et al* ont montré qu'une injection de CSM en même temps que celle de collagène dans un modèle d'arthrose induite par le collagène permet de limiter le développement de la maladie (Augello et al. 2007). Ter Huurne et al ont quant à eux montré que l'injection de CSM issues du tissu adipeux 7 jours après l'induction de l'arthrite permet de limiter les lésions, notamment via une inhibition de la destruction du

cartilage (Ter Huurne et al. 2012). En clinique, 24 patients souffrant d'arthrose du genou ont reçu une greffe de CSM chargées au sein d'un gel de collagène directement dans leur cartilage. Contrairement aux résultats attendus suite aux études précliniques et malgré une amélioration de la structure histologique, aucune amélioration significative de l'état des patients n'a pu être observée (Wakitani et al. 2002).

2.4.3. Régénération cardio-vasculaire

Les études démontrant la possibilité d'utiliser les CSM afin de soigner les maladies cardio-vasculaires ont été réalisées dans différents modèles, à la fois *in vitro* et *in vivo*.

In vitro, les CSM ont montré leur capacité à se différencier en cardiomyocytes, soit suite à un traitement par le 5-azacytidine (Makino et al. 1999) (Tomita et al. 1999), soit spontanément (Planat-Benard et al. 2004) (Miranville et al. 2004). Ces cellules ont toutes montré une différenciation en cardiomyocytes fonctionnels capables de répondre aux stimuli physiologiques et pharmacologiques de la même façon que les myocytes cardiaques. L'utilisation de CSM a également été mise en œuvre dans le traitement des infarctus du myocarde. Des études ont ainsi démontré que l'injection de CSM après un infarctus permet d'améliorer la fonction cardiaque, aussi bien chez le rongeur (Orlic et al. 2001) que chez le porc (Amado et al. 2005). Plusieurs tentatives ont été réalisées afin de favoriser l'implantation et la différenciation des CSM au sein du myocarde (Toma et al. 2002) (Wang et al. 2001). Cependant, la capacité des CSM à se différencier *in situ* en cardiomyocytes reste controversée.

Chez l'homme, plusieurs études cliniques ont été réalisées afin de réparer le cœur après un infarctus du myocarde. L'équipe de Chen *et al* a ainsi réalisé une étude clinique au cours de laquelle ils ont administré des CSM autologues par voie intra-coronaire 7 à 10 jours après un infarctus (Chen et al. 2004). L'injection de cellules a été globalement bien tolérée et une amélioration de la fonction cardiaque a pu être observée chez les patients ayant reçu les CSM par rapport au groupe contrôle. Deux autres études similaires ont été réalisées et ont elles aussi conclu à une innocuité du traitement ainsi qu'à une amélioration de la fonction, voir même de la régénération, du muscle cardiaque (Katrtsis et al. 2005) (Mohyeddin-Bonab et al. 2007).

Un traitement par injection de CSM a également été envisagé dans les cas d'ischémie. En effet, des études sur des modèles animaux d'ischémie ont montré que l'injection de CSM dans un membre ischémique induit l'apparition d'une angiogenèse accompagnée d'une augmentation du flux sanguin et de la densité du réseau vasculaire (Al-Khaldi et al. 2003). Différentes études cliniques ont également exploré les capacités de régénération des CSM dans des cas d'ischémie ayant différentes origines (Tateishi-Yuyama et al. 2002) (Assmus et al. 2002) (Tse et al. 2007). Ces études ont unanimement conclu que la greffe est bien tolérée par les patients et que ces derniers ont connu une amélioration de leur état, parfois de façon spectaculaire. Cependant, ces résultats doivent encore être confirmés par des études cliniques randomisées et à plus grande échelle.

Enfin, une dernière utilisation des CSM afin de régénérer le système cardio-vasculaire est leur utilisation dans le but de réparer directement les vaisseaux endommagés. Ainsi, Mirza *et al* ont réussi à améliorer la greffe d'aorte artificielle chez le rat en implantant des CSM au sein du vaisseau artificiel (Mirza et al. 2008). Ils ont en effet pu observer que les CSM ont colonisé le greffon synthétique et se sont partiellement différenciées en cellules musculaires lisses. En outre, la greffe de CSM a permis de diminuer les thromboses, risque majeur lors de la pose de prothèses vasculaires.

2.4.4. Régénération du système nerveux

L'accident vasculaire cérébral est un déficit neurologique soudain d'origine vasculaire, causé par un infarctus ou une hémorragie cérébrale. Compte tenu de la capacité que possède les CSM à régénérer les lésions causées par les infarctus cardiaques, et vu leur potentiel de différenciation en cellules nerveuses, différentes études ont été menées en utilisant des modèles animaux d'accident vasculaire cérébral. Ces études ont montré que les CSM injectées par voie intraveineuse à des rats souffrant d'un accident vasculaire cérébral sont capables de migrer vers le site lésionnel et de s'y différencier en cellules exprimant des marqueurs neuronaux, aboutissant ainsi à la réparation des cellules neurales endommagées (Li et al. 2005). En outre, d'autres études ont quant à elles permis de démontrer que l'injection intracérébrale de CSM chez le rat peut être réalisée, et permet de diminuer les déficits fonctionnels dus à l'accident vasculaire cérébral (Chen et al. 2001).

En ce qui concerne les maladies neuro-dégénératives, les traitements actuellement disponibles ne permettent pas d'obtenir une réelle guérison des patients. La thérapie cellulaire par CSM pourrait permettre de régénérer les cellules neurales détruites ou endommagées dans le cadre de ces pathologies.

De nombreuses études ont de ce fait été menées sur des modèles animaux reproduisant diverses pathologies neuro-dégénératives. Les CSM ont ainsi démontré leur capacité à restaurer, au moins partiellement, les fonctions atteintes dans des modèles aussi variés que la maladie de Huntington (Amin et al. 2008), la maladie de Parkinson (Bouchez et al. 2008) (Park et al. 2008) ou encore la sclérose latérale amyotrophique (Zhao et al. 2007) (Vercelli et al. 2008).

Des études cliniques ont également pu être menées chez des patients atteints de diverses maladies neuro-dégénératives. Les premiers, Koc *et al* ont tenté de corriger les atteintes dues soit à un syndrome de Hurler soit à une leucodystrophie métachromatique (Koc et al. 2002). Leur étude a montré que le traitement permet une amélioration des signes cliniques de la maladie sans provoquer d'effets secondaires notables. L'équipe de Mazzini *et al* s'est quant à elle concentrée sur le traitement de la sclérose latérale amyotrophique. Ses deux études cliniques ont permis de montrer d'une part que l'injection de CSM dans le liquide cébro-spinal est sans risque pour le patient, et d'autre part que cette injection permet de diminuer la vitesse du déclin musculaire au niveau des jambes des patients traités (Mazzini et al. 2010). Enfin, une étude de Lee *et al* a quant à elle permis de démontrer l'efficacité d'un traitement par CSM chez des patients souffrant d'atrophie multisystématisée, où le traitement a permis de ralentir la progression des déficits neurologiques chez les patients traités (Lee et al. 2008).

2.4.5. Régénération des épithéliums

Tout comme les cellules souches embryonnaires, les CSM ont été utilisées afin de restaurer les fonctions de production d'insuline du pancréas de personnes souffrant de diabète de type 1. Les études menées sur les modèles animaux ont ainsi permis de démontrer que l'injection de CSM permet d'améliorer la régulation du taux de glucose sanguin, ainsi que d'augmenter la production endogène d'insuline (Ezquer et al. 2008) (Lee et al. 2006). Leur utilisation a également été testée dans le cadre des maladies rénales. Une amélioration de la structure histologique et de la fonction rénale ont ainsi pu être observées suite à une injection de CSM dans des modèles d'ischémie-reperfusion, de lésion tubulaire aigüe ou encore de

glomérulonéphrite (Herrera et al. 2004) (Morigi et al. 2008) (Togel et al. 2007). Bien que ces études apportent toutes des résultats très prometteurs, aucune étude clinique n'a à ce jour été menée afin de réparer l'un de ces épithéliums à l'aide de CSM.

Des études précliniques ont permis de montrer que si les CSM sont capables de se différencier en cellules hépatiques *in vitro* grâce à certains stimuli (Fiegel et al. 2006), cette différenciation peut également se produire *in vivo* (Sato et al. 2005) (Chamberlain et al. 2007). En outre, l'injection de CSM à des animaux présentant des atteintes hépatiques induites chimiquement permet de limiter la progression de la fibrose hépatique et de restaurer en partie une fonctionnalité normale du foie (Fang et al. 2004) (Sakaida et al. 2004) (Zhao et al. 2005). Grâce aux connaissances acquises dans les modèles animaux, une étude clinique a pu être menée par Mohamadnejad *et al* (Mohamadnejad et al. 2007). Au cours de leur essai, les patients souffrant de cirrhose et présentant une fibrose hépatique très importante ont vu leurs fonctions hépatiques s'améliorer suite à la greffe de CSM. En outre, une augmentation du volume hépatique a également pu être observée 12 mois après la greffe de CSM.

L'épithélium pour lequel la thérapie par CSM est le plus avancé est la peau. En effet, les CSM ont rapidement montré leur efficacité dans l'aide à la fermeture des plaies dans des modèles animaux, notamment grâce à leur action pro-angiogénique et à leur potentiel de différenciation en cellules épithéliales (Wu et al. 2007) (Ebrahimian et al. 2009). En outre, les CSM ont prouvé leur efficacité dans la réparation des lésions cutanées dues à une exposition aux rayonnements ionisants. En effet, les études menées au sein du laboratoire ont permis de démontrer que l'injection de CSM par voie systémique permet d'accélérer la fermeture des plaies cutanées dues à une dose importante d'irradiation (Francois et al. 2007). Cette efficacité des CSM dans la réparation des lésions radiques cutanées a d'ailleurs été exploitée en clinique grâce à la collaboration de l'IRSN avec le Centre de Transfusion Sanguine des Armées de l'hôpital Percy. Plusieurs patients souffrant de dommages cutanés importants suite à une exposition accidentelle à des rayonnements ionisants ont ainsi pu bénéficier d'une greffe de CSM associé à une greffe de peau autologue (Lataillade et al. 2007) (Bey et al. 2007) (Bey et al. 2010). Les résultats obtenus ont été spectaculaires et ont permis aux patients traités de retrouver l'usage de leurs membres, ce qui aurait été impossible avec une prise en charge conventionnelle.

Les CSM sont également utilisées afin de réparer les lésions de l'épithélium gastro-intestinal. Différents modèles animaux de colite induite par le DSS ou le TNBS ont ainsi permis de montrer que l'administration de CSM permet de diminuer les lésions, similaires à celles de la maladie de Crohn et à la colique ulcéraire, causées par ces produits chimiques (Hayashi et al. 2008) (Gonzalez et al. 2009) (Gonzalez-Rey et al. 2009). En clinique, les études menées par les équipes de l'hôpital universitaire de Madrid sur le traitement par CSM des fistules péri-anales provoquées par la maladie de Crohn ont donné des résultats très positifs. En effet, Garcia-Olmo *et al* ont démontré que l'ajout de CSM au sein de la colle de fibrine habituellement utilisée pour traiter les fistules péri-anales permet d'améliorer la fermeture des fistules (17 patients sur 24 traités par CSM contre 3 sur 25 traités par fibrine seule) et permet également de limiter la récurrence des fistules un an après le traitement (Garcia-Olmo et al. 2009). L'étude de Guadalajara *et al* parue en 2012 montre un effet positif à long terme de l'utilisation des CSM au sein des colles de fibrine utilisées pour traiter les fistules péri-anales, avec 7 patients sans récurrence de fistule sur les 12 suivis (Guadalajara et al. 2012). L'efficacité de l'utilisation des CSM dans le cadre de la régénération des lésions intestinales post-radiques aiguës a été démontrée par notre laboratoire grâce aux travaux de Semont *et al*. (Semont et al. 2010). Cette étude a en effet permis de démontrer que l'injection de CSM suite à une irradiation abdominale létale permet d'augmenter la survie des animaux. En effet, 80% des souris ayant reçu les CSM sont vivantes 5 jours après l'irradiation alors qu'aucun animal non traité par CSM n'a survécu. L'étude a également montré que l'amélioration de la survie des animaux est liée à la régénération à la fois de la structure et de la fonctionnalité intestinales, avec une diminution de l'apoptose radio-induite associée à une augmentation de la prolifération des cellules intestinales. Dans le cadre de l'accident d'irradiation survenu à Epinal, trois patients sur-irradiés ont pu bénéficier d'un traitement par CSM (Peiffert et al. 2007). Bien que l'efficacité du traitement ait été difficilement appréciable du fait de son caractère compassionnel, une diminution des douleurs ressenties par les patients, pourtant réfractaires à la morphine, a pu être observée très rapidement suite à l'injection des cellules.

2.5. Mécanismes impliqués dans l'amélioration de la régénération par les CSM

Les mécanismes impliqués dans l'amélioration de la régénération tissulaire par les CSM varient en fonction du type de lésion et du tissu endommagé. La compréhension complète de ces mécanismes passe donc par le décryptage systématique des interactions complexes ayant

lieu entre les CSM et leur environnement dans chacun des cas où cette thérapeutique est utilisée.

L'amélioration de la régénération tissulaire fait bien évidemment appel aux différentes capacités intrinsèques des CSM telles que nous les avons déjà décrites. La compréhension de ces facultés intrinsèques et de leurs implications dans la régénération tissulaire est essentielle afin d'améliorer et d'optimiser les protocoles de thérapie cellulaire.

2.5.1. Mobilisation et homing vers les sites lésionnels

Les protocoles de thérapie cellulaire utilisent deux voies d'administration des CSM. En effet, les cellules sont soit injectées localement au niveau du site lésionnel, soit administrées de façon systémique par voie intraveineuse (IV).

L'administration locale semble théoriquement être la plus à même d'apporter de bons résultats. En effet, les cellules étant administrées directement au sein du tissu lésé, leur effet bénéfique devrait être rapidement visible. Les études utilisant ce mode d'administration montrent d'ailleurs un effet bénéfique important de l'injection de CSM. Cependant, l'injection locale des cellules au sein de la zone lésée n'est pas toujours possible, que ce soit à cause d'un manque d'accessibilité de la zone, comme le système nerveux central, ou à cause de la dispersion des zones à traiter, comme dans le cas du traitement de l'ostéogenèse imparfaite. Dans des situations de ce type, les CSM doivent être administrées par voie systémique. Cependant, l'administration par voie intraveineuse pose le problème de la capacité des CSM à migrer vers le tissu que l'on souhaite régénérer et à s'y intégrer efficacement afin de pouvoir favoriser sa régénération.

Les résultats obtenus suite à l'administration systémique de CSM dans différents modèles animaux ainsi que lors d'essais cliniques ont prouvé que ce mode d'administration des cellules est efficace et permet l'obtention de bénéfices thérapeutiques au même titre que l'injection locale (McFarlin et al. 2006). Cependant deux questions majeures pour la compréhension et l'amélioration des protocoles de thérapie cellulaire se posent:

- 1- Les CSM migrent-elles vraiment vers le site lésionnel ? Et si oui,
- 2- Comment les CSM sont-elles guidées vers les sites lésés ?

Migration des CSM vers les sites lésés

Comme nous l'avons déjà évoqué, les CSM peuvent être induites à quitter la moelle osseuse et migrer via le sang vers les tissus périphériques afin de favoriser la régénération des lésions tissulaires de l'organisme.

L'injection thérapeutique de CSM par voie systémique permettrait donc d'augmenter la présence des CSM circulantes et ainsi de potentialiser l'effet thérapeutique endogène des CSM. Cependant, cet effet potentialisateur ne peut exister qu'à la condition que les cellules exogènes soient elles aussi capables de migrer vers les tissus lésés. La distribution des CSM exogènes dans le corps suite à leur administration par voie systémique a donc été particulièrement étudiée.

La distribution des CSM suite à leur injection intraveineuse chez un animal sain a été explorée par l'équipe de Von Lüttichau *et al* chez la souris (Von Luttichau et al. 2005). En utilisant des CSM syngéniques exprimant la GFP, ils ont pu retrouver des cellules au sein de la rate, du thymus et des ganglions lymphatiques 24 heures après l'injection. Le nombre de cellules présentes dans ces organes atteignait son maximum 3 jours après l'injection, et restait stable 4 jours après, soit 7 jours après l'injection. A 3 jours post-infusion, les CSM étaient également détectables au niveau de la peau, des glandes salivaires et de l'intestin grêle. Elles étaient en revanche absentes du rein et très peu nombreuses dans le foie et la moelle osseuse. Dans notre laboratoire, François *et al* ont quant à eux décrit une migration des CSM vers le poumon, la moelle osseuse et les muscles chez la souris saine. Les cellules n'étaient cependant que très faiblement présentes au sein de ces organes et étaient indétectables dans le reste de l'organisme (Francois et al. 2006). Enfin, l'étude de Devine *et al* menée chez le singe a quant à elle montré que les CSM injectées à un animal immunocompétent s'implantent dans des tissus non hématopoïétiques, et notamment le tractus gastro-intestinal (colon, estomac, duodénum, iléon, pancréas, foie) (Devine et al. 2003).

La thérapie cellulaire étant utilisée à des fins thérapeutiques, la distribution des CSM dans le corps suite à leur administration par voie intraveineuse a de ce fait été particulièrement étudiée en conditions non plus physiologiques mais pathologiques. De nombreuses études ont ainsi démontré la capacité des CSM exogènes à migrer vers un site lésionnel suite à leur injection par voie sanguine. Cette migration a pu être démontrée dans de nombreux modèles

pathologiques affectant divers tissus et organes, prouvant l'affinité des CSM non pas pour un tissu donné mais pour les organes endommagés. Différentes équipes ont ainsi réussi à détecter les CSM injectées par voie systémique dans le cerveau (Chen et al. 2001), le cœur (Nagaya et al. 2004), les poumons (Ortiz et al. 2003), la moelle osseuse (Horwitz et al. 2002) ou encore les reins (Hauger et al. 2006) lorsque ces organes avaient subi des dommages.

Les CSM exogènes utilisées en thérapie cellulaire semblent donc capables de sortir de la circulation sanguine et de migrer vers les tissus lésés afin de potentiellement participer à leur régénération, tout comme les cellules endogènes de la moelle osseuse. Cependant, le faible nombre de cellules exogènes retrouvées au sein de ces tissus a amené un grand nombre d'équipes à chercher à comprendre les mécanismes sous-jacents à cette migration afin de pouvoir améliorer le recrutement des CSM au sein des organes lésés et/ou inflammés.

Mécanismes impliqués dans le homing des CSM

Le homing est défini comme étant le processus par lequel les cellules migrent vers, et s'implantent dans, le tissu dans lequel elles peuvent exercer localement des effets fonctionnels. Ce terme s'applique donc à toute cellule se déplaçant d'un tissu à un autre, que ce soit une cellule souche ou une cellule sanguine circulante de type leucocyte.

Les mécanismes par lesquels les cellules immunitaires sont conduites vers les sites lésionnels sont très étudiés et relativement bien décryptés. En revanche, la migration des cellules progénitrices et des cellules souches, endogènes ou exogènes, vers les sites ischémiques ou lésionnels reste moins bien comprise.

Le homing des leucocytes implique une cascade de quatre événements (Voir figure 11):

- 1- **L'initiation** grâce aux interactions d'adhérence ayant lieu entre les cellules circulantes et l'endothélium vasculaire du tissu cible ;
- 2- **L'activation** du phénomène d'adhérence des intégrines via un signal de type chémokine ;
- 3- **L'adhésion** solide des leucocytes à l'endothélium ;
- 4- **L'extravasation** des cellules adhérentes à l'intérieur des tissus cibles.

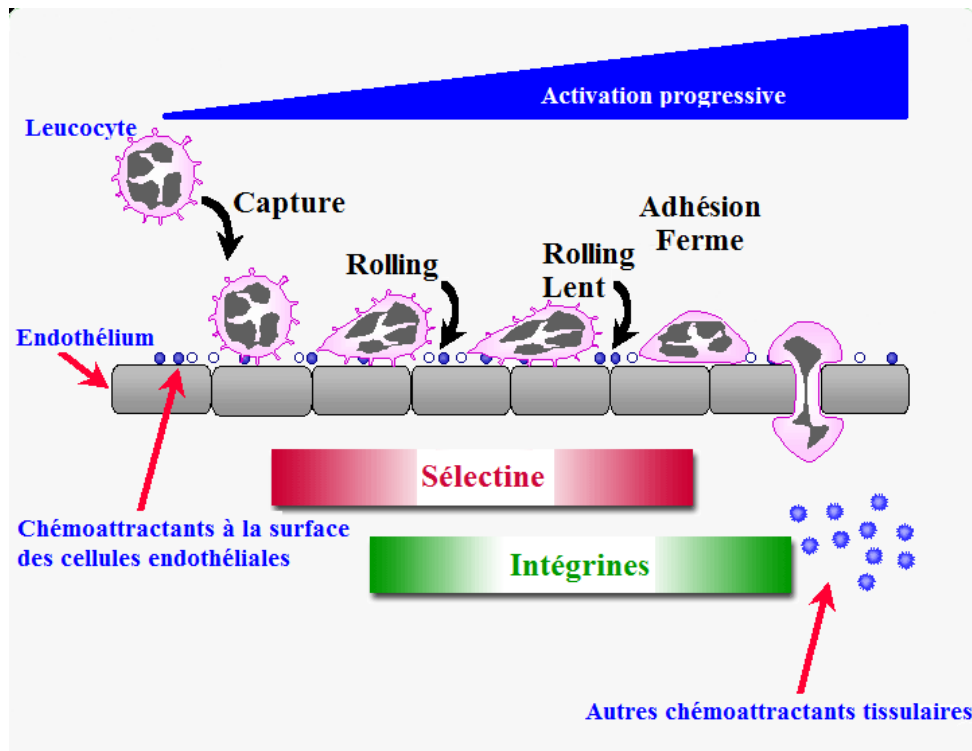


Figure 11 : Représentation schématique du homing leucocytaire

Les études cherchant à comprendre les mécanismes régissant la migration des cellules souches se sont focalisées sur la recherche de similitudes entre leur homing et celui des leucocytes. Ainsi, Chute *et al* ont pu démontrer que les mécanismes soutenant la migration des CSH des vaisseaux sanguins vers les tissus environnant sont très similaires à ceux impliqués dans la migration leucocytaire (Chute 2006). La capacité des CSM à migrer vers les sites lésionnels étant reconnue, l'existence d'un mécanisme similaire à celui des leucocytes et des CSH s'est rapidement imposée.

L'expression des molécules d'adhésion à la surface des cellules représente un point critique du homing, puisque ce sont elles qui vont permettre aux cellules de migrer vers leurs tissus cibles et d'y adhérer à la matrice extracellulaire afin de s'y implanter durablement. Le homing des leucocytes et des CSH au niveau des sites inflammatoires en réponse aux stimuli inflammatoires est ainsi entièrement dépendant de l'expression de molécules d'adhésions telles que les intégrines et les sélectines. L'expression de molécules d'adhésion à la surface des CSM a donc été évaluée, et différentes études ont pu montrer qu'elles expriment bien à leur surface des intégrines, ainsi que les récepteurs aux chémokines nécessaires à la

perception du signal inflammatoire à l'origine du déclenchement de leur migration (Brooke et al. 2008) (De Ugarte et al. 2003).

Implication de l'interaction Intégrine $\alpha4/\beta1$ -VCAM-1 : Le homing des leucocytes et des CSM dépend des molécules exprimées à leur surface mais également de celles exprimées à la surface des cellules endothéliales. Leur migration repose en effet sur les interactions entre les molécules d'adhésions présentes à la surface des cellules migrantes, telle que l'intégrine $\alpha4/\beta1$, avec celles présentes sur les cellules endothéliales, telle que VCAM-1 (Springer 1990). Segers *et al* ont démontré que le blocage de VCAM-1 par un anticorps bloquant permet d'inhiber l'adhésion des CSM de rat aux cellules endothéliales, démontrant ainsi l'implication de VCAM-1 (Vascular Cell Adhesion Molecule 1) dans la migration des CSM (Segers et al. 2006). En outre, les CSM présentes dans la moelle osseuse sont positives pour $\alpha4/\beta1$, et Ip *et al* ont démontré que le blocage de $\beta1$ induit une diminution du nombre de CSM recrutées au sein du myocarde après un infarctus (Ip et al. 2007). Ruster *et al* ont quant à eux démontré l'implication de ces deux molécules dans l'adhésion des CSM aux cellules endothéliales en montrant que l'inhibition de l'une ou l'autre inhibe le processus d'adhésion des CSM aux cellules endothéliales (Ruster et al. 2006).

Rôle de SDF1 dans le guidage des CSM aux sites lésionnels : Le Stromal Cell-Derived Factor 1 (SDF-1), aussi appelé CXCL12, est une petite cytokine chimiotactique connue pour activer les leucocytes, et dont la production est induite par des signaux inflammatoires tels que le $TNF\alpha$ ou l'IL-1 (Fedyk et al. 2001). L'augmentation de sa synthèse au niveau des sites lésionnels a par ailleurs été démontrée dans de nombreux modèles tels que les lésions de la peau (Toksoy et al. 2007) et du cerveau (Cui et al. 2007) ou encore l'infarctus du myocarde (Askari et al. 2003). Le récepteur de cette chémokine, CXCR4, est quant à lui exprimé par les CSM (Honczarenko et al. 2006). Dans un modèle d'infarctus du myocarde, Abbott *et al* ont démontré que l'administration d'un antagoniste spécifique de CXCR4 inhibe significativement la migration des CSM vers le site de l'infarctus. A l'inverse, ils ont également démontré qu'une surproduction de SDF-1 au sein du myocarde permet d'augmenter significativement la quantité de CSM qui y sont recrutées (Abbott et al. 2004). L'impact d'un prétraitement par un antagoniste de CXCR4 a également été démontré dans le cas de l'ischémie cérébrale (Wang et al. 2008). L'expression de CXCR4 par les CSM a quant à elle montré son importance dans la régulation de l'adhésion des CSM aux cellules

endothéliales (Wynn et al. 2004). Enfin, SDF-1 est également un « facteur de rétention » qui assure une présence suffisamment longue des cellules CXCR4 positives afin qu'elles puissent participer à la réparation des tissus lésés (Grunewald et al. 2006). Les molécules impliquées dans le recrutement des CSM au niveau des sites lésionnels ne se limitent pas à SDF-1. Ponte *et al* ont en effet montré que la capacité migratoire des CSM est sous le contrôle d'un large panel de molécules telles que les facteurs de croissance PDGF (Platelet-Derived Growth Factor) et IGF-1 (Insulin Like Growth Factor 1) et les chémokines CCR2, CCR3, CCR4 ou CCL5 (Ponte et al. 2007).

Interaction avec les métalloprotéinases matricielles : Une fois les cellules arrivées par voie sanguine au niveau du site lésé, leur passage au sein du tissu nécessite leur extravasation du vaisseau vers le tissu. Schmidt *et al* ont démontré que les CSM possèdent la capacité de traverser la barrière endothéliale (Schmidt et al. 2006). Cette migration repose sur la balance entre les métalloprotéinases matricielles (MMP) activées, qui vont dégrader la membrane des vaisseaux et ainsi permettre l'extravasation des CSM de la même manière que pour les leucocytes, et les inhibiteurs tissulaires de métalloprotéinases (TIMPS), qui inactivent les MMP et inhibent donc l'extravasation des cellules (Kasper et al. 2007). Cette implication des MMP et des TIMP a été démontrée par l'utilisation d'animaux knock-out (KO) qui ont permis de constater que l'inhibition de MMP-2, de MT1-MMP ou de TIMP-2 diminue fortement l'invasion tissulaire par les CSM, alors que l'extinction de TIMP-1 augmente la migration cellulaire (Ries et al. 2007). Enfin, les cytokines inflammatoires telles que l'IL1 β , le TGF- β 1 (Transforming Growth Factor β 1) et le TNF α augmentent la production de MMP-2, MT1-MMP et MMP-9, ce qui permettrait de créer un environnement favorable à la migration cellulaire et au remodelage vasculaire et tissulaire (Ries et al. 2007).

2.5.2. Différenciation et transdifférenciation

Outre leur migration vers les sites lésés, les CSM ont également prouvé leur capacité à se différencier en de nombreux types cellulaires *in vitro*. La capacité des CSM à réparer les lésions pourrait donc, selon l'organe lésé, être en partie due à leur différenciation en cellules du tissu afin de remplacer les cellules détruites. La compréhension de ces phénomènes de différenciation et de transdifférenciation permettrait de favoriser une différenciation ciblée afin de potentialiser les effets bénéfiques des thérapies à base de CSM.

La différenciation des CSM en cellules spécifiques des tissus lésés a été évaluée dans différents modèles. Plusieurs équipes ont ainsi montré leur capacité à se différencier en différents types de cellules épithéliales suite à leur administration *in vivo*. Les équipes d'Ortiz, de Kotton et de Rojas ont montré que les CSM sont capables de se différencier en différents types cellulaires composant les poumons, tels que les pneumocytes de type I et II (Ortiz et al. 2003) (Kotton et al. 2001) (Rojas et al. 2005). Outre les cellules pulmonaires, les CSM ont également prouvé leur capacité à remplacer les cellules lésées au niveau de la peau (Nakagawa et al. 2005), des glandes sébacées (Fu et al. 2006), de la rétine (Arnhold et al. 2007) ou encore des tubules rénaux (Herrera et al. 2004).

La capacité des CSM à se différencier *in vivo* est également particulièrement visible dans le cadre de la réparation des dommages vasculaires et cardiaques. En effet, plusieurs études ont réussi à démontrer que les CSM sont capables de se différencier efficacement en cardiomyocytes, en cellules musculaires lisses ou encore en cellules endothéliales, qui sont tous des types cellulaires indispensables au bon fonctionnement cardiaque (Gojo et al. 2003). Enfin, Kopen *et al* ont quant à eux montré que des CSM injectées dans le système nerveux central de souris nouveau-nés migrent dans le cerveau et y adoptent une morphologie et des caractéristiques phénotypiques d'astrocytes et de neurones (Kopen et al. 1999).

Malgré les résultats obtenus dans les études précédemment citées, la réalité de la transdifférenciation des CSM *in vivo* reste discutée, aussi bien en ce qui concerne leur différenciation en cellules neurales qu'en cardiomyocytes. Les équipes remettant en cause cette transdifférenciation *in vivo* se basent sur différents critères. Tout d'abord, Blandini *et al* ont montré que les CSM cultivées *in vitro* expriment spontanément des marqueurs de cellules neurales, telles que la Nestine, GAP-43, la Tubuline III ou encore MAP-2 (Blandini et al. 2010). Certaines études remettent également en cause les méthodes utilisées afin de statuer sur la différenciation des cellules, tels que Dai *et al* qui ont remis en question l'utilisation de la protéine α -SMA (α -Smooth Muscle Actin) comme marqueur de la différenciation des CSM en cardiomyocytes (Dai et al. 2005).

Enfin, de nombreuses équipes ont pu observer un bénéfice suite à l'utilisation de CSM sans pour autant être en mesure d'apporter une preuve de leur persistance à long terme au sein des lésions. Ainsi, les enfants traités pour leur ostéogenèse imparfaite ont montré un net bénéfice suite au traitement bien que moins d'un pourcent des CSM administrées se soient intégrées au

sein de l'organisme des receveurs (Horwitz et al. 2002). En outre, Iso *et al* ont quant à eux constaté une amélioration de la fonction cardiaque suite à l'injection de CSM dans leur modèle d'infarctus du myocarde, et ce malgré l'absence d'implantation des CSM 3 semaines après l'injection (Iso et al. 2007).

Cette très faible présence à moyen terme des CSM au sein de leurs tissus cibles pousse de nombreuses équipes à penser que l'action bénéfique des CSM sur la régénération tissulaire serait majoritairement indépendante des mécanismes de transdifférenciation.

2.6. Effets trophiques paracrines

Le faible nombre de CSM retrouvé sur les sites lésionnels a amené les chercheurs à envisager un effet indirect des CSM via une synthèse de facteurs trophiques (Caplan et al. 2006).

Des études *in vitro* ont en effet démontré que les CSM sont capables de sécréter une large variété de facteurs angiogéniques, mitogènes et anti-apoptotiques, tels que le VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor), l'HGF (Hépatocyte Growth Factor), l'angiopoïétine-1 et l'IGF-1 (Kinnaird et al. 2004) (Nagaya et al. 2005). Plusieurs études ont en outre montré que l'utilisation de milieu conditionné, c'est-à-dire le milieu de culture dans lequel les CSM ont été cultivées, permet d'augmenter la prolifération et la migration des cellules endothéliales, et des cellules musculaires lisses *in vitro* de la même façon que lors d'une mise en contact direct avec les CSM (Kinnaird et al. 2004) (Korf-Klingebiel et al. 2008). Ces études ont en outre montré que l'ajout d'anticorps bloquant le VEGF ou le FGF aux cultures inhibe cet effet pro-angiogénique, suggérant une implication de ces deux molécules dans cet effet paracrine des CSM. La figure 12 résume les facteurs trophiques sécrétés *in vitro* par les CSM ainsi que leur participation aux différents processus impliqués dans la régénération tissulaire.

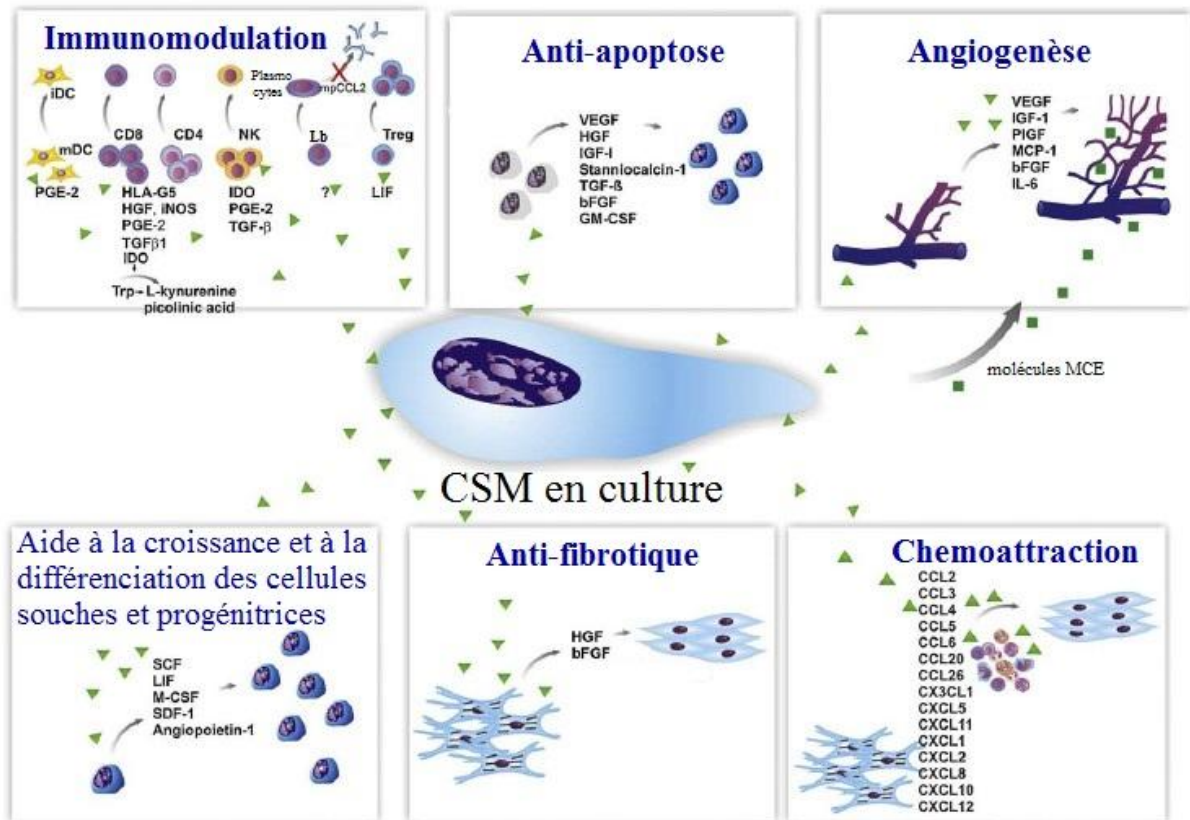


Figure 12 : Molécules trophiques sécrétées par les CSM et leur participation aux différents processus impliqués dans la régénération tissulaire (d'après (Meirelles Lda et al. 2009))

L'importance des molécules sécrétées par les CSM a également été étudiée *in vivo*. Parekkadan *et al* ont ainsi démontré que la connexion du contenu de bioréacteurs servant à la culture de CSM avec la circulation sanguine de rats souffrant d'insuffisance hépatique fulgurante permet de faire passer leur taux de survie de 14 à 71% (Parekkadan et al. 2007). Les molécules sécrétées par les CSM jouent également un rôle dans leur effet pro-angiogénique. Dans leur étude portant sur l'ischémie du membre, Kinnaird *et al* ont en effet démontré que le milieu conditionné de CSM contient des molécules pro-angiogéniques telles que le bFGF, le VEGF, le PlGF (placental growth factor) ou encore MCP-1 (Monocyte Chemoattractant Protein 1). Ils ont en outre démontré la présence *in vivo* et *in situ* de VEGF et de βFGF aux alentours des CSM implantées au niveau de la lésion (Kinnaird et al. 2004). De leur côté, Hung *et al* ont quant à eux démontré que le milieu conditionné de CSM contient de grandes quantités de facteurs pro-angiogéniques et anti-apoptotiques tels que l'IL-6, le VEGF et MCP1, et que ces molécules sont à l'origine de l'inhibition de la mort des cellules

endothéliales normalement provoquée par la culture en conditions hypoxiques de ces cellules (Hung et al. 2007). Enfin, les CSM ont également prouvé leur capacité à produire des molécules constituant la matrice extracellulaire, qui forment un substrat indispensable à la bonne croissance des cellules endothéliales (Sorrell et al. 2009). L'effet neuro-protecteur des CSM semble également, du moins en partie, dû à la production de facteurs trophiques tels que le BDNF (brain-derived neurotrophic factor), le NGF (nerve growth factor) et l'IGF1, qui sont tous impliqués dans la restauration des fonctions neuronales (Wilkins et al. 2009) (Wakabayashi et al. 2010). Enfin, l'étude menée par Leroux et al a montré une implication de la sécrétion de Wnt4 par les CSM dans l'amélioration de la régénération des fibres musculaires et du système vasculaire lors du traitement d'une ischémie du membre (Leroux et al. 2010).

De nombreux autres facteurs trophiques sont sécrétés par les CSM, notamment des molécules impliquées dans la régulation des processus inflammatoires. Ces molécules permettant aux CSM de moduler l'inflammation, ainsi que l'immunité en générale, sont donc fortement impliquées dans la dernière capacité intrinsèque des CSM : la modulation des processus immunologiques. Cette régulation immunitaire serait, tout comme leur action trophique, fortement impliquée dans la plupart des effets bénéfiques observés suite à un traitement par CSM.

3. Cellules Stromales Mésoenchymateuses et immunité

3.1. Physiologie de l'inflammation

3.1.1. Rôle physiologique

L'inflammation, ou réaction inflammatoire, est la réponse la plus fréquente des tissus vascularisés face à une agression. L'inflammation est un processus normalement bénéfique dont le but est d'éliminer les agents pathogènes et de permettre la réparation des lésions tissulaires. Les causes de l'inflammation sont multiples, et regroupent notamment les contaminations par des micro-organismes (bactéries, virus, parasites), les lésions dues aux agents physiques (traumatisme, chaleur, froid, irradiation) et chimiques (toxines, venins), la présence de corps étrangers, les nécroses dues à un défaut de vascularisation ou encore les

dérèglements immunitaires (allergies, maladies auto-immunes). Dans les cas où la cause de l'inflammation n'est pas un pathogène viral ou bactérien mais un stimulus particulière (particule toxique, allergène) ou endogène (réaction auto-immune) on parle d'inflammation stérile.

Deux grands types d'inflammations sont définis en fonction de leur durée :

Inflammation aiguë : il s'agit de la réponse immédiate à un agent agresseur. Elle se met en place très rapidement et est de courte durée, de quelques jours à quelques semaines. Elle est principalement caractérisée par un important infiltrat de cellules inflammatoires au niveau du site lésionnel. Le plus souvent, l'inflammation aiguë se résout de façon spontanée et ne laisse que très peu de séquelles tissulaires.

Inflammation chronique : il s'agit d'une inflammation qui persiste, évolue, et parfois s'aggrave, pendant plusieurs mois ou plusieurs années.

3.1.2. Déroulement normal de l'inflammation

La réaction inflammatoire normale est un processus dynamique faisant intervenir différents types cellulaires, les vaisseaux, la matrice extracellulaire ainsi que de nombreux médiateurs moléculaires, qui vont soit entretenir soit diminuer la réaction. Quels que soient le siège et la nature de l'agression qui en est à l'origine, le déroulement d'une réaction inflammatoire présente des caractères morphologiques généraux et des mécanismes communs. Trois phases inflammatoires sont définies chronologiquement suite à la pénétrance d'un pathogène au sein de l'organisme (voir figure 13).

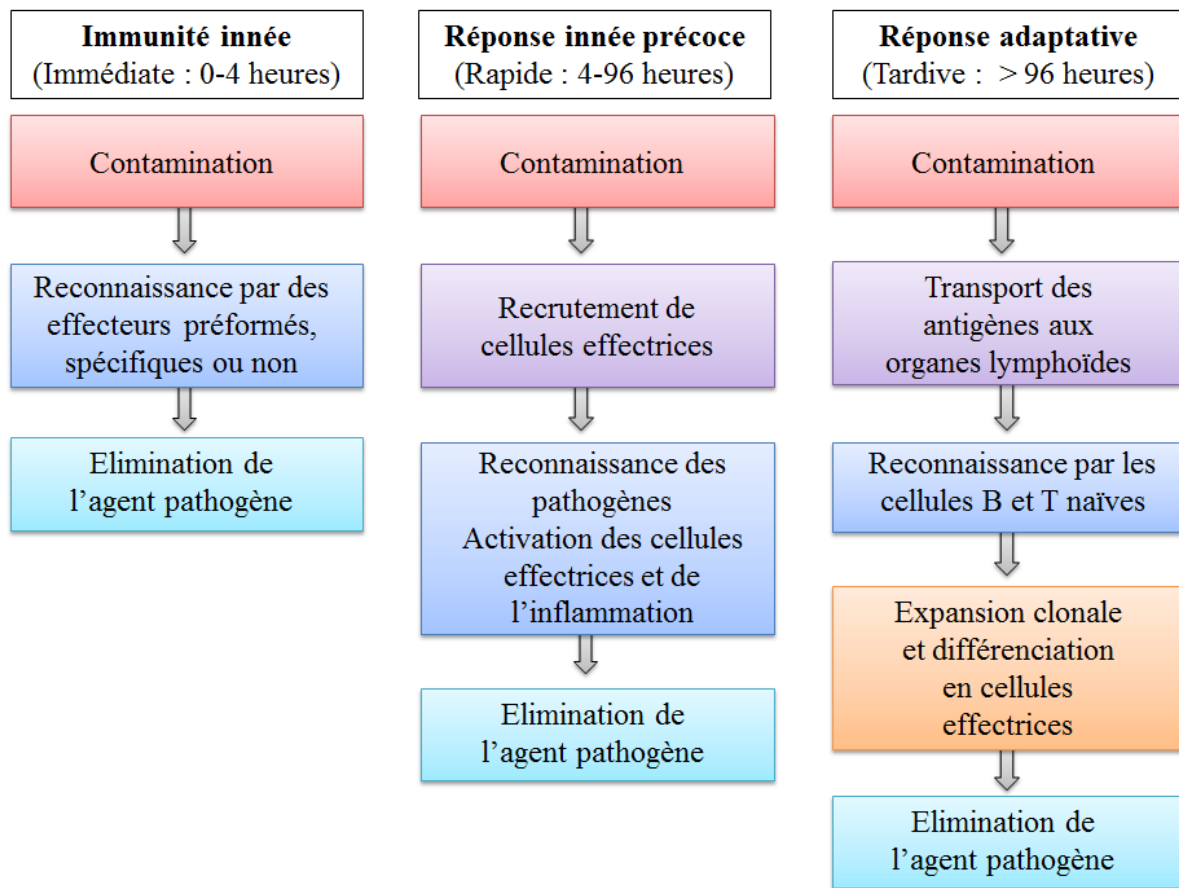


Figure 13 : Chronologie des phases inflammatoires (D'après Immunobiology, Charles A Janeway et al, 7^{ème} édition, 2011)

Le but de l'inflammation est de diriger les molécules sériques et les cellules du système immunitaire vers le site de la lésion tissulaire. La réaction peut se décomposer en trois éléments : la **vasodilatation** pour permettre l'augmentation du flux sanguin, l'**augmentation de la perméabilité** des capillaires sanguins de la zone infectée afin de permettre l'infiltration cellulaire et l'exsudat moléculaire et enfin la **migration** des cellules immunitaires depuis le flux sanguin vers le tissu lésé.

Bien que présentant toujours des caractéristiques générales, les différentes étapes de la réaction inflammatoire vont cependant s'adapter à la nature de l'agent pathogène, à l'organe où elle se déroule ainsi qu'au terrain physiologique de l'hôte. Ce sont tous ces éléments qui vont conditionner l'intensité et la durée de la réaction inflammatoire ainsi que l'aspect lésionnel résiduel. La figure 14 schématise le déroulement du processus inflammatoire ainsi que les issues possibles suite au déclenchement d'un tel processus.

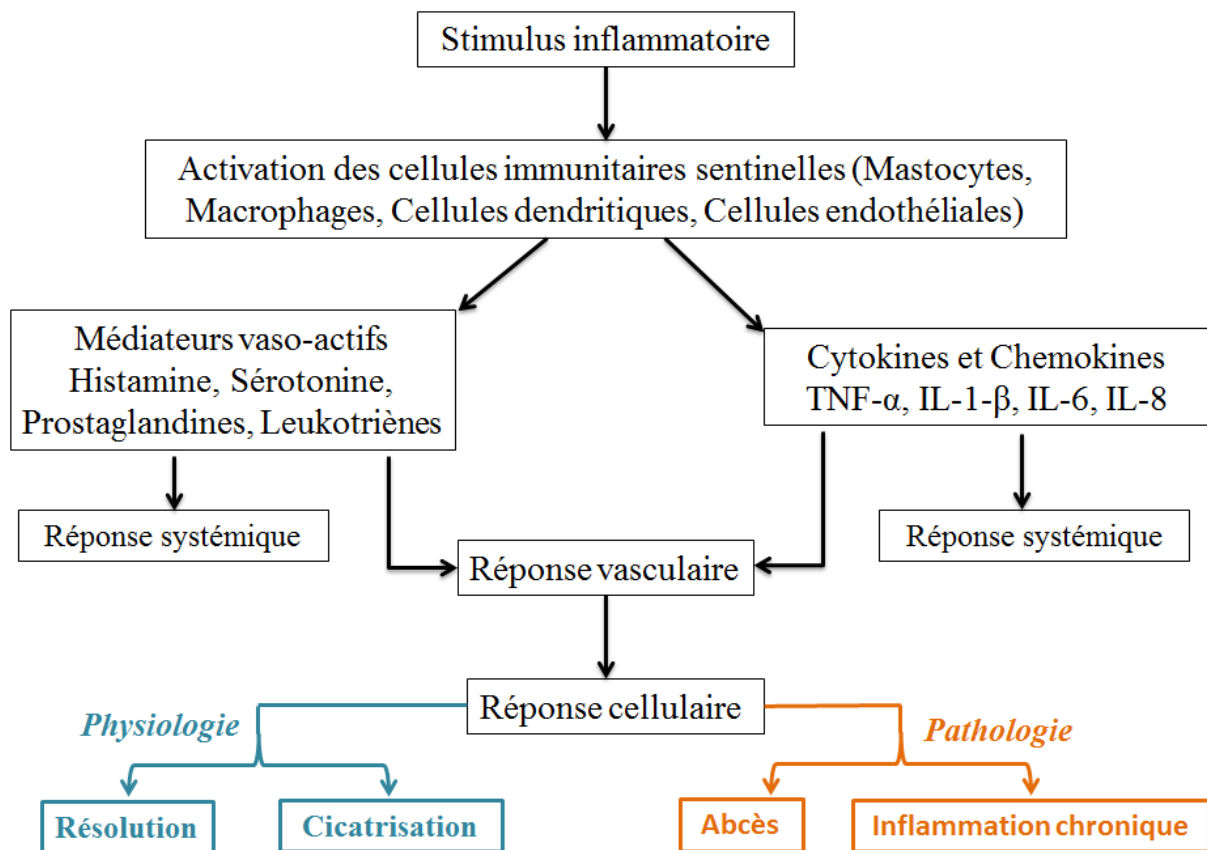


Figure 14 : Déroulement de l'inflammation. Le stimulus inflammatoire, qu'il soit endogène ou exogène, active les cellules immunitaires et vasculaires qui vont libérer divers médiateurs inflammatoires. Ces médiateurs vont induire une réponse vasculaire locale (augmentation du flux sanguin, dilatation et augmentation de la perméabilité capillaire) qui va aboutir à une exsudation de plasma et de protéines plasmatiques dans les tissus environnants. La réponse cellulaire qui se met en place par la suite est initiée par le recrutement des neutrophiles suite à leur diapédèse hors des vaisseaux sanguins. Les neutrophiles ainsi recrutés vont détruire la cause de l'inflammation par phagocytose. Quatre issues existent pour l'inflammation. Si la résolution et la cicatrisation aboutissent à un retour à des conditions physiologiques, la formation d'un abcès en cas d'infection ainsi que l'évolution vers une inflammation chronique maintiennent l'organisme en conditions pathologiques.

3.2. Les médiateurs de l'inflammation

3.2.1. Les cellules impliquées dans l'inflammation

D'une façon générale, on distingue deux grandes familles de cellules immunitaires intervenant de façon complémentaire dans les réponses inflammatoires :

L'immunité innée, également dite « non-spécifique », qui comprend notamment les barrières naturelles entre l'organisme et le milieu extérieur comme la peau et les muqueuses. Ce système de défense induit une réponse cellulaire rapide dirigée contre des antigènes communs à un large spectre de pathogènes. Cette réaction va faire intervenir les cellules épithéliales et vasculaires afin de permettre la sécrétion de médiateurs pro-inflammatoires, mais également les cellules immunitaires spécialisées dans la phagocytose (neutrophiles, macrophages, cellules dendritiques) afin d'éliminer les bactéries ainsi que les cellules infectées. La réponse innée repose principalement sur l'activation de récepteurs reconnaissant des motifs moléculaires : les PRR (Pattern Recognition Receptor). Parmi les motifs reconnus par ces récepteurs, on trouve des constituants de pathogènes tels que les bactéries et les virus qui sont regroupés sous le terme de PAMP (Pathogen Associated Molecular Pattern). En dehors des PAMP, certaines protéines libérées lors de dommages cellulaires, appelées Alarmines ou DAMP, sont également reconnues par certains PRR. Des protéines telles que les Heat Shock Proteins (HSP) ou encore un grand nombre de protéines associées à l'ADN font partie des DAMPs (Schaue et al. 2010). Les PRR les plus connus sont les TLR qui reconnaissent spécifiquement certains motifs présents à la surface de diverses familles de pathogènes telles que les bactéries, les virus ou encore les parasites. Les TLRs jouent un rôle déterminant dans la réponse inflammatoire innée et sont exprimés par de nombreuses cellules intestinales dont les cellules épithéliales, les cellules immunitaires résidentes et les cellules endothéliales. Alors que la réponse cellulaire innée est rapide et n'entraîne pas de réponse mémoire, la réponse spécifique est plus longue à se mettre en place lors du premier contact avec le pathogène.

L'immunité adaptative fait intervenir une réponse cellulaire spécifique pour un antigène donné. On y distingue la réponse humorale, assurée par les lymphocytes B, qui vise à bloquer l'action des pathogènes et à faciliter leur élimination par le biais d'anticorps spécifiques, et la réponse cytotoxique, assurée par les lymphocytes T, qui vise à éliminer les cellules infectées (porteuses de l'antigène du pathogène) et à faciliter leur destruction. La réponse immune adaptative nécessite la présentation aux lymphocytes B et T d'antigènes dérivés de l'agent pathogène par des cellules spécialisées, dites cellules présentatrices d'antigènes (CPA), parmi lesquelles les cellules dendritiques et les macrophages. La reconnaissance de l'antigène pathogénique permet de sélectionner les cellules immunocompétentes et induit de leur prolifération clonale, i.e. leur multiplication à l'identique, afin de permettre une lutte efficace contre le pathogène reconnu. Cette

reconnaissance spécifique permet d'offrir une réponse adaptée à un pathogène précis ne pouvant être contenu par la seule réponse innée. La réponse immune adaptative permet également de générer des cellules mémoires spécifiques du pathogène qui, grâce à leur durée de vie longue, permettront la mise en place d'une réponse plus rapide lors d'un second contact avec lui. Les deux mécanismes de défense sont complémentaires.

Toutes les cellules du système immunitaire vont pouvoir être amenées à prendre part à la réaction inflammatoire. Les cellules de l'immunité innée constituent ainsi les premières défenses contre l'invasion pathogénique, et vont de ce fait intervenir précocement dans le processus inflammatoire. Les cellules de l'immunité adaptative vont quant à elles intervenir de façon plus tardive suite à leur recrutement par les molécules sécrétées par le tissu lésé et par les cellules de l'immunité innée. Le tableau 5 reprend les fonctions et les sécrétions cytokiniques de chaque cellule immunitaire au cours du processus inflammatoire.

Cellules	Rôle dans l'inflammation	Molécules sécrétées
Cellules de l'immunité innée		
Polynucléaires neutrophiles	Phagocytose et destruction des pathogènes (bactériens et viraux) Recrutement des cellules immunitaires	IL-1 β , IL-1RA, TNF- α , IL-8, MIP-1 α et β , MIP-2, Leucotriène B4, Prostaglandine E2
Monocytes / Macrophages	Phagocytose des pathogènes Présentation antigénique aux cellules de l'immunité adaptative Elimination des corps apoptotiques Recrutement des cellules immunitaires	TNF- α , IL-1 β , IFN α et β , IL-6, IL-10
Natural Killer	Destruction des cellules anormales Recrutement des cellules immunitaires	IFN- γ , TNF- α , GM-CSF, MIP-1 α , RANTES, IL-10
Cellules de l'immunité adaptative		
Lymphocytes B	Neutralisation des agents pathogènes Présentation antigénique Elimination des corps apoptotique par opsonisation	Anticorps TNF α , IFN γ , IL-12, IL-4, IL-6, IL-10
Lymphocytes T auxiliaires (CD4)	Coordination de la réponse immunitaire	IL-2, IFN- γ , IL-12, IL-4, IL-5, IL-13, IL-17, IL-10
Lymphocytes T cytotoxiques (CD8)	Elimination des cellules infectées par lyse enzymatique	Perforine, Granzyme IFN- γ , TNF- α

Tableau 5 : Cellules immunitaires et leur rôle dans le processus inflammatoire

La mise en œuvre de la réponse innée permet d'apporter une réponse inflammatoire rapide tout en favorisant la mise en place d'une réponse spécifique plus tardive médiée par les lymphocytes T, éléments clés de la réponse immune adaptative.

On distingue 2 grands groupes de lymphocytes T :

- Les lymphocytes T CD4, dits auxiliaires ou *helpers*, qui contribuent au développement de la réponse immune en activant d'autres types cellulaires (macrophages, lymphocytes B), principalement via la sécrétion de cytokines.
- Les lymphocytes T CD8, dits cytotoxiques, qui sont capables de provoquer la lyse des cellules qu'elles reconnaissent via le système perforine-granzyme.

Quatre polarisations théoriques des lymphocytes T auxiliaires sont définies et dénommées Th1 (T helper 1), Th2, Th17 et T régulateurs (Treg). Ces polarisations sont acquises par les lymphocytes naïfs, appelés Th0, sous l'influence de cytokines spécifiques. Chaque polarisation est caractérisée par l'activation de facteurs de transcription, l'expression des récepteurs de certaines chémokines, la production d'une cohorte de cytokines, l'activation de cellules partenaires et le développement d'une réponse immunitaire spécifique. Ces polarisations peuvent coexister dans l'inflammation tissulaire mais s'inhibent généralement les unes les autres (Zhu et al. 2010).

La polarisation **Th1** aboutit à la stimulation des macrophages en augmentant leur production d'IL-12, contribuant ainsi à l'auto-entretien de cette polarisation. Cette orientation est particulièrement impliquée dans l'élimination des pathogènes intracellulaires tels que les virus et certaines bactéries. Les cellules Th1 ont également été impliquées dans le développement des maladies auto-immunes.

La polarisation **Th2** va principalement stimuler l'immunité humorale via l'activation des lymphocytes B, et ainsi permettre de lutter contre certains vers parasites et certaines bactéries. D'un point de vue pathologique, les cellules orientées Th2 sont impliquées dans le développement de la réponse allergique.

La polarisation **Th17** participe au recrutement des neutrophiles et à l'activation des cellules épithéliales. Elle est fortement impliquée dans la lutte contre les bactéries extracellulaires et contre certains champignons. Tout comme les lymphocytes Th1, les lymphocytes Th17 participent au développement de pathologies auto-immunes.

Les lymphocytes **T régulateurs** sont particulièrement importants pour le maintien d'une immunotolérance. Leur sécrétion de cytokines anti-inflammatoires telles que le TGF- β et l'IL-10 inhibe le développement et l'activation des lymphocytes de type Th1 et Th17.

Les caractéristiques des principales polarisations des lymphocytes T CD4+ sont réunies dans le tableau suivant.

Polarisation Caractéristiques	Th1	Th2	Th17	Treg
Induite par	IL-12 IFN γ	IL-4	TGF- β , IL-6, IL-23	TGF- β , IL10
Facteurs de transcription associés	T-bet	GATA 3	ROR γ t	FOXP3+ FOXP3-
Principales Cytokines sécrétées	INF- γ TNF- α IL-2, 1, 6, 12, 18	IL-10 IL-4 IL-5 IL-6 IL-13	IL-17 IL-21, 22 IL 26	TGF- β IL-10
Principales cellules Activées	Macrophages	Lymphocytes B	Neutrophiles	TH1/TH17

Tableau 6 : Caractéristiques des principales polarisations des lymphocytes T CD4+ (d'après (Zhu et al. 2010)).

Suite à l'activation de la réponse immunitaire adaptative, l'environnement cytokinique produit par les lymphocytes T va induire une polarisation différentielle des macrophages. Reflétant la nomenclature Th1/Th2, la polarisation des macrophages a été divisée en deux sous-types : les **macrophages M1**, pro-inflammatoires, induits par les cytokines de type Th1 (IFN- γ et TNF- α) et les **macrophages M2**, anti-inflammatoires, induits par les cytokines de type Th2 (IL-4 et IL-13) (Mantovani et al. 2005; Mantovani et al. 2007).

3.2.2. Les médiateurs chimiques de l'inflammation

De multiples médiateurs chimiques, issus du plasma ou produits par les cellules inflammatoires, sont impliqués à tous les stades de l'inflammation. Les médiateurs plasmatiques sont généralement présents dans le plasma sous forme de précurseurs qui devront être activés afin d'acquérir leurs propriétés. Les médiateurs d'origine cellulaire sont quant à eux soit formés lors de la réception d'un stimulus inflammatoire par les cellules productrices, soit préformés et stockés dans des granules intracellulaires dont le contenu sera libéré lors de la réaction inflammatoire. C'est notamment le cas des médiateurs contenus dans les granules des polynucléaires neutrophiles.

Médiateurs d'origine plasmatique

Trois systèmes plasmatiques interdépendants sont connus pour intervenir lors du processus inflammatoire : le système du complément, le système des kinines et le système de la coagulation.

Le système du complément : le complément est un ensemble de protéines plasmatiques (35 sont connues à l'heure actuelle) se trouvant à l'interface entre l'immunité innée et l'immunité acquise. Douze de ces molécules sont directement impliquées dans la lutte contre les pathogènes, alors que les autres molécules du système servent à les réguler finement afin d'éviter l'apparition de réactions aspécifiques ou auto-immunes. La figure 15 reprend les différentes voies d'activation du complément ainsi que le processus de formation du complexe d'attaque membranaire, indispensable à la lyse des agents microbiens.

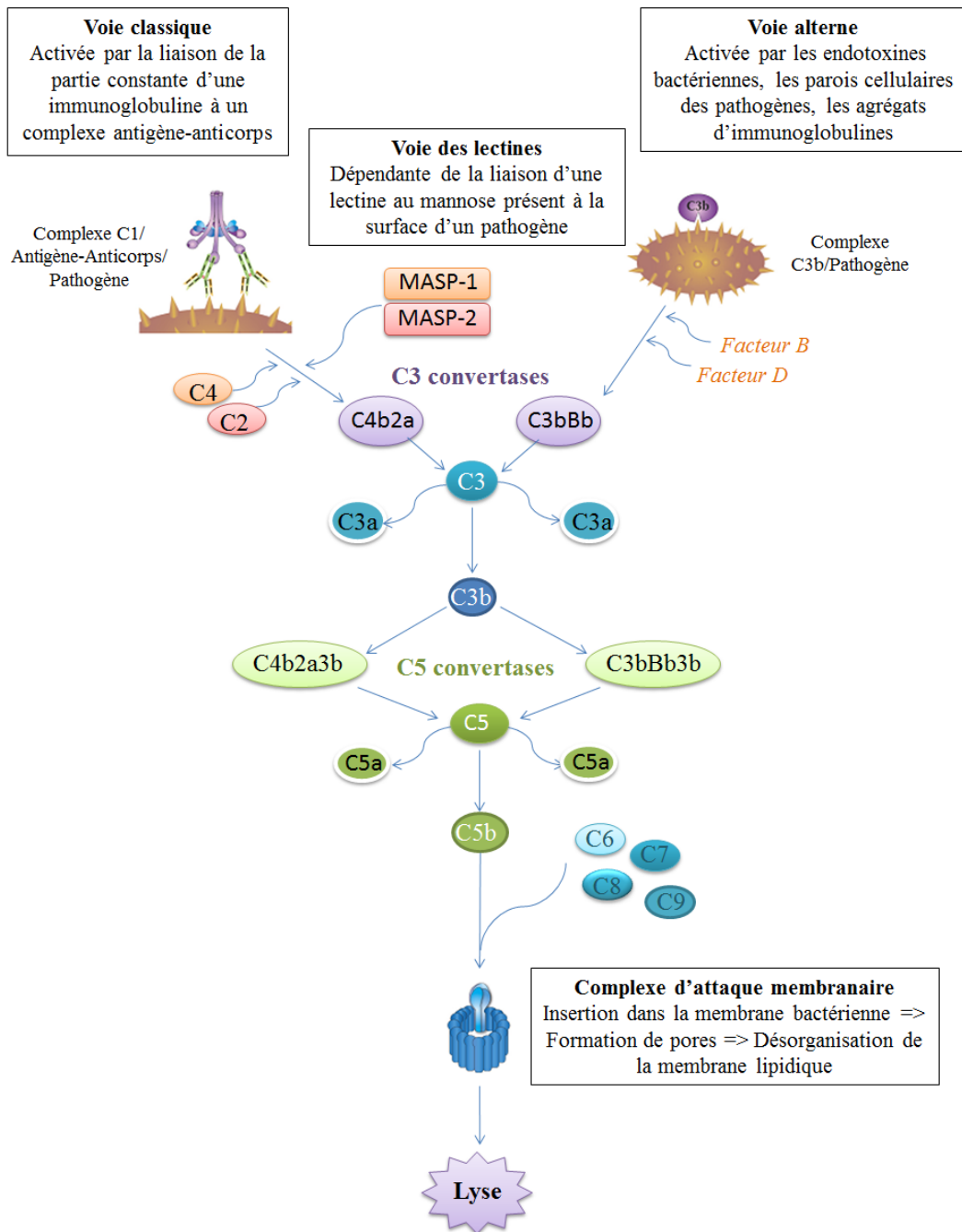


Figure 15 : Les différentes voies d'activation du complément. La voie classique est activée par la liaison du C1q aux complexes antigène-anticorps alors que la voie alterne est activée par la liaison du C3b aux motifs membranaires bactériens. La voie des lectines est activée par la reconnaissance de résidus mannose présents à la surface des micro-organismes par une lectine spécifique des mannanes (MBL, mannose-binding lectin). Cette liaison permet d'activer deux sérines protéases (MASP1 et MASP2), qui vont cliver C4 et C2 de la même manière que la voie classique afin de former l'une des C3 convertases. Les trois voies du complément génèrent des C3 et des C5 convertases qui vont cliver ces deux éléments en C3a et b et en C5a et b, les formes b étant les formes actives de ces molécules. Une fois lié à la cible bactérienne, le C5b est converti en complexe d'attaque membranaire par l'ajout de C6, C7, C8 et de plusieurs C9. L'insertion du complexe d'attaque membranaire au sein de la membrane bactérienne va aboutir à une désorganisation membranaire, entraînant ainsi la destruction des pathogènes.

Le système des kinines : les kinines sont des polypeptides à action vasoactive formés à partir du kininogène plasmatique grâce à l'intervention d'enzymes, les kallibréines (Voir Figure 16 : Activation du système des kinines). La kinine la plus connue est la bradykinine. Les signaux déclenchant la production des kinines sont multiples, et regroupent notamment le facteur XII de la coagulation, les protéases libérées par les polynucléaires et les tissus fibrosés, ou encore l'histamine. L'action des kinines est proche de celle de l'histamine. Elles vont jouer un rôle important lors de la phase vasculo-exsudative grâce à leurs capacités de vasodilatation, d'induction de l'hyperperméabilité capillaire et d'augmentation de l'adhérence des polynucléaires aux cellules endothéliales. Si leur action est puissante, elle est cependant très brève de par leur durée de vie très courte.

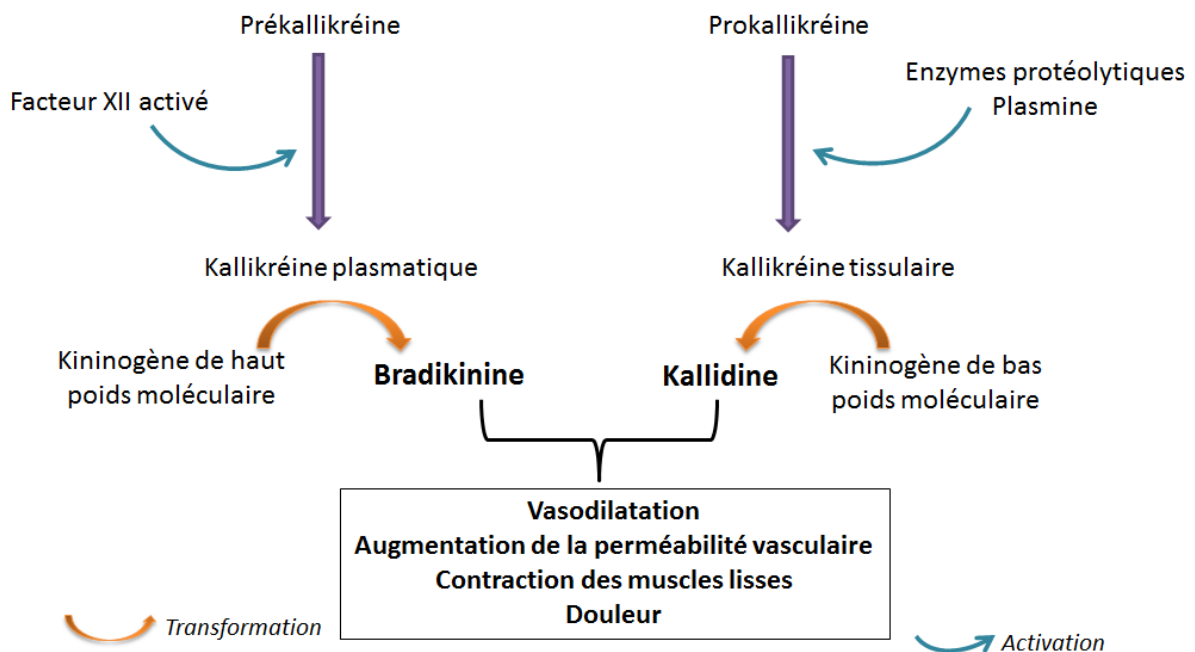


Figure 16 : Activation du système des kinines.

Le système de la coagulation : les relations existant entre l'inflammation et le système de la coagulation sont particulièrement complexes, notamment à cause de l'implication de la fibrine dans ces deux processus. La figure 17 présente les interactions existantes entre la voie de la coagulation et le système de la plasmine.

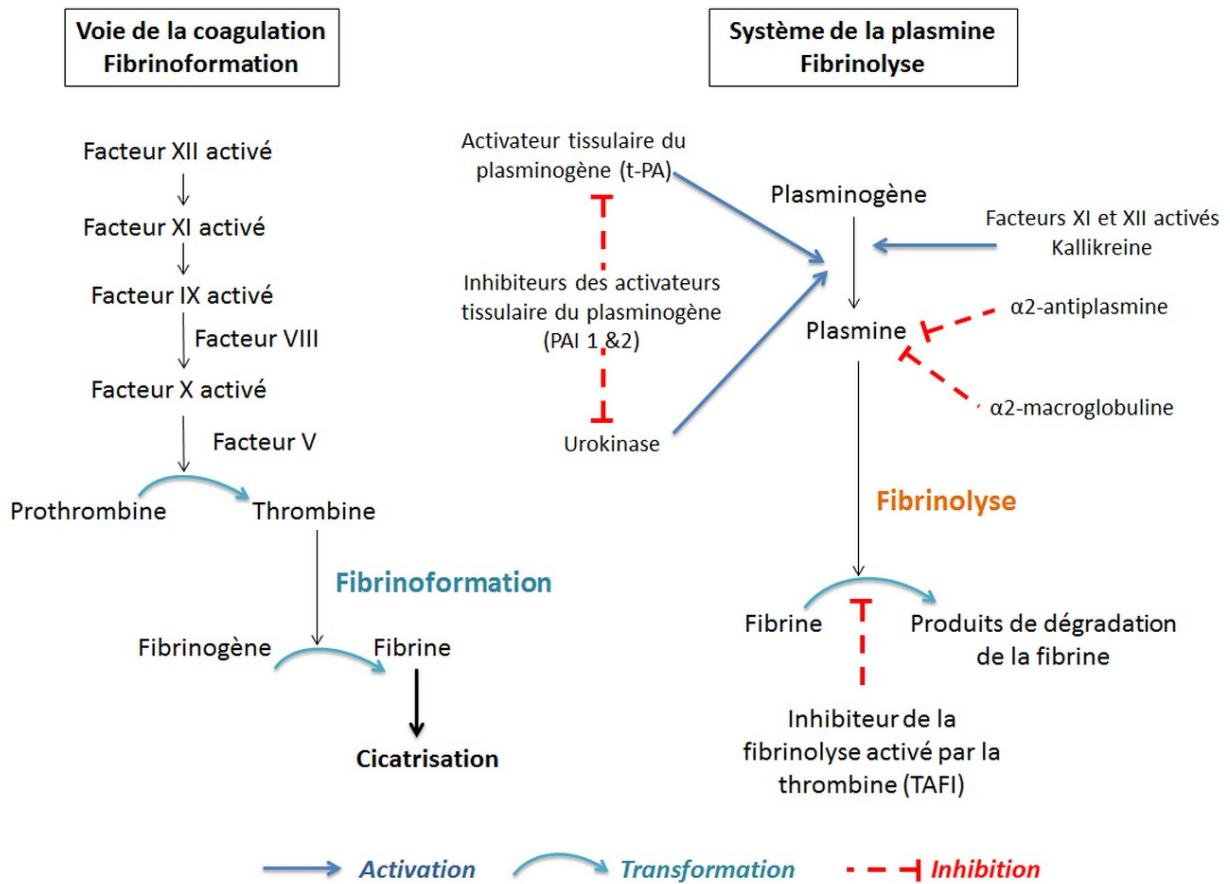


Figure 17 : Interactions entre la voie de la coagulation et le système de la plasmine.

Il est également à noter que différents facteurs spécifiques de la voie de coagulation vont interagir avec les composants de l'inflammation. Ainsi, le facteur XII va être impliqué dans l'activation du système des kinines, du complément, de la coagulation et de la fibrinolyse. Les produits de dégradation de la fibrine ont pour leur part des propriétés vasodilatatrices et chimiotactiques pour les polynucléaires. Enfin, la thrombine participe à l'activation des plaquettes et des cellules endothéliales et est également chimiotactique pour les polynucléaires et les monocytes-macrophages.

Médiateurs d'origine cellulaire

Les médiateurs inflammatoires d'origine cellulaire sont les plus nombreux. Différentes familles de molécules se distinguent : les amines, les médiateurs lipidiques, les enzymes et métabolites des polynucléaires et des macrophages, le monoxyde d'azote et les facteurs de

croissance. Le tableau 7 présente les différents membres de ces familles ainsi que leurs rôles dans l'inflammation.

Famille	Exemple de molécules	Rôles dans l'inflammation
Amines	Sérotonine Histamine	Participent au déclenchement de la réaction inflammatoire. Sont parmi les premiers médiateurs libérés lors de la phase vasculo-exsudative
Médiateurs lipidiques	Métabolites de l'acide arachidonique Facteur d'agrégation plaquettaire	Effets variables en fonction du médiateur. Vasoconstriction, vasodilatation, chimiotactisme. Certains participent à la douleur.
Enzymes et métabolites des polynucléaires et des macrophages	Enzymes lysosomales Radicaux libres dérivés de l'oxygène	Microbicidie. Fort effet pro-inflammatoire lors du relargage dans le milieu
Monoxyde d'azote	Monoxyde d'azote	Vasodilatation Diminution de l'agrégation plaquettaire Régulation du recrutement leucocytaire Microbicidie
Facteurs de croissance	PDGF EGF FGF TGFβ	Limité à la phase de regeneration. Prolifération des fibroblastes et des cellules endothéliales Régénération épithéliale Fibrogenèse cicatricielle

Tableau 7 : Médiateurs inflammatoires d'origine cellulaire

Médiateurs cytokiniques

Les cytokines sont les médiateurs de la communication intercellulaire et sont très fortement impliquées dans le déroulement et la régulation des processus inflammatoires. Ce sont des facteurs peptidiques solubles synthétisés et libérés par différents types cellulaires, leucocytaires et non-leucocytaires. Leur action est le plus souvent locale, c'est-à-dire à proximité de leur lieu de synthèse, et peut toucher soit les cellules qui les ont produites soit les cellules voisines. Grâce à leur fixation à leurs récepteurs membranaires de haute affinité, les cytokines sont généralement efficaces à faible concentration. Les cytokines sont extrêmement nombreuses et ne sont pas toutes impliquées dans la réaction inflammatoire. Le tableau 8

regroupe les cytokines majeures impliquées dans le processus inflammatoire, leur rôle dans ce processus, ainsi que les cellules par lesquelles elles ont majoritairement produites.

Cytokine	Rôle dans l'inflammation	Cellules productrices
Interféron γ	Active les macrophages et les NK. Inhibe la réplication virale	Natural Killers, lymphocytes T activés
TNF α	Effets systémiques de la phase aiguë ; augmentation de l'expression des molécules d'adhésion à la surface des cellules endothéliales ; pro-thrombotique ; stimulation de la synthèse endothéliale d'IL-1, 8 et 6	Macrophages activés
Interleukine 1	Effets systémiques de la phase aiguë ; augmentation de l'expression des molécules d'adhésion à la surface des cellules endothéliales ; pro-thrombotique ; stimulation de la synthèse endothéliale d'IL- 8 et 6	Macrophages, monocytes, cellules dendritiques
Interleukine 2	stimule la prolifération, l'activation et la différenciation lymphocytaire.	Lymphocytes T activés
Interleukine 4	stimule la prolifération, l'activation et la différenciation lymphocytaire. Oriente la réponse T vers un phénotype Th2	Lymphocytes T activés
Interleukine 6	Stimule la sécrétion des protéines de la phase aiguë de l'inflammation au niveau du foie. Stimule la prolifération et la différenciation des lymphocytes B.	Macrophages et lymphocytes activés
Interleukine 8	Recrutement des polynucléaires neutrophiles et stimulation de leur dégranulation	Macrophages, cellules épithéliales, cellules endothéliales
MCP-1	Recrutement des monocytes-macrophages et des cellules dendritiques	Monocytes, macrophages, cellules dendritiques

Tableau 8 : Exemples de cytokines impliquées dans la mise en place et déroulement de l'inflammation.

Molécules régulatrices de l'inflammation

Certaines molécules spécifiques ont pour rôle de contrôler les réactions inflammatoires et d'éviter leur emballement. La molécule la plus connue est une cytokine : l'interleukine 10. Majoritairement produite par les T_H régulateurs et les macrophages de type M2, l'IL-10 inhibe les réponses immunitaires en diminuant l'expression des cytokines de type Th1, inhibe l'expression des molécules de co-stimulation présentes à la surface des macrophages et peut également bloquer la voie de signalisation NFκB, particulièrement impliquée dans les réponses inflammatoires (pour revue, voir (Sabat et al. 2010)). Des études menées chez la souris KO pour le gène de l'IL10 ont par ailleurs mis en exergue son importance dans le contrôle de l'immunité intestinale (Berg et al. 1996). De même, le traitement des patients souffrant de la maladie de Crohn par des bactéries exprimant une IL-10 recombinante montre de bons résultats, démontrant l'importance de cette cytokine dans la régulation des réponses inflammatoires (Braat et al. 2006).

Les glucocorticoïdes forment une autre famille de molécules anti-inflammatoires est bien connue. Les glucocorticoïdes naturels (majoritairement le cortisol chez l'homme et la corticostérone chez le rongeur), dérivés du cholestérol, sont sécrétés par l'organisme à faible dose et suivant le rythme circadien. Ils interviennent majoritairement dans le métabolisme protidique et lipidique mais sont également de puissants régulateurs de l'immunité (Coutinho et al. 2011). Les glucocorticoïdes de synthèse sont quant à eux utilisés depuis de nombreuses années en cliniques pour leurs propriétés anti-inflammatoires et immunosuppressives, exacerbées par rapport aux molécules naturelles. Les glucocorticoïdes font partie de la famille des hormones. C'est pourquoi leur passage à travers la membrane cellulaire vers leur récepteur intra-cytoplasmique se fait librement. Une fois formé, le complexe glucocorticoïde-récepteur est transloqué dans le noyau cellulaire où sa fixation aux différents motifs de régulation de la transcription va permettre de moduler l'expression de nombreux gènes (Coutinho et al. 2011). Bien que la production de cortisol soit majoritairement assurée par les glandes surrénales, une production extra-surrénalienne a pu être mise en évidence, notamment au sein de la muqueuse intestinale (Cima et al. 2004) (Taves et al. 2011). Les glucocorticoïdes sont donc des régulateurs de l'immunité à la fois au niveau systémique et local. Une augmentation de la production des glucocorticoïdes naturels a d'ailleurs pu être observée dans plusieurs pathologies inflammatoires, notamment lors de l'étude des colites chimio-induites

par le DSS (Dextran Sulfate Sodium) et le TNBS (TriNitrobenzène Sulfonic Acid) (Ergang et al. 2011).

Tous les mécanismes mis en jeu lors de la réaction inflammatoire ont pour but de permettre un retour à une situation physiologique normale. Ce retour à la normale passe à la fois par l'élimination de la cause de l'inflammation et par la réparation des tissus lésés. Cependant, une fois le pathogène ou le corps étranger éliminé, et lorsque le processus de réparation est complété, l'inflammation doit se résorber sous peine d'évoluer en une inflammation non plus aiguë et bénéfique mais chronique et délétère. C'est pourquoi des mécanismes de régulation de l'inflammation ont été mis en place par l'organisme afin de contrôler l'inflammation et de permettre sa résorption en temps et en heure.

3.3. Résolution des réponses inflammatoires

L'inflammation est un processus bénéfique et nécessaire. Elle permet en effet d'éliminer les pathogènes attaquant l'organisme et est indispensable à la réparation des lésions tissulaires. Cependant, ce processus bénéfique peut parfois devenir néfaste lorsque le pathogène impliqué est trop agressif, lorsque le site inflammatoire est situé dans une zone normalement protégée (œil, cerveau) ou encore lorsque la régulation du processus inflammatoire est insuffisante. En outre, une part importante des lésions devant être réparées à la suite d'une agression ne sont pas dues à l'agent agresseur mais sont en fait des effets secondaires de la réaction inflammatoire, qui devront être réparés au même titre que les dommages causés par l'agresseur.

3.3.1. Résolution physiologique

Le retour à l'homéostasie tissulaire nécessite qu'un certain nombre de conditions soit remplies, qui regroupent notamment :

- La destruction de la cause de l'inflammation ;
- La neutralisation ou la destruction des médiateurs chimiques de l'inflammation ;
- Le retour d'un flux sanguin et d'une perméabilité vasculaire normaux ;
- Un arrêt de l'infiltration leucocytaire ;

- L'apoptose des neutrophiles et leur élimination par les macrophages par phagocytose ;
- L'élimination de l'exsudat et de la fibrine par phagocytose macrophagique, ainsi que leur drainage par le système lymphatique ;
- La régénération des tissus.

L'ensemble des processus qui permettent de remplir ces conditions constituent la phase de résolution de l'inflammation. En effet, si la fin de l'inflammation a pendant longtemps été considérée comme étant un phénomène passif, il est aujourd'hui évident que ce phénomène naturel est en réalité un processus actif impliquant des médiateurs spécialisés : les lipoxines, les résolvines E et D, les protectines et les marésines.

Ces molécules pro-résolutives sont toutes des médiateurs lipidiques dérivées du métabolisme des acides gras insaturés.

Les **lipoxines** sont issues du métabolisme de l'acide arachidonique (oméga 6). En effet, bien que son métabolisme soit principalement dédié à la production de molécules pro-inflammatoires impliquées dans l'initiation et le déroulement de l'inflammation, de récentes études ont montré que certains métabolites particuliers, les lipoxines, possèdent des effets anti-inflammatoires et sont fortement impliqués dans la phase de résolution de l'inflammation.

Les **résolvines**, **protectine** et **marésines** sont quant à elles dérivées du métabolisme des acides gras oméga 3. L'acide eicosapentaénoïque et l'acide docosahexaénoïque, deux acides gras polyinsaturés de type oméga 3 libérés des membranes cellulaires par l'action de la phospholipase A2, vont ainsi être convertis en résolvines, protectines ou marésines via un processus enzymatique impliquant les cyclooxygénases et lipooxygénases.

Les différentes molécules pro-résolutives vont jouer un rôle important dans le retour à l'homéostasie. Elles sont en effet impliquées dans l'arrêt de la migration des neutrophiles, le retour à une perméabilité normale des capillaires sanguins, la stimulation du recrutement des macrophages et de leur phagocytose des neutrophiles, l'inhibition du TNF α et de l'interleukine 12, l'élimination des chémokines, le blocage des signaux impliqués dans la douleur, l'inhibition de la formation de radicaux libres de l'oxygène ou encore celle de la formation de dépôts fibreux.

Cette implication des molécules pro-résolutives dans le retour à l'homéostasie a été démontré dans de nombreux modèles précliniques de pathologies telles que la colite, la péritonite, la néphrite, la dermatite, l'asthme, les rétinopathies, la gingivite ou encore le choc endotoxinique (pour revue sur les molécules pro-résolutives, voir (Serhan et al. 2008)).

3.3.2. Résolution pathologique et inflammation chronique

L'inflammation aiguë localisée est une part importante de la réponse normale de l'organisme afin de se protéger des dommages tissulaires et des invasions microbiennes. Bien que cette réponse inflammatoire ait pour but de préserver l'organisme, son développement anormal, notamment en cas de défaut ou d'absence du processus résolutif, peut aboutir à un grand nombre de désordres inflammatoires aigus et chroniques. A un certain stade du développement de l'inflammation, le processus doit donc être inhibé et la résolution doit avoir lieu afin que le retour à l'homéostasie tissulaire puisse s'effectuer correctement. Lorsque la résolution n'a pas intégralement lieu, où lorsque les agents pathogènes parviennent à échapper aux cellules immunitaires, l'inflammation aiguë va persister et évoluer en inflammation chronique, particulièrement délétère pour l'organisme.

Si la phase aiguë du processus inflammatoire met principalement en jeu des cellules immunitaires innées telles que les neutrophiles et les macrophages, l'inflammation chronique fait intervenir tous les types cellulaires immuns, avec notamment une forte implication des macrophages et des lymphocytes T. Les cellules normalement responsables de la réparation tissulaire, et notamment les fibroblastes et les cellules mésenchymateuses, sont elles aussi fortement impliquées dans les processus d'inflammation chronique.

La définition du caractère chronique d'une inflammation n'est pas évidente. En général, on considère qu'une inflammation est de type chronique lorsqu'elle perdure pendant plus de six semaines. L'évolution d'une inflammation aiguë vers un processus de type chronique est extrêmement fréquente suite à une exposition aux radiations ionisantes. Cette inflammation chronique est d'ailleurs reconnue comme étant responsable de nombreux effets secondaires tardifs de l'irradiation, tels que la fibrose radio-induite.

Les mécanismes physiologiques associés à l'inflammation chronique sont différents de ceux de l'inflammation aiguë. En effet, les différents compartiments touchés par l'inflammation aiguë vont être modifiés de façon plus profonde et plus durable au cours de l'inflammation chronique. Par exemple, les modifications de la perméabilité vasculaire observées

transitoirement au cours de la phase inflammatoire aiguë vont être associées à des altérations durables de la structure des vaisseaux au cours de la phase chronique (hypertrophie des cellules endothéliales et des fibres musculaires lisses, infiltration leucocytaire durable de la paroi vasculaire, néo-angiogenèse,...).

Le processus de réparation va être particulièrement impacté par l'inflammation chronique. En effet, si l'inflammation aiguë normalement résolue s'achève par une réparation totale des tissus lésés, l'inflammation chronique va elle-même être à l'origine de lésions tissulaires pouvant être importantes. En effet, lors d'une inflammation chronique, le tissu conjonctif se trouvant au niveau du site inflammatoire va subir un remodelage précoce qui va aboutir à sa destruction locale et à son remplacement par un tissu riche en collagène, dit tissu fibro-inflammatoire. Cette destruction tissulaire est suivie d'une phase de réparation au cours de laquelle les fibroblastes et les cellules endothéliales vont produire un tissu cicatriciel de remplacement. Cette réparation est cependant est très différente de celle observée à la fin de la phase aiguë et donnera naissance à un tissu fibreux ne possédant presque aucune des caractéristiques structurales et fonctionnelles du tissu initialement détruit. Ces atteintes tissulaires réparées à l'aide de tissu fibreux sont l'un des événements marquant le début d'un processus très néfaste pour le tissu atteint et particulièrement mis en cause dans les lésions radio-induites tardives : la fibrose.

La fibrose est définie comme étant la formation excessive d'un tissu conjonctif fibreux lors d'un processus de réparation. C'est un mécanisme de cicatrisation pathologique qui se caractérise par un dépôt excessif de fibres issues de la matrice extracellulaire dans un tissu ou un organe, aboutissant à une destruction de la structure tissulaire. La fibrose découle d'une rupture de l'équilibre de la matrice extracellulaire, avec une augmentation de la synthèse et du dépôt des fibres de collagène associée à une diminution de leur dégradation. Bien que les mécanismes physiopathologiques de la fibrogenèse soient encore imparfaitement connus, plusieurs facteurs solubles, notamment d'origine immunologique, ont pu être impliqués :

Le TGFβ : il est sécrété sous une forme inactive qui est stockée à la surface des cellules ou au sein de la matrice extracellulaire. Une fois activé, il va stimuler la synthèse de l'ensemble des constituants de la matrice extracellulaire via la stimulation de la prolifération et de la différenciation des fibroblastes et des myofibroblastes ainsi que par l'activation de la transcription des gènes des protéines de la matrice extracellulaire. En outre, le TGFβ va diminuer la dégradation de la matrice extracellulaire en inhibant la sécrétion des collagénases et en augmentant celle des inhibiteurs tissulaires des métalloprotéinases, enzymes

responsables de la dégradation du collagène. Le TGF β est donc un facteur favorisant le dépôt des fibres de collagène constituant la matrice extracellulaire.

Les facteurs de croissance (EGF, PDGF, FGF) : ils vont stimuler la prolifération des fibroblastes et celle des cellules musculaires lisses, ainsi que leur migration vers les sites lésés. L'augmentation du nombre de fibroblastes, producteurs de matrice extracellulaire, va ainsi augmenter la production et le dépôt de collagène au niveau du site lésionnel.

Les cytokines pro-inflammatoires : l'IL-1 et le TNF α stimulent la prolifération des fibroblastes ainsi que la synthèse des constituants de la matrice extracellulaire. A l'opposé, l'interféron γ (IFN γ) a une action anti-fibrosante.

Le développement d'une fibrose peut donner naissance à une condition pathologique pouvant mettre en péril la survie des patients atteints. En effet, dans les cas de fibrose hépatique l'évolution la plus courante est la cirrhose, pathologie grave donnant naissance à des insuffisances hépatiques, mortelles dans 85% des cas, et débouchant fréquemment sur un cancer hépatique.

3.4. Immunité intestinale physiologique et pathologique

3.4.1. Le système immunitaire intestinal

Le système immunitaire est constitué par un ensemble coordonné de mécanismes permettant à l'organisme de se défendre contre tout ce qui lui est étranger en discriminant « le soi » du « non soi ».

Le tube digestif représente un organe immunitaire à part entière. La présence d'organes lymphoïdes secondaires, tels que les ganglions mésentériques, les plaques de Peyer (très nombreuses dans l'intestin grêle) et les follicules lymphoïdes, ainsi que la présence de nombreuses cellules immunocompétentes résidentes (leucocytes intra-épithéliaux, lymphocytes B et T, macrophages, éosinophiles, mastocytes) en font en effet le plus grand organe immunitaire de l'organisme. Le tissu lymphoïde associé à l'intestin (GALT : Gut Associated Lymphoid Tissu) assure la protection de l'organisme vis-à-vis des agents pathogènes et modère les réactions immunes qui pourraient être mises en place au contact d'antigènes non pathogènes tels que les bactéries composant la flore bactérienne commensale. Le GALT joue également un rôle dans certains processus aspécifiques de protection contre les pathogènes tels que le renouvellement de l'épithélium, la régulation de l'acidité gastrique, la

modulation du péristaltisme intestinal, le contrôle de la microflore intestinale ou encore de la couche protectrice de mucus.

Dans l'intestin, la présence d'une flore bactérienne commensale et symbiotique importante ainsi que des antigènes, bactéries et toxines exogènes apportés par l'alimentation nécessitent une vigilance permanente du système immunitaire. L'intestin contient en effet une quantité importante de bactéries commensales et symbiotiques, dont la quantité totale est estimée à 10^{14} cellules, soit 10 fois le nombre de cellules somatiques de l'organisme. Ces bactéries symbiotiques bénéficient d'un environnement stable et d'un apport constant de nutriments au sein du tube digestif. En retour, l'organisme bénéficie d'une aide à la digestion de certains aliments, notamment les végétaux. Les bactéries symbiotiques permettent également la mise en place des systèmes de défense immuns dans les premiers mois de la vie, et régulent le développement de certaines pathologies métaboliques telles que le diabète, l'obésité ou les maladies cardiovasculaires (Leser et al. 2009). Cette importante population bactérienne et la constante stimulation du système immunitaire intestinal par ces dernières nécessitent un contrôle strict de la part de l'hôte afin d'éviter le développement d'une inflammation chronique délétère. Le côlon, qui est la portion intestinale la plus riche en organismes symbiotes, est d'ailleurs un organe fortement à risque et est touché par différentes pathologies inflammatoires chroniques telles que la rectocolite hémorragique et la maladie de Crohn.

Etant donné l'énorme surface de la muqueuse (200m^2 chez l'Homme) et la richesse de la flore intestinale, il est admis que l'interaction entre les bactéries lumineales et les cellules inflammatoires résidentes de la *lamina propria* est inévitable à l'état physiologique. En cas de franchissement de la barrière épithéliale par des bactéries lumineales, le système immunitaire est capable de produire une réponse proportionnée. La réponse immune intestinale repose sur la coopération entre différents types cellulaires parmi lesquels les macrophages, les cellules dendritiques, les lymphocytes T et B, les NK, les neutrophiles et les mastocytes. Ces cellules se trouvent dans les différents compartiments de la muqueuse, en particulier au sein de la *lamina propria*, et sont regroupées au sein des plaques de Peyer. Les plaques de Peyer sont des « nodules » composés d'agrégats lymphoïdes et sont recouvertes d'une couche de cellules épithéliales particulières, les cellules M, qui facilitent l'échantillonnage de la flore bactérienne par le système immunitaire de l'hôte. Les cellules dendritiques de la *lamina propria* et celles des plaques de Peyer jouent un rôle déterminant dans la régulation de l'immunité muqueuse. Elles sont en effet capables de prélever des bactéries présentes dans le mucus intestinal en faisant passer des projections cellulaires, les dendrites, à travers l'épithélium. Les bactéries

ainsi recueillies sont ensuite phagocytées et démantelées en antigènes présentables aux cellules immunitaires. La présentation des antigènes bactériens va permettre l'activation des clones immunocompétents et induire leur différenciation en plasmocytes sécréteurs d'immunoglobulines de type IgA, dirigées contre ces mêmes bactéries. Ces IgA sont ensuite transportées par transcytose à travers les cellules épithéliales vers le mucus, où elles vont contribuer à bloquer l'interaction entre bactéries et cellules épithéliales et ainsi prévenir le développement d'une réponse inflammatoire chronique.

Outre les cellules dendritiques, qui jouent elles aussi un rôle important dans l'activation des lymphocytes T en réponse aux antigènes luminaux, et les lymphocytes résidents, la *lamina propria* contient également un grand nombre de macrophages situés à proximité immédiate de l'épithélium (Lee et al. 1985). Ces macrophages ont pour rôle de phagocyter les bactéries qui auraient réussi à franchir la barrière épithéliale. Alors que dans la majorité des tissus la phagocytose des bactéries par les macrophages est associée à la sécrétion de cytokines provoquant une augmentation de l'activation des lymphocytes T et du recrutement des neutrophiles, les macrophages intestinaux sont maintenus dans un état d'anergie, caractérisé par une capacité réduite à développer l'inflammation suite à la phagocytose bactérienne (Macpherson et al. 2004) (Smythies et al. 2005). Cette anergie des macrophages intestinaux est essentielle afin de maintenir la tolérance et donc de limiter la réponse inflammatoire intestinale à la flore bactérienne. En plus de leur rôle normal de cellules phagocytaires, les macrophages de la *lamina propria* produisent des facteurs de croissance capables de soutenir la prolifération des cellules épithéliales, ce qui participe à la restauration de la barrière épithéliale en cas de rupture liée à la mort des cellules la constituant. Outre les macrophages, les mastocytes de la *lamina propria* sont également capables de phagocyter les bactéries, d'activer les lymphocytes et de participer au recrutement des neutrophiles. Les cellules NK sont également impliquées dans l'immunité muqueuse. Leur activation par l'IL-12 sécrétée par les cellules dendritiques activées permet la production d'importantes quantités d'IL-22, qui va augmenter la sécrétion de mucus et de défensines tout en stimulant le transit intestinal, ces trois processus étant directement impliqués dans la défense de l'organisme vis-à-vis des pathogènes luminaux. Les neutrophiles représentent 60% des leucocytes circulants mais leur nombre dans les tissus est faible. Les neutrophiles sont parmi les premières cellules recrutées lors d'une inflammation tissulaire. Ils possèdent une forte activité antimicrobienne via la libération de peptides antimicrobiens, d'espèces réactives de l'oxygène et de protéases. Ils

contribuent également au recrutement de monocytes et de cellules dendritiques ainsi qu'à la différenciation des macrophages (Mumy et al. 2009).

3.4.2. Pathologies inflammatoires intestinales

Chez l'Homme, différentes pathologies intestinales sont décrites sous le terme général de Maladies Inflammatoires Chroniques Intestinales (MICI). Les MICI, ou IBD (Inflammatory Bowel Disease), regroupent principalement deux pathologies : la maladie de Crohn et la rectocolite hémorragique. En 2007, les MICI touchaient 1,4 millions de personnes aux Etats Unis et 2,2 millions en Europe (Neuman 2007). Elles sont caractérisées par des phases de rémission et de rechute qui se manifestent par des symptômes cliniques tels que des pertes de poids, des diarrhées parfois sanglantes et des douleurs abdominales. La rectocolite hémorragique et la maladie de Crohn sont toutes les deux des pathologies immunitaires liées à une rupture de la symbiose existant entre le système immunitaire muqueux et la flore commensale. Cette rupture de la tolérance bactérienne induit le développement d'une réactivité aberrante du système immunitaire à l'encontre des antigènes intra-luminaux ainsi qu'une dérégulation de l'activation des effecteurs immunologiques qui sont à l'origine des lésions tissulaires observées (Bouma et al. 2003).

La maladie de Crohn touche l'ensemble des segments de l'intestin avec une alternance possible entre les zones lésées et saines. On observe une inflammation transmurale, i.e qui touche toutes les couches intestinales, caractérisée par une hyperplasie lymphoïde, des œdèmes sous-muqueux, des ulcérations muqueuses et une fibrose (Neuman 2007). Environ 2/3 des personnes souffrant de la maladie de Crohn développent des complications, principalement des fibroses conduisant à une occlusion intestinale ainsi qu'un développement de fistules et d'abcès (Lakhan et al. 2010). Du point de vue immunitaire, la maladie de Crohn est considérée comme étant une pathologie de type Th1 impliquant l'axe cytokinique IL-12/IFN γ /TNF α . Les succès des thérapies utilisant des anti-TNF et des anti-IL-12 ont permis de renforcer cette hypothèse d'orientation Th1 (Hanauer et al. 2006) (Mannon et al. 2004).

La rectocolite hémorragique est circonscrite au côlon et se caractérise par une inflammation et une ulcération de la muqueuse. Immunologiquement, la rectocolique est orientée vers une réponse de type Th2, avec une production accrue de cytokines telle que l'IL-4, l'IL-5 et l'IL-13 (Heller et al. 2005).

Malgré la persistance des dogmes Th1/Th2, la découverte de l'importance de l'orientation lymphocytaire vers un profil Th17 est venue perturber la vision des mécanismes sous-jacents aux IBD. En effet, plusieurs études menées sur des modèles animaux, mais également sur des patients atteints, ont permis de mettre en lumière une implication importante de l'orientation Th17 dans le développement et l'évolution de la maladie de Crohn et de la rectocolite hémorragique (Fujino et al. 2003) (Kullberg et al. 2006). Des études génomiques menées chez des patients souffrant de maladie de Crohn ou de rectocolite hémorragique ont par ailleurs montré la présence chez les patients atteints d'un allèle codant pour une forme particulière d'une sous-unité du récepteur à l'IL-23, cytokine indispensable à l'orientation Th17, démontrant une fois de plus l'implication de cette polarisation immunologique dans ces deux pathologies (Duerr et al. 2006).

La nécessité de compréhension des mécanismes impliqués dans l'apparition et le développement des MICI a conduit les équipes scientifiques à développer des modèles expérimentaux de lésions intestinales, principalement chez le rongeur. L'inflammation y est induite par différents composés, des molécules chimiques comme l'acide acétique, l'éthanol, le TNBS ou des polymères comme le DSS. Il existe également des modèles inflammatoires induits par une déficience génétique comme celle de l'IL-10 (Elson et al. 1995). Ces modèles permettent d'étudier des processus inflammatoires ayant des origines diverses comme la rupture de la barrière suite à des lésions épithéliales (DSS), des pathologies de type allergique (TNBS) et des pathologies ayant pour origine une immunodéficiência (souris KO pour l'IL-10). L'étude de ces modèles montre que l'inflammation intestinale est régulée par les communications existant entre le système immunitaire, l'épithélium, la flore bactérienne et également le système nerveux entérique qui régule ces différentes fonctions. Les inflammations induites par le DSS et le TNBS sont les modèles les plus utilisés pour étudier la rectocolite hémorragique et la maladie de Crohn (Elson et al. 1995).

3.4.3. Cas particulier de l'inflammation intestinale radio-induite

Réponse inflammatoire radio-induite

La réponse inflammatoire à l'irradiation débute de façon directe par l'activation radio-induite de gènes pro-inflammatoires tels que le TNF- α , le GM-CSF (Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor), COX-2 (Cyclo-Oxygénase de type 2) et ICAM-1 (InterCellular Adhesion Molecule 1) dans différents types cellulaires et tissus. Parmi les cytokines inflammatoires induites par l'irradiation, l'une des mieux caractérisée est le TNF- α . L'irradiation provoque *in vivo* et *in vitro* dans de nombreux types cellulaires et tissus l'augmentation de l'expression de TNF- α et de son récepteur. L'activation de cette voie est fortement pro-inflammatoire et peut entraîner, en fonction des types cellulaires, des signaux pro-apoptotiques ou de survie. Il a également été démontré une augmentation de la perméabilité épithéliale chez l'homme au cours de la radiothérapie contribuant ainsi à l'exposition des cellules immunes aux bactéries, et donc à l'inflammation (Nejdfors et al. 2000). Cette expression précoce précède la seconde vague inflammatoire provoquée par la signalisation PRR/PAMP/DAMP activée suite à la rupture de la barrière épithéliale et à la nécrose cellulaire. La génération d'espèces réactives de l'oxygène et du nitrate (ERO et ERN) va également contribuer au développement de l'inflammation. Quantitativement, la production radio-induite d'ERO et d'ERN est plus faible que celle produite par les cellules phagocytaires telles que les neutrophiles et les macrophages. Ces espèces réactives entraînent l'apoptose de certaines cellules et l'activation de l'expression du TNF- α , contribuant ainsi à l'exacerbation de l'inflammation.

Les premières cellules recrutées au sein de la lésion radique intestinale sont les neutrophiles, qui vont jouer un rôle déterminant en empêchant la translocation bactérienne après la rupture de la barrière épithéliale. Ils vont ensuite permettre le recrutement de macrophages extra-tissulaires, qui vont eux aussi avoir une action antimicrobienne et vont jouer un rôle déterminant dans la détersion des débris cellulaires et la phagocytose des corps apoptotiques, notamment issus des neutrophiles, deux étapes cruciales pour la résolution de l'inflammation. Dans le cadre des lésions intestinales radio-induites, le développement de la phase d'angiogenèse et de réparation tissulaire va nécessiter le passage d'un contexte pro-inflammatoire et pro-oxydant, avec des macrophages de type M1, à un contexte anti-inflammatoire et antioxydant, avec des macrophages de type M2. Cette modification

phénotypique est permise par l'exposition des macrophages à des cytokines de types Th2 et Treg (l'IL-4, l'IL-13, l'IL-10, TNF- β). Les macrophages M2 vont ainsi pouvoir participer à la cicatrisation en favorisant l'angiogenèse et la fibrogenèse. Une étude menée dans notre laboratoire a permis de mettre en évidence l'induction par l'irradiation fractionnée du colorectum chez le rat d'une réponse inflammatoire aigue de type Th2 qui perdure 6 mois après l'irradiation (Gremy et al. 2008). La persistance à long terme du déséquilibre immunitaire Th1/Th2 pourrait être impliquée dans la chronicité des lésions radiques, et en particulier dans le développement de la fibrose tissulaire.

3.4.4. Fibrose intestinale radio-induite : rôle du processus inflammatoire

La cicatrisation radique

L'un des effets secondaires tardifs les plus fréquents lors des radiothérapies abdomino-pelviennes est la fibrose. En effet, l'irradiation répétée de tissus en cours de cicatrisation et de remodelage semble favoriser l'apparition d'une forme pathologique de réparation tissulaire. Dans ce cadre, la fibrose tardive est généralement associée à une perte de souplesse tissulaire, à un fonctionnement anormal ainsi qu'à un rétrécissement des organes touchés pouvant aller jusqu'à créer une obstruction intestinale nécessitant une intervention chirurgicale en urgence. D'un point de vue histopathologique, les organes atteints de fibrose radio-induite montrent un tissu normal atrophié, en partie remplacé par des cellules stromales, et présentant un dépôt très excessif de collagène.

Le lien existant entre l'inflammation et le processus fibrotique est connu depuis de nombreuses années. Moduler l'inflammation radio-induite de façon efficace pourrait de ce fait permettre d'inhiber les effets néfastes de cette inflammation, et par la même peut être permettre de diminuer les autres effets secondaires dus à l'exposition aux rayonnements ionisants.

Lorsqu'elle se déroule de façon physiologique, la cicatrisation comprend une phase inflammatoire caractérisée par l'activation des plaquettes, la production de cytokines et de chémokines, la prolifération des cellules inflammatoires puis la formation d'un tissu de granulation ainsi qu'une angiogenèse active. Le tissu de granulation est ensuite progressivement remplacé par un tissu cicatriciel dans les semaines et les mois suivant la fin du processus inflammatoire.

Dans le cas d'une cicatrisation post-radique, la cicatrisation va devenir un phénomène chronique, notamment à cause du maintien de l'activation du système de coagulation plusieurs semaines après l'irradiation. On observe également une mort cellulaire à long terme due aux lésions de l'ADN ainsi que le développement de lésions vasculaires avec l'apparition d'une hypoxie et la présence d'un stress oxydatif. Tous ces signaux contribuent à maintenir la production de cytokines qui vont stimuler la synthèse de matrice extracellulaire et ainsi contribuer au développement de la fibrose radique, responsable d'une grande partie des effets secondaires observés chez les patients. La figure 18 met en parallèle le processus normal de la cicatrisation avec le développement de la fibrose radio-induite, assimilable à une cicatrisation pathologique.

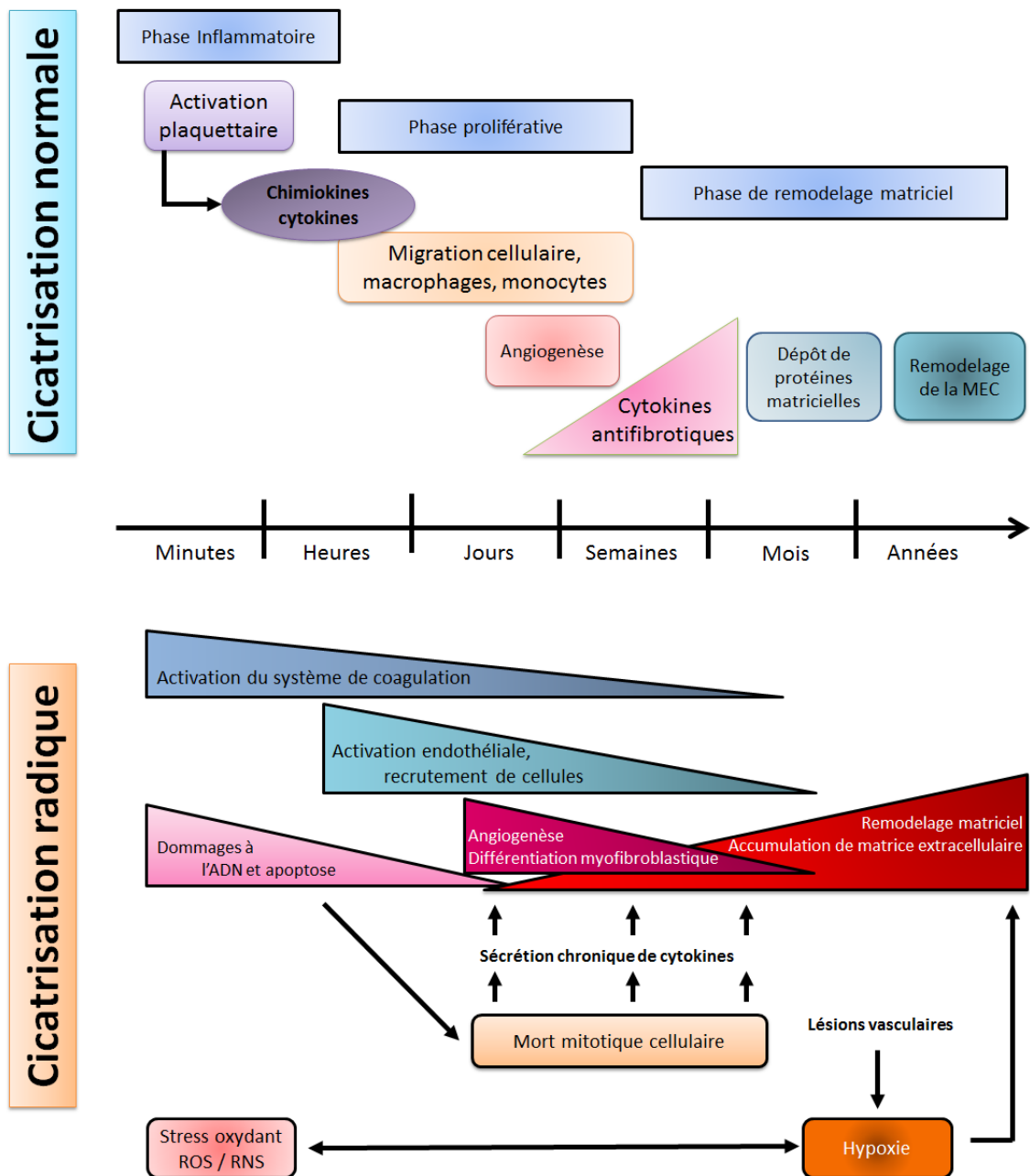


Figure 18 : Phases d'une cicatrisation normale et du développement d'une fibrose radio-induite (d'après (Bentzen 2006))

Rôle des fibroblastes et du TGF- β dans la fibrose radique

Les fibroblastes sont le principal constituant cellulaire du mésenchyme et participent de façon active à la production et à l'accumulation de la matrice extracellulaire. Dans un tissu mature, les fibroblastes sont quiescents et sont appelés fibrocytes. Lors du remodelage matriciel qui caractérise la cicatrisation consécutive à des dommages tissulaires, ces fibrocytes opèrent une

évolution phénotypique en exprimant l' α -SMA et deviennent des myofibroblastes (Gabbiani 1994). L'un des principaux facteurs induisant la différenciation myofibroblastique est le TNF- β 1. Cette cytokine est présente dans la MEC sous une forme latente qui peut être directement activée par les rayonnements ionisants, contribuant à l'activation myofibroblastique (Bentzen 2006). Le phénotype myofibroblastique se caractérise par la sécrétion de protéines matricielles telles que les collagènes, la fibronectine, les protéoglycanes et les glycoprotéines de structure. Les myofibroblastes sécrètent également des métalloprotéinases matricielles (collagénase, estérase, etc), impliquées dans la dégradation et le renouvellement de la MEC (Ravanti et al. 2000). La capacité des myofibroblastes à synthétiser à la fois les principaux constituants de la MEC et les protéases capables d'assurer sa dégradation fait de ce type cellulaire un acteur central du remodelage et de la cicatrisation tissulaire.

Les myofibroblastes, via la sécrétion de facteurs de croissance comme le TGF- β , l'INF- γ , le PDGF, l'EGF et le KGF, de cytokines comme l'IL-1 β et l'IL-6 et de prostaglandines comme le PGE2 (prostaglandine E2), sont capables d'influencer le phénotype des cellules musculaires et des cellules épithéliales et ainsi d'orchestrer une réponse pluricellulaire (Martin et al. 2000). Les myofibroblastes sont responsables de la contraction des plaies et de l'accumulation de fibres matricielles comme le collagène III lors de la cicatrisation. Une cicatrisation physiologique se termine par la génération de signaux inhibiteurs qui entraînent une inactivation des myofibroblastes et une réduction de l'inflammation (Desmouliere et al. 1995). Les lésions radiques sont caractérisées par une persistance de l'activation des fibroblastes et de l'infiltrat inflammatoire. En plus de l'activation du TGF- β latent, l'irradiation provoque une augmentation de son expression dans de nombreux organes tels que la peau et l'intestin (Langberg et al. 1994; Martin et al. 2000). Cette augmentation est détectable au niveau génique dans les jours suivant l'irradiation, mais s'estompe durant la phase chronique des lésions. En revanche, l'immuno-marquage du TGF- β 1 révèle une persistance de sa surexpression dans les fibroblastes, les cellules endothéliales, les cellules musculaires lisses, et ce jusqu'à 26 semaines après une irradiation localisée de l'intestin grêle à 12 ou 21Gy (Hauer-Jensen et al. 1998) (Wang et al. 1999). Le TGF- β 1 semble impliqué dans l'initiation des phénomènes fibreux pendant la phase aiguë des lésions radio-induites ainsi que dans leur maintien durant la phase chronique. L'étude de l'expression du TGF- β durant le développement des lésions radiques intestinales montre que les trois isoformes TGF- β 1, 2 et 3 sont augmentées pendant la phase aiguë des lésions avec une plus grande importance du TGF- β 1. Durant cette phase, l'expression du TGF- β se retrouve principalement

au niveau des cryptes, des cellules musculaires lisses et des cellules inflammatoires. Durant la phase chronique des lésions, seule l'expression du TGF- β 1 reste élevée, principalement dans les cellules impliquées dans le développement des lésions chroniques à savoir les fibroblastes, les cellules endothéliales et les cellules musculaires lisses (Wang et al. 1998). Le rôle des cellules musculaires lisses dans la progression des lésions radiques est mal déterminé mais elles sont la principale source de collagène dans l'entérite radique où elles passent d'un phénotype contractile à un phénotype sécrétoire (Haydont et al. 2008). La fibrose vasculaire est une caractéristique des lésions vasculaires induites par l'irradiation. Le rôle du TGF- β et de son interaction avec les cellules musculaires lisses vasculaires a été démontré dans le développement de la fibrose vasculaire associée à différentes pathologies (Ruiz-Ortega et al. 2007).

3.5. Interactions entre les CSM et l'immunité

La modulation des processus immuns par les CSM est l'un de leur mode d'action les plus étudiés mais aussi les plus complexes.

3.5.1. Interactions entre CSM et immunité innée

La composante innée du système immunitaire forme une barrière complexe, rapide et efficace contre les pathogènes. Tout comme dans le cas des greffes d'organes, cette efficacité de la barrière immune innée pose un problème majeur dans le cadre de la thérapie cellulaire. En effet, toute cellule extérieure à l'organisme qui y pénètre sera invariablement reconnue puis détruite par les cellules et les composants de l'immunité innée. Malgré la capacité des CSM à échapper à cette élimination, elles ne sont tout de même pas insensibles aux signaux issus de l'immunité innée, notamment ceux provenant du système du complément. Certaines études ont en effet montré que les CSM peuvent être recrutées par les anaphylatoxines C3a et C5a, suggérant un recrutement des CSM au niveau des sites inflammatoires plutôt que leur élimination (Schraufstatter et al. 2009). Cette protection des CSM par rapport au système immunitaire inné s'étend également aux cellules NK. Les CSM ont en effet montré leur capacité à inhiber la prolifération, l'expression des récepteurs de surface mais aussi les fonctions effectrices des NK, échappant ainsi à l'élimination par ces cellules (Aggarwal et al. 2005) (Spaggiari et al. 2006) (Poggi et al. 2005). Cette protection semble cependant ne pas

être universelle puisque les CSM peuvent être lysées par les NK dans certaines conditions particulières (Spaggiari et al. 2008).

L'interaction des CSM avec la composante innée du système immunitaire ne s'arrête pas à l'évitement de l'action lytique des cellules. Les CSM vont également interagir directement avec le processus inflammatoire afin de le moduler et de favoriser sa résolution et la réparation des lésions. Différentes cellules vont de ce fait être modulées, positivement ou négativement, par les CSM.

Les monocytes et les macrophages sont l'une des premières lignes de défense lors d'une infection. Ils possèdent des effets lytiques au sein des sites subissant une attaque microbienne mais sont également capables de produire un large panel de facteurs pro-régénératifs impliqués dans la réparation des lésions. Plusieurs études ont montré que les monocytes et les macrophages pourraient être programmés par leur environnement vers un effet agressif, localement destructeur mais approprié pour permettre une clairance rapide des cellules mortes et empêcher le développement d'un foyer infectieux au niveau d'une lésion, ou vers une production de molécules anti-inflammatoires et pro-réparatrices, signe de leur forte implication dans les processus de résolution de l'inflammation et de réparation tissulaire (Stout et al. 2009) (Geissmann et al. 2010). Plusieurs études ont montré des résultats allant dans le sens d'une implication des CSM dans cette orientation des macrophages. Par exemple, Nemeth *et al* ont pu démontrer cette interaction *in vivo* et établir que l'administration de CSM à des souris atteintes de septicémie permet de favoriser leur survie via une interaction avec les macrophages pulmonaires, qui sont alors induits à produire de l'IL-10, anti-inflammatoire (Nemeth et al. 2009).

Les polynucléaires neutrophiles sont les cellules majoritaires de la phase inflammatoire aiguë. Suite à la reconnaissance des motifs bactériens, les neutrophiles phagocytent les pathogènes et utilisent le contenu de leur granules afin de procéder à leur lyse. Cette lyse bactérienne va aboutir à la mort des neutrophiles et provoquer le relargage de leur contenu dans le milieu extracellulaire. Ce relargage de radicaux libres, appelé burst oxydatif, peut être extrêmement nocif pour les tissus s'il n'est pas contrôlé. Les CSM sont capables de limiter ce phénomène. En effet, Raffaghello *et al* ont montré que les CSM limitent le phénomène de burst oxydatif en inhibant l'apoptose des neutrophiles, tout en préservant leurs fonctions phagocytaires et chémoattractantes (Raffaghello et al. 2008). Cet effet sur les neutrophiles met une fois de plus en lumière l'action « reprogrammante » des CSM, qui semblent capables de moduler la

fonctionnalité des composantes de l'immunité innée afin de préserver leurs effets bénéfiques tout en inhibant leurs effets destructeurs.

La compréhension des interactions existant entre les CSM et la part innée du système immunitaire reste complexe. En effet, les CSM doivent être recrutées sur les sites lésés afin d'y contribuer à la réparation des lésions ainsi qu'à la résolution de l'inflammation, mais elles ne doivent cependant pas interférer avec les processus normaux de lutte contre les pathogènes, indispensables à la survie de l'organisme. Depuis quelques années, une nouvelle piste permettant d'expliquer cette régulation différentielle des réponses immunes est explorée : les TLR. Les TLR sont une famille de récepteurs membranaires présents sur les cellules immunitaires et capables de reconnaître différents motifs bactériens, tels que le LPS (Lipopolysaccharide) ou la flagelline. La reconnaissance des motifs bactériens va entraîner l'activation de la cellule porteuse du TLR et ainsi déclencher le processus d'élimination du pathogène. Initialement découverts à la surface des cellules immunitaires, de nombreuses études ont depuis montré que ces récepteurs sont exprimés par de très nombreuses cellules au sein de l'organisme, et notamment par les CSM. Cette expression des TLR par les CSM renforce l'idée de l'existence d'une interaction entre les CSM et la réponse immunitaire innée (Pevsner-Fischer et al. 2007) (Liotta et al. 2008) (Tomchuck et al. 2008). Les CSM expriment un large panel de TLR qui, en fonction de leur activation, vont influencer leur migration, leur survie, leur différenciation ainsi que leurs capacités immunomodulatrices. Certaines études ont ainsi montré que les capacités immunomodulatrices des CSM sont diminuées en présence des ligands des TLR3 et 4 (Liotta et al. 2008) (Romieu-Mourez et al. 2009) mais augmentées en présence d'IFN γ (English et al. 2007). A l'inverse, dans certaines conditions particulières, l'activation des voies des TLR permet de favoriser les effets anti-inflammatoires des CSM (Tomchuck et al. 2008). Ces effets contradictoires suggèrent l'existence d'un modèle d'interaction entre les CSM et les TLR présentant deux visages (voir figure 19) :

- En absence de PAMP, les CSM vont être poussées vers un phénotype leur permettant de favoriser un processus normal de réparation et de moduler négativement l'inflammation ;
- En présence de PAMP, synonymes d'une infection bactérienne, et suite à un fort signal TLR, les CSM sont orientées vers un phénotype moins immunosuppresseur et à caractère pro-fibrotique.

Si cette hypothèse est confirmée, elle permettra de renforcer l'idée selon laquelle les CSM permettraient de traiter de façon efficace les inflammations chroniques de type stérile,

notamment celles liées à des phénomènes auto-immuns, tout en conservant la réactivité normale du système immunitaire envers les pathogènes potentiellement dangereux.

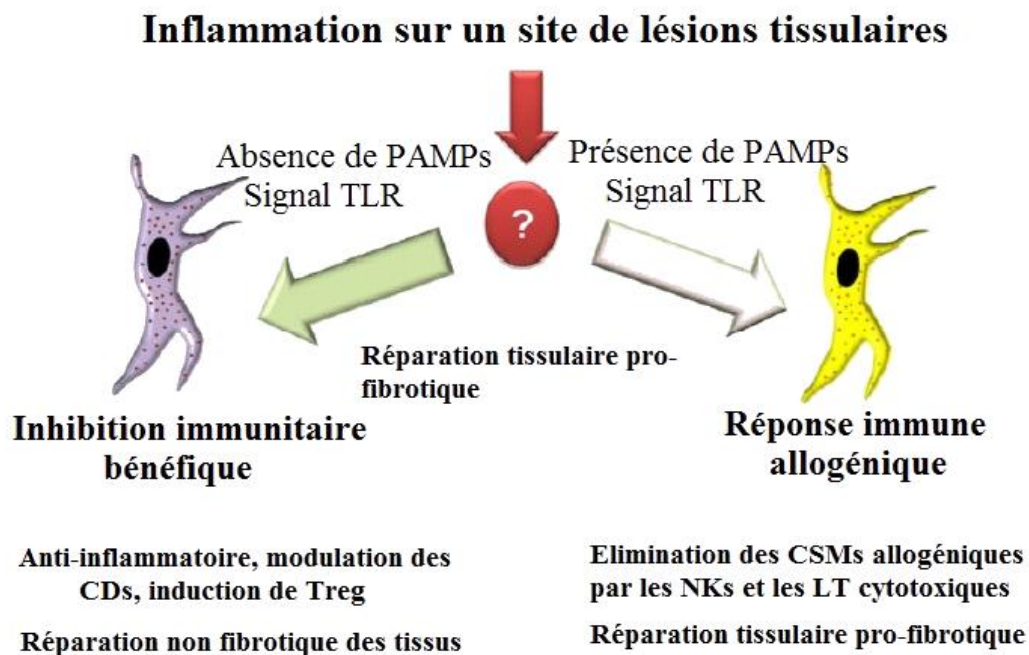


Figure 19 : Hypothèse de l'orientation différentielle des CSM en fonction du contexte pathologique (d'après (English et al. 2011))

Une attention particulière a été portée aux interactions pouvant exister entre les CSM et les cellules présentatrices d'antigènes, organisatrices et coordinatrices de la réponse immunitaire. De ce fait, de nombreuses études se sont penchées sur les relations existants entre les CSM et les cellules dendritiques.

Bien qu'étant apparentées aux cellules de l'immunité innée, les cellules dendritiques présentent les antigènes aux lymphocytes T CD4 et jouent donc un rôle critique dans l'immunité adaptative. Les interactions des CSM avec les cellules dendritiques sont multiples. Tout d'abord, plusieurs équipes ont montré que la co-culture de CSM avec des monocytes bloque la différenciation de ces derniers en cellules dendritiques (Beyth et al. 2005) (Nauta et al. 2006). Cet effet est réversible (Beyth et al. 2005) et peut être reproduit à l'aide de facteurs solubles produit par les CSM (IL-6, PGE2) (Djouad et al. 2007). Tout comme pour les monocytes et les macrophages, l'effet des CSM sur les cellules dendritiques semble être modulé en fonction des besoins immunologiques de l'organisme. Chen *et al* ont ainsi démontré que les CSM inhibent la différenciation des cellules dendritiques conventionnelles mais favorisent celle des cellules dendritiques de type plasmacytoïde, impliquées dans les

réponses antivirales (Chen et al. 2007). Ces résultats, bien que devant être interprétés avec précaution, suggèrent que l'effet suppresseur des CSM pourrait être outrepassé en cas de menace virale nécessitant la protection de l'organisme (Karlsson et al. 2008).

Au sein des épithéliums, le rôle majeur des cellules dendritiques est de détecter les menaces bactériennes et d'initier la réponse immunitaire adaptative lorsqu'un pathogène est présent. De nombreuses études ont montré que les CSM interfèrent avec la maturation des cellules dendritiques à la fois chez la souris et chez l'homme (Zhang et al. 2004) (Djouad et al. 2007) (English et al. 2008). En présence de CSM, les cellules dendritiques immatures mises en contact avec des facteurs induisant leur maturation, tels que le LPS ou le TNF α , ne présentent aucun des marqueurs d'activations normalement exprimés dans ces conditions (CMH de classe II, CD40, CD86) (Djouad et al. 2007; English et al. 2008). Les CSM inhibent également l'activation des lymphocytes T CD4 par les cellules dendritiques (English et al. 2008).

Enfin, comme pour les monocytes et les macrophages, les cellules dendritiques seraient induites par les CSM à acquérir un phénotype tolérant et à exprimer un profil cytokinique modifié, avec une diminution de l'expression de l'IL-12 et une augmentation de celle de l'IL-10, tout en maintenant actifs les mécanismes nécessaires au maintien de l'intégrité de l'organisme (Zhang et al. 2004; Aggarwal et al. 2005; Jiang et al. 2005).

La figure 20 résume les interactions ayant été mise en évidence entre les CSM et les cellules de l'immunité innée.

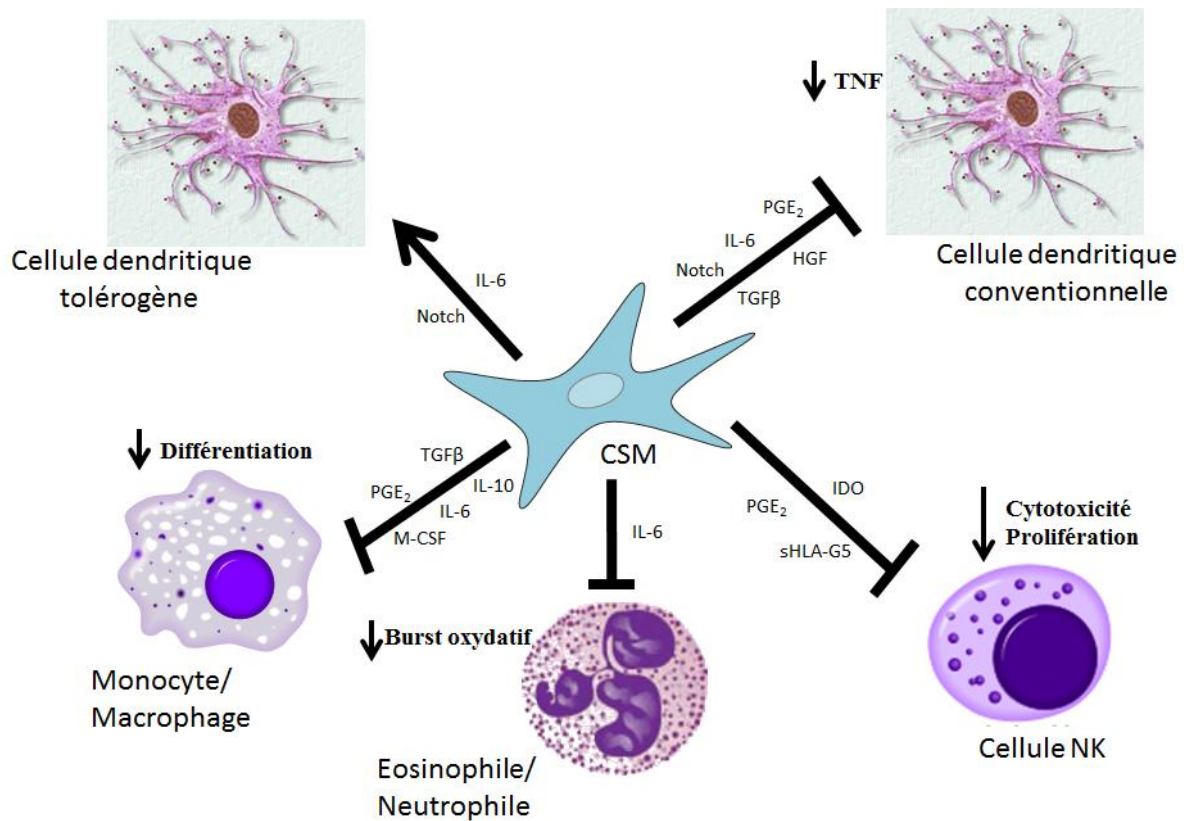


Figure 20 : Interactions *in vitro* entre CSM et cellules de l'immunité innée

2.1.1. Interactions entre CSM et immunité adaptative

Les premières indications des capacités immunosuppressives des CSM proviennent d'études démontrant que les CSM sont capables d'inhiber l'activation et la prolifération des lymphocytes T *in vitro* (Bartholomew et al. 2002) (Di Nicola et al. 2002). Cette inhibition de la prolifération des lymphocytes T a été montrée comme étant due à un arrêt du cycle cellulaire des lymphocytes concernés en phase G0/G1, pendant laquelle ils sont inactifs (Glennie et al. 2005). La capacité des CSM à moduler les lymphocytes outrepassent en outre la barrière du CMH puisque les CSM allogéniques inhibent la prolifération des lymphocytes aussi efficacement que les CSM autologues. Il a cependant été montré que cette capacité des CSM à inhiber la prolifération et l'activation des lymphocytes T est directement dépendante du microenvironnement inflammatoire dans lequel se trouvent les CSM et les lymphocytes (Polchert et al. 2008). Ren *et al* ont ainsi suggéré que la présence d'IFN γ et/ou d'IL-1 seraient nécessaires à l'activation des capacités inhibitrices des CSM (Ren et al. 2008).

L'orientation des réponses lymphocytaires T CD4 vers un profil de type Th1 ou Th2 semble également modulée par les CSM. Plusieurs études ont en effet montré que les CSM réduisent

les réponses Th1 et favorisent l'expression d'un pattern de cytokines de type Th2 (Batten et al. 2006) (Li et al. 2007) (Wang et al. 2008) (Lu et al. 2009).

En ce qui concerne la régulation des processus inflammatoires T dépendants, différentes études ont montré que les CSM induisent une réponse cytokinique de type anti-inflammatoire, ainsi que l'inhibition des réponses Th1, Th2 et Th17 (Nemeth et al. 2009) (Rafei et al. 2009) (Ghannam et al. 2010). *In vivo*, les cellules responsables de la régulation des processus inflammatoires impliquant des lymphocytes T sont les lymphocytes T régulateurs. Ces cellules particulières, exprimant classiquement les marqueurs membranaires CD4 et CD25^{High} et le facteur de transcription FoxP3, sont capables d'inhiber les autres cellules immunitaires, notamment via la sécrétion d'IL-10. Les CSM sont capables d'induire la formation de lymphocytes T régulateurs à partir de lymphocytes T naïfs. En effet, lors de leur co-culture avec des lymphocytes T CD4 naïfs, les CSM sont capables d'induire ces derniers à se différencier en lymphocytes T régulateurs sécréteurs d'IL-10 (Aggarwal et al. 2005) (Selmani et al. 2008). Les signaux à l'origine de cette différenciation en lymphocytes T régulateurs sont multiples. Il semble que le contact entre les CSM et les lymphocytes soit nécessaire, de même que la présence de PGE2 et de TGFβ (English et al. 2009). La sécrétion par les CSM d'HLA-G, d'IL-10 et de LIF (Leukemia Inhibitory Factor) semblent cependant également pouvoir induire la différenciation en lymphocytes T régulateurs (English et al. 2009) (Selmani et al. 2008).

La régulation des processus inflammatoires par les CSM passe par de multiples voies. Ainsi, parallèlement à l'induction de lymphocytes T régulateurs, les CSM vont également moduler l'activité des lymphocytes T CD8 cytotoxiques. Des études ont ainsi montré que les CSM inhibent la cytotoxicité médiée par les lymphocytes cytotoxiques ainsi que leur capacité de prolifération (Rasmusson et al. 2003). Cependant, les résultats concernant l'inhibition de l'activité cytolytique restent hétérogènes. En effet, Rasmusson *et al* ont montré que l'inhibition de la lyse des cellules par les lymphocytes cytotoxiques au cours d'une réaction lymphocytaire mixte (MLR) n'est efficace que si les CSM sont présentes dès l'initiation de la réaction (Rasmusson et al. 2003). De la même façon, Ramasamy *et al* ont montré que les CSM n'inhibent pas la lyse des cellules par les CTL dans le cadre d'essais à court terme (Ramasamy et al. 2008). Bien que difficilement comparables car réalisés dans des conditions différentes, ces études indiquent que les CSM suppriment plus efficacement la prolifération et l'induction de la réponse lytique des CTL qu'elles n'inhibent l'activité cytolytique des lymphocytes déjà activés. Ces observations sont par ailleurs cohérentes avec celles de

Karlsson, qui a observé que les CSM n'interfèrent pas avec les réponses cytotoxiques à visée antivirales (Karlsson et al. 2008).

Les derniers composants de la réponse immunitaire adaptative sont les lymphocytes B, spécialisés dans la production d'anticorps. En ce qui les concerne, les études portant sur les effets des CSM donnent des résultats hétérogènes. En effet, la co-culture en conditions stimulantes de CSM avec des lymphocytes B purifiés inhibe l'activation des lymphocytes B, c'est-à-dire leur prolifération, leur différenciation, leur production d'immunoglobulines et leurs capacités de chémoattraction (Corcione et al. 2006). A l'inverse, certaines études montrent un effet stimulant des CSM sur les plasmocytes et les lymphocytes B activés *in vitro* (Rasmusson et al. 2007). Ces contradictions montrent une fois de plus les effets différentiels que peuvent exercer les CSM, à la fois anti ou pro-inflammatoire en fonction des conditions physiologiques et pathologiques auxquelles elles sont confrontées.

La figure 21 résume les interactions connues entre les CSM et les cellules de l'immunité adaptative.

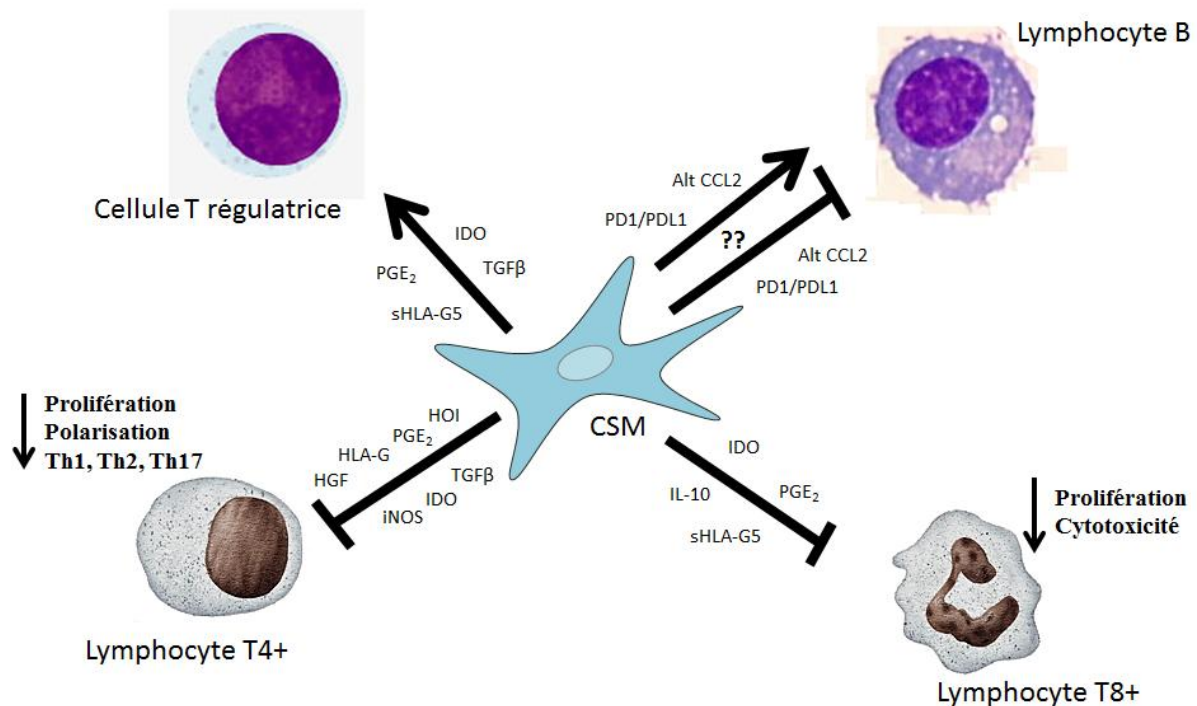


Figure 21 : Interactions *in vitro* entre CSM et cellules de l'immunité adaptative

Bien que la plupart de ces études aient été réalisées *in vitro*, elles mettent en lumière les capacités des CSM à interagir avec l'environnement immunitaire de l'organisme. Leurs

capacités immunomodulatrices sont à l'heure actuelle reconnues, et ouvrent de larges perspectives quant à leur utilisation dans le traitement des pathologies impliquant un processus inflammatoire, aussi bien auto-immun que d'origine exogène.

3.6. Mécanismes de régulation des maladies inflammatoires par les CSM

In vitro, les mécanismes par lesquels les CSM modulent la réponse immunitaire ont montré leur multiplicité. Différentes études ont permis d'étudier leurs modes d'action *in vivo* et de démontrer que les mêmes voies moléculaires sont également impliquées dans les différentes pathologies pour le traitement desquelles l'efficacité des CSM a été évaluée. Il faut tout de même noter que les mécanismes impliqués dans la régulation des processus inflammatoires par les CSM semblent être modèle et pathologie dépendants. Il est de ce fait impossible de définir un mécanisme unique et général d'immunomodulation par les CSM.

La synthèse de molécules possédant des propriétés anti-inflammatoires par les CSM a été observée *in vitro* depuis de nombreuses années. Le même phénomène est également observé lors de leur utilisation *in vivo*. Ainsi, dans leur modèle de lésions du poumon créées par la bléomycine, Ortiz et al ont observé que le traitement des animaux par CSM permet de diminuer l'inflammation tout en inhibant l'apparition de la fibrose pulmonaire. Ces effets bénéfiques se font via la sécrétion d'une molécule possédant la capacité de bloquer le signal pro-inflammatoire dû à la sécrétion d'IL-1 : l'antagoniste du récepteur à l'IL-1 (IL1-RA) (Ortiz et al. 2003; Ortiz et al. 2007).

Une autre molécule anti-inflammatoire semble impliquée dans de nombreux effets bénéfiques apportés par les CSM : le TSG-6 (Tumor Necrosis Factor-inducible gene 6 protein). En effet, l'implication de la sécrétion de TSG-6 par les CSM a été montré dans plusieurs modèles pathologiques tels que l'infarctus du myocarde (Lee et al. 2009), les lésions cornéennes (Roddy et al. 2011) ou encore la péritonite (Choi et al. 2011).

Un mécanisme différent a été proposé dans un modèle de septicémie. En effet, Nemeth *et al* ont observé une diminution des taux plasmatiques de TNF α et d'IL-6, deux molécules pro-inflammatoires très impliquées dans la pathologie de la septicémie, suite à l'injection de CSM (Nemeth et al. 2009). Cet effet était en outre corrélé à une augmentation du taux plasmatique d'IL-10, anti-inflammatoire et sécrétée entre autre par les macrophages orientés vers un

phénotype anti-inflammatoire. Dans leur modèle, l'administration aux animaux d'un anticorps bloquant l'IL-10, ainsi que l'élimination de leurs macrophages, permettent d'inhiber l'effet bénéfique des CSM. A l'inverse, l'utilisation de CSM issues de souris KO pour l'IL-10 permet bien l'obtention des effets bénéfiques des cellules. Il semble donc que dans ce modèle de septicémie, l'IL-10 produite provienne non pas des CSM elles-mêmes mais des macrophages endogènes, qui seraient induits par les CSM vers un phénotype non plus pro mais anti-inflammatoire. Cette hypothèse d'une réorientation macrophagique par les CSM vers un phénotype anti-inflammatoire est également évoquée dans d'autres études, dans lesquelles ce changement d'orientation semble dû à la sécrétion de PGE2 par les CSM (Maggini et al. 2010).

Un mécanisme d'action différent a pu être mis en évidence en utilisant un modèle de colite chimio-induite. Liang *et al* ont ainsi pu observer une diminution de l'expression des interleukines 17, 23 et 6 mais aussi de l'IFN γ chez leurs animaux traités par CSM par rapport à ceux n'ayant pas reçu les cellules, mettant ainsi en lumière une inhibition non plus uniquement de la réponse de type Th1 mais aussi de la réponse de type Th17 par les CSM (Liang et al. 2011).

Enfin, le mécanisme d'inhibition de l'inflammation par les CSM le plus fréquemment retrouvé *in vivo* est l'induction de lymphocytes T régulateurs. Ce mécanisme est très souvent observé dans les modèles de colites induites par le DSS ou par le TNBS, et est associé avec une diminution de l'expression des cytokines pro-inflammatoires de type Th1 (Gonzalez-Rey et al. 2009; Gonzalez et al. 2009). Ce mécanisme de régulation de l'inflammation a par ailleurs été observé dans de nombreux autres modèles tels que les atteintes pulmonaires dues au LPS (Sun et al. 2011), la pancréatite aiguë (Jung et al. 2011), l'arthrite (Augello et al. 2007) ou encore la greffe d'organe (Xia et al. 2012). Cette induction de lymphocytes T régulateurs est généralement associée à une inhibition de la sécrétion des molécules pro-inflammatoires ainsi que, dans certains cas, à l'induction d'un état tolérogène des cellules immunitaires. Cependant, dans une étude portant sur le traitement de patients souffrant de lupus érythémateux par les CSM, l'apparition des lymphocytes T régulateurs n'a pu être corrélée avec une amélioration des symptômes (Carrion et al. 2010). Ces résultats laissent supposer que la limitation de l'inflammation suite à l'induction de lymphocytes T régulateurs par les CSM n'induit pas forcément une amélioration de la pathologie.

3.7. Exemples de pathologies inflammatoires traitées par CSM

3.7.1. La polyarthrite rhumatoïde

La polyarthrite rhumatoïde est la forme la plus fréquente des diverses formes de rhumatismes inflammatoires. Elle entraîne une inflammation des articulations qui gonflent et se déforment, provoquant une limitation des mouvements ainsi que des douleurs invalidantes pour le patient.

Les mécanismes sous-jacents à la polyarthrite rhumatoïde sont encore peu compris. On sait cependant qu'il s'agit d'une maladie auto-immune provoquant la destruction de l'os et du cartilage, associée à une production locale de médiateurs pro-inflammatoires tels que le TNF α et IL-1 β . Une forte implication des lymphocytes T est également soupçonnée. En effet, les lymphocytes CD4 de type Th1, ainsi que les lymphocytes CD8 cytotoxiques, semblent impliqués dans le développement de la pathologie. Différentes thérapies anti-inflammatoires sont actuellement utilisées afin de soulager les patients souffrant de polyarthrite rhumatoïde. Cependant, et comme pour la plupart des maladies inflammatoires chroniques, l'arsenal thérapeutique mis à la disposition des médecins (anti-inflammatoires stéroïdiens et non-stéroïdiens, immunodépresseurs, anti-TNF α , anti-IL-1) est insuffisant pour réellement traiter la cause de la maladie et permet uniquement de soulager transitoirement les symptômes les plus handicapants.

Les CSM ont d'ores et déjà prouvé leur capacité à régénérer les os et les cartilages défectueux (Quarto et al. 2001) (Horwitz et al. 2001) (Augello et al. 2007). Les résultats obtenus sur les modèles animaux de polyarthrite sont cependant mitigés. En effet, si la première étude menée par Djouad *et al* ne montre aucune amélioration de la pathologie suite à l'injection de CSM (Djouad et al. 2005), les études menées par la suite ont quant à elles montré des résultats plus encourageants. Augello *et al* ont ainsi pu observer que l'injection de CSM permet d'éviter l'apparition de certaines lésions de l'os et du cartilage, de même qu'une inhibition de l'activation des lymphocytes T ainsi qu'une diminution du taux de TNF α plasmatique chez les souris traitées (Augello et al. 2007).

Chez l'Homme, Zheng *et al* ont montré que les CSM sont capables d'inhiber *in vitro* la prolifération ainsi que l'activation des lymphocytes T issus de patients atteints de polyarthrite (Zheng et al. 2008). Cet effet est également observé lorsque les cellules utilisées sont non plus

des CSM indifférenciées mais des chondrocytes différenciés à partir de ces cellules. Les CSM, ainsi que les chondrocytes, provoquent en outre une inhibition de la synthèse de molécules pro-inflammatoires (IFN γ , TNF α) par les lymphocytes tout en augmentant la production d'IL-10 par ces mêmes cellules.

Malgré les bons résultats obtenus lors des co-cultures des lymphocytes issus de patients avec les CSM par Zheng et par Gonzalez-Rey, aucun essai clinique n'est à ce jour en cours afin de tester l'utilisation des CSM dans le traitement de la polyarthrite rhumatoïde chez l'homme (Zheng et al. 2008) (Gonzalez-Rey et al. 2010).

3.7.2. La sclérose en plaque

Les causes de la sclérose en plaque (SEP) sont multiples. Certaines prédispositions génétiques ont pu être mises en évidence grâce à des études génomiques à grande échelle, impliquant notamment certains allèles du CMH de classe II (HLA-DR et HLA-DQ). Des études protéomiques ont également permis de démontrer l'implication des immunoglobulines, de l'IL-6 et de l'ostéopontine dans la phase inflammatoire aiguë de la SEP. Enfin, l'une des causes les plus récemment établies sont les homologies moléculaires existant entre certains pathogènes viraux et notre organisme. Dans le cas de la SEP, de nombreux motifs microbiens présentent de fortes similitudes de structure avec les composants de la gaine de myéline, ce qui induit l'apparition d'une réaction auto-immune due au mimétisme moléculaire du pathogène. Les pathogènes impliqués sont majoritairement des virus, tels que l'herpèsvirus 6, le papillomavirus ou encore le virus d'Epstein-Barr.

Le déroulement de la SEP a récemment été divisé en deux phases distinctes, avec une première phase dite d'attaque auto-immune et une seconde phase dite neurodégénérative. La phase auto-immune est caractérisée par l'infiltration du cerveau par les lymphocytes activés, qui vont passer à travers la barrière hémato-encéphalique et migrer vers la substance blanche. Cette invasion inflammatoire s'accompagne d'une destruction de la gaine de myéline des axones neuronaux ainsi que d'un phénomène de re-myélinisation des gaines dans le but de réparer les lésions. C'est ce second processus qui va donner naissance aux plaques de myélines caractéristiques des lésions dues à cette maladie. La phase neurodégénérative se caractérise quant à elle par des lésions neuro-axonales importantes qui sont à l'origine des symptômes de paralysie dont souffrent les patients atteints. Les mécanismes responsables de

ces deux phases sont complexes et font intervenir des médiateurs aussi bien inflammatoires que neurologiques (pour revue, voir (Steinman 2001)).

Les traitements actuellement utilisés pour traiter la SEP (immunomodulateurs, immunosuppresseurs, corticoïdes) permettent de réduire le processus inflammatoire en cas de crise mais ne permettent pas de d'augmenter la régénération des axones et des neurones endommagés. Le recours à la thérapie cellulaire est donc apparu comme pouvant être salutaire. En effet, les cellules souches vont pouvoir migrer au niveau des sites lésés au sein desquels elles pourront alors favoriser la régénération neuronale ainsi que la formation de nouvelles gaines de myéline grâce à leurs effets trophiques, à la stimulation des cellules souches résidentes du système nerveux central ainsi que via leurs capacités d'immunomodulation.

Le modèle animal classique de la SEP est l'encéphalomyélite auto-immune expérimentale (EAE). Ce modèle permet de recréer un processus inflammatoire ainsi que des lésions similaires à ceux observés chez les patients souffrant de SEP. Les premières études visant à soigner l'EAE grâce à l'injection de CSM ont donné des résultats très encourageants. En effet, Zappia *et al* et Gerdoni *et al* ont montré que l'injection intraveineuse de CSM autologues à des souris atteintes d'EAE permet d'induire une tolérance immune périphérique qui aboutit à l'inhibition de la réactivité excessive des lymphocytes T et B (Zappia et al. 2005) (Gerdoni et al. 2007). Cet effet bénéfique a par ailleurs également été observé lors de l'injection de cellules xénogéniques humaines aux souris atteintes (Zhang et al. 2005). Suite à ces premiers résultats, de nombreux autres groupes ont eux aussi démontré des effets bénéfiques de l'administration de CSM chez les animaux atteints d'EAE, et ce quel que soit le mode d'administration des CSM (voie intraveineuse, voie intrapéritonéale, injection locale au niveau des ventricules cérébraux). Bien qu'aucune preuve concrète de la différenciation des CSM en cellules neurales n'ait pu être obtenue dans la plupart de ces études, le traitement par les CSM s'est révélé suffisant pour diminuer la perte axonale ainsi que pour augmenter la survie des neurones chez les animaux traités (Gerdoni et al. 2007) (Rafei et al. 2009) (Gordon et al. 2008) (Kassis et al. 2008) (Zhang et al. 2006) (Karussis et al. 2008). Le traitement par CSM permet en outre d'induire la prolifération des oligodendrocytes et d'augmenter les processus de remyélinisation (Bai et al. 2009).

Ces études précliniques prometteuses ont permis de réaliser quelques essais cliniques comprenant un nombre limité de patients. Dans ces études pionnières, l'injection intraveineuse ou intrathécale de CSM a été bien tolérée et les patients ont présenté des signes

d'amélioration clinique associés à une amélioration des paramètres physiques vus par résonance magnétique (Mohyeddin Bonab et al. 2007) (Liang et al. 2009) (Karussis et al. 2010) (Yamout et al. 2010). Ces résultats encourageants ont ouvert la voie à de nouveaux essais cliniques, dont 5 sont actuellement en cours (source clinicaltrials.gov).

3.7.3. Greffes d'organes et maladie du greffon contre l'hôte

Malgré tous les progrès réalisés au cours des dernières décennies dans les techniques de greffe et de prévention des rejets, le risque de rejet de l'organe greffé par le système immunitaire du receveur reste majeur. Les patients ayant subi une greffe doivent de ce fait suivre un traitement immunosuppresseur tout au long de leur vie, ce qui n'est ni sans risque ni sans effets secondaires. L'utilisation des CSM dans le but de prévenir le rejet du greffon lors de la greffe d'un organe solide pourrait apporter des avantages conséquents aux patients. En effet, en associant leurs capacités immunomodulatrices à leurs effets pro-régénérant, les CSM pourraient permettre de limiter le phénomène de rejet immunitaire tout en favorisant la cicatrisation et l'intégration à l'organisme du nouvel organe.

Bien qu'aucune étude clinique n'ait été menée à ce jour dans le domaine de la prévention du rejet de greffe allogénique par les CSM, de nombreuses études précliniques laissent présager que cette thérapie pourrait être particulièrement efficace. Lors de ces études, l'injection de CSM simultanée à la greffe d'organe a permis d'améliorer la survie de la greffe tout en réduisant, et parfois même en éliminant, la nécessité d'un traitement immunosuppresseur pharmacologique. (Bartholomew et al. 2002) (Zhou et al. 2006) (Popp et al. 2009) (Crop et al. 2009). Il semble donc que l'injection de CSM permette d'induire un phénomène de tolérance immunitaire envers l'organe exogène, probablement grâce à leur action tolérogène sur les lymphocytes T (Bartholomew et al. 2009).

La maladie du greffon contre l'hôte (GvHD) est la complication la plus fréquente des greffes de cellules souches hématopoïétiques. Au cours de cette réaction, les cellules immunitaires présentes au sein du greffon vont reconnaître les cellules de l'hôte comme leur étant étrangère et vont déclencher une réponse immunitaire à leur encontre. Si une forme légère de GvHD peut être bénéfique en permettant l'élimination des cellules leucémiques résiduelles, sa forme sévère est létale en l'absence de traitement immunosuppresseur, et est même dans certains cas résistante au traitement. Plusieurs essais cliniques ont permis d'établir l'utilité du traitement

des GvHD par les CSM. Le Blanc *et al* ont ainsi publié en 2004 les résultats du traitement d'un patient souffrant d'une GvHD de grade IV réfractaire aux traitements classiques par corticothérapie et présentant des lésions au niveau de l'intestin et du foie (Le Blanc et al. 2004). Après injection de CSM, l'effet sur la GvHD fut miraculeux, avec une normalisation du taux de bilirubine et un retour à un transit intestinal normal. L'interruption des traitements immunosuppresseurs afin de favoriser l'effet greffe versus leucémie a entraîné la réapparition de la GvHD, qui a pu à nouveau être inhibée grâce à une nouvelle injection de CSM. Malheureusement, la GvHD du patient est réapparue 18 mois après le traitement par CSM, provoquant son décès. Une autre étude du même groupe portant sur 9 patients atteints de GvHD a également fourni des résultats encourageants, avec une réponse complète chez 6 des patients, avec une disparition complète des symptômes (Ringden et al. 2006). Bien que les connaissances issues de ces études soient restreintes par leur faible nombre de patients, plusieurs points positifs en ressortent. En effet, l'injection de CSM n'a pas eu d'effets secondaires notables, même lors d'un transfert HLA incompatible. Les CSM ont par ailleurs permis de diminuer drastiquement la maladie ainsi que de réparer efficacement les lésions présentes au niveau de l'intestin et du foie. Un essai de phase II a pu être mené grâce aux bons résultats des études de phase I. Sur les 55 patients souffrant de GvHD réfractaire aux traitements chimiques et ayant reçu des CSM, 30 ont présenté une réponse complète, et 9 une réponse partielle au traitement. Les patients présentant une réponse complète au traitement ont par ailleurs bénéficié par la suite d'une meilleure survie que ceux n'ayant pas ou partiellement répondu au traitement (Le Blanc et al. 2008). Les études sur le traitement de la GvHD par administration de CSM se poursuivent, aussi bien au stade préclinique que clinique, et continuent de donner des résultats de plus en plus prometteurs (Xia et al. 2012). Actuellement, 12 essais cliniques sont en cours afin de poursuivre l'étude du bénéfice thérapeutique du traitement de ces pathologies par CSM (consultation Clinicaltrials du 12-10-2012).

3.7.4. Maladies inflammatoires chroniques intestinales

Aucun traitement curatif n'est actuellement disponible pour traiter les MICI. Le traitement par anti-inflammatoire permet de calmer les symptômes mais ne permet pas de stopper l'évolution de la maladie.

Les résultats pro-régénérant et anti-inflammatoires obtenus sur les lésions intestinales dues à la GvHD grâce au traitement par les CSM ont cependant permis d'espérer un effet similaire sur les lésions provoquées par les désordres immunitaires de la maladie de Crohn.

Différents modèles animaux sont utilisés afin de tenter de mieux comprendre les mécanismes régissant les maladies inflammatoires chroniques de l'intestin ainsi que leur traitement par les CSM. L'administration de TNBS ou de DSS dans l'eau de boisson ou par instillation intra-intestinale permet de créer une inflammation donnant naissance à des lésions similaires à celles observées chez les patients atteints. Les différentes études menées sur ces modèles ont toutes obtenus de très bons résultats. En effet, les différentes équipes ont toutes montré une amélioration du score lésionnel suite à l'administration des CSM aux animaux, et ce quel que soit la molécule inductrice de la colite, les animaux utilisés ou encore le mode d'administration (local, systémique) des CSM (Tanaka et al. 2008) (Hayashi et al. 2008) (Gonzalez-Rey et al. 2009; Gonzalez et al. 2009) (Zhang et al. 2009) (Liang et al. 2011). Ces études ont par ailleurs montré une forte inhibition du processus inflammatoire chez les animaux traités, notamment liée à une présence accrue de lymphocytes T régulateurs sécréteurs d'IL-10 suite au traitement par CSM.

L'apparition de fistules est le signe externe des lésions provoquées par une maladie de Crohn. Différentes études cliniques ont été menées afin de les traiter grâce à l'administration locale de CSM. En 2005, la première étude menée chez 4 patients souffrant en tout de 8 fistules a permis d'obtenir la fermeture complète de 6 des lésions suite à l'administration locale de CSM (Garcia-Olmo et al. 2005). Aucun abcès ni aucune complication ne furent visibles pendant les 12 à 24 mois de suivi post-opératoire. Une étude clinique de phase II a par la suite été réalisée par la même équipe. Dans cette étude, une cohorte de 49 patients souffrant de fistules péri-anales, dont 14 associées à une maladie de Crohn, ont reçu un traitement par colle biologique, associé ou non à une administration de CSM au sein même de la colle (Garcia-Olmo et al. 2009). Cinq patients atteints de la maladie de Crohn sur sept ont montré une fermeture de leur fistule dans les 12 mois suivants la co-thérapie colle-CSM, contre seulement un sur sept pour les patients ayant reçu la colle en monothérapie. Les résultats obtenus avec les patients atteints de la maladie de Crohn sont en outre le reflet de ceux obtenus chez les patients non atteints par cette maladie.

Le traitement par CSM permet de favoriser la réparation des fistules tout en inhibant leur réapparition, mais qu'en est-il des manifestations internes de la maladie ? Une première étude clinique de phase I utilisant les CSM a été menée chez 10 patients souffrant de maladie de

Crohn réfractaire aux traitements médicamenteux (Duijvestein et al. 2010). Trois des patients traités ont montré une diminution de l'indice d'activité de la maladie 6 semaines après le traitement par les CSM. Une étude de phase II réalisée par la suite sur 10 nouveaux patients a permis de montrer une diminution du score d'activité de la maladie 14 jours après l'injection des CSM chez 33% des patients. Après 12 mois de suivi, aucun effet secondaire n'a pu être attribué aux CSM (Onken et al. 2008). Enfin, l'étude menée par Ciccocioppo *et al* a confirmé que l'injection locale de CSM au sein des fistules provoquées par la maladie de Crohn permet de favoriser leur fermeture, mais a également montré que ces injections locales permettent de diminuer l'activité de la pathologie dans son ensemble, et ce pendant les 12 mois suivant la fin du traitement (Ciccocioppo et al. 2011). Ces résultats très positifs ont pu être corrélés avec une augmentation durable de la présence des lymphocytes T régulateurs, non seulement au sein de la muqueuse intestinale mais également dans le sang suite au traitement par CSM. Actuellement, 12 essais cliniques de phase I/II et de phase III sont en cours, à la fois sur le traitement des fistules et de la pathologie interne, afin de confirmer les résultats obtenus grâce au traitement par les CSM (clinicaltrials, consultation du 12-10-2012).

Les maladies inflammatoires chroniques sont multiples, et possèdent autant de causes que de symptômes différents. Elles ont cependant plusieurs points communs : qu'elles soient auto-immunes ou liées à une réponse antimicrobienne excessive, elles sont toutes dues à un dérèglement du système immunitaire et sont toutes à l'origine de lésions tissulaires qui portent atteinte à l'intégrité de l'organisme et mettent en péril la santé des patients.

L'exposition aux rayonnements ionisant crée des lésions au sein de l'organisme suite à la mort des cellules irradiées. La mort de ces cellules va entraîner l'apparition d'un processus inflammatoire afin de nettoyer les débris des cellules apoptotiques. Cette inflammation, dite stérile car déclenchée en l'absence de pathogène, est un phénomène normal et bénéfique. Dans le cadre de l'irradiation intestinale, les lésions provoquées par la mort des cellules épithéliales va permettre l'entrée dans l'organisme de pathogènes normalement maintenus au sein de la lumière épithéliale. Cette invasion bactérienne va à son tour provoquer le déclenchement d'une réaction inflammatoire, cette fois-ci à visée antibactérienne. La réaction inflammatoire aiguë présente au sein de l'intestin irradié est donc une réponse mixte, avec à la fois une composante stérile et une composante antibactérienne. On pourrait supposer que ces

deux réactions immunitaires vont travailler de concert afin d'éliminer leurs causes et de favoriser la régénération des tissus lésés. Cependant, la fréquence d'évolution des lésions radiques vers la fibrose laisse penser que les mécanismes de résolution de l'inflammation, si important pour obtenir une réparation totale des tissus, sont en quelque sorte déréglés. En outre, une inflammation chronique est généralement associée à la fibrose radique, indiquant un lien entre les deux phénomènes. Si la mise en place et le déroulement de la phase aiguë de l'inflammation post-radique sont maintenant relativement connus, les mécanismes orientant l'inflammation vers un phénotype chronique et pro-fibrotique restent mal connus. Une meilleure connaissance des cellules et des molécules impliquées dans ce développement chronique pourrait permettre de développer des stratégies afin de limiter, ou même d'éviter, l'apparition de la phase chronique de l'inflammation radio-induite.

En ce qui les concerne, les CSM ont prouvé leur efficacité dans de très nombreuses pathologies, qu'elles soient strictement dégénératives ou immuno-induites. Les lésions radio-induites, quant à elles, sont initiées par l'exposition aux rayonnements ionisants puis entretenues par l'emballement du processus inflammatoire. L'utilisation des CSM dans le traitement des lésions intestinales radio-induites pourrait de ce fait se révéler particulièrement efficace. En effet, les CSM, de par leurs actions multiples, pourraient à la fois réparer les lésions directement induites par l'irradiation et inhiber la réponse inflammatoire, permettant la mise en place d'une réparation normale, et non plus fibrotique, des tissus irradiés.

Modèle expérimental

1. Structure colique

1.1. Fonction colique

Le gros intestin est la partie terminale du tube digestif. Il mesure environ 1,5 m chez l'Homme et débute avec le cæcum d'où part l'appendice vermiforme, dont l'inflammation conduit à l'appendicite. On trouve ensuite le côlon proprement dit qui, chez l'homme, est divisé en cinq parties anatomiques : le côlon ascendant (ou côlon droit), le côlon transverse, le côlon descendant (ou côlon gauche), le côlon sigmoïde puis le rectum, qui est la partie terminale du côlon.

La fonction essentielle du côlon est de transformer les résidus liquides de l'intestin grêle en un matériau solide en absorbant l'eau (1 à 1,5 L par jour) et les sels minéraux. Afin de permettre le transit de ce contenu semi-solide, le côlon sécrète de grandes quantités de mucus qui lubrifient sa paroi interne. Le côlon est également le site de digestion principal de la cellulose par la flore bactérienne, avant l'expulsion des déchets alimentaires non digestibles (fèces). Il est à noter que, mis à part un cæcum très important chez les rongeurs par rapport à l'Homme, les différentes parties du tube digestif ainsi que l'organisation structurelle de la paroi colique sont similaires chez l'Homme et les rongeurs.

1.2. Structure de la paroi colique

Le tube digestif dans son ensemble présente une structure conservée, qui comprend de l'intérieur vers l'extérieur : une muqueuse, une sous-muqueuse, une couche musculaire et une séreuse.

1.2.1. La muqueuse colique

La muqueuse colique est la partie de la paroi intestinale en contact avec le contenu luminal. Elle est composée uniquement de cryptes, contrairement à la muqueuse de l'intestin grêle qui présente à la fois des villosités et des cryptes.

Les cryptes du côlon, ou cryptes de Lieberkühn, sont formées d'un épithélium composé de 4 types cellulaires :

Les cellules souches et progénitrices, immatures, sont situées respectivement à la base et dans le premier tiers des cryptes. Elles assurent la production et le remplacement des différentes lignées cellulaires différenciées de la muqueuse.

Les cellules cylindriques (colonocytes) sont les cellules épithéliales les plus nombreuses du côlon et forment l'épithélium bordant, en contact direct avec le contenu luminal. Ce sont elles qui permettent l'absorption de l'eau et des sels minéraux.

Les cellules caliciformes sont responsables de la production et de la sécrétion de mucus. On observe une augmentation de la taille des vacuoles de mucines (protéines du mucus) et une augmentation de la sulfatation des mucines dans le côlon gauche et le rectum.

Les cellules endocrines sont des cellules épithéliales peu nombreuses (environ 1%) dispersées parmi les autres cellules de l'épithélium et chargées de médiateurs de type hormonaux tels que la substance P, la somatostatine et le glucagon. Elles jouent un rôle important dans la régulation de l'absorption et de la sécrétion intestinale.

La monocouche cellulaire épithéliale repose sur une membrane basale composée de collagène de type IV, de protéoglycanes, de laminine et de fibronectine (Simoneau et al. 1998). Ces protéines matricielles interagissent avec les intégrines des cellules épithéliales, permettant leur adhésion et la cohésion de l'épithélium (Beaulieu 1999). On trouve ensuite une couche de collagène compacte qui sépare l'épithélium de la *lamina propria* (chorion). Le chorion est un tissu de soutien de l'épithélium essentiellement composé de collagène, de réticuline et de fibroblastes encastrés dans une matrice de glycosaminoglycanes. Il contient également des cellules immunocompétentes, en particulier des lymphocytes T et B, des cellules dendritiques, des mastocytes muqueux et quelques rares éosinophiles (Lee et al. 1988). La muqueuse colique comprend également des follicules lymphoïdes (structures proches des plaques de Peyer) ainsi qu'une micro-vascularisation endothéliale et lymphatique.

1.2.2. La sous-muqueuse

La sous-muqueuse est constituée d'un tissu conjonctif dense séparé de la muqueuse par une fine couche de cellules musculaires lisses, la *Muscularis mucosa* (ou musculaire muqueuse).

La musculaire muqueuse du côlon comprend une couche interne circulaire et une couche externe longitudinale. La sous-muqueuse est un tissu conjonctif riche en fibres et en cellules immunes. On y trouve des vaisseaux sanguins et lymphatiques de diamètre important qui portent la vascularisation muqueuse plus fine. On y trouve également des nerfs et de petites quantités de tissu adipeux chez l'Homme.

1.2.3. La musculaire externe (*Muscularis propria*)

Elle est à l'origine des principales forces permettant la progression des fécès dans le tube digestif. Elle se compose d'une couche circulaire de cellules musculaires lisses et d'une couche longitudinale externe discontinue, disposée en trois bandes. Cette organisation en bandes longitudinales reliées par de fins faisceaux est spécifique du côlon. La contraction des muscles lisses du côlon est sous le contrôle du système nerveux autonome, et en particulier du système nerveux parasymphatique.

1.2.4. La séreuse ou adventice

Il s'agit de la couche la plus externe de l'intestin. Elle est composée de tissu conjonctif lâche soutenant les gros vaisseaux et les nerfs qui irriguent et innervent la musculaire externe.

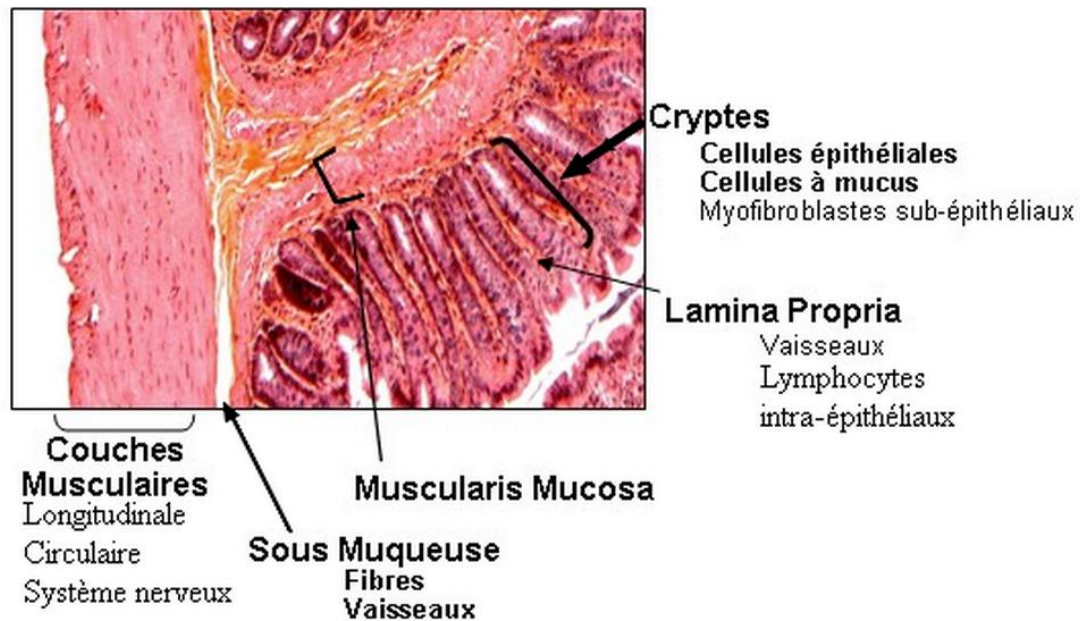


Figure 22 : Structure de la paroi colique

2. Analyse anatomopathologique du colon-rectum irradié

Les dommages muqueux observés après irradiation sont une déplétion dose-dépendante des cryptes, qui peut, pour des doses supérieures à 17 Gy, conduire à une dénudation de l'épithélium ainsi qu'à une ulcération de la muqueuse entre 7 et 14 jours post-irradiation. On observe de façon concomitante le remplacement de l'épithélium par un infiltrat inflammatoire, essentiellement composé de neutrophiles, de macrophages et de lymphocytes et qui persiste plusieurs mois après irradiation. A des doses supérieures à 20 Gy, des lésions tardives (3 mois post-irradiation) vont apparaître, caractérisées par le développement d'une fibrose ainsi qu'un épaissement de la muqueuse, associés à des dommages vasculaires tels que des hyperplasies néointimales. On note également, dans la sous-muqueuse et la *muscularis propria*, la présence de cryptes régénérantes ectopiques (Colitis cystica profunda), ainsi que des lésions musculaires, en particulier une dystrophie de la *muscularis propria* (Followill et al. 1993). Enfin, les lésions tardives se caractérisent également par un épaissement de la séreuse, caractérisé par une fibrose associée à une accumulation de cellules inflammatoires. On observe également dans les prélèvements de rectums humains ayant subi une radiothérapie (45Gy par fractions de 2Gy par jour) la présence, 6 semaines après l'arrêt de celle-ci, de lésions muqueuses, vasculaires et fibreuses ressemblant aux lésions induites dans les modèles expérimentaux.

3. Irradiation colorectale chez le rat

L'irradiation colorectale chez le rat se fait par positionnement de la zone colorectale dans le champ d'irradiation de 3cm par 2cm. Le colorectum étant une partie fixe du tube digestif, cette configuration permet des irradiations itératives et a été largement utilisée par l'équipe d'Elisabeth Travis pour décrire les dommages coliques induits par des irradiations uniques ou fractionnées dans une gamme de dose allant de 15 à 35Gy chez la souris. Ce modèle a permis de générer des lésions coliques sévères avec une dénudation épithéliale persistante, suivie ou non d'une régénération muqueuse en fonction de la dose et du fractionnement (Followill et al. 1993; Followill et al. 1995).

Dans notre étude, nous avons utilisé ce modèle en dose unique de 27 Gy chez le rat. Cette configuration permet d'observer des lésions radiques aiguës entre 7 et 14 jours post-irradiation, qui évoluent en lésions intermédiaires à 21 et 28 jours post-irradiation. Ce modèle permet également d'observer le développement de lésions tardives de 10 à 22 semaines après l'irradiation. Dans ce modèle, l'observation des coupes histologique colorées par HES (Hémalun-Eosine-Safran) permet de constater une augmentation de l'infiltration des leucocytes dès J3, ainsi qu'une ulcération muqueuse totale au-delà de J7, avec un infiltrat inflammatoire maximal à J14. Une réduction de l'infiltrat inflammatoire est observée après J14, associée à une régénération partielle de la muqueuse.. A partir de 8 semaines post-irradiation, on observe la présence d'une fibrose muqueuse et sous-muqueuse associée à la présence de cystes sous-muqueux, d'un épaissement de la musculaire et de lésions vasculaires, essentiellement des hyperplasies néointimales. D'un point de vue fonctionnel, l'irradiation colorectale à 27Gy va induire une altération de la fonction contractile du muscle colique, associée à un défaut de fonctionnalité du système nerveux entérique (résultats internes au laboratoire en cours de publication). Les lésions créées lors de l'irradiation des rats selon ce modèle sont très proches de celles observées chez les patients subissant une résection chirurgicale suite à une radiothérapie (voir figure 23).

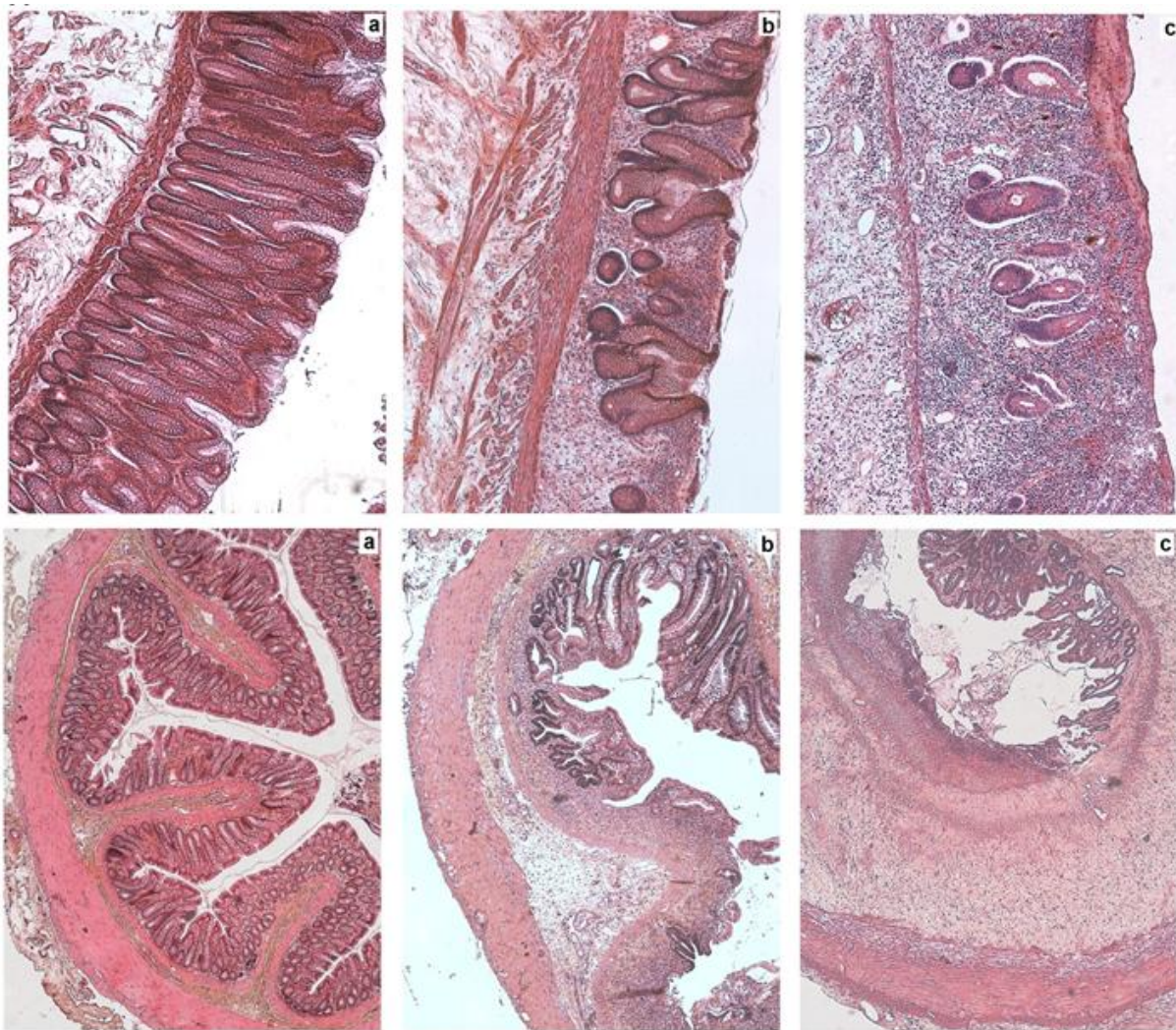


Figure 23 : Coupes histologiques représentatives des lésions coliques induites par l'irradiation chez l'Homme et le rat.

Panel supérieur : Images représentatives des lésions colorectales humaines induites par une radiothérapie pré-opérative (dose totale de 45Gy délivrée en fractions de 2Gy), 6 semaines après la fin de la radiothérapie. a : tissu colorectal situé en dehors de la zone irradiée. b, c : tissus colorectal situé dans la zone irradiée.

Panel inférieur : Images représentatives des lésions induites par une irradiation colorectale monodose de 27Gy chez le rat. a : colorectum non irradié (animal témoin). b : colorectum irradié deux semaines après l'exposition. c : colorectum irradié huit semaines après l'exposition.

4. Traitement par CSM

4.1. Isolement et culture des CSM

4.1.1. Cellules de la moelle osseuse

Les CSM sont isolées à partir de la moelle osseuse de fémurs de rats SD femelles âgées de 7 semaines. La moelle osseuse est extraite du fémur grâce à des flushs énergiques avec une seringue contenant du MEM Alpha avec 10% de sérum. Les cellules recueillies sont mises en culture en flasque de 75cm² en milieu MEM 20% de sérum supplémenté avec de la pénicilline/streptavidine et de la L-Glutamine et incubées à 37°C et 5% de CO₂. Trois lavages des flasques en PBS sont réalisés après 24 heures afin d'éliminer les cellules hématopoïétiques non adhérentes. Les cellules sont trypsinées à 80% de confluence et remises en culture à plus faible densité afin de les amplifier. Les cellules sont injectées 21 jours après passage.

4.1.2. Cellules du tissu adipeux

Les CSM sont isolées à partir du tissu graisseux sous-cutané inguinal de rats SD femelles âgées de 7 semaines. Le tissu adipeux est détaillé en morceaux et incubé 3 fois 30min à 37°C dans une solution de DMEM contenant 0.1% de collagénase de type I afin de dissocier les cellules. La collagénase est inhibée à l'aide de milieu de culture contenant 10% de SVF, puis les cellules sont centrifugées afin d'éliminer les adipocytes matures. Le culot cellulaire contenant les CSM est ensuite resuspendu en milieu de culture et planté en flasques à une densité de 1000 cellules par cm². Les cellules sont injectées à 6 jours post-mise en culture.

4.2. Vérification phénotypique des CSM cultivées

Le phénotype des CSM cultivées est vérifié par cytométrie en flux (tableau 9) et par l'analyse de leur capacité de différenciation *in vitro* (Figure 24).

Marqueur	% de positivité
CD90	94,8 (± 3,3)
CD73	81,25 (± 8,12)
CD34	2,13 (± 0,79)
CD45	6,4 (± 1,15)

Tableau 9 : Marqueurs phénotypiques des CSM vérifiés par cytométrie en flux

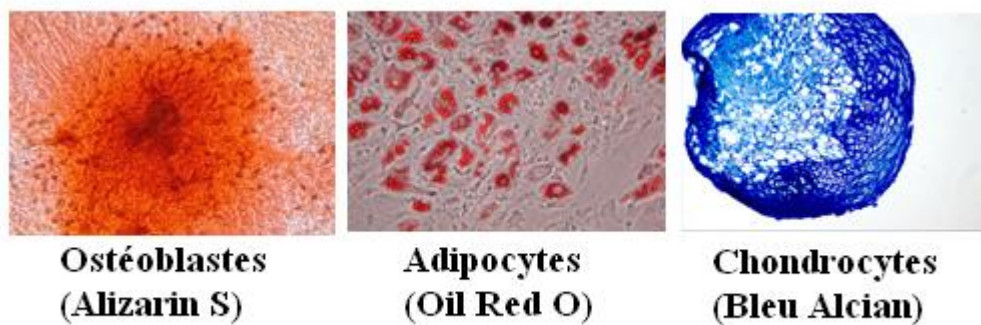


Figure 24 : Photographies représentatives de la différenciation *in vitro* des CSM de rat en ostéoblastes, adipocytes et chondrocytes.

4.3. Protocoles d'irradiation et de traitement des animaux par CSM

4.3.1. Protocole de traitement précoce

Les animaux sont endormis à l'aide d'isofluorane gazeux puis maintenus sous anesthésie durant toute la durée de l'irradiation et de l'injection des CSM ou du placebo. L'animal à irradier est positionné sur la source d'irradiation à l'aide d'une planche en plexiglas sur laquelle est matérialisée la zone à irradier ainsi que des repères anatomiques. L'animal ainsi positionné est ensuite irradié à l'aide d'une source au Cobalt 60 (^{60}Co) dont le faisceau est réduit aux dimensions de la zone à irradier (2cm de large pour 3cm de long) grâce à des briques de plomb positionnées sur la sortie de la source. C'est sur ces briques de plomb que repose la plaque en plexiglas sur laquelle est positionné l'animal à irradier.

Lorsque la séance d'irradiation est achevée, on réalise l'injection des CSM ou du placebo en intraveineuse via la veine caudale. La suspension cellulaire injectée contient $5 \cdot 10^6$ CSM en suspension dans 500 μl de PBS stérile alors que le placebo ne contient que les 500 μl de PBS.

L'apport en anesthésique est ensuite stoppé et l'animal remis dans sa cage sous surveillance en attendant que les effets de l'isofluorane se dissipent.

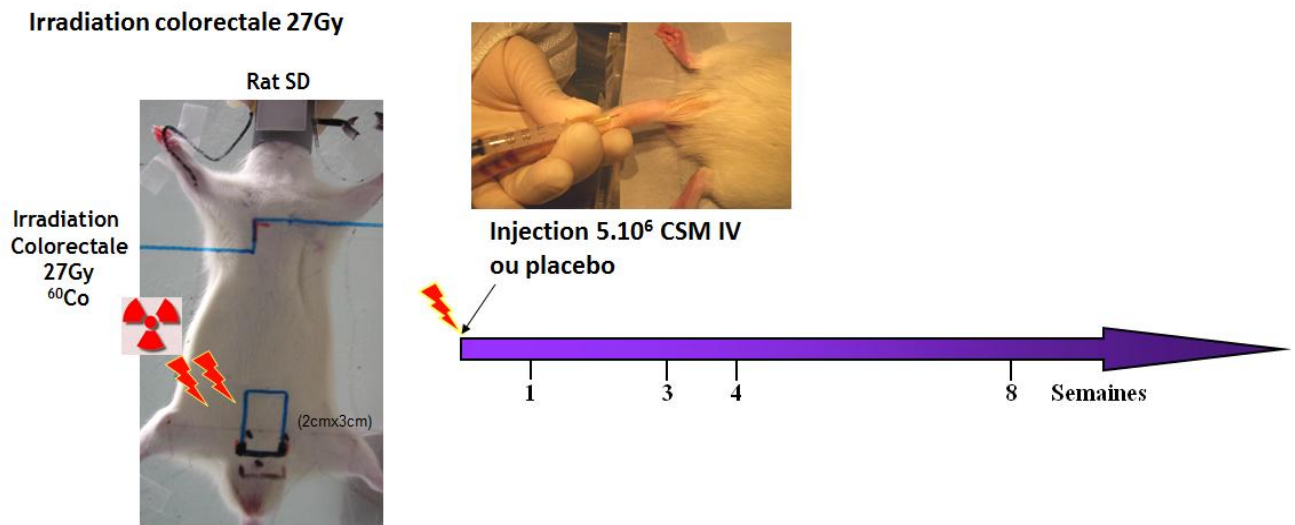


Figure 25 : Irradiation colorectale localisée chez le rat et cinétique d'analyse des effets du traitement précoce par CSM. L'injection de CSM ou du placebo a lieu immédiatement après l'irradiation. Les animaux sont ensuite euthanasiés une, trois, quatre ou huit semaines après l'exposition aux rayonnements ionisants.

4.3.2. Protocole de traitement tardif

Le protocole d'irradiation est identique à celui utilisé lors du protocole précoce. Lorsque la séance d'irradiation est achevée, l'animal est cette fois immédiatement remis dans sa cage sous surveillance en attendant que les effets de l'isofluorane se dissipent. L'injection des CSM ou du placebo en intraveineuse via la veine caudale n'a lieu que 21 jours après l'exposition aux rayonnements ionisants afin de nous permettre d'évaluer l'efficacité de notre traitement sur des lésions et un processus inflammatoire déjà établis. L'animal est alors à nouveau anesthésié par isofluorane gazeux le temps de procéder à l'injection. La suspension cellulaire et le placebo sont les mêmes que dans le protocole précoce.

Irradiation colorectale 27Gy

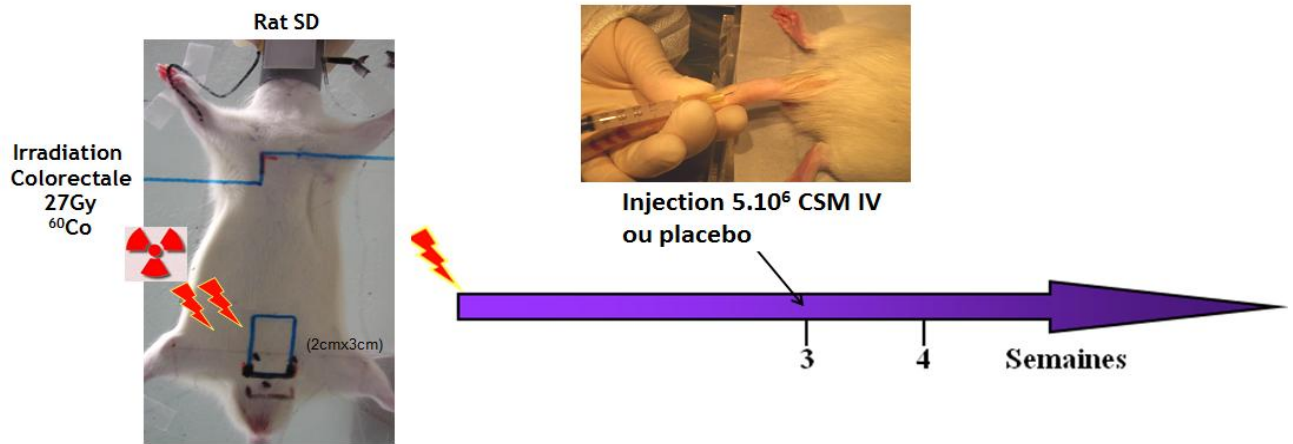


Figure 26 : Irradiation colorectale localisée chez le rat et cinétique d'analyse des effets du traitement tardif par CSM. L'injection de CSM ou du placebo a lieu 3 semaines après l'irradiation. Les animaux sont euthanasiés une semaine après l'injection, soit 4 semaines après l'exposition aux rayonnements ionisants.

Objectifs et Résultats

Ce travail de thèse s'inscrit dans le cadre de la recherche de nouveaux traitements afin de soigner efficacement les patients souffrant d'atteintes non-cancéreuses aux tissus sains suite à une radiothérapie abdomino-pelvienne. La réponse tissulaire à l'irradiation est un processus complexe qui implique différents compartiments tissulaires tels que l'épithélium, l'endothélium, le mésenchyme et le système immunitaire. Si l'inflammation post-radique est une réponse normale au stress que représente l'irradiation et permet d'éviter l'apparition d'une attaque pathogène, son emballement et sa dérive vers un processus chronique vont eux-mêmes provoquer des dommages tissulaires importants et délétères pour la santé des patients. Les cellules souches mésenchymateuses sont depuis quelques années devenues des armes de choix afin de traiter différentes pathologies dégénératives et inflammatoires. C'est pourquoi le laboratoire de Radiopathologie et Thérapies Expérimentales a orienté ses recherches sur une thérapie cellulaire basée sur l'utilisation des CSM afin de restaurer l'intégrité des tissus lésés par l'irradiation et d'inhiber le processus inflammatoire à l'origine entre autres des fibroses radiques. Les résultats d'ores et déjà obtenus sont très encourageants, avec une réduction visible des lésions radiques cutanées et intestinales suite au traitement par CSM (Francois et al. 2006; Semont et al. 2010) + datas en cours de publication). Bien que les résultats obtenus montrent clairement un bénéfice du traitement par les CSM, la compréhension des mécanismes impliqués dans la réparation des lésions radio-induites permettrait d'optimiser les traitements, et ainsi d'améliorer la vie des futurs patients. Les cancers de la sphère abdomino-pelvienne sont parmi les cancers les plus fréquemment traités par radiothérapie. Le colon sigmoïde et le rectum sont, de par leur position fixe au sein de l'abdomen et leur proximité avec des organes tels que l'utérus et la prostate, les organes sains les plus fréquemment irradiés au cours des radiothérapies abdomino-pelviennes. Dans ce contexte, l'objectif de ma thèse a été d'évaluer l'impact du traitement par les CSM sur l'inflammation colorectale radio-induite, ainsi que la relation existant entre cette modulation de l'inflammation et l'amélioration de la régénération des lésions colorectales post-radiques.

- **Le premier objectif de cette thèse a été d'évaluer l'impact du traitement par les CSM sur l'apparition et l'évolution des dommages causés par une irradiation colorectale localisée.** Pour ce faire, nous avons utilisé un modèle d'irradiation localisée à forte dose du colon-rectum chez le rat nous permettant d'obtenir des lésions similaires à celles

observées chez les patients irradiés. Cet objectif a été traité en deux parties. Nous avons en effet évalué d'une part l'impact du traitement sur l'inflammation (**Article 1**) et d'autre part sur les lésions tissulaires radio-induites (**Article 2**), ainsi que les différents mécanismes sous-tendant à ces effets. A l'aide d'une technique d'extraction exclusive des cellules immunitaires contenues dans le colon et grâce à la cytométrie en flux, nous avons pu analyser l'évolution du contexte immunologique local suite à l'irradiation du colon-rectum, avec ou sans traitement par CSM isolées à partir de moelle osseuse. Les effets sur les lésions radio-induites ont quant à eux été évalués grâce à l'établissement d'un score lésionnel (adapté de (Langberg et al. 1994)) sur des coupes histologiques colorées par la méthode de l'HES (Hématoxyline-Eosine-Safran). Les mécanismes moléculaires et cellulaires impliqués dans les effets observés suite au traitement par CSM ont par la suite été étudiés via différentes méthodes. Nous avons ainsi analysé *in vivo* l'expression des médiateurs inflammatoires ainsi que des molécules impliquées dans la croissance et la régénération épithéliales au sein de la muqueuse irradiée. Des études menées à la fois *ex vivo* et *in vitro* nous ont également permis de confirmer les résultats obtenus *in vivo* et de modéliser les différents modes d'action des CSM aboutissant aux améliorations observées suite au traitement.

- **La seconde question abordée durant cette thèse est celle de l'influence de la diminution de l'inflammation sur la régénération observée suite au traitement par CSM (Résultats 3).** Afin d'évaluer l'impact du processus inflammatoire sur la régénération épithéliale post-radique, nous avons utilisé un modèle se rapprochant plus des conditions cliniques. Pour ce faire, le traitement par CSM n'a été administré aux animaux irradiés que 3 semaines après leur exposition aux rayonnements, c'est-à-dire lorsque les lésions et le processus inflammatoire sont d'ores et déjà établis. Les résultats obtenus furent similaires à ceux obtenus lors de l'utilisation du modèle d'injection précoce, avec une nette amélioration de la gravité des lésions ainsi qu'une forte modulation du processus inflammatoire 7 jours après l'injection des CSM (soit 4 semaines post-irradiation). Afin de déterminer la relation existant entre la diminution de l'inflammation et la réparation des lésions tissulaires suite au traitement par CSM, nous avons inhibé l'inflammation à l'aide d'un anticorps bloquant les lymphocytes T. L'impact de la disparition de l'inflammation sur l'évolution des lésions tissulaires a été évalué d'un point de vue aussi bien structural (évaluation du score sur des coupes colorées par HES) que fonctionnel (mesure de la capacité contractile du muscle du colon-rectum). Les résultats obtenus furent similaires à ceux observés suite au traitement par

CSM, démontrant l'existence d'un lien direct entre inflammation et lésions tissulaires radio-induites. Nous avons également commencé à aborder les mécanismes cellulaires et moléculaires sous-tendant ce lien entre inflammation et lésion, notamment via l'étude de l'apoptose cellulaire au sein de la muqueuse intestinale suite au traitement par CSM ou par anticorps bloquant.

Article 1

Résumé de l'article 1 : L'utilisation thérapeutique des CSM induit une synthèse locale de glucocorticoïdes et supprime l'activation radio-induite des lymphocytes T : nouvel éclairage sur l'immunomodulation par les CSM

Introduction

La radiothérapie est largement utilisée dans le traitement des tumeurs pelviennes et abdominales. Bien que le bénéfice de la radiothérapie sur la régression tumorale soit important, on estime tout de même que 80% des patients qui subissent une radiothérapie abdomino-pelvienne développeront des effets secondaires aigus aboutissant à une modification durable de leurs fonctions intestinales, et que 5 à 10% de ces patients développeront des effets secondaires chroniques sévères après 10 ans.

Suite à l'exposition aux rayonnements ionisants, les segments intestinaux ayant été exposés vont rapidement développer une forte réaction inflammatoire, caractérisée par une sécrétion importante de cytokines associée à une invasion de la muqueuse par des neutrophiles et des macrophages. Cette réaction inflammatoire est en outre associée à la dégradation de la muqueuse intestinale provoquée par la mort par apoptose radio-induite des cellules épithéliales. Les symptômes résultant de cette inflammation et de la dégradation de la structure intestinale vont apparaître rapidement et sont souvent douloureux et handicapants pour le patient. Les traitements actuellement utilisés en clinique afin de traiter ces effets secondaires sont le plus souvent symptomatiques et non pas curatifs. Les thérapies basées sur l'utilisation d'une thérapie cellulaire à base de Cellules Souches Mésoenchymateuses (CSM) se sont révélées prometteuses dans de nombreuses pathologies combinant une dégradation structurelle et un processus inflammatoire important (Maladie de Crohn, Rectocolite, ...).

Les objectifs de cette sont multiples. Dans un premier temps, nous avons caractérisé la réponse inflammatoire s'établissant suite à l'irradiation dans notre modèle d'irradiation colorectale localisée à forte dose. Nous avons ensuite évalué l'impact du traitement par CSM sur ce processus inflammatoire radio-induit. Pour finir, différents mécanismes moléculaires impliqués dans ces modulations du processus inflammatoire ont pu être mis en évidence.

Résultats

Dans un premier temps, nous avons caractérisé la réponse inflammatoire innée induite par une irradiation localisée du colon-rectum à forte dose (27Gy). Grâce à un isolement spécifique des cellules immunitaires du colon et à leur analyse en cytométrie de flux, nous avons pu observer une forte augmentation de la présence des neutrophiles au sein de la muqueuse irradiée dès 7 jours après l'exposition. Cette augmentation persiste au cours du temps et reste présente 3 et 4 semaines après l'exposition. Des marquages immunohistochimiques spécifiques sur des coupes histologiques de colons irradiés ont par ailleurs montré une augmentation de la présence des macrophages au sein de la muqueuse irradiée 21 jours après l'exposition. Malgré leurs effets connus sur ces deux types cellulaires, aucune modification de leur présence n'a pu être détectée suite au traitement des animaux par CSM. L'analyse de la sécrétion cytokinique au sein de la muqueuse irradiée nous a quant à elle révélée une forte présence des cytokines produites par les neutrophiles et les macrophages 3 semaines après l'irradiation, là encore sans modulation détectable suite au traitement par CSM.

Nous avons également analysé les composants adaptatifs de la réponse inflammatoire radio-induite. Si aucune modification du nombre de lymphocytes B présents au sein de la muqueuse irradiée n'a pu être détectée, les lymphocytes T CD4 et CD8 sont quant à eux augmentés dès 7 jours après l'exposition. Cette augmentation est en outre persistante jusqu'à 4 semaines après l'exposition. Contrairement aux effecteurs innés, le traitement des animaux par CSM permet de ramener le nombre de lymphocytes T présents au sein de la muqueuse irradiée à celui présent chez des animaux sains, non-irradiés. Les mêmes effets ont par ailleurs pu être observés au niveau systémique (sang et ganglions mésentériques).

Nous avons ensuite cherché à comprendre les mécanismes cellulaires mis en jeu dans l'inhibition par les CSM du nombre de lymphocytes T présents au sein de la muqueuse irradiée. L'analyse des marqueurs d'activation CD25 et CD69 nous a permis de mettre en évidence une inhibition de l'activation lymphocytaire suite au traitement par CSM, aussi bien chez les lymphocytes CD4 que CD8. Ces résultats ont par ailleurs été confirmés par l'analyse de la capacité de prolifération des deux populations lymphocytaires, qui a également montré une nette inhibition chez les animaux traités par rapport aux animaux non-traités. La régulation des mécanismes d'apoptose est également un élément essentiel dans la régulation

de la réponse inflammatoire. La capacité des CSM à augmenter l'apoptose des lymphocytes T activés ayant déjà été démontrée, nous avons voulu vérifier cet effet dans notre modèle. L'analyse *ex vivo* de l'apoptose des lymphocytes T en cours de prolifération nous a permis de mettre en évidence une apoptose accrue des Lt CD8 activés suite au traitement par CSM.

Bien qu'un grand nombre d'études montrent que la régulation des processus inflammatoires par les CSM peut dépendre de l'induction de lymphocytes T régulateurs et d'une sécrétion accrue d'IL-10, ces deux éléments ne semblent pas impliqués dans notre modèle d'irradiation colorectale localisée. Nous avons donc cherché quel mécanisme de régulation de l'inflammation par les CSM pourrait être impliqué dans notre modèle. Pour ce faire, nous nous sommes intéressés aux glucocorticoïdes, régulateurs naturels des processus inflammatoires. Bien que l'analyse de la sécrétion surrénalienne de la corticostérone n'ait montré aucune variation suite au traitement par CSM, l'analyse de la production locale au sein de la muqueuse colique a pour sa part été concluante. Nous avons ainsi pu déterminer que l'injection systémique de CSM aux animaux irradiés entraîne une augmentation de la sécrétion de corticostérone par les cellules de la muqueuse intestinale par rapport aux animaux témoins et aux animaux irradiés ayant reçu le placebo. Cette augmentation est par ailleurs corrélée à une augmentation de l'expression muqueuse de la 11 β -hydroxystéroïde déshydrogénase de type 1 (11 β -HSD1), enzyme responsable de la conversion de la forme inactive de la corticostérone en sa forme active.

Les effets inhibiteurs des glucocorticoïdes sur les lymphocytes T sont largement reconnus. Dans notre modèle, nous nous sommes particulièrement intéressés à l'interaction entre les glucocorticoïdes et le TCR. Nous avons ainsi montré que le traitement par CSM inhibe l'activation de la voie de signalisation du TCR à la fois chez les lymphocytes T CD4 et CD8. Cette inhibition, particulièrement drastique chez les lymphocytes T CD8, est reflétée par une absence de phosphorylation de la tyrosine kinase p56lck, spécifique du TCR. Nous avons également évalué la capacité des lymphocytes T à répondre à une stimulation directe de leur TCR par un anticorps anti-CD3. Nous avons ainsi pu établir que le traitement des animaux par CSM inhibe la capacité de réponse des lymphocytes T CD4 et CD8 à une stimulation de leur TCR. Enfin, nous avons réussi à reproduire ces effets inhibiteurs des CSM en traitant *ex vivo* des lymphocytes T issus d'animaux irradiés par un glucocorticoïde de synthèse, la dexaméthasone. Ces résultats suggèrent donc que l'augmentation de la sécrétion colique de

corticostérone pourrait être fortement impliquée dans l'inhibition de l'activation et de la réponse aux stimuli des lymphocytes T CD4 et CD8 suite au stimulus radique.

Enfin, nous avons évalué la capacité des CSM cultivées *in vitro* à exprimer la 11 β -HSD1 et à produire de la corticostérone. Les résultats ont montré une présence de corticostérone dans le milieu de culture mais aussi dans les protéines extraites des CSM. En outre, une expression basale de la 11 β -HSD1 a pu être détectée dans les CSM cultivée, de même que celle de deux autres enzymes impliquées dans la synthèse des corticostéroïdes, les cytochromes CYP11A1 et CYP11B1. Nous avons en outre montré que l'exposition des CSM à des molécules présentes au sein de la muqueuse colique irradiée (ligands de TLR, cytokines pro-inflammatoires) induit une augmentation de l'expression de ces enzymes par les CSM.

Conclusions

Les résultats obtenus au cours de cette étude démontrent pour la première fois l'effet inhibiteur d'un traitement par CSM sur la part adaptative de l'inflammation radio-induite, et permettent de mettre en évidence un nouveau mode d'action immunomodulateur des CSM. Nous avons en effet été en mesure de montrer que l'inhibition suite au traitement par CSM de la présence, de l'activation et de la capacité de réponse aux stimuli des lymphocytes T CD4 et CD8, ainsi que l'augmentation de l'apoptose des lymphocytes T CD8 activés, sont corrélées à une augmentation de la synthèse endogène de corticostérone par la muqueuse intestinale. Nous avons en outre pu montrer pour la première fois que les CSM cultivées *in vitro* expriment certaines des enzymes impliquées dans la synthèse de glucocorticoïdes et sécrètent spontanément de la corticostérone. Notre étude montre également une influence du contexte inflammatoire sur l'expression des enzymes de synthèse de la corticostérone par les CSM, suggérant que la présence *in vivo* d'une réponse inflammatoire pourrait augmenter la synthèse de corticostérone par les CSM présentes au sein de l'organisme, qu'elles soient endogènes ou injectées dans le cadre d'un traitement. Cette étude met ainsi en lumière un mécanisme de régulation des réponses immunes radio-induites par les CSM jusqu'ici inconnu, et qui pourrait également être valable dans d'autres modèles de maladies inflammatoires intestinales.

Les molécules impliquées dans la synthèse des glucocorticoïdes sont également impliquées dans la régulation de la prolifération des cellules de la crypte intestinale. Les hypothèses concernant les bénéfices observés suite à un traitement par CSM s'orientent toutes en faveur

de l'effet combiné de plusieurs processus bénéfiques. La mise en évidence de cette implication de la voie des glucocorticoïdes dans les effets immunomodulateurs des CSM pourrait de ce fait permettre la mise en évidence future du lien existant peut-être entre les capacités anti-inflammatoires et pro-régénérantes des CSM.

**MSC therapy induces local glucocorticoid synthesis
and suppresses radiation-activated T cells:
New insight into MSC immunomodulation**

Bessout R, Sémont A, Demarquay C, Charcosset A, Benderitter M and Mathieu N.

Institut de Radioprotection et de Sûreté Nucléaire (IRSN), PRP-HOM, SRBE, LRTE,
Fontenay-aux-Roses, France

Corresponding author: MATHIEU Noëlle

Address: IRSN, PRP-HOM/SRBE/LRTE,
BP 17
92262 Fontenay aux Roses
Tel: 33 1 58 35 76 40
Fax: 33 1 58 35 84 67
e-mail address : noelle.mathieu@irsn.fr

Running title: Glucocorticoids in MSC immunosuppression

Abbreviations:

CYP11A1: Cytochrome P450, family 11, subfamily A, polypeptide 1

CYP11B1: Cytochrome P450, family 11, subfamily B, polypeptide 1

GC: Glucocorticoids

GR: Glucocorticoid Receptor

HSD11b1: 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase type 1

MLN: Mesenteric Lymph Nodes

MSC: Mesenchymal Stem Cells

P-I κ k: Phosphorylated p56I κ k

TCR: T Cell Receptor

TLR: Toll Like Receptor

T-Reg: T regulatory cells

ABSTRACT

The efficacy of radiotherapy requires an optimal compromise between tumor control and normal tissue injury. Non-neoplastic tissues around an abdomino-pelvic tumor can be damaged by ionizing radiation, leading to chronic gastrointestinal complications which affect quality of life with substantial mortality. Chronic radiation enteritis is an increasing problem as more patients receive radiotherapy and survive longer after treatment. There is no unified approach to the assessment and treatment of this disease, characterized mainly by uncontrolled inflammation and tissue fibrosis. Stem cell-based approaches using immunosuppressive mesenchymal stem cells (MSC) from bone marrow are promising cell therapy tools to improve inflammatory diseases. In this study, we infused MSC in a rat model of radiation proctitis and found evidence that stem cell treatment specifically reduces T cell infiltration without affecting innate immune cells. We report that MSC therapy decreases proliferation and increases apoptosis of T cells activated by radiation. To assess molecular mechanisms, we analyzed anti-inflammatory molecules and demonstrated for the first time an increased level of corticosterone and HSD11b1 steroidogenic enzyme expression in colic mucosa after MSC treatment. We also demonstrated corticosterone secretion by infused MSC. Using an irradiation model, we found evidence for a new immunosuppressive mechanism of MSC involving glucocorticoids.

KEYWORDS: Stem cell therapy, Bone marrow MSC, Radiation disease, Immunosuppression, Glucocorticoids

INTRODUCTION

Radiation therapy is an established part of treatment of both primary and recurrent pelvic and abdominal malignancies, including colorectal, urologic, and gynecologic cancers. Although the benefit of radiotherapy on tumor regression is well-established, damage to healthy non-neoplastic tissues may be severe and still remains the dose-limiting factor in cancer treatment. It is estimated that 90% of patients who undergo pelvic radiotherapy develop acute side effects with permanent changes in bowel habits. Half of them say that their quality of life is reduced [1]. Within 10 years, 5 to 10% of patients develop severe chronic side effects such as rectal bleeding, occlusion, tenesmus and diarrhea, associated with substantial morbidity and mortality (for review [2]). The growing number of cases declared each year and the specific complex symptoms have led some specialists to talk of a new disease termed “Pelvic-radiation disease” [1]. Understanding the mechanisms involved and the discovery of new therapies have increasingly become a priority.

Following ionizing radiation, mainly studied in the intestine, the early response has been characterized as acute inflammation with a high level of cytokine and chemokine secretion within the first hours. Radiation-induced apoptosis later leads to transient mucosal atrophy with loss in bowel barrier function. The resultant epithelial dysfunction leads to nutrient and fluid loss, whereas the associated increase in intestinal permeability to gut pathogens exacerbates mucosal inflammation with dense infiltration of the lamina propria by inflammatory cells [3]. Activated immune cells, primarily neutrophils followed by macrophages, attack and destroy neighboring cells either directly or indirectly through the release of soluble factors. The endothelial compartment is also affected by radiation exposure leading to increased vascular permeability contributing to immune cell infiltration into injured tissue. Delayed effects of intestinal radiation toxicity are characterized by an abnormally sustained repair process that can lead to transmural fibrosis. The mechanism of radiation injury is a continuous process which starts immediately after irradiation. There is increasing evidence to suggest that some of the risk of late toxicity is related to the degree of acute toxicity, termed “consequential late effects”, and recent clinical data support the hypothesis that cumulative acute symptoms predict

late problems more effectively than peak acute changes [4]. Treatments usually applied to manage acute side effects are only symptomatic, so finding treatments that limit acute radiation toxicity in order to reduce late side effects makes sense.

In order to achieve a combinatorial approach to disease treatment, some investigators have considered the use of stem cells as therapeutic. Stem cell-based approaches using mesenchymal stem cells (MSC) are promising since numerous studies suggest their immunosuppressive and regenerative capacities. In animal models of inflammatory bowel diseases, studies demonstrated that MSC injection down-regulates release of pro-inflammatory cytokines by macrophages and increases T-Reg content in mesenteric lymph nodes [5]. Other studies have highlighted different mechanisms of MSC immunosuppression such as the induction of T cell apoptosis [6, 7] and the induction of T cell anergy [8]. MSC-mediated inhibition of immune response is a complex mechanism that could involve low immunogenicity, the ability to modify maturation and the function of antigen-presenting cells, as well as an alteration in cytokine secretion of naïve dendritic cells, natural killer cells and effector T cells. Emerging theories of MSC-leukocyte interactions have suggested that MSC can enhance natural suppressor populations. These findings have encouraged the use of MSC in acute graft-versus-host disease [9] and autoimmune diseases [10, 11] to induce tolerance.

After pelvic radiotherapy, the colorectum is more commonly injured because of its fixed position in the pelvis. In Sprague-Dawley rats, we generated radiation-induced lesions similar to those seen in patients suffering from the late side effects of pelvic radiotherapy [12]. We characterized immune cell infiltration and found evidence that MSC treatment specifically modulates T lymphocytes. We assessed the molecular mechanisms of MSC immunosuppression in analyzing anti-inflammatory molecule secretion in irradiated mucosa and their effect on downstream T cell signaling.

RESULTS

MSC treatment specifically decreases activated-T lymphocytes induced by recto-colic irradiation

To quantify immune cell infiltration over time following localized colic irradiation and its modulation after MSC treatment, we used flow cytometry analyses on leukocytes isolated from colon and immunohistochemistry. We observed that irradiation leads to a six-fold increase in the percentage of neutrophils in leukocyte infiltrate 7 days after irradiation compared to controls. This increase persists 21 and 28 days after irradiation. However, no modification in the neutrophil infiltrate could be detected after MSC injection at any of the different times analyzed (D7, D21 and D28) (Figure 1A). We also analyzed neutrophil infiltration by immunohistochemistry using antibodies directed against MPO, 21 days after irradiation. In the same way, no modification of radiation-induced neutrophil infiltration can be evidenced by scoring after MSC therapy (Figure 1B, left panel). Two other cells of innate immunity: macrophages and mastocytes were analyzed on histological slides. The results given in Figure 1B show a statistic increase in macrophages and mastocytes in mucosa after irradiation (middle and right panel). However, no modification was observed after MSC treatment. Irradiation induces pro-inflammatory cytokine secretion, in particular IL1 β , IL6 and TNF α , in insulted areas as early as the first hours [13] [14]. However, later secretion of these molecules after irradiation, which could be implicated in late tissue damage, has never been studied. We therefore analyzed the secretion of cytokines and chemoattractants produced mainly by innate immune cells and their modulation by MSC treatment. IL6 and TNF α cannot be detected by ELISA on whole colic mucosa protein extracts after localized colic irradiation. IL1 β , MIP2 and IL8 are secreted in significant quantities after radiation however neither of them decrease after MSC therapy (Figure 1C).

In irradiated mucosa, B, T and NK cells were also quantified. The results show a statistical increase only for CD4 helper and CD8 cytotoxic T cells as early as 7 days and up to 28 days after irradiation. After MSC infusion, the percentage of T cells is statistically lower at 21 and 28 days compared with the irradiated group (Figure 1D). Twenty-eight days after irradiation, we observed that

even if the number of CD8 in irradiated animals was no different from the sham group, a statistical decrease was detected after MSC treatment (Figure 1B). The immunosuppressive effect of MSC on T cells was also observed in the peripheral area (draining mesenteric lymph nodes (MLN) and blood) after localized colic irradiation, with a more significant effect on CD8 compared with CD4 T cells (data not shown).

Cellular mechanisms of MSC immunosuppressive effect in recto-colic irradiation context

T lymphocyte activation using the interleukin 2 receptor (CD25) marker on total T lymphocytes from the colon, MLN and blood was assessed 21 days after irradiation. Flow cytometry results show that the percentage of CD25 activation marker increased 116.7% in the colon, 16.78% in MLN and 41.7% in blood in leukocytes isolated from rats after irradiation. Either in the colon or in the peripheral area, MSC infusion after irradiation decreases the percentage of CD25 activation marker to sham levels (Figure 2A).

To further investigate the activation status in CD4 and CD8 subsets, we analyzed CD4/CD25 and CD8/CD25 double positive cells in MLN of rats from different groups (Figure 2B). The results demonstrate that MSC therapy decreases the CD25 activation marker induced by irradiation in MLN to the same extent for CD4 and for CD8 T cell subsets. This result was confirmed using quantitative RT-PCR on isolated CD4 and CD8 lymphocytes using the CD69 marker (data not shown). We also assessed T cell proliferation ability using a BrDU-based proliferation assay on sorted CD4 and CD8 populations. Corroborating CD25 marker expression, irradiation leads to a statistical increase in both T cell subtype proliferation and MSC treatment reduces their ability to proliferate (Figure 2C). There is a noteworthy effect of MSC treatment on the CD8 T cell population, which has a proliferation rate that is statistically inferior to the sham level.

Regulation of T cell apoptosis is an important mechanism controlling the number of activated T cells. In addition, research has demonstrated an *in vivo* induction of proliferating T cell apoptosis after MSC treatment [6]. We therefore examined apoptosis by AnnexinV staining on *ex vivo* EdU-

incorporated CD4 and CD8 sorted T cells from shams, irradiated and irradiated MSC-treated animals. The results showed a statistical increase in apoptosis (1.5 times more) of proliferating CD8 T cells from irradiated MSC-treated rats compared with irradiated rats (Figure 2D). However, no statistical difference could be detected among proliferating CD4 T cells from the various groups.

MSC infusion induces local corticosterone secretion

An increasing number of *in vivo* studies have demonstrated that IL10-secreting T-Reg are involved in the therapeutic effect of MSC in inflammatory bowel disease [5, 15, 16]. However, depending on the disease model, the molecular mechanisms of immunosuppression induced by MSC seem to vary [8, 17]. To study the immunosuppressive mechanisms of MSC in an irradiation context, IL10 anti-inflammatory cytokine secretion was analyzed after MSC therapy. The results shown in Figure 3A do not demonstrate any increase of IL10 in mucosa. Corroborating this result, we showed that T-Reg cells detected by the CD4/CD25/FoxP3 triple staining are not increased after MSC treatment in irradiated rats compared to controls (Figure 3B). Therefore, IL10-secreting T-Reg are unlikely to be involved in the T cell modulation induced by MSC treatment after irradiation.

The intestine contains a large number of immune cells to protect the huge surface of epithelial cells. The immune system is in constant contact with food antigens and commensal bacteria as well as potentially dangerous bacteria, viruses and parasites. Intestinal mucosa contains high levels of immunosuppressive cytokines, but additional mechanisms exist to maintain confined immune response, such as glucocorticoids (GC). Glucocorticoids are secreted by mucosal cells and studies have demonstrated their important role in intestinal T cell regulation [18]. We therefore investigated whether the immunosuppressive action of MSC therapy could be due to an increase in GC. We analyzed the corticosterone molecule, which is the major GC in rats, in the adrenal glands and colon. In adrenal glands, no modification was detected in irradiated and irradiated MSC-treated rats (data not shown). However, in the colon, the results in Figure 3C show a two-fold increase in the corticosterone level in irradiated rats after MSC infusion compared with irradiated rats. We also analyzed expression

of 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase type 1 (HSD11b1) in colic tissue. This enzyme, implicated in the metabolism of corticosterone, is important in local GC level regulation and is expressed in the colon. Immunohistochemistry analyses on normal colic mucosa showed HSD11b1 expression in the lamina propria and epithelial cells (Figure 3E, top panel) as previously described [18]. After irradiation and irradiation with MSC treatment, we observed a dramatic increase in HSD11b1 expression (Figure 3E, bottom panel). Quantification of *HSD11b1* expression using RT-PCR demonstrated a statistical increase in its expression after radiation by 53-fold, and an even higher increase after MSC treatment (183 fold) (Figure 3D).

Signal transduction induced by glucocorticoids on T cells from irradiated rats: in vivo and ex vivo analyses

MSC treatment after irradiation decreases T cell proliferation by reducing their activation and increases CD8 T cell apoptosis. The effects of GC on these functions are widely recognized and can be achieved through the classic genomic pathway (gene regulation at transcriptional level) or the nongenomic pathway. In our irradiation model, we cannot detect pro-inflammatory cytokine secretion such as IL2 and IFN γ in whole protein extracts from irradiated mucosa. Moreover, transcriptional up-regulation of IL10, which is usually the target of GC leading to an increase in T-Reg, is not observed after MSC therapy (Figure 3A, B). So, GC-induced cytokine regulation by the genomic pathway is unlikely to be the main mechanism involved in our model. Nongenomic GC activities are obviously not uniform, but Löwenberg et al. demonstrated in T cells that GC receptor (GR) is an integrative and essential part of the T cell receptor (TCR) complex. They demonstrated that GC treatment, by inducing GR nuclear translocation, broke up the TCR complex leading to impaired TCR signaling (Figure 4A [19]). We therefore analyzed the impact of irradiation, MSC treatment and GC on CD4- and CD8- TCR signaling, by immunofluorescence staining using phosphorylated p56lck (P-lck) antibody. The results in Figure 4B show that irradiation induces a dramatic increase in the percentage of CD4 and CD8 P-lck positive cells compared to shams. After MSC treatment, the percentage of P-

lck positive cells among CD4 and CD8 sorted cells decreases statistically, with a return to sham level for CD8 T cells. We also tested *ex vivo* the ability of dexamethasone, a synthetic GC, to inhibit TCR signaling of CD4 and CD8 T cells purified from irradiated rats. We found that the incubation of T cells with dexamethasone reduces the percentage of P-lck positive lymphocytes compared to lymphocytes without dexamethasone incubation (Figure 4B). This result demonstrates that a synthetic GC can reduce TCR signaling in irradiated activated lymphocytes. We then assessed the ability of sorted T cells to respond to subsequent direct TCR stimulation using CD3 agonist antibodies. This experiment also demonstrated a decrease in TCR signaling in the T cell population purified from irradiated MSC-treated compared with irradiated rats (Fig. 3B). Taken together, these data suggest that the increased level of corticosterone in colic mucosa after MSC treatment could participate to TCR unresponsiveness and decreased T cell activation.

Infused MSC express HSD11b1 and produce GC in culture.

We have previously demonstrated MSC engraftment in an irradiated intestine [20, 21] and we suggested that MSC benefits are mediated via soluble factors as stated in various studies (for review see [22]). We therefore investigated the ability of infused MSC to express enzymes implicated in GC metabolism (*HSD11b1*, *CYP11A1* and *CYP11B*) and to produce GC in culture. The results demonstrated that corticosterone can be detected in MSC culture supernatant and in MSC total protein extracts (Figure 5A). PCR analysis showed high expression of *HSD11b1*, as its expression level is similar to the housekeeping *GAPDH* gene. *CYP11A1* and *CYP11B1* enzymes are less expressed than *HSD11b1* (Figure 5B). Expression of *HSD11b1* was confirmed at the protein level by immunofluorescence on cultured MSC (Figure 5C). Moreover, we analyzed whether these enzymes are modulated by stimuli induced after epithelial barrier disruption following irradiation (H₂O₂, PAM3CSK4, LPS and Flagellin). We also tested IFN γ stimulation, which has been described as playing an important role in MSC immunosuppression [23]. The results in Figure 5D show that *CYP11A1* expression is not increased after stimulation while *CYP11B1* is increased after IFN γ

stimulation. We determined that *HSD11b1* expression, which is already highly expressed, is increased to an even greater extent after TLR ligand stimulations.

DISCUSSION

Ionizing radiation produces a burst of free radicals which not only causes DNA damage but also alters proteins, lipids, carbohydrates and complex molecules. In organs, this contributes to direct tissue injury as well as cytokine synthesis and recruitment of inflammatory cells. Cellular damage induced by ionizing radiation generally ceases within hours following the insult, while the inflammatory response accumulates, amplifies tissue injuries and reduces the efficacy of the regenerative process. Therefore, the inflammatory reaction after irradiation is presumed to play a pivotal role in the development of pelvic radiation disease and it is important to characterize the immune cells implicated in order to mitigate the inflammatory process. In human colic tissues, histopathology analysis exhibits inflammatory cell infiltration in the lamina propria, with a prevalence of neutrophils, eosinophilic granulocytes and macrophages [1]. Mast cell hyperplasia has also been described in intestine and colic mucosa in late irradiation damage [24]. Our study characterized the composition of innate immune cell infiltrate in colic mucosa up to 4 weeks in experimental colorectal irradiation rat model and the results are in agreement with human cell composition observed after late irradiation damage. In intestinal inflammatory pathologies, it is largely admitted that chronic activated T cells contribute to mucosal damage. After irradiation, a T cell imbalance has been demonstrated [25] but depending on the studied irradiation models, there is either no modification or a decrease of CD4 T cells in the intestine [26, 27]. The present findings, using quantitative flow cytometry analysis, demonstrate the persistent infiltrate of CD4 and CD8 T cells in colic mucosa up to 4 weeks after colorectal irradiation. We also describe a statistical increase in T cell percentage in the peripheral area after local irradiation, demonstrating their ability to continuously recirculate. T lymphocytes from irradiated rats are more activated as measured by the increase of CD25, CD69 markers and their

ability to proliferate in culture compared to control lymphocytes. Radiation treatment of tumors modifies and increases the peptide repertoire (tumor peptides but also self-antigen peptides) presented by CMH class I to cytotoxic CD8 T lymphocytes (CTL) [28]. It has been demonstrated that CTL are activated by this unrecognized repertoire composed of specific irradiated peptides which are very useful in anti-tumor immunotherapy [29]. However, self-antigens may also be presented when irradiation affects healthy tissues and CTL may therefore attack and destroy colic cells, perpetuating tissue lesions. Besides up-regulation of CMH class I, irradiation also induces secretory, adhesion and co-stimulatory molecules as well as Fas expression on hematological or non-hematological cells [30]. Together, these data may explain the activation process of CD8 cytotoxic and CD4 helper cells as well as antigen-presenting cells after irradiation.

Mesenchymal stem cells are mesoderm-derived cells with the ability to extensively proliferate and differentiate in various cell lineages. In addition to these primordial characteristics for tissue repair, MSC have also been shown to hold a potent anti-inflammatory effect on immune disorders such as GVHD [31] or Crohn's disease [32]. *In vitro* studies have demonstrated MSCs' impact onto practically all immune cell subtypes (for review see [33]). In this study, we analyzed *in vivo* the ability of MSC to suppress inflammation induced by ionizing radiation and determined the cellular and molecular mechanisms involved. Analysis of innate immune cells demonstrates that their number and secretion capacities were not modified by MSC therapy. However, we were unable to exclude a modification of the maturation status or function of innate cells associated with T cell-suppression mechanism by MSC in the irradiation model. It has been demonstrated that MSC are able to reprogram macrophages to become immunosuppressive [34] and *in vivo* depletion of CD11b⁺ macrophages abolishes MSC immunosuppressive effect on T cells [16]. This effect will be tested in inflammation induced by irradiation in further investigations. The number and proliferation ability of both CD4 and CD8 T cells return to control level and apoptosis of proliferating CD8 T cells increases following MSC treatment. MSC effect starts as early as 7 days but becomes statistically relevant at 21

days. Altogether these results support the suppression of radiation-activated T cells after MSC therapy and are in accordance with studies obtained in other *in vivo* models [6, 8].

The precise molecular mechanisms of MSC effect on T cell modulation remain unresolved. Various *in vitro* studies demonstrated that immunosuppressive effect is mediated through several inducible soluble factors such as TGF β , HGF, IL10, PGE2 and IDO [35]. In these studies, only a partial reversion of the MSC inhibitory effect on T-cell proliferation was demonstrated. An increasing number of *in vivo* studies demonstrated that the IL10 anti-inflammatory molecule associated to an increased number of T-Reg are involved in the therapeutic effect of MSC [5, 15, 16, 34]. However, according to the model, MSC immunosuppressive effect may be T-Reg independent [6, 7, 17]. While we can easily detect IL10 in MSC culture supernatant, we cannot detect an increase of IL10 secretion or T-Reg cells in irradiated colic mucosa after MSC infusion. However, we found the secretion of corticosterone, a powerful anti-inflammatory molecule, *in vitro*, by cultured MSC associated with the expression of enzymes implicated in the corticosterone metabolism. We also found *in vivo* that MSC treatment increases corticosterone secretion and *HSD11b1* expression in colic mucosa after irradiation which is associated with T cell modulation. These results reveal a new molecular mechanism of MSC immunosuppressive action. MSC treatment after irradiation decreases T cell proliferation by reducing their activation and increases CD8 T cell apoptosis. The effects of glucocorticoids on these functions are widely recognized and can be achieved through the classic genomic pathway (gene regulation at transcriptional level) or the nongenomic pathway. Investigations of the molecular action mechanism of MSC immunosuppression by signal transduction analysis were carried out on isolated T lymphocytes from irradiated rats. We observed a decrease in p56lck phosphorylation after MSC treatment and demonstrated the involvement of the nongenomic pathways in T-cell immunosuppression as described by Löwenberg et al. [19]. The GC genomic pathway is known to induce IL10 secretion and inhibit pro-inflammatory cytokines such as IL2 and IFN γ , it could therefore be hypothesized that GC synthesis is also involved in the MSC immunosuppressive mechanism in other models. This study highlights an unrevealed molecular mechanism of the MSC immunosuppressive effect, valuable in

radiation-induced inflammation but possibly also involved in other inflammatory bowel diseases. We also investigated whether systemic injection of MSC in normal non-irradiated rats could influence specific immunity (Figure 6). MSC were therefore injected intravenously into sham rats and T cell number, CD25 marker, proliferation ability and corticosterone secretion were studied 21 days later. Analyses of CD25 cell surface activation marker on the colon, MLN and blood, as well as BrDU proliferation assay on CD4 and CD8 sorted populations, demonstrated a statistical decrease in basal T cell activation after MSC injection (Figure 6A, B). MSC are thus able to decrease the activation state and proliferation rate of T lymphocytes, associated with an increase in local corticosterone secretion (Figure 6C) even without pathologic activation. However, quantification of lymphocyte number by flow cytometry was not able to detect any difference between shams and sham MSC-injected animals (data not shown). This suggests that MSC must be stimulated to exert their full immunosuppressive capacities. We also demonstrated *in vitro*, that stimuli induced by irradiation (H₂O₂ or TLR ligands) induce an increase in enzymes involved in corticosterone secretion by MSC. This notion that MSC must be stimulated to exert their immunosuppressive capacities has already been described [23] and is of interest in enhancing the therapeutic effect of MSC.

Glucocorticoids are secreted by mucosal cells and we describe an unrevealed corticosterone secretion by native MSC, which have been shown to engraft in irradiated area [20, 21]. Ionizing radiation triggers uncontrolled inflammation but also stem/progenitor cell apoptosis, highly limiting the regenerative ability of mucosa, and leading to chronic damage. The relevance of intestinal GC synthesis in the regulation of immune cells has been demonstrated [18] and experiments established that inhibition of GC synthesis in mice aggravates colic damage [36]. It has been demonstrated that molecules involved in GC synthesis are also important regulators of intestinal crypt cell proliferation [37]. Hypotheses regarding the benefits of stem cell therapy rely on the combinatorial effect of several processes. The involvement of the GC pathway in MSC immunosuppressive effect could therefore contribute to determining the potential link between the anti-inflammatory and regenerative capacities of MSC. These results may be of importance in understanding the molecular mechanisms of MSC

benefits and could open up new perspectives for improving the therapeutic potential of MSC therapy, not only in radiation-induced inflammation but also in other inflammatory bowel diseases.

MATERIALS AND METHODS

Animals, treatments and sample collection

All experiments were performed in compliance with French laws and guidelines for animal experimentations (P08-13). The 300g wild-type male Sprague-Dawley rats were purchased from Charles River Laboratories (France). Animals were anesthetized by isoflurane inhalation and a single 27 Gy dose was delivered by ^{60}Co source through a 2x3 cm window centered on the colorectal region. This model of localized single-dose of radiation exposure generates histopathological lesions similar to those seen clinically (ie, severe acute mucosal ulceration, large immune cell infiltrate and transmural collagen deposition during the late phase). Four groups of animals were defined: Sham (un-irradiated and un-MSC treated), Sham MSC-treated, Irradiated (γ -irradiated alone) and Irradiated MSC-treated. For MSC-treated groups, 5.10^6 autologous MSC were injected in the tail vein of the rat (right after radiation exposure for irradiated MSC-treated animals). Animals were ethically euthanized 7, 21 or 28 days after radiation exposure. Cardiac puncture was made under anesthesia. Collected blood was transferred in EDTA sample collection tubes and centrifuged (2500rpm, 20min) to separate white blood cells from red cells and plasma. Mesenteric lymph nodes and colorectum were sampled and transferred into calcium and magnesium free Hank's Balanced Salt Solution (HBSS, Invitrogen). For histological analysis, colorectum was fixed in 4% formaldehyde and embedded in paraffin.

MSC culture, characterization and stimulation

Bone marrow MSC were obtained by flushing femurs of seven-week-old rat as previously described in the literature [38]. After ten days, the monolayer of adherent cells was trypsinized, resuspended in culture medium, and seeded at 5,000 cells per cm^2 (passage P1). At each passage the phenotype of amplified MSC was verified by flow cytometry. The percentage of CD90 (clone OX-7; BD Biosciences) and CD73 (clone 5F/B9 ; BD Biosciences) was analyzed and the absence of hematopoietic cells was verified with CD34 (clone ICO115, Santa Cruz) and CD45 (clone OX-1; Becton Dickinson, France) markers. On average, MSC expressed CD90 at 94.8% (+/-3.3), CD73 at

81.25% (+/-8.12), CD34 at 2.13% (+/-0.79) and CD45 at 6.4% (+/-1.15). Isotype identical antibodies served as controls. The potential of adipogenic, osteogenic and chondrogenic differentiation was also evaluated as described by Rochefort et al.

Analyses of MSC genic expression were performed after 24 hours of *in vitro* stimulation by H₂O₂ (10⁻⁸ M) or synthetic TLR ligands from Invivogen®: PamCSK4 (TLR2; 2,5µg/ml), UltraPure LPS (TLR4; 1µg/ml) and Flagelin (TLR5; 2.5µg/ml) on 70% confluent cells. Cells were then trypsinized, washed in Phosphate Buffer Saline (PBS, Invitrogen) and frozen in liquid nitrogen.

Isolation of colonic leukocytes and flow cytometry analysis

Immediately after harvesting, distal colon was cut into 5mm pieces and transferred into a solution of HBSS containing 0.752Units/ml of Liberase TL (Roche Applied Science) and 0.1mg/ml of DNase I (Roche Applied Science). Samples were incubated at 37°C for four digestion rounds (20 to 40 minutes each). At the end of each round, samples were 40µm filtered and washed with HBSS supplemented with 0.1mg/ml DNase I and 10% Fetal Bovine Serum (FBS, Gibco). The remaining tissues were put back into the digestion cocktail and shaken again at 37°C. Obtained cells were then settled on a Percoll gradient. Shortly, cells were suspended in a 40% Percoll solution, layered on a 100% Percoll phase before centrifugation (20 min, 2,300 rpm without break). Leukocytes recovered between the two phases were washed in PBS and stained for flow cytometry analysis using direct labeled antibodies against CD3-FITC (G4-18, BD Biosciences), CD4-PeCy5 (Ox-35, BD Biosciences), CD8a-Pe or FITC (BD Biosciences), CD25-Pe (Ox-39, BD Biosciences), Granulocytes (HIS48, eBioscience) and FoxP3 staining kit (eBioscience). Isotype-identical antibodies served as controls. All experiments were made using a FACS Canto II (BD Biosciences) and all analyses were conducted with DIVA software (BD Biosciences). Results are expressed as the percentage of positive cells among the total leukocyte population.

Sorting of CD4 and CD8 T lymphocytes

Separation of CD4 and CD8 T lymphocytes from draining mesenteric lymph nodes was done using MACS technology (Miltenyi Biotech) according to manufacturer's instructions. For the CD4 lymphocytes isolation, 1.10^8 total cells were stained with a biotin-coupled anti-CD4 antibody (OX-35, BD Biosciences). After washing, cells were labeled with streptavidin MicroBeads (Miltenyi Biotech). For CD8 cells, 1×10^8 total cells were incubated with CD8 α MicroBeads (Miltenyi Biotech). Stained cells were then purified on LS columns. Cell purity was assessed by flow cytometry analysis and we obtained on average $86.5\% \pm 1.7\%$ and $71.5\% \pm 1.7\%$ purity for CD4 and CD8 cells respectively.

Measurement of sorted lymphocyte proliferation

Purified lymphocytes were seeded in triplicate into 96-well cell culture plates (75,000 cells per well for CD4 and 150,000 cells per well for CD8) in RPMI 1640 medium (Invitrogen) supplemented with 10% FBS and 50mM β -mercaptoethanol (Sigma-Aldrich). Lymphocytes were stimulated with 20ng/ml of Phorbol 12-Myristate 13-Acetate (PMA, Sigma-Aldrich) and 5 μ g/ml of Concanavalin A (ConA, Sigma-Aldrich). After 72 hours, BrdU was added and we waited an additional 24 hours to reveal cell proliferation by chromogenic assay (Roche Applied Science) according to manufacturer's instructions. Results are expressed in nm (Optical Density).

Measurement of apoptosis on proliferating sorted lymphocytes

EdU proliferation kit (Click-iT EdU Flow Cytometry Assay Kit, Invitrogen) was combined to flow cytometry apoptosis detection by Annexin V antibody (BD Biosciences). 5×10^5 cells were seeded in a 96-well cell culture plate in lymphocyte culture medium with EdU. After 22 hours, cells were harvested, washed, stained for anti-Annexin V expression and EdU incorporation and finally analyzed by flow cytometry. Results are expressed as the percentage of Annexin V positive cells among total EdU proliferating cells.

Immunohistochemistry

Paraffin embedded colons were cut into circular sections of 5µm. Sections were deparaffinized, hydrated and stained for MPO (Imgenex), Macrophages (CD68, AbDserotec), Mastocytes (toluidine blue) and 11β-HSD1 enzyme (11β-HSD1, Rabbit polyclonal, LSBio). Staining was developed with Histogreen substrate (E109; Abcys) and sections were counterstained with Fast nuclear red (S1963; DakoCytomation), dehydrated and mounted.

Immunofluorescence

CD4 and CD8 cells were purified from MLN, fixed onto microscope slides and stained for TCR activation using antibody against the activated form of p56lck (phosphor-Tyr 394, Santa Cruz). Different conditions were analyzed: unstimulated cells, cells activated by anti-CD3 antibody (G4-18, BD Biosciences, 1µg/ml), cells treated by 1µM dexamethasone (Sigma Aldrich) and cells activated by anti-CD3 antibody after dexamethasone treatment.

MSC were cultured on Lab-Tek chamber slide system (Nunc) and stained for 11β-HSD1 enzyme (11β-HSD1, Rabbit polyclonal, LSBio) or control isotype (Dako). Staining was revealed using a fluorescent secondary antibody (Goat anti-rabbit Alexa 568, Invitrogen) and DAPI (Vectashield HardSet Mounting Medium with DAPI, Vector Laboratories). Samples were scanned using a confocal microscope (LSM 780 NLO, Carl Zeiss MicroImaging, Germany) using a 405 nm and a 637 nm LASER under a 20X water objective.

Protein extracts and ELISA

Colic mucosa was separated from muscularis propria by gentle dissection. Mucosa protein extracts were obtained by tissue disruption in PBS with protease inhibitors (complete Mini, Roche) and stored at -80°C until use. Protein measurement was done using a BCA assay kit (Sigma Aldrich). The amounts of IL1β, MIP-2, IL8 and corticosterone in each sample were then determined by ELISA measurement, according to the manufacturer's instructions (BD Biosciences, Invitrogen, USCN life) and expressed for 100 µg of total protein extract (except for culture supernatant: 10⁶ cells per ml).

Real-time quantitative PCR analysis

Total RNA were extracted from the mucosal samples with the RNeasy Mini kit (Qiagen) and cDNA were obtained with the High Capacity Reverse Transcriptase cDNA kit (Applied Biosystems). Real-time quantitative PCR was performed using Taqman gene expression assays (Applied Biosystems) with *GAPDH* as housekeeping gene. Relative mRNA was quantified using the $\Delta\Delta C_t$ method.

Statistical analysis

Results are expressed as mean \pm SEM. Differences between groups were analyzed using the unpaired student t test or non-parametric Mann Whitney test when necessary. $P \leq 0.05$ was considered as statistically significant.

REFERENCES

- 1 Andreyev HJ, Wotherspoon A, Denham JW, Hauer-Jensen M. Defining pelvic-radiation disease for the survivorship era. *The lancet oncology* 2010; 11:310-312.
- 2 Henson C. Chronic radiation proctitis: issues surrounding delayed bowel dysfunction post-pelvic radiotherapy and an update on medical treatment. *Therapeutic advances in gastroenterology* 2010; 3:359-365.
- 3 Theis VS, Sripadam R, Ramani V, Lal S. Chronic radiation enteritis. *Clin Oncol (R Coll Radiol)* 2010; 22:70-83.
- 4 Wedlake LJ, Thomas K, Lalji A *et al.* Predicting late effects of pelvic radiotherapy: is there a better approach? *International journal of radiation oncology, biology, physics* 2010; 78:1163-1170.
- 5 Gonzalez MA, Gonzalez-Rey E, Rico L, Buscher D, Delgado M. Adipose-derived mesenchymal stem cells alleviate experimental colitis by inhibiting inflammatory and autoimmune responses. *Gastroenterology* 2009; 136:978-989.

- 6 Lim JH, Kim JS, Yoon IH *et al.* Immunomodulation of delayed-type hypersensitivity responses by mesenchymal stem cells is associated with bystander T cell apoptosis in the draining lymph node. *J Immunol* 2010; 185:4022-4029.
- 7 Ren G, Zhang L, Zhao X *et al.* Mesenchymal stem cell-mediated immunosuppression occurs via concerted action of chemokines and nitric oxide. *Cell Stem Cell* 2008; 2:141-150.
- 8 Zappia E, Casazza S, Pedemonte E *et al.* Mesenchymal stem cells ameliorate experimental autoimmune encephalomyelitis inducing T-cell anergy. *Blood* 2005; 106:1755-1761.
- 9 Le Blanc K, Rasmusson I, Sundberg B *et al.* Treatment of severe acute graft-versus-host disease with third party haploidentical mesenchymal stem cells. *Lancet* 2004; 363:1439-1441.
- 10 Karussis D, Karageorgiou C, Vaknin-Dembinsky A *et al.* Safety and immunological effects of mesenchymal stem cell transplantation in patients with multiple sclerosis and amyotrophic lateral sclerosis. *Archives of neurology* 2010; 67:1187-1194.
- 11 Sun L, Wang D, Liang J *et al.* Umbilical cord mesenchymal stem cell transplantation in severe and refractory systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 2010; 62:2467-2475.
- 12 Jullien N, Blirando K, Milliat F *et al.* Up-regulation of endothelin type a receptor in human and rat radiation proctitis: preclinical therapeutic approach with endothelin receptor blockade. *International journal of radiation oncology, biology, physics* 2009; 74:528-538.
- 13 Blirando K, Milliat F, Martelly I *et al.* Mast cells are an essential component of human radiation proctitis and contribute to experimental colorectal damage in mice. *The American journal of pathology* 2011; 178:640-651.
- 14 Linard C Fau - Marquette C, Marquette C Fau - Clarencon D, Clarencon D Fau - Galonnier M *et al.* Acute ileal inflammatory cytokine response induced by irradiation is modulated by subdiaphragmatic vagotomy. *Journal of Neuroimmunology* 2005.
- 15 Gonzalez MA, Gonzalez-Rey E, Rico L, Buscher D, Delgado M. Treatment of experimental arthritis by inducing immune tolerance with human adipose-derived mesenchymal stem cells. *Arthritis Rheum* 2009; 60:1006-1019.

- 16 Parekkadan B, Upadhyay R, Dunham J *et al.* Bone marrow stromal cell transplants prevent experimental enterocolitis and require host CD11b+ splenocytes. *Gastroenterology* 2011; 140:966-975.
- 17 Parekkadan B, Tilles AW, Yarmush ML. Bone marrow-derived mesenchymal stem cells ameliorate autoimmune enteropathy independently of regulatory T cells. *Stem Cells* 2008; 26:1913-1919.
- 18 Cima I, Corazza N, Dick B *et al.* Intestinal epithelial cells synthesize glucocorticoids and regulate T cell activation. *J Exp Med* 2004; 200:1635-1646.
- 19 Lowenberg M, Verhaar AP, Bilderbeek J *et al.* Glucocorticoids cause rapid dissociation of a T-cell-receptor-associated protein complex containing LCK and FYN. *EMBO reports* 2006; 7:1023-1029.
- 20 Francois S, Bensidhoum M, Mouiseddine M *et al.* Local irradiation not only induces homing of human mesenchymal stem cells at exposed sites but promotes their widespread engraftment to multiple organs: a study of their quantitative distribution after irradiation damage. *Stem Cells* 2006; 24:1020-1029.
- 21 Semont A, Mouiseddine M, Francois A *et al.* Mesenchymal stem cells improve small intestinal integrity through regulation of endogenous epithelial cell homeostasis. *Cell Death Differ* 2010; 17:952-961.
- 22 Meirelles Lda S, Fontes AM, Covas DT, Caplan AI. Mechanisms involved in the therapeutic properties of mesenchymal stem cells. *Cytokine & growth factor reviews* 2009; 20:419-427.
- 23 Krampera M, Cosmi L, Angeli R *et al.* Role for interferon-gamma in the immunomodulatory activity of human bone marrow mesenchymal stem cells. *Stem Cells* 2006; 24:386-398.
- 24 Zheng H, Wang J, Hauer-Jensen M. Role of mast cells in early and delayed radiation injury in rat intestine. *Radiat Res* 2000; 153:533-539.
- 25 Gremy O, Benderitter M, Linard C. Acute and persisting Th2-like immune response after fractionated colorectal gamma-irradiation. *World Journal of Gastroenterology* 2008.
- 26 Garg S, Boerma M, Wang J *et al.* Influence of sublethal total-body irradiation on immune cell populations in the intestinal mucosa. *Radiat Res* 2010; 173:469-478.

- 27 Billiard F, Buard V, Benderitter M, Linard C. Abdominal gamma-radiation induces an accumulation of function-impaired regulatory T cells in the small intestine. *International journal of radiation oncology, biology, physics* 2011; 80:869-876.
- 28 Reits EA, Hodge JW, Herberts CA *et al.* Radiation modulates the peptide repertoire, enhances MHC class I expression, and induces successful antitumor immunotherapy. *J Exp Med* 2006; 203:1259-1271.
- 29 Takeshima T, Chamoto K, Wakita D *et al.* Local radiation therapy inhibits tumor growth through the generation of tumor-specific CTL: its potentiation by combination with Th1 cell therapy. *Cancer Res* 2010; 70:2697-2706.
- 30 Friedman EJ. Immune modulation by ionizing radiation and its implications for cancer immunotherapy. *Curr Pharm Des* 2002; 8:1765-1780.
- 31 Ringdén O, Uzunel M, Rasmusson I *et al.* Mesenchymal stem cells for treatment of therapy-resistant graft-versus-host disease. *Transplantation* 2006; 81:1390-1397.
- 32 Garcia-Olmo D, Garcia-Arranz M, Herreros D *et al.* A phase I clinical trial of the treatment of Crohn's fistula by adipose mesenchymal stem cell transplantation. *Dis Colon Rectum* 2005; 48:1416-1423.
- 33 Uccelli A, Moretta L, Pistoia V. Mesenchymal stem cells in health and disease. *Nat Rev Immunol* 2008; 8:726-736.
- 34 Nemeth K, Leelahavanichkul A, Yuen PS *et al.* Bone marrow stromal cells attenuate sepsis via prostaglandin E(2)-dependent reprogramming of host macrophages to increase their interleukin-10 production. *Nat Med* 2009; 15:42-49.
- 35 Yagi H, Soto-Gutierrez A, Parekkadan B *et al.* Mesenchymal stem cells: Mechanisms of immunomodulation and homing. *Cell Transplant* 2010; 19:667-679.
- 36 Coste A, Dubuquoy L, Barnouin R *et al.* LRH-1-mediated glucocorticoid synthesis in enterocytes protects against inflammatory bowel disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2007; 104:13098-13103.
- 37 Botrugno OA, Fayard E, Annicotte JS *et al.* Synergy between LRH-1 and beta-catenin induces G1 cyclin-mediated cell proliferation. *Molecular cell* 2004; 15:499-509.

38 Rochefort GY, Delorme B, Lopez A *et al.* Multipotential mesenchymal stem cells are mobilized into peripheral blood by hypoxia. *Stem Cells* 2006; 24:2202-2208.

FIGURES LEGENDS

Figure 1. MSC treatment induces no modification of innate immune cells recruitment nor of cytokines secretion profile but decreases T lymphocytes number.

(A) Quantification of innate immune infiltration was done by flow cytometry analyses (FACS) using anti-granulocytes (His48, BD Biosciences) antibody and expressed in percentage of leukocytes isolated from rat colon. Shams (white bar, n= 13), irradiated animals (red bar) and irradiated MSC-treated animals (green bar) were analyzed at 7 days (n=12 and 6), 21 days (n=9 and 20) and 28 days (n=11 and 8) post-irradiation exposure. Animal numbers are the same in all FACS analysis. (B) Neutrophils infiltration was also analyzed 21 days after irradiation by immunohistochemistry using antibody directed against myeloperoxidase (MPO) then cell infiltrate was scored (left panel). Middle and right panels: staining on histological slides of macrophages (CD68) and mastocytes (toluidine blue staining). Quantification was realized by scoring for macrophages or counted per circular section for mastocytes. (C) Cytokine secretion was measured by ELISA on colonic mucosa protein extracts in Shams (white bar), 21 days irradiated animals (red bar) and 21 days irradiated MSC-treated animals (green bar). (D) Kinetic analysis of the percentage of CD4 (CD3+CD4+) and CD8 (CD3+CD8+) T cells in total colonic leucocytes. All results are expressed as mean \pm SEM. S, $p < 0.05$ versus sham animals. I, $p < 0.05$ versus irradiated animals

Figure 2. MSC treatment decreases activation and proliferation of radiation-activated T lymphocytes and increases apoptosis of proliferating cytotoxic lymphocytes.

(A) Flow cytometry quantification of CD25 positive cells in colon, MLN and blood 21 days after irradiation. (B) Percentage of CD4+CD25+ and CD8+CD25+ positive cells among total MLN cells 21 days after irradiation. (C) CD4 and CD8 sorted lymphocytes from MLN of the different groups 21 days after irradiation were induced to proliferate and assessed for BrdU proliferation assay. (D) Measurement of apoptosis on proliferating cells was assessed *ex vivo* on purified CD8 from MLN of each group, 21 days after irradiation. Freshly sorted CD8 T cells were incubated in culture medium with EdU and analyzed for double staining EdU+AnexinV+ by FACS. All results are expressed as mean \pm SEM, animal number for each group is defined in Fig. 1 and experiments were done at least twice. S, $p < 0.05$ versus sham animals. I, $p < 0.05$ versus irradiated animals.

Figure 3. MSC treatment induces corticosterone secretion in irradiated colon.

(A) ELISA measurement of IL-10 colic secretion. (B) FACS detection of CD4+CD25+FoxP3+ triple positive cells into total MLN cells. (C) ELISA measurement of corticosterone secretion. Shams (white bar), irradiated rats (red bar) and irradiated MSC-treated rats (green bar). (D) Relative *HSD11b1* mRNA expression in mucosa of irradiated and irradiated MSC-treated rats. Results were normalized with *GAPDH* housekeeping gene and standardized to sham level (sham expression =1). (E) Representative pictures of HSD11b1 immunohistochemistry (blue staining) on colic sections from shams, irradiated and irradiated-MSC treated animals. All experiments were done 21 days after radiation-exposure and results are expressed as mean \pm SEM. Animal number for each group is at least six. S, $p < 0.05$ versus sham animals. I, $p < 0.05$ versus irradiated animals.

Figure 4. MSC or Dexamethasone treatment impairs TCR signaling onto CD4 and CD8 T cells from irradiated animals.

(A) Schematic representation of glucocorticoids receptor interactions with TCR adapted from Löwenberg et al. [19]. (B, C) Twenty-one days after irradiation exposure, CD4 and CD8 cells were stained for phosphorylated p56-lck kinase (P-lck) which is essential to TCR downstream signaling;

Shams (white bar), irradiated rats (red bar) and irradiated MSC-treated rats (green bar). (B) Percentage of P-Ick positive cells among total CD4 and CD8 T cells. Effect of corticosterone on TCR signaling was verified *ex vivo* on T lymphocytes from irradiated rats incubated with 1 μ M dexamethasone. Percentage of P-Ick positive cells is represented by orange bars. (C) To assess T cell response to subsequent TCR stimulus, lymphocytes were *ex vivo* stimulated with anti-CD3 antibody before P-Ick staining. Results are expressed as mean \pm SEM and are representative of two independent experiments with 4 animals per group for each experiment. S, $p < 0.05$ versus sham animals. I, $p < 0.05$ versus irradiated animals. NS, $p > 0.05$ versus MSC-treated animals.

Figure 5. *In vitro* cultured MSC express HSD11b1 and produce corticosterone.

(A) Quantification of rat corticosterone by ELISA on 24h cultured MSC supernatant and MSC protein extract. (B) mRNA expression of enzymes implicated in GC metabolism normalized with *GAPDH* in cultured MSC. (C) Confocal microscopy imaging of HSD11b1 expression on cultured MSC. (D) Relative mRNA expression of enzymes following MSC stimulation normalized with *GAPDH* and standardized to unstimulated MSC (unstimulated MSC=1). Results are expressed as mean \pm SEM and experiments were done in triplicate on MSC derived from 3 different samples. S, $p < 0.05$ versus sham animals.

Figure 6. MSC treatment decreases activation and proliferation of T lymphocytes and increases colonic corticosterone level even without radiation exposure.

(A) Quantification by FACS analyses of the percentage of CD25 positive cells in colon, MLN and blood and (B) BrdU proliferation assay on MLN sorted CD4 and CD8 lymphocytes in shams (white bar) and in sham MSC-treated animals (light green bar) 21 days after infusion. (C) ELISA measurement of corticosterone secretion in shams and sham MSC-treated animals. All results are expressed as mean \pm SEM. Animal number for each group is at least six. S, $p < 0.05$ versus sham animals.

Figure 1

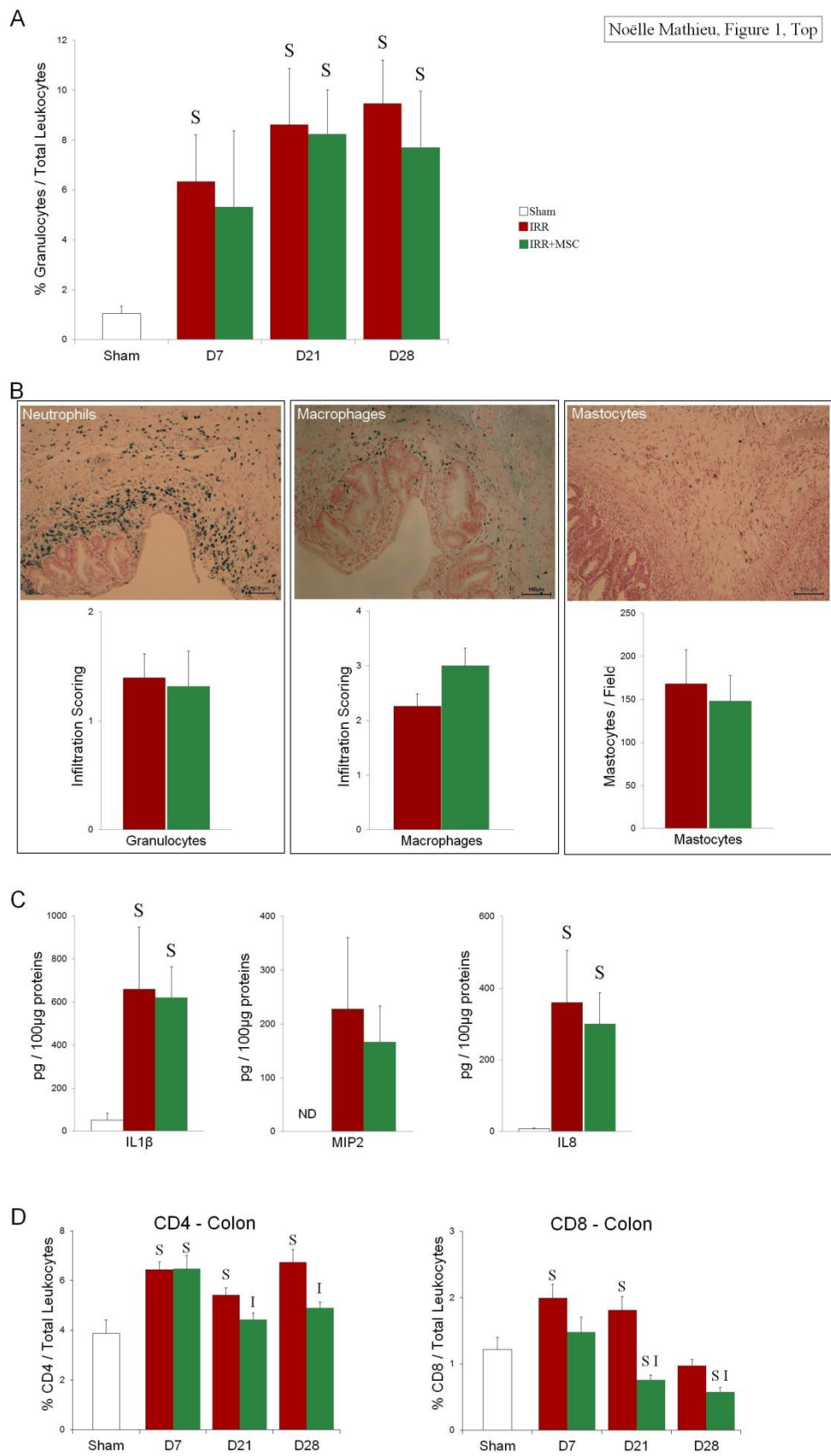


Figure 2

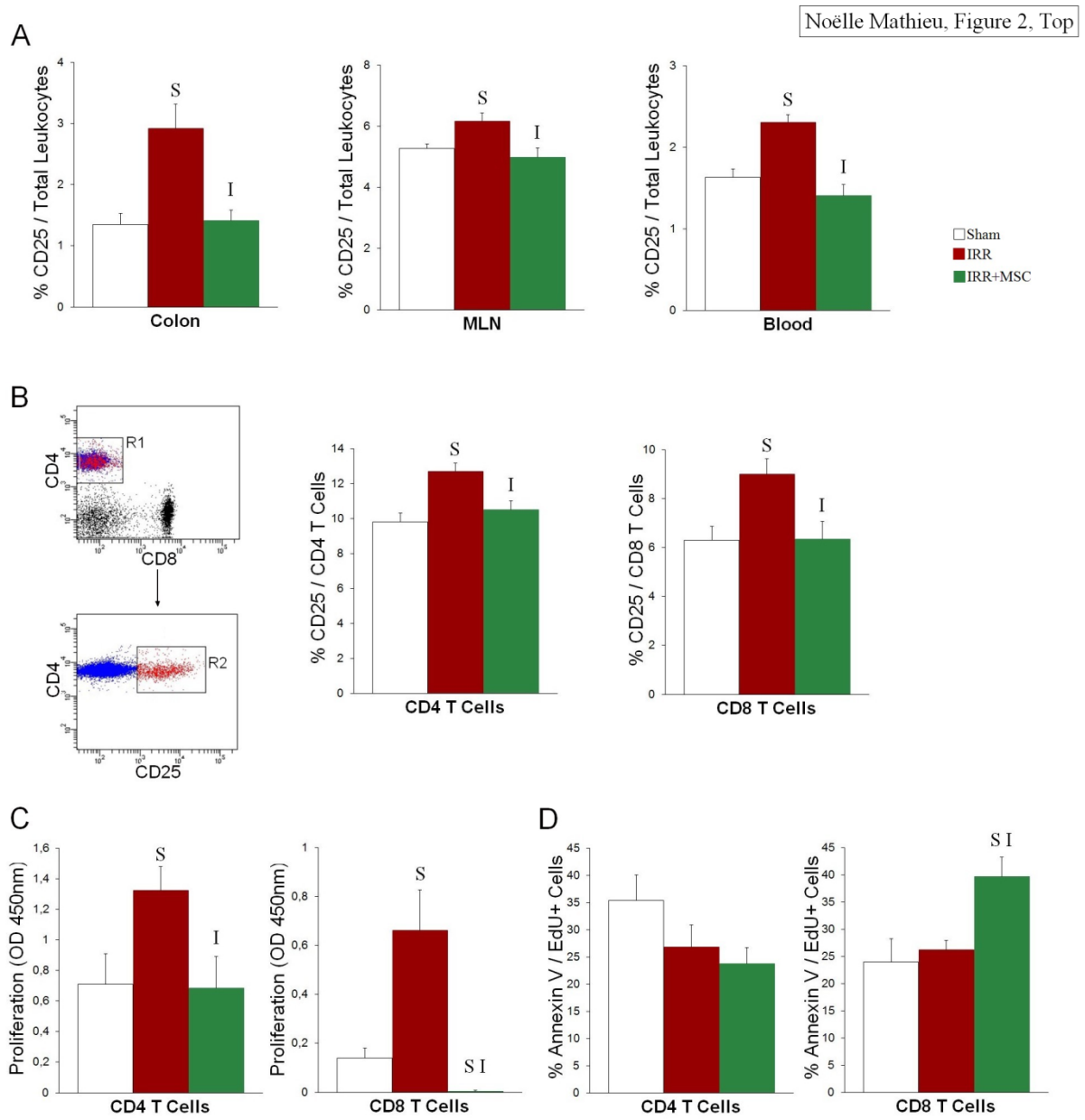


Figure 3

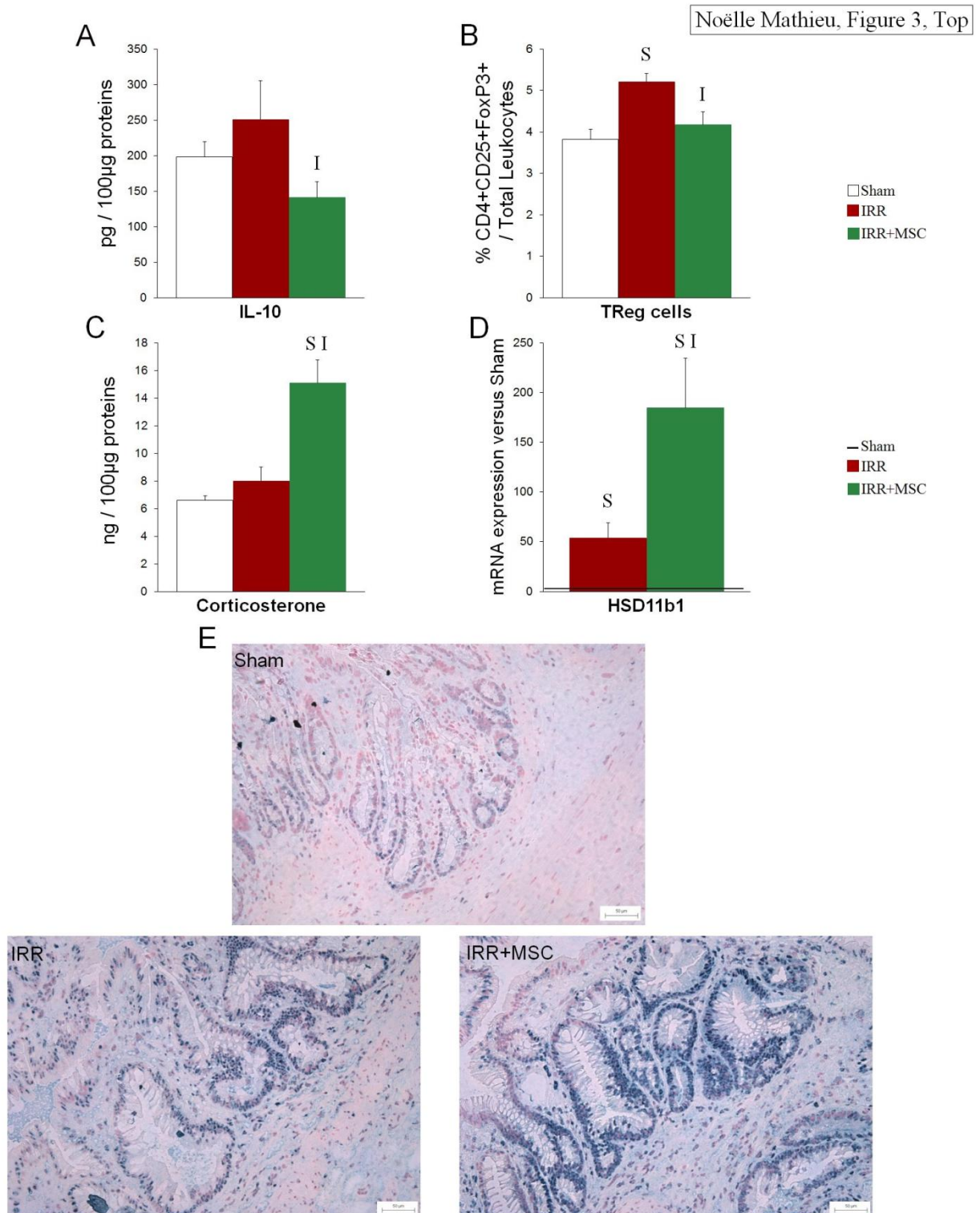


Figure 4

Noëlle Mathieu, Figure 4, Top

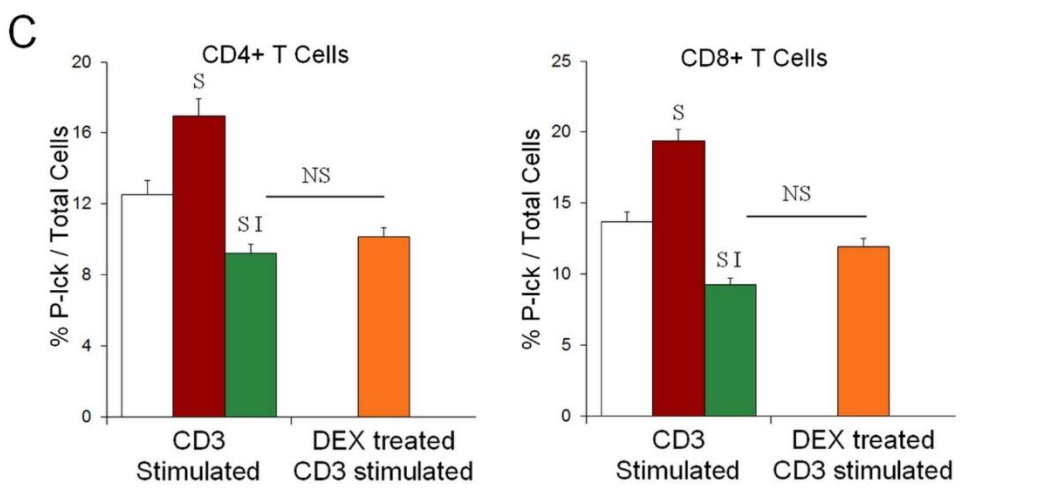
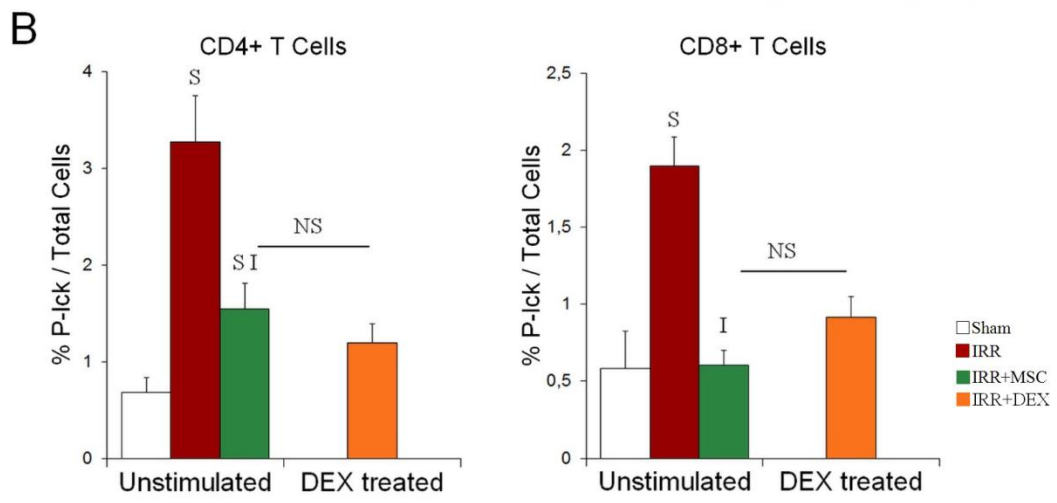
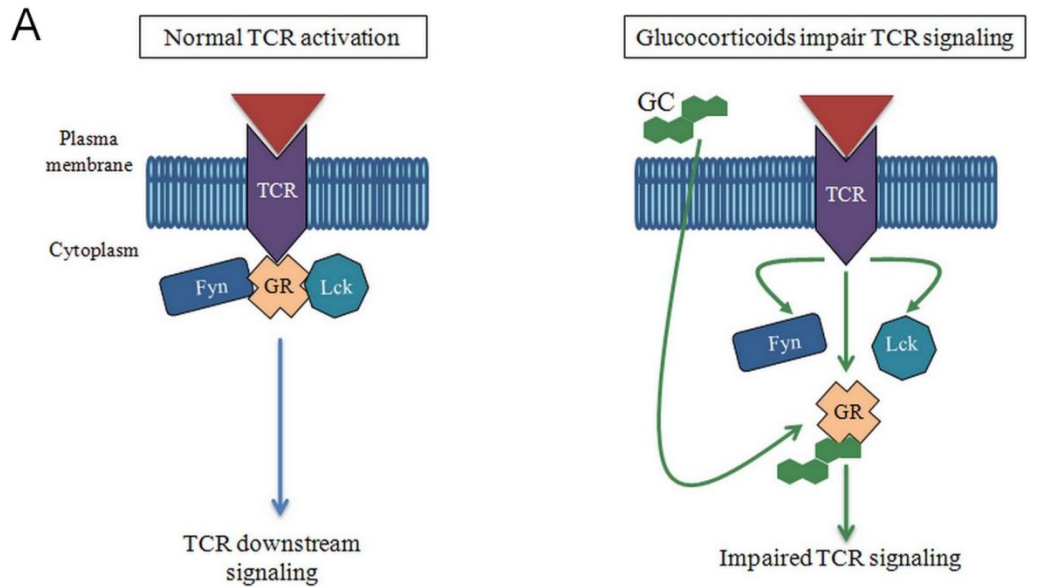


Figure 5

Noëlle Mathieu, Figure 5, Top

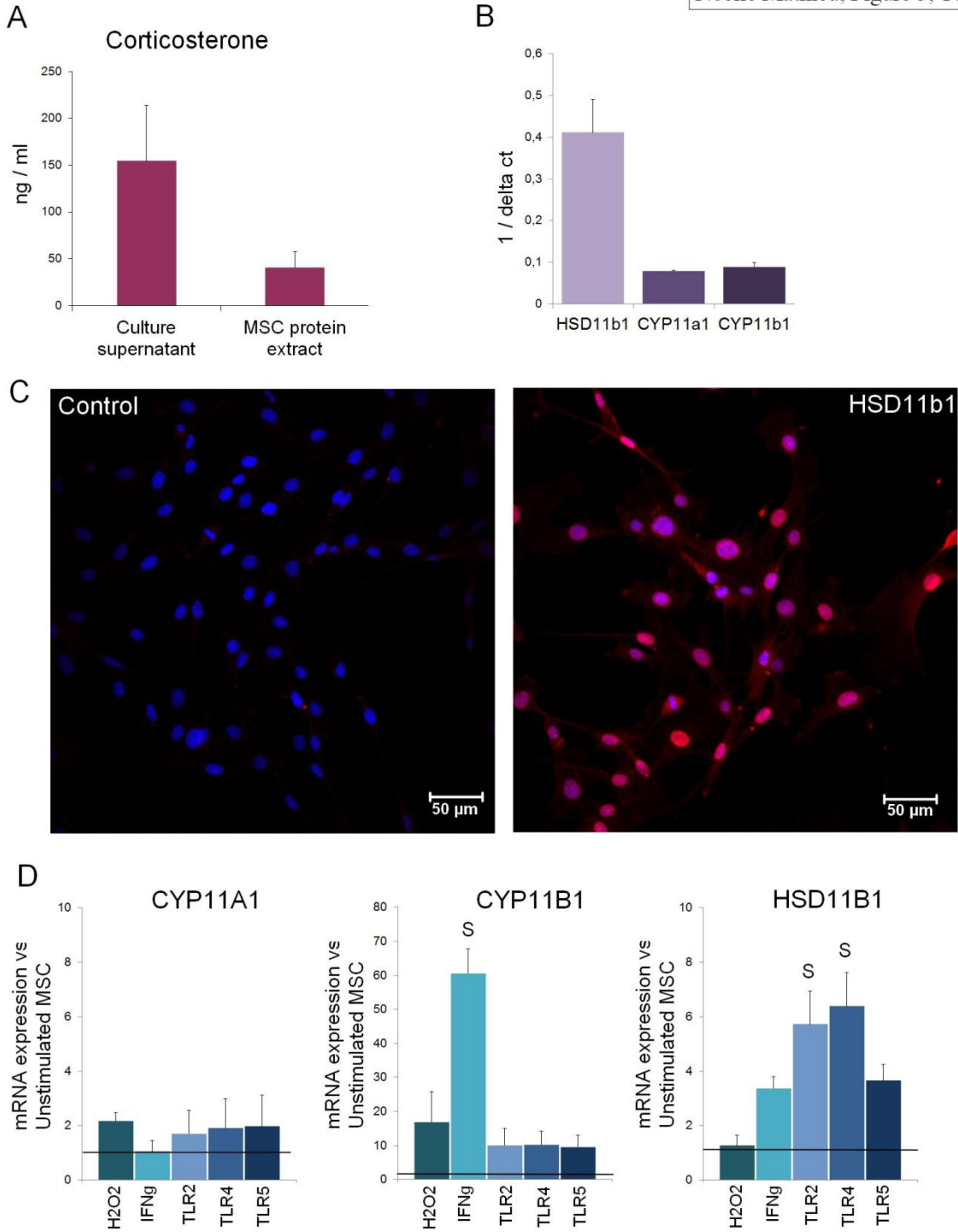
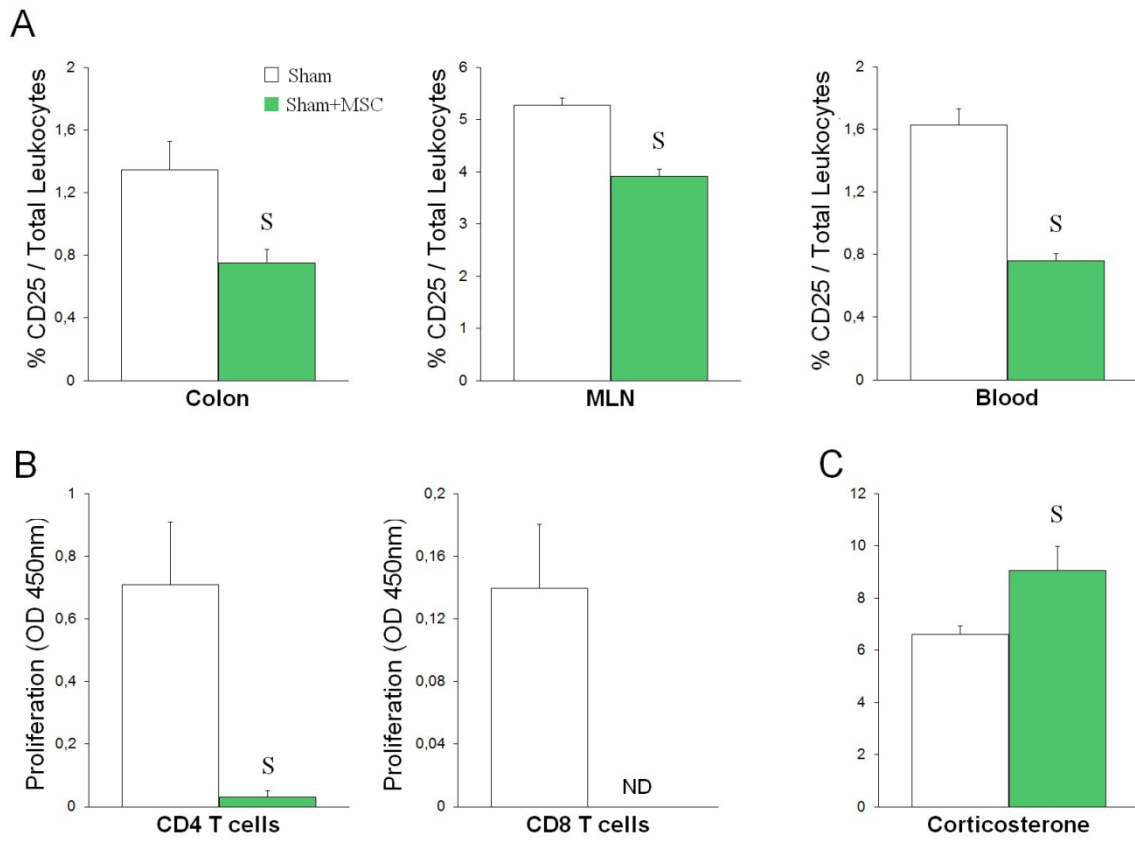


Figure 6

Noëlle Mathieu, Figure 6, Top



Article 2

Résumé de l'article 2 : Les cellules souches mésenchymateuses améliorent la régénération épithéliale colique chez le rat : nouveaux espoirs pour traiter les maladies intestinales radio-induites

Introduction

La radiothérapie est l'un des traitements de référence dans le cas des cancers de la sphère abdomino-pelvienne. L'efficacité du protocole de radiothérapie requiert un compromis optimal entre le contrôle tumoral et la toxicité induite aux tissus sains, non-néoplasiques. L'exposition des tissus sains aux rayonnements ionisants peut donner naissance à des complications gastro-intestinales aiguës et chroniques, appelées « pelvic-radiation disease ». On estime que 5 à 10% des patients irradiés souffrent d'effets secondaires tardifs sévères (diarrhées, saignements rectaux, occlusions) après à leur radiothérapie.

Suite à l'irradiation, la modification du processus de régénération de l'épithélium colique va aboutir soit à une perte de tissu (ulcération, apparition de fistules) soit à une cicatrisation pathologique (fibrose). Une restauration rapide de l'intégrité de la structure intestinale est donc essentielle afin de préserver l'homéostasie normale de la muqueuse. Dans le colon, la structure épithéliale est maintenue grâce à un processus de renouvellement permanent des cellules épithéliales différenciées, assuré par la réplication et la différenciation de cellules clonogéniques localisées au sein de la crypte colique. Ces cellules souches intestinales (CSI) peuvent être identifiées à l'aide de marqueurs moléculaires tels que Lgr5, Sox9, Tert et Bim1. Plusieurs stratégies pharmaceutiques basées sur la protection/suppression de la destruction des cellules ou sur la stimulation du processus régénératif ont été testées afin de limiter les dommages intestinaux radio-induits. Cependant, leur efficacité est actuellement limitée et de nouvelles recherches sont nécessaires afin d'améliorer leurs effets. Les thérapies cellulaires à base de cellules souches mésenchymateuses (CSM) sont prometteuses dans de nombreux modèles de lésions coliques, et ont d'ores et déjà fait leurs preuves lors d'essais cliniques. Dans cette étude, nous avons tout d'abord évalué l'impact du traitement par CSM sur les lésions induites dans notre modèle d'irradiation colorectale localisée. Nous avons ensuite étudié les différents mécanismes moléculaires et cellulaires impliqués dans l'obtention du bénéfice observé. Les différentes études menées *in vivo* et *in vitro* nous ont ainsi permis de

mettre en évidence plusieurs mécanismes à l'origine de la régénération observée suite au traitement par CSM.

Résultats

Dans un premier temps, l'analyse histologique des résections chirurgicales pratiquées chez des patients ayant subi une radiothérapie pour des cancers de la zone abdomino-pelvienne nous a permis de constater la présence de zone ulcérées ainsi que de zones fibrotiques au sein de la muqueuse colique irradiée. Dans notre modèle expérimental d'irradiation colorectale localisée à forte dose chez le rat, des lésions similaires à celles observées chez les patients ont pu être retrouvées, et ce de façon relativement précoce suite à l'irradiation (1 à 8 semaines).

L'utilisation de CSM issues d'animaux transgéniques exprimant constitutivement la GFP (Green Fluorescent Protein) nous a permis de détecter la présence des CSM injectées au sein de la muqueuse irradiée. Les cellules ont ainsi pu être retrouvées dans la sous-muqueuse et près des vaisseaux mésentériques jusqu'à 7 jours après l'injection. L'analyse de la présence des CSM dans le sang a été réalisée en utilisant la capacité des CSM à former des colonies fibroblastiques (CFU-F) en culture. Trois jours après leur injection, on retrouve 2,5 fois plus de CSM dans le sang des animaux traités que chez les animaux ayant reçu le placebo. Cependant, les cellules ayant formé les CFU-F en culture se sont révélées être négatives pour l'expression de la GFP, indiquant une origine médullaire des CSM. Cette mobilisation des CSM endogènes suite au traitement par CSM est en outre associée à une augmentation du chémoattractant SDF-1 α , suggérant l'existence d'un lien entre ces deux phénomènes.

L'analyse histologique de la structure colique suite à l'irradiation et au traitement par CSM a montré une amélioration du score lésionnel 7 et 14 jours après l'exposition et le traitement par CSM. Ce bénéfice se traduit par une amélioration du processus de ré-épithélisation donnant naissance à des cryptes atypiques, ainsi que par une augmentation de la création de nouvelles cryptes via le phénomène de « crypt branching ». En outre, l'analyse immunohistochimique des protéines formant les jonctions serrées, indispensables au maintien de l'intégrité de la barrière épithéliale, montre que leur expression, diminuée suite à l'irradiation, redevient similaire à celle des animaux non-irradiés suite au traitement par CSM. Ces résultats montrent

donc que le traitement par CSM permet d'améliorer le processus de régénération colique post-radique.

Nous avons par la suite étudié les mécanismes impliqués dans cette amélioration du processus régénératif par les CSM. Afin de reproduire *in vitro* les effets observés *in vivo*, nous avons mis au point un modèle d'interaction entre des cellules épithéliales intestinales (IEC18) et les CSM. Le mécanisme d'action supposé étant un effet paracrine via la sécrétion des facteurs de croissance, nous avons irradié des cellules IEC18 et les avons cultivées en présence ou non de milieu conditionné de CSM. L'impact de la présence du milieu conditionné de CSM a été évalué en mesurant la prolifération des cellules IEC18. Cette technique nous a permis de constater que la culture en présence de milieu conditionné de CSM permet d'augmenter la capacité de prolifération des cellules épithéliales irradiées (+31,55% de cellules). Nous avons ensuite réalisé une analyse des molécules pro-proliférantes sécrétées par les CSM. Dans nos conditions de culture, les 9 facteurs connus pour faciliter la réparation de la muqueuse intestinale sont exprimés. Afin d'évaluer le rôle de chacun, nous avons utilisé des inhibiteurs spécifiques que nous avons ajoutés à notre milieu conditionné de CSM et avons évalué l'impact de chaque blocage sur la prolifération des cellules IEC18. Nous avons ainsi pu constater que si l'inhibition totale des voies de prolifération Wnt inhibe l'effet bénéfique du milieu conditionné de CSM, cet effet est lié à l'inhibition d'une voie des Wnt particulière, dite non-canonique, et impliquant spécifiquement la molécule Wnt4, sécrétée par les CSM en culture.

L'irradiation provoque une diminution du nombre de cellules proliférantes au sein de la muqueuse colique deux semaines après l'exposition. Le traitement par CSM permet en revanche de d'augmenter le nombre de cellules proliférantes de 32,1% par rapport aux animaux irradiés ayant reçu le placebo. Le traitement par CSM permet également d'augmenter l'expression génique des marqueurs de SCI Sox9 et Tert. Cette augmentation de Sox9 a également été retrouvée lors de l'analyse immunohistochimique des coupes de colons issus d'animaux irradiés et traités par CSM. Cette restauration du nombre de cellules Sox9 positives est accompagnée d'une augmentation de l'expression génique de Wnt4 au sein de la muqueuse colique, confirmant l'implication de la voie non-canonique des Wnt observée *in vitro*.

Enfin, nous nous sommes intéressés à l'efficacité thérapeutique du traitement par CSM de lésions radio-induites non plus précoces mais établies. Nous avons donc choisi d'injecter les CSM non plus immédiatement après l'irradiation mais 3 semaines après, lorsque les lésions sont déjà établies. Des injections répétées de CSM à nos animaux irradiés nous ont permis de mettre en évidence une amélioration de la survie des animaux traités par CSM par rapport aux animaux ayant reçu le placebo. Les analyses menées en histologie et par coloscopie nous ont permis de mettre en évidence une amélioration de la gravité des lésions suite au traitement par CSM. Tout comme pour le protocole précédent d'injection précoce, cette amélioration de la gravité des lésions a pu être corrélée avec une augmentation du nombre de cellules Sox9 positives ainsi que de l'expression de Wnt4 par les cellules épithéliales.

Conclusions

Les résultats obtenus au cours de cette étude démontrent pour la première fois le bénéfice thérapeutique apporté par l'utilisation de CSM dans le traitement des lésions coliques radio-induites sévères. Cet effet bénéfique a pu être observé aussi bien lors du traitement précoce, i.e immédiatement après l'irradiation, que tardif, i.e 3 semaines après l'irradiation. Cette étude constitue donc une première approche nous permettant d'envisager d'adapter la thérapie par CSM au traitement des patients souffrant de « pelvic-radiation disease ».

Dans cette étude, nous avons également pu mettre en évidence une mobilisation des CSM endogènes suite à l'injection de CSM exogènes aux animaux. Cette mobilisation des cellules endogènes pourrait permettre de poursuivre la régénération tissulaire même si les cellules injectées ne sont retrouvées que transitoirement au sein de l'organisme.

D'un point de vue mécanistique, notre étude montre que le traitement par CSM permet de maintenir la capacité de prolifération, et de ce fait le potentiel de régénération, de l'épithélium colique, tous les deux altérés suite à l'irradiation. La sécrétion par les CSM d'une grande variété de molécules bioactives est impliquée dans un grand nombre de leurs effets bénéfiques. Dans notre modèle, le traitement par CSM augmente la sécrétion paracrine de la molécule Wnt4 par la muqueuse colique, qui semble être à l'origine de la stimulation de la prolifération des cellules Sox9 positives observée et qui permet d'améliorer le renouvellement épithélial.

Cette étude fournit des éléments montrant que l'utilisation thérapeutique des CSM limite les effets nocifs de l'irradiation sur l'épithélium colique via une amélioration du processus

endogène de régénération épithéliale L'une des caractéristiques majeurs de la « pelvic-radiation disease » est que d'autres organes, tels que la vessie, peuvent également à long terme développer des lésions radio-induites qui vont venir amplifier les effets secondaires déjà présents. Dans ces cas d'atteintes multi-organes, les CSM présenteraient un avantage thérapeutique certain puisque leur utilisation en médecine régénérative afin de réparer différents organes (vessie, foie, rein, ...) a déjà été largement décrite dans la littérature.

Mesenchymal Stromal Cells improve colonic epithelial regeneration in rat:

New insights to treat pelvic radiation disease

Short title: MSC therapy stimulates host tissue regeneration

ALEXANDRA SEMONT, CHRISTELLE DEMARQUAY, RAPHAËLLE BESSOUT, CHRISTELLE DURAND, MARC BENDERITTER and NOËLLE MATHIEU.

Institut de Radioprotection et de Sûreté Nucléaire, PRP-HOM/SRBE/LRTE, BP 17, 92262 Fontenay-aux-Roses, France

Grant Support: This work was supported by the Institut de Radioprotection et de Sûreté Nucléaire and by grants from Ile de France regional council.

Abbreviations: CFU-F, colony-forming unit-fibroblasts ; GFP, green fluorescent protein; Gy, Gray; ISC, Intestinal stem cells; MSC, Mesenchymal stromal cells; SDF-1 α , Stroma derived factor-1 alpha.

Correspondence: MATHIEU Noëlle, PhD, Institut de Radioprotection et de Sûreté Nucléaire, PRP-HOM/SRBE/LRTE, BP 17, 92 262 Fontenay-aux-Roses, France, E-mail:noelle.mathieu@irsn.fr, Tel: 33 1 58 35 76 40, Fax: 33 1 58 35 84 67.

Disclosures: The authors disclose no conflicts

Author Contribution:

ALEXANDRA SEMONT: study concept and design; acquisition of data; analysis and interpretation of data; drafting of the manuscript;

CHRISTELLE DEMARQUAY: acquisition of data; analysis and interpretation of data; statistical analysis;

RAPHAËLLE BESSOUT: acquisition of data; analysis and interpretation of data;

CHRISTELLE DURAND: acquisition of data; analysis and interpretation of data;

MARC BENDERITTER: study supervision

NOËLLE MATHIEU: study concept and design; acquisition of data; analysis and interpretation of data; drafting of the manuscript;

ABSTRACT

BACKGROUND & AIMS: Patients who undergo pelvic radiotherapy may develop severe chronic gastrointestinal lesions and complications, the condition labeled as “pelvic radiation disease”. The lack of curative treatment and the potential severity of the disorder highlight the importance of novel and effective therapeutic strategies. We, thus, tested the therapeutic benefit of mesenchymal stromal cells (MSC) treatment and proposed molecular mechanisms of action.

METHODS: Histological studies of epithelial damages of the colon were carried out from resections performed in patients with colorectal adenocarcinoma and subjected to preoperative pelvic radiotherapy. MSC efficacy was tested in an experimental model of radiation-induced similar severe colonic ulceration to those observed in patients. Rats were subjected to 27-Gy colorectal irradiation. In this model, MSC (5×10^6 cells) were administered intravenously, immediately or three weeks (established lesions) after irradiation and analysis were performed 1, 2, 8 or 21 weeks after irradiation.

RESULTS: Injected-MSC engraft in the colon but also increase endogenous MSC mobilization in blood (with plasmatic SDF-1 α increase). MSC therapy reduces radiation-induced colonic ulcers by improving the epithelial regenerative process. MSC infusion increases the proliferation of epithelial cells through paracrine mechanisms involving non-canonical Wnt4 pathways. Proliferating cells are also positive for SOX9 progenitor/stem cell marker. The regenerative potential of MSC could be due to their ability to maintain some active progenitor/stem cells with the ability to proliferate.

CONCLUSIONS: This study constitutes a first approach to arguing in favor of the use of MSC for compassionate applications to reduce irreversible pelvic radiotherapy-induced gastrointestinal complications.

Keywords: Radiotherapy Side Effects; Regenerative Medicine; Intestinal Stem Cells; Non-Canonical Wnt4 Pathways

INTRODUCTION

Radiotherapy is an established part of treatment of both primary and recurrent pelvic malignancies, including colorectal, urologic, and gynecologic cancers. The efficacy of pelvic radiotherapy requires an optimal compromise between tumor control and toxicity to healthy, non-neoplastic tissues. As a result of radiotherapy, non-neoplastic tissue around the tumor can be damaged, leading to acute and/or chronic gastrointestinal complications, the condition labeled as “pelvic-radiation disease” by Andreyev *et al*¹ Advances in the quality of radiation treatment have improved tumor control, increasing the number of cancer survivors suffering from treatment-related adverse effects. It is estimated that 90% of patients subjected to pelvic radiotherapy develop acute side effects (nausea, alternation of diarrhea and constipation, vomiting and abdominal pain) with permanent changes to their bowel habits. Half of these patients report that their quality of life is reduced. After 20 years, 20% of patients develop severe late side effects (diarrhea, rectal bleeding, tenesmus and occlusion)² associated with high morbidity and mortality.

After irradiation, death of proliferating stem cells, microvascular apoptosis and local ischemia can disrupt epithelial renewal. Moreover in the gut, impairment of the epithelial barrier may result in increased penetration and absorption of toxic and immunogenic factors, leading to uncontrolled immune response and homeostatic imbalance in the epithelium. Disturbance of the repair process can lead to loss of tissue (ulceration, fistula) or pathological healing (fibrosis). Thus, rapid resealing of the epithelial surface barrier following injury is essential to preserve normal homeostasis. Colorectal epithelium is maintained by an intricate cell-replacement process in which terminally differentiated epithelial cells are continuously and rapidly replaced by replication and differentiation of clonogenic epithelial cells located within the colonic crypts. The recent identification of intestinal stem cell (ISC) markers such as Lgr5, Sox9, Tert and Bmi1, made it possible to distinguish two functionally distinct ISC populations during homeostasis and the injury repair process. Lgr5+, Sox9+ mark the rapidly dividing cells and identify a population of cells capable of forming *in vitro* organoids.³⁻⁵ In support of Potten’s initial hypothesis, the ISC field has recently evidenced the presence in the intestine of Sox9+, Bmi+ and mTert+ slow-cycling cells playing an important role in the regenerative process.⁶⁻⁹

To minimize radiation damage to the intestine, several pharmaceutical strategies have been considered, based on the protection/suppression of the destructive process (TFF3, GLP2) or stimulation of the regenerative process (Il11, KGF and R-Spondin). However, their efficacy is limited and further research is needed to investigate their safety and efficacy in patients. To date there are no effective FDA-approved therapeutic agents for improving

significantly intestinal radiation-induced lesions.¹⁰ Stem cell-based approaches using MSC have proved promising for the development of future therapeutic approaches. In mouse models of inflammatory bowel disease, MSC injection reduces the severity of colitis, prevents recurrence of the disease and reduces animal mortality.¹¹ In clinical trials, MSC treatment induces therapeutic benefits in patients with graft-versus-host disease¹² or Crohn's disease,¹³ suffering from gastrointestinal disorders such as peritonitis or rectovaginal and perianal fistulas respectively. Moreover, long-term follow-up of patients undergoing MSC administration affirms the safety profile of the treatment.¹⁴

In this study we used a rat model of radiation-induced injury, with mucosal damage histologically similar to that seen in patients treated by radiotherapy. In this context, we assessed the ability of MSC to improve epithelial integrity. We also analyzed the involvement of molecular signaling pathways on epithelial cells regulation *in vitro* and *in vivo* after MSC treatment.

MATERIALS AND METHODS

Cell Cultures

Rat Bone marrow MSC were obtained as previously described in the literature.¹⁵ For the MSC-conditioned medium preparation, MSC were seeded at 2×10^6 cells in 75cm² flasks and cultured overnight in media without fetal calf serum (FCS). The supernatant was then collected and frozen and the cells were counted.

IEC-18 were obtained from ATCC (ref ATCC-CRL-1589, Manassas, VA) and cultured in DMEM, high glucose (Invitrogen) supplemented with 5% FCS, 1% PS and 1% Glutamine (Gibco-BRL; Invitrogen). Cells were seeded at 60,000 cells/well in 6-well plates, starved for 24 h without FCS, irradiated or not at 15-Gy with a ¹³⁷Cs source (1.1 Gy/min). Immediately after irradiation, MSC-conditioned medium or medium alone was applied to the cells with or without inhibitors of different signaling pathways. After 48 h, supernatants were collected for protein analysis and IEC-18 were trypsinized and numbered.

Animals, Irradiation and MSC injection

All experiments were performed in compliance with French laws and guidelines for animal experimentation (Act no.92-333) and approved by the IRSN Ethics Committee. The 300g wild-type male Sprague-Dawley rats were purchased from Charles River Laboratories (France). Animals were anesthetized by isoflurane inhalation and a single 27-Gy dose was delivered from a ⁶⁰Co source through a 2x3 cm window centered on the colorectal region.

Immediately after irradiation (preventive protocol) or three weeks after irradiation, then every 15 days (late and iterative protocol), 5 million MSC were injected into the tail vein of the anesthetized rat. Colonoscopy analyses were performed over time on anaesthetized rats using a pediatric bronchoscope (Pentax, France).

Rat and Human Tissue Samples

Rats were killed 1 or 2 weeks (preventive protocol) and 8 or 21 weeks (late protocol) after irradiation. Blood and colon were collected for analysis.

Human tissue was obtained following institutional ethical guidelines (Gustave Roussy Institute) and French Medical Research Council guidelines.

Statistical Analysis were performed using unpaired Student's t-test, non-parametric Mann Whitney test or a one way ANOVA followed by a Tukey-test, with $P < 0.05$ considered significant.

Full methods available in Supplementary Information

RESULTS

Histopathology of Colorectal Radiation Injury in Patients Subjected to Pelvic Radiotherapy and in a Rat Model.

Histologic examination of normal human mucosa revealed numerous organized crypts lining dense muscularis mucosa (Figure 1A-a). In the irradiated field, characteristic damage is observed, which can be separated into dystrophic and fibronecrotic zones. In dystrophic areas, mucosal lesions consist of atypical crypts and edema (Figure 1A-b). In fibronecrotic areas, crypts are almost completely absent and mucosa is replaced by intense inflammatory cell infiltrate (Figure 1A-c). Non-healing mucosal ulcers are usually associated with fibrosis, which affects the mucosa and sub-mucosa with dense extracellular matrix deposition (Figure 1A-d). In our experimental model of rats subjected to colorectal irradiation, histopathological lesions were similar to those seen clinically. Indeed, irradiation induced apoptotic crypts and sub-mucosal edema 1 week after irradiation. At 2 weeks, we observed dystrophic zones or fibronecrotic zones. Substantial sub-mucosal edema was also visible (Figure 1B-b). Eight and 21 weeks after irradiation, fibronecrotic areas in mucosa and sub-mucosa were also observed (Figure 1B-c). While atypical crypts usually described as highly dividing cells could still be seen in the lamina propria and the sub-mucosa (Figure 1B-d), there was a worsening of the lesion leading to transmural fibrosis associated with vascular sclerosis and dystrophy of the muscularis propria.

MSC Engraft in Colonic Mucosa and Improve Endogenous MSC Mobilization into Blood

MSC were prepared from bone marrow of green fluorescent protein (GFP)-transgenic SD rats, then verified for GFP expression and injected intravenously in immunocompetent SD rats immediately after colorectal irradiation. We analyzed MSC engraftment in colonic mucosa using immunohistochemistry. Experiments revealed the presence of GFP cells in the sub-mucosa and in the mesentery, near the vessels, until one week after MSC injection (Figure 2A). However, GFP-MSC injected couldn't be detected after two weeks via this method. We, then, tested the ability of MSC therapy to induce endogenous MSC mobilization in the blood. To quantify MSC frequency in peripheral blood, we used their ability to form colony-forming unit-fibroblasts (CFU-F) in culture. Morphology of blood-derived CFU-F was similar to those obtained from bone marrow (Figure 2B). Quantitative analysis evidenced a 2.5-fold ($p=0.011$) increase in the number of blood-derived CFU-F, three days after MSC treatment, in comparison with the irradiated group (Figure 2C). As CFU-F were GFP-negative, we can exclude the presence of injected cells in blood three days after the treatment. At the same time, MSC treatment also induced increase ($P<0.05$) in the level of chemoattractant molecule SDF-1 α in plasma compared to irradiated animals (Figure 2D). These results suggest that mobilization of endogenous MSC into the bloodstream induced by MSC-based therapy could be at least stimulated by the secretion of SDF-1 α .

MSC Therapy Decreases Radiation-Induced Colonic Ulcers and Improves Epithelium Integrity

Quantification of the therapeutic potential of MSC infusion on epithelial injury induced by ionizing radiation was analyzed on histological sections using HES coloration. Results demonstrated improvements in the epithelial injury score at 1 and 2 weeks of 16.05% ($p=0.022$) and 25.48% ($p=0.024$) respectively (Figure 3A). This therapeutic benefit is cell dose-dependent; indeed the injection of lower number of MSC (1×10^6 and 0.1×10^6) displayed no significant benefit on the radiation-induced epithelial injury score (data not shown). Within the irradiated area, we observed a characteristic benefit of MSC therapy at 2 weeks with improvement of the compensatory re-epithelization process that originates in atypical crypts with actively dividing epithelial cells (Figure 3B). Newly-formed crypts are important for the epithelial regeneration process in the intestine and can be achieved through crypt branching (Figure 3C-a). While the underlying mechanisms of crypt branching are unknown, it has been suggested that crypt size is important in initiating this phenomenon. We used morphometric analysis to evaluate crypt depth and counted the number of crypt branching per transversal section located near the ulcerated zone. At 2 weeks, we observed increased crypt size in irradiated rats ($363.07 \mu\text{m} \pm 5.7$) compared to controls ($266.4 \mu\text{m} \pm 2.9$), which was even greater in the irradiated, MSC-treated group ($475.91 \mu\text{m}$

± 8.9). This crypt size increase is associated with a higher number of crypt branching which is substantially higher ($p < 0.001$) in irradiated animals infused with MSC compared to irradiated animals not treated with MSC (Figure 3C-b). The number of crypts per transversal section was also higher ($p < 0.001$) in the irradiated, MSC-treated group compared to the irradiated group (data not shown). After irradiation, we also observed, at the margin of the ulcerated areas, edematous areas where crypt structure seems to have been preserved. We reported functional changes in this zone, which are not observed after MSC treatment. Indeed, immunostaining experiments reveal a decrease in adherent junction protein expression after irradiation, while this level of expression is similar to the control after MSC treatment (Figure 3D). Furthermore, a radiation-induced reduction of goblet cell content (i.e. acid mucus stained with alcian blue) was not reported after MSC treatment (Figure 3E). Altogether, these results demonstrate that infused MSC reduce radiation-induced ulcers by improving the regenerative process not only in ulcerated areas but also in healthy margins.

MSC-Secreted Molecules Increase the Number of Crypt Epithelial Cells: Involvement of the Non-Canonical Wnt Pathways

To analyze paracrine mechanisms of MSC action and signaling pathway involvement in the re-epithelization process, we performed *in vitro* experiments using irradiated, non-transformed rat crypt epithelial cells (IEC-18) cultured or not with MSC-supernatant (SN-MSC). In our culture conditions, rat MSC expresses β FGF, HGF, KGF, I111, R-Spondin, Wnt2, 4, 5 and 11 molecules, factors described as facilitating intestinal mucosal repair. We also reported that SN-MSC increases the expression of β FGF, KGF, I111 and Wnt4 by IEC-18 (Suppl. Data 1). We observed a 31.55% increase ($p < 0.001$) in the number of irradiated IEC-18 in the presence of SN-MSC (Figure 4A). Blocking PI3-K, MEK or JAK signaling pathways does not significantly modify the MSC-induced benefit (Figure 4B). Although the three inhibitors were added at the same time to the culture medium, SN-MSC increases the number of irradiated IEC-18 (data not shown), demonstrating non-redundant role of PI3-K, MEK and JAK pathways. Nevertheless, blocking Wnts signaling pathways with CK1i cancelled out the benefit of SN-MSC (Figure 4B). The use of DKK1, which specifically blocked canonical Wnt pathway, did not affect the benefit of SN-MSC (Figure 4C). Canonical Wnt pathway is dependent on the stabilization of β -catenin and its translocation to the nucleus. We validated the absence of this pathway involvement in analyzing β -catenin localization by means of immunofluorescence on irradiated IEC-18. As GSK3 inhibitor induces stabilization of intra-cellular β -catenin in irradiated IEC-18, incubation with SN-MSC maintains β -catenin localized to the cell membrane in irradiated IEC-18 (Figure 4D). Non-canonical Wnt pathways are the planar cell polarity (PCP)

pathway and the calcium-dependent pathway (Wnt/Ca²⁺). Using specific inhibitors of these pathways, we demonstrated significant loss of the benefit provided by SN-MSC (Figure 4C). Downstream signaling of non-canonical pathways induces c-Jun phosphorylation. Western blotting analysis revealed an increase (p<0.05) of c-Jun phosphorylation in irradiated IEC-18 after SN-MSC incubation (Figure 4E). These *in vitro* results demonstrate that MSC, via paracrine mechanisms, increase the secretion of growth factors by crypt epithelial cells, among them the non-canonical Wnt4 molecule. Moreover, MSC increase the number of crypt epithelial cells through the non-canonical Wnt pathways.

After Colorectal Irradiation, MSC Therapy Induces Proliferation of Crypt Epithelial Cells and Increases Wnt4 Ligand Expression

Epithelial proliferation was assessed by counting PCNA-positive cells per total cells of the crypt on sections of the colon adjacent to the ulcer. Two weeks after irradiation, the number of proliferating cells per total cells of the crypt has decreased in irradiated animals. At the same time, the increased proliferation observed in the irradiated, MSC-treated group compared to the irradiated group is 32.1% (Figure 5A and 5B). We also demonstrated, through gene expression analysis in colonic mucosa, that MSC treatment increases Sox9 and Tert ISC markers (Figure 5C). Immunohistochemistry analyses with Sox9 marker allow us to distinguish low-expressing cells (described as transit-amplifying progenitor cell zone) and high-expressing cells (described as cells with stemness characteristics). As already demonstrated in the colon,⁵ we found a majority of proliferating cells that also express Sox9 at the bottom of the crypt. One and 2 weeks after irradiation, we observed a number decreasing of sox9+ cells. The reduction is small for Sox9-low cells and drastic for Sox9-high cells. MSC treatment in irradiated rats increases the number of Sox9-low cells compared to values obtained in irradiated animals (x1.44 at 1 week [p<0.001] and x1.48 at 2 weeks [p<0.001]). At 1 week, this number remains at the basal level (Figure 5D). MSC treatment also limits radiation-induced reduction of the number of Sox9-high cells and the major effect (p<0.001) is detected at 2 weeks (x4.5 in irradiated and MSC treated rats *versus* irradiated rats) (Figure 5D). To evaluate molecules involved in crypt-cell proliferation, we performed *in vivo* analysis of growth factor secretion (EGF, β FGF, IGF1/2, KGF and Il11), R-Spondin and Wnt gene expression (Wnt2, 3, 4, 5, 6 and 11) on colonic mucosa. Except for Wnt4 gene expression, results do not evidence differences between irradiated and irradiated, MSC-treated animals, similar to our *in vitro* findings (Figure 5E and Suppl. Data 2). Two weeks after irradiation with or without MSC treatment, we observed an increase of Wnt4 immunostaining in epithelial cells (Figure 5F). Quantification of Wnt4 expression using RT-PCR demonstrated a small increase in its expression

after irradiation by 3.6 fold, and an even higher increase ($p=0.003$) by 2 fold, after irradiation and MSC treatment (Figure 5E). Our results demonstrate *in vivo* MSC ability to maintain regenerative properties by stimulation of proliferating colonic epithelial cells. This effect might be potentiated by an epithelial cell autocrine regulation through the secretion of the non-canonical Wnt4 factor.

Analysis of the Therapeutic Efficacy of MSC on Established, Radiation-Induced Damage.

Three weeks after irradiation colonic ulceration are established. Iterative injections of MSC starting at this time increase ($p=0.005$) animal survival (Figure 6A). Colonic lesions were also studied by endoscopy. Representative pictures are presented in Figure 6B. We observed profound ulcerated areas with necrotic tissues in irradiated rats. Hemorrhages and petechial vessels were also observed in numerous irradiated animals. In MSC-treated rats, deep necrotic areas are less extensive and hemorrhages are less pronounced but petechial vessels are still observed. Scoring of lesions on HES slides demonstrated muscular ($p<0.001$) and vascular ($p=0.001$) improvement at 8 weeks and 21 weeks respectively. Furthermore, we observed mucosal improvement at both times ($p<0.001$ and $p=0.004$) (Figure 6C and 6D). Mucosal scoring includes epithelial atypia, re-epithelization ability and size of the ulceration. All of these criteria were improved in MSC-treated compared to the non-treated group. These results demonstrate improved mucosal structure in MSC-treated rats that could be explained by an increased capacity of crypt epithelial cells, located at the margin of the ulcer, to proliferate (Figure 7A). As previously described in preventive protocol (Figure 5), this was associated with an increase in Sox9 cells and boosted Wnt4 molecule expression (Figure 7B).

DISCUSSION

The present findings demonstrate that a single dose of local irradiation induces severe colonic epithelial alterations leading to chronic mucosal ulceration and fibrosis. In previous studies performed using the same model, we showed that, in addition to epithelial lesions, irradiation also induces inflammatory processes and vascular damage.^{16, 17} These lesions seem to be similar to those observed in patients subjected to pre-operative radiotherapy who develop side effects. Using this model we demonstrated, for the first time, the therapeutic benefit of MSC on radiation-induced severe epithelial colonic ulceration. Therapeutic efficacy of MSC was observed at all stages of lesion development (i.e. in established or non-established lesions) at the time of cell treatment. This study constitutes a first approach to being able to argue in favor of the use of MSC for

compassionate applications in order to try to reduce irreversible, pelvic radiotherapy-induced gastrointestinal complications. We provided evidence that MSC therapy maintains the proliferative ability, and therefore regenerative potential, of the colonic epithelium, which is lost after irradiation. Our study postulates the paracrine mechanisms of MSC action, in which Wnt4, through non-canonical pathway activation, might play a major role in the stimulation of Sox9-positive progenitor/stem cell proliferation and therefore in the improvement of epithelium renewal.

MSC-mediated secretion of a broad range of bioactive molecules induces more significant biological effects than their ability to differentiate.¹⁸ As already demonstrated by Lee *et al.*,¹⁹ in our model we observed a high number of injected MSC trapped in the lung initially and until three days after their injection (data not shown). Lung-trapped MSC have been reported to improve myocardial infarction through the abscopal effect.¹⁹ Such a mechanism could also be responsible for the initial benefit induced by MSC on colonic epithelial regeneration. In addition to the presence of MSC in the lung, we also observed transient engraftment of these cells in irradiated mucosa. Accumulation of evidence shows that MSC are also capable of migrating into injured tissues after intravenous delivery.²⁰ It has been hypothesized that MSC will engraft in tissue through the same mechanism as leukocytes. Indeed many of molecules involved in the tethering, rolling, adhesion and transmigration of leukocytes from the bloodstream into the tissue are known to be expressed on MSC.²¹ However, colorectal irradiation leads to a local inflammatory environment that is unfavorable to the survival of MSC. Thus, the secretion of regenerative factors by MSC engrafted in the colon was probably followed by their rapid removal. This could explain the common difficulty in highlighting MSC engraftment in damaged tissues. We also demonstrated that MSC therapy increases plasmatic SDF-1 α and endogenous circulating MSC. SDF-1 α plays an important role in the mobilization of MSC by down-regulating adhesion molecules that hold them in their niche.²² Our study thus supports the idea that MSC therapy using secreted factors could enhance the pool of endogenous MSC by mobilizing them from organ storage. This endogenous MSC mobilization could indirectly ensure the continuation of tissue regeneration even if injected cells are partially lost. Mobilization of endogenous MSC to promote tissue repair has already been reported after tissue damage^{15, 23} but never after MSC therapy, as was demonstrated in this study.

Intestinal epithelium undergoes rapid, continuous homeostatic renewal. Upon injury, the integrity of the intestinal mucosal surface is rapidly re-established because of the epithelium's powerful regenerative capability. The ability of the host to respond to intestinal injury requires a highly orchestrated response involving migration, proliferation and differentiation of the epithelial cells from the ISCs. Our study demonstrates that radiation-

induced reduction of colonic epithelial cells with progenitor or stemness characteristics (Sox9+), is limited by MSC therapy. Indeed, MSC treatment delays the reduction of Sox9-high cell number. Moreover, MSC therapy reduces the decline of both Sox9-high and Sox9-low cell number. These effects are associated to an increase in the number of proliferating cells in the colon crypt. Recent studies have demonstrated that following Lgr5+ cells depletion (that are also Sox9-high) as a result of genetic mutation or irradiation, the number of slow-cycling cells (Sox9-low) increases, giving rise to Lgr5-expressing cells⁶⁻⁹. Moreover, during the regenerative process following irradiation, Sox9-low slow-cycling cells acquire *in vivo* proliferative potential and exhibit the ability *in vitro* to form organoids, whereas the same non-irradiated subset failed⁹. Altogether, results from various studies suggest that crypt regeneration involves the activation of a subset of radiation-resistant, low-proliferating cells that can adopt or dedifferentiate into a “stem cell-like” state²⁴ with high proliferation capacity. Our results are in accordance with this concept and seem to demonstrate that after radiation injury, MSC therapy might improve this process.

As previously described for bone marrow hematopoietic stem cells,²⁵ MSC might be an essential component of the intestinal epithelial stem cell niche, providing an optimal microenvironment for stem cell function. Mesenchymal-epithelial paracrine interactions involved in ISC maintenance and activation depend on a large array of signaling molecules. Wnt glycoprotein family is expressed specifically in the mesenchymal and epithelial compartments in the adult intestine²⁶ and the Wnt pathways have emerged as a key regulator of maintaining epithelial homeostasis.²⁷ Our data support the assumption that MSC efficacy on the regenerative process of colonic epithelium after its irradiation may involve the Wnt signaling pathway activation through mesenchymal-epithelial paracrine interactions. Wnt glycoprotein family is a highly conserved ligand that acts through the canonical (Wnt1, 2 and 3) or non-canonical (Wnt4, 5a, 6 and 11) signaling pathways. Our *in vitro* experiments show that the inhibition of canonical Wnt pathway by DKK1 does not modify the increase of epithelial cells induced by SN-MSC. Similarly, recent *in vivo* data has demonstrated that the canonical Wnt antagonist DKK1 does not modify epithelial proliferation in the colon.²⁸ We also reported by both *in vitro* and *in vivo* experiments that SN-MSC or MSC treatment respectively does not induce β -catenin nuclear translocation in colonic epithelial cells, usually observed after canonical Wnt pathway activation. We, thus, can exclude the involvement of canonical Wnt pathway in MSC ability to induce mucosal regeneration of the colon in a context of radiation-induced its alteration. By contrast, in the small intestine, the canonical Wnt signaling pathway has been shown to accelerate radiation-induced ISC proliferation.²⁹ Such controversial results could be explained by the differential responsiveness of segments of the digestive tract to canonical Wnt agonists/antagonists or to the

relative abundance of Wnt agonists in the colon.²⁶ We clearly show *in vitro* an involvement of non-canonical Wnt pathways in MSC-induced the increase of epithelial cells and our results also suggest a MSC ability to stimulate autocrine regulation of epithelial cells through the secretion of Wnt4 factor. Our *in vivo* study points in the same direction. We, thus, demonstrated that after irradiation, MSC treatment stimulates epithelial proliferation and increases the number of Sox9-high positive cells associated with an increase in Wnt4 expression by colonic epithelial cells. Altogether, these data support the involvement of the non-canonical Wnt4 pathway in the capability of MSC to increase progenitor/stem cells activation and therefore to favor the epithelial regenerative process of the colon after radiation-induced its epithelium ulceration. In regenerative medicine, it also been demonstrated in a hindlimb ischemia model that MSC-secreted Wnt4, which increases with hypoxia, plays a primordial role in vascular and skeletal muscle fiber regeneration.³⁰ Another study also demonstrated that MSC genetically engineered to express Wnt-4, enhance osteogenesis and improve the repair of craniofacial defects.³¹

Canonical and non-canonical Wnt pathways act via Frizzled family receptors and it has been demonstrated that Lgr5 (R-spondin receptor) associate with Frizzled in β -catenin signaling,³² reinforcing the notion that Wnt signaling and stem cell biology are closely related.³³ Moreover, Lgr5 can also act through the non-canonical signaling pathways depending on the availability of molecules.³⁴ In the colon, Sox9-high positive cells are also Lgr5.⁵ However, we were not able to set up Lgr5 immunostaining in rat colon to confirm this observation. In our model, R-spondin (ligand of Lgr5) is expressed in colonic mucosa but its expression is not modified after MSC treatment (data not shown). However, we cannot exclude the synergy of R-spondin and Wnt molecules in inducing non-canonical signaling and ISC proliferation.^{33, 34}

Although various drugs have been already tested in clinic to reduce “pelvic radiation disease”, no agents have been identified that are able to prevent or reduce intestinal radiation toxicity, which is the most important dose-limiting factor during pelvic radiotherapy.¹⁰ This study provides evidence for the potential of MSC therapy to limit the effects of radiation on the colon through enhancement of the regenerative process. A specific feature of “pelvic radiation disease” is that other organs such as the bladder may also be altered in the long term, leading to intensified side effects.¹ In this case, MSC treatment provides a significant therapeutic advantage since its use in regenerative medicine for the restoration of many organs (bladder, liver, kidney...) has been widely described¹²

Additional studies are underway in our laboratory to confirm the benefit of MSC treatment on radiation-induced colonic damage in mini-pig model which could offer new therapeutic perspectives for the treatment of patients suffering late damages induced by pelvic radiotherapy.

REFERENCES

1. Andreyev HJ, Wotherspoon A, Denham JW, et al. Defining pelvic-radiation disease for the survivorship era. *Lancet Oncol* 2010;11:310-2.
2. Henson C. Chronic radiation proctitis: issues surrounding delayed bowel dysfunction post-pelvic radiotherapy and an update on medical treatment. *Therap Adv Gastroenterol* 2010;3:359-65.
3. Sato T, Vries RG, Snippert HJ, et al. Single Lgr5 stem cells build crypt-villus structures in vitro without a mesenchymal niche. *Nature* 2009;459:262-5.
4. Yui S, Nakamura T, Sato T, et al. Functional engraftment of colon epithelium expanded in vitro from a single adult Lgr5(+) stem cell. *Nat Med* 2012;18:618-23.
5. Ramalingam S, Daughtridge GW, Johnston MJ, et al. Distinct levels of Sox9 expression mark colon epithelial stem cells that form colonoids in culture. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2012;302:G10-20.
6. Yan KS, Chia LA, Li X, et al. The intestinal stem cell markers Bmi1 and Lgr5 identify two functionally distinct populations. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2012;109:466-71.
7. Tian H, Biehs B, Warming S, et al. A reserve stem cell population in small intestine renders Lgr5-positive cells dispensable. *Nature* 2011;478:255-9.
8. Montgomery RK, Carlone DL, Richmond CA, et al. Mouse telomerase reverse transcriptase (mTert) expression marks slowly cycling intestinal stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2011;108:179-84.
9. Van Landeghem L, Santoro MA, Krebs AE, et al. Activation of two distinct Sox9-EGFP-expressing intestinal stem cell populations during crypt regeneration after irradiation. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2012;302:G1111-32.
10. Berbee M, Hauer-Jensen M. Novel drugs to ameliorate gastrointestinal normal tissue radiation toxicity in clinical practice: what is emerging from the laboratory? *Curr Opin Support Palliat Care* 2012;6:54-9.
11. Gonzalez MA, Gonzalez-Rey E, Rico L, et al. Adipose-derived mesenchymal stem cells alleviate experimental colitis by inhibiting inflammatory and autoimmune responses. *Gastroenterology* 2009;136:978-89.
12. Le Blanc K, Rasmusson I, Sundberg B, et al. Treatment of severe acute graft-versus-host disease with third party haploidentical mesenchymal stem cells. *Lancet* 2004;363:1439-1441.
13. Garcia-Olmo D, Herreros D, Pascual I, et al. Expanded adipose-derived stem cells for the treatment of complex perianal fistula: a phase II clinical trial. *Dis Colon Rectum* 2009;52:79-86.
14. Guadalajara H, Herreros D, De-La-Quintana P, et al. Long-term follow-up of patients undergoing adipose-derived adult stem cell administration to treat complex perianal fistulas. *Int J Colorectal Dis* 2012;27:595-600.
15. Rochefort GY, Delorme B, Lopez A, et al. Multipotential mesenchymal stem cells are mobilized into peripheral blood by hypoxia. *Stem Cells* 2006;24:2202-2208.
16. Jullien N, Blirando K, Milliat F, et al. Up-regulation of endothelin type a receptor in human and rat radiation proctitis: preclinical therapeutic approach with endothelin receptor blockade. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2009;74:528-38.
17. Blirando K, Milliat F, Martelly I, et al. Mast cells are an essential component of human radiation proctitis and contribute to experimental colorectal damage in mice. *Am J Pathol* 2011;178:640-51.
18. Meirelles Lda S, Fontes AM, Covas DT, et al. Mechanisms involved in the therapeutic properties of mesenchymal stem cells. *Cytokine Growth Factor Rev* 2009;20:419-27.
19. Lee RH, Pulin AA, Seo MJ, et al. 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.
20. Francois S, Bensidhoum M, Mouiseddine M, et al. Local irradiation not only induces homing of human mesenchymal stem cells at exposed sites but promotes their widespread engraftment to multiple organs: a study of their quantitative distribution after irradiation damage. *Stem Cells* 2006;24:1020-9.
21. Chamberlain G, Fox J, Ashton B, et al. Concise review: mesenchymal stem cells: their phenotype, differentiation capacity, immunological features, and potential for homing. *Stem Cells* 2007;25:2739-49.
22. Liu ZJ, Zhuge Y, Velazquez OC. Trafficking and differentiation of mesenchymal stem cells. *J Cell Biochem* 2009;106:984-91.

23. Mansilla E, Marin GH, Drago H, et al. Bloodstream cells phenotypically identical to human mesenchymal bone marrow stem cells circulate in large amounts under the influence of acute large skin damage: new evidence for their use in regenerative medicine. *Transplant Proc* 2006;38:967-9.
24. Zipori D. The nature of stem cells: state rather than entity. *Nat Rev Genet* 2004;5:873-8.
25. Moore KA, Lemischka IR. Stem cells and their niches. *Science* 2006;311:1880-5.
26. Gregorieff A, Pinto D, Begthel H, et al. Expression pattern of Wnt signaling components in the adult intestine. *Gastroenterology* 2005;129:626-38.
27. Wodarz A, Nusse R. Mechanisms of Wnt signaling in development. *Annu Rev Cell Dev Biol* 1998;14:59-88.
28. Koch S, Nava P, Addis C, et al. The Wnt antagonist Dkk1 regulates intestinal epithelial homeostasis and wound repair. *Gastroenterology* 2011;141:259-68, 268 e1-8.
29. Bhanja P, Saha S, Kabarriti R, et al. Protective role of R-spondin1, an intestinal stem cell growth factor, against radiation-induced gastrointestinal syndrome in mice. *PLoS One* 2009;4:e8014.
30. Leroux L, Descamps B, Tojais NF, et al. Hypoxia preconditioned mesenchymal stem cells improve vascular and skeletal muscle fiber regeneration after ischemia through a Wnt4-dependent pathway. *Mol Ther* 2010;18:1545-52.
31. Chang J, Sonoyama W, Wang Z, et al. Noncanonical Wnt-4 signaling enhances bone regeneration of mesenchymal stem cells in craniofacial defects through activation of p38 MAPK. *J Biol Chem* 2007;282:30938-48.
32. Carmon KS, Gong X, Lin Q, et al. R-spondins function as ligands of the orphan receptors LGR4 and LGR5 to regulate Wnt/beta-catenin signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2011;108:11452-7.
33. Schuijers J, Clevers H. Adult mammalian stem cells: the role of Wnt, Lgr5 and R-spondins. *Embo J* 2012;31:2685-96.
34. Glinka A, Dolde C, Kirsch N, et al. LGR4 and LGR5 are R-spondin receptors mediating Wnt/beta-catenin and Wnt/PCP signalling. *EMBO Rep* 2011;12:1055-61.

Acknowledgments

The authors are grateful to Pr C.Sabourin for giving them human tissue and Dr A.Francois and F.Milliat for their help concerning human histologic analysis. The authors also thank GSEA of the IRSN for technical assistance of animals.

Conflicts of interest

The authors disclose no conflicts.

FIGURE LEGENDS

Figure 1: (A) Representative pictures of human colorectal lesions induced by preoperative radiotherapy (total of 45-Gy delivered in 2-Gy fractions) after 6 weeks in patients treated for adenocarcinoma. Colorectal tissues outside (a) or inside (b, c, d) of the irradiated zones. (B) Representative pictures of colorectal lesions induced in rats by 27-Gy (single dose) irradiation (a) Sham, (b) irradiation at 2, (c) 8 and (d) 21 weeks. Tissues are stained with hematoxylin-eosin-saffron (HES).

Figure 2: (A) Detection of GFP-MSC (black arrow) in irradiated colonic sub-mucosa (a, b) or mesentery (c), 1 week after injection using GFP-specific antibody. (B) Mobilization of endogenous MSC in blood. Comparison of MSC morphology in blood CFU-F or bone marrow CFU-F. (C) Quantification of CFU-F number per 15×10^6 plated cells (n=11 for each group) and (D) Detection of SDF-1 α by ELISA in plasma three days after irradiation (n=8 for each group).

Figure 3: (A) Epithelial injury score. (B) Representative histological pictures of atypical crypts 2 weeks after irradiation and irradiation combined with MSC treatment in the ulcerated zone. (C) Quantification of crypt branching number per circular section. (D) Representative pictures of adherent junction staining by immunohistochemistry using anti- β -catenin antibody (blue staining without counterstaining) and (E) mucin secretion by alcian blue coloration 2 weeks after irradiation in the healthy margins of the colon. In all experiments n=8 for each group.

Figure 4: (A) MSC supernatant increases the number of IEC-18 after irradiation. Data are the mean of 9 independent experiments conducted in triplicate. (B) Inhibition of Akt (Ly294002), MEK (PD-98059), JAK1 and Wnts (CK1i) signaling pathways using specific blocking agents. (C) Inhibition of the canonical (DKK1) and non-canonical (KN-93 and Ro31-8220) Wnt pathways. All results are expressed as a percentage of the MSC-induced benefit. (D) Representative immunofluorescence staining to visualize β -catenin nuclear translocation in irradiated IEC-18. (E) Representative western blot using an antibody against phosphorylated c-Jun or GAPDH and quantification of 4 independent experiments normalized to GAPDH signal and expressed as mean \pm SEM.

Figure 5: (A) *In vivo* analyses of epithelial proliferation. Representative pictures of PCNA immunostaining (blue staining) 2 weeks after irradiation. (B) Quantification of PCNA-positive cells per total number of crypt cells. (C) Relative mRNA expression of ISC markers in colonic mucosa of irradiated and irradiated MSC-treated rats. Results were normalized to GAPDH housekeeping gene and standardized to control level (control expression=1). (D) Variation of Sox9 expression level in rat colonic crypt and quantification of Sox9-high and Sox9-low-expressing cells by crypt. (E) Relative Wnt4 mRNA expression in colonic mucosa. (F) Representative pictures of Wnt4 immunostaining (blue staining) 2 weeks after irradiation. In B and D no statistically differences were observed between 1 week and 2 weeks control groups, control groups were pooled. In A, B, D, E and F experiments n=8 for each groups. In C experiments n=6 for each group. * p<0.001 *versus* control groups.

Figure 6: Established colon damage induced by ionizing radiation and therapeutic benefit of iterative injections of MSC (injection 3 weeks after irradiation, every 15 days). (A) Comparison of animal survival between irradiated (n=25) and irradiated, MSC-treated group (n=20); *p* value determined by log RANK test. (B) Representative endoscopy pictures 18 weeks after irradiation (n=5 for each group). (C) Representative epithelial damage visualized by HES coloration 8 and 21 weeks after irradiation. (D) Radiation injury score 8 and 21 weeks after irradiation (n= 6 for each group).

Figure 7: (A) Representative pictures of PCNA immunostaining (blue staining) 8 weeks after irradiation and quantification of PCNA-positive cells per total number of crypt cells. (B) Representative Sox9 immunostaining 8 weeks after irradiation. Irradiation drastically reduces the number of Sox9-high cells restored after MSC treatment and representative pictures of Wnt4 immunostaining in colonic mucosa. Eight weeks after irradiation, Wnt4 expression cannot be detected in all analyzed rats, while Wnt4 expression in colonic mucosa of MSC treated rats is higher than in the control group. In all experiments n= 6 for each group.

Figure 1

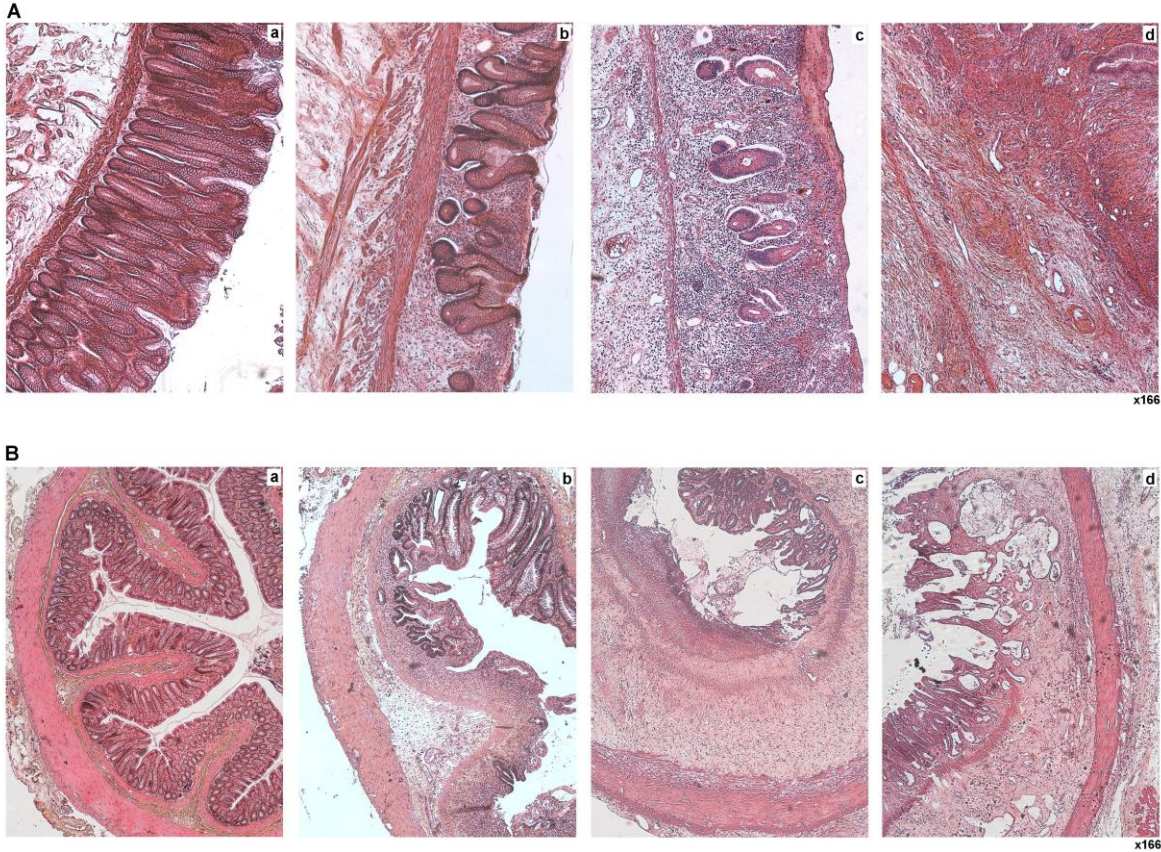


Figure 2

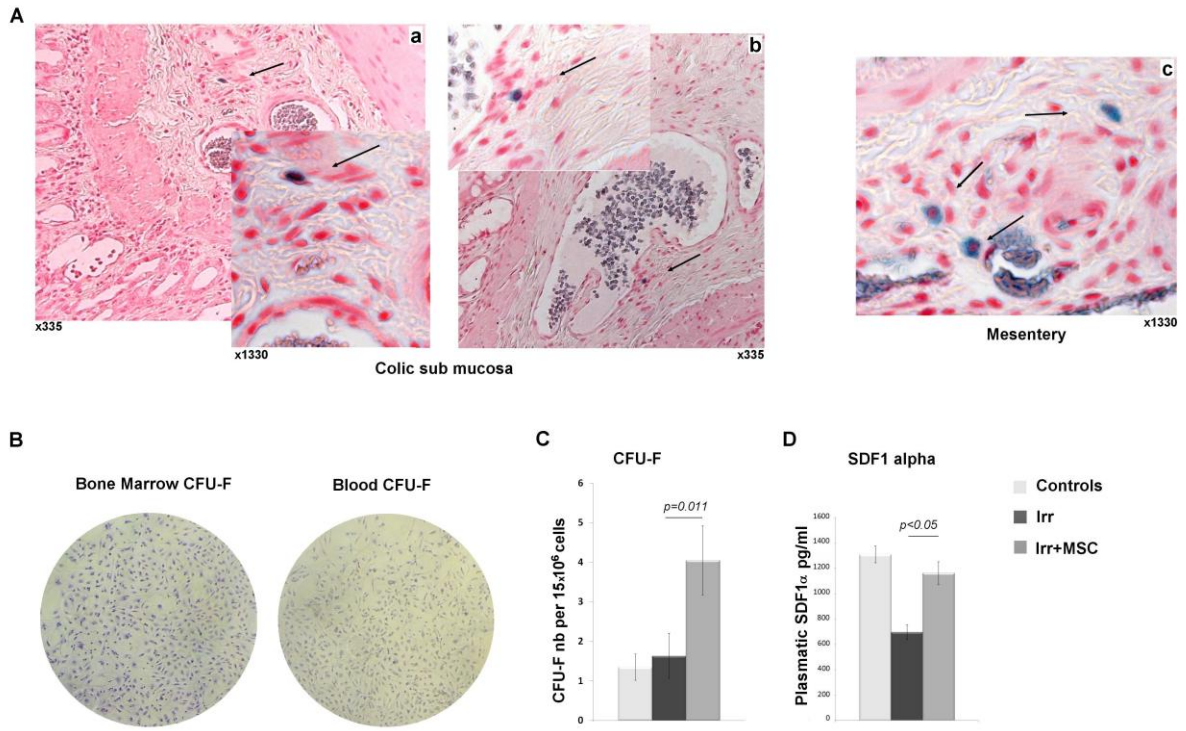


Figure 3

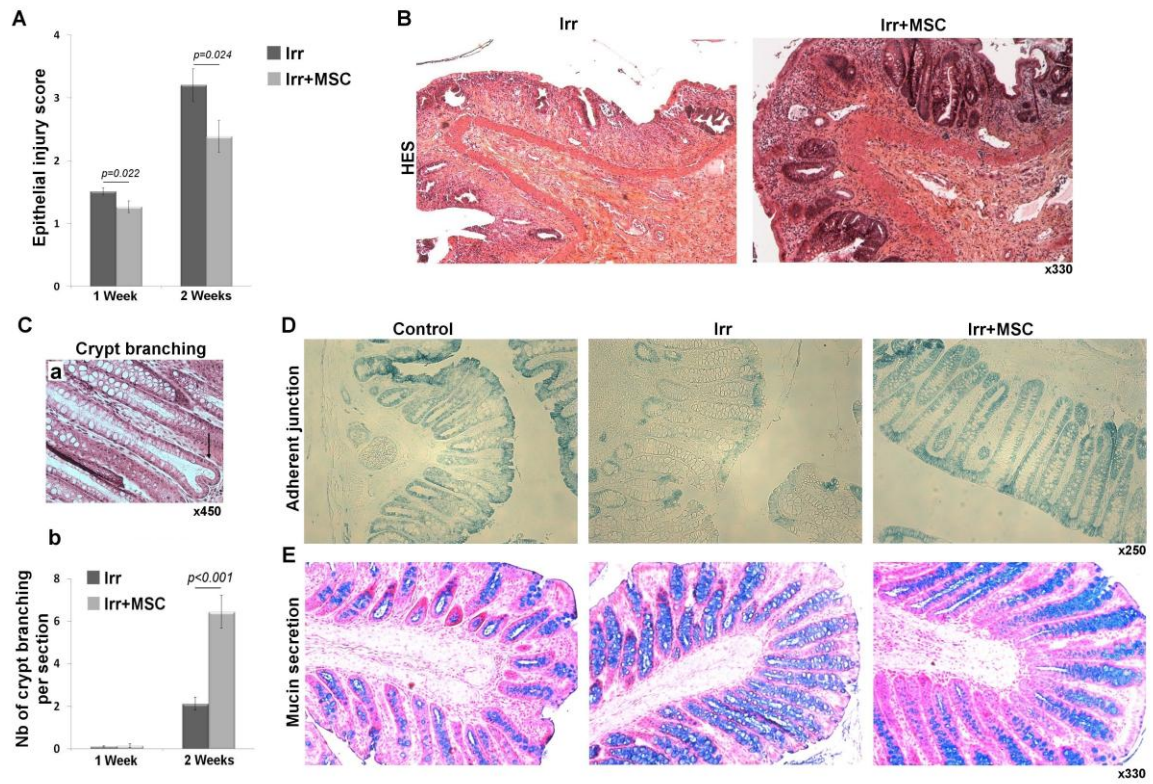


Figure 4

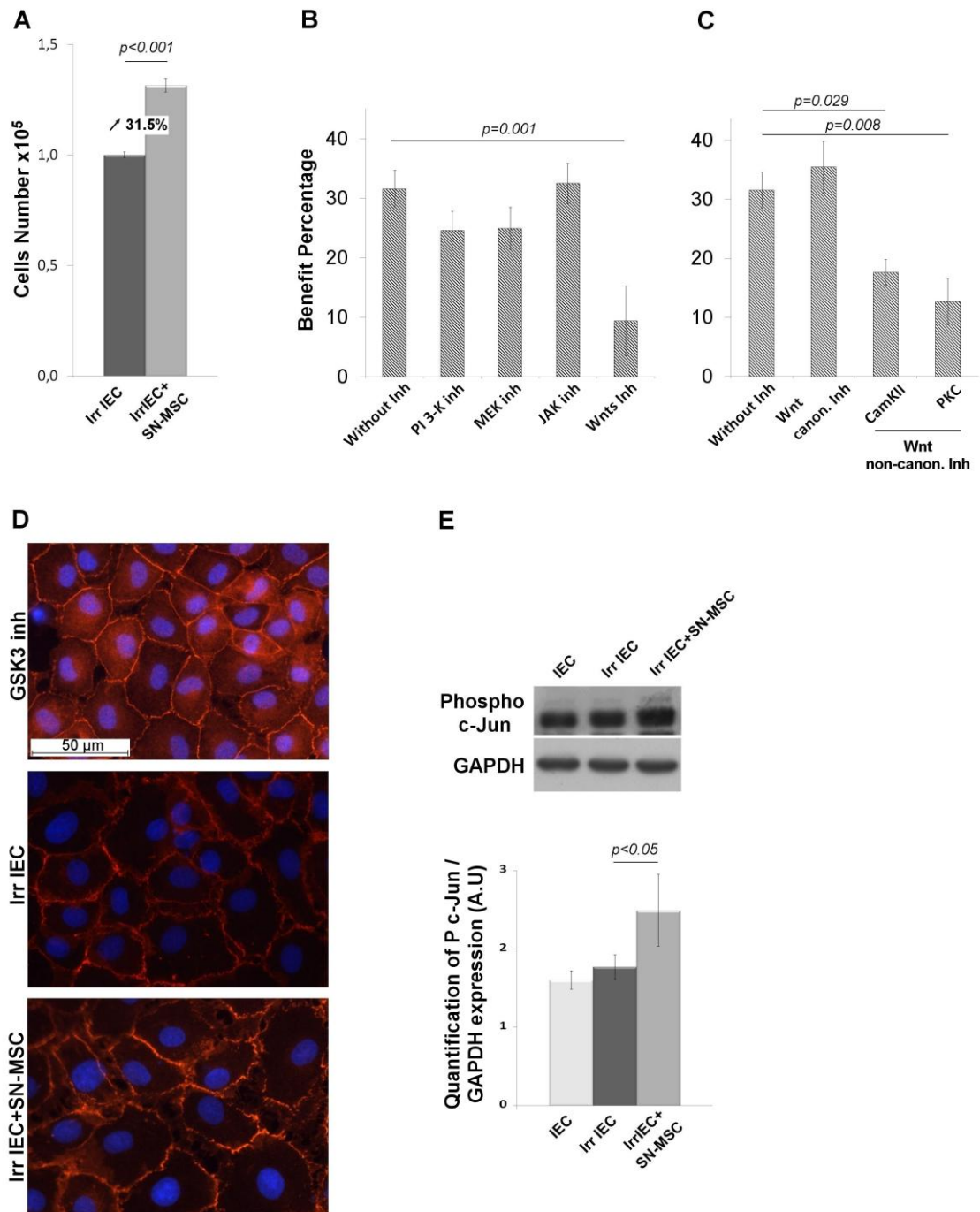


Figure 5

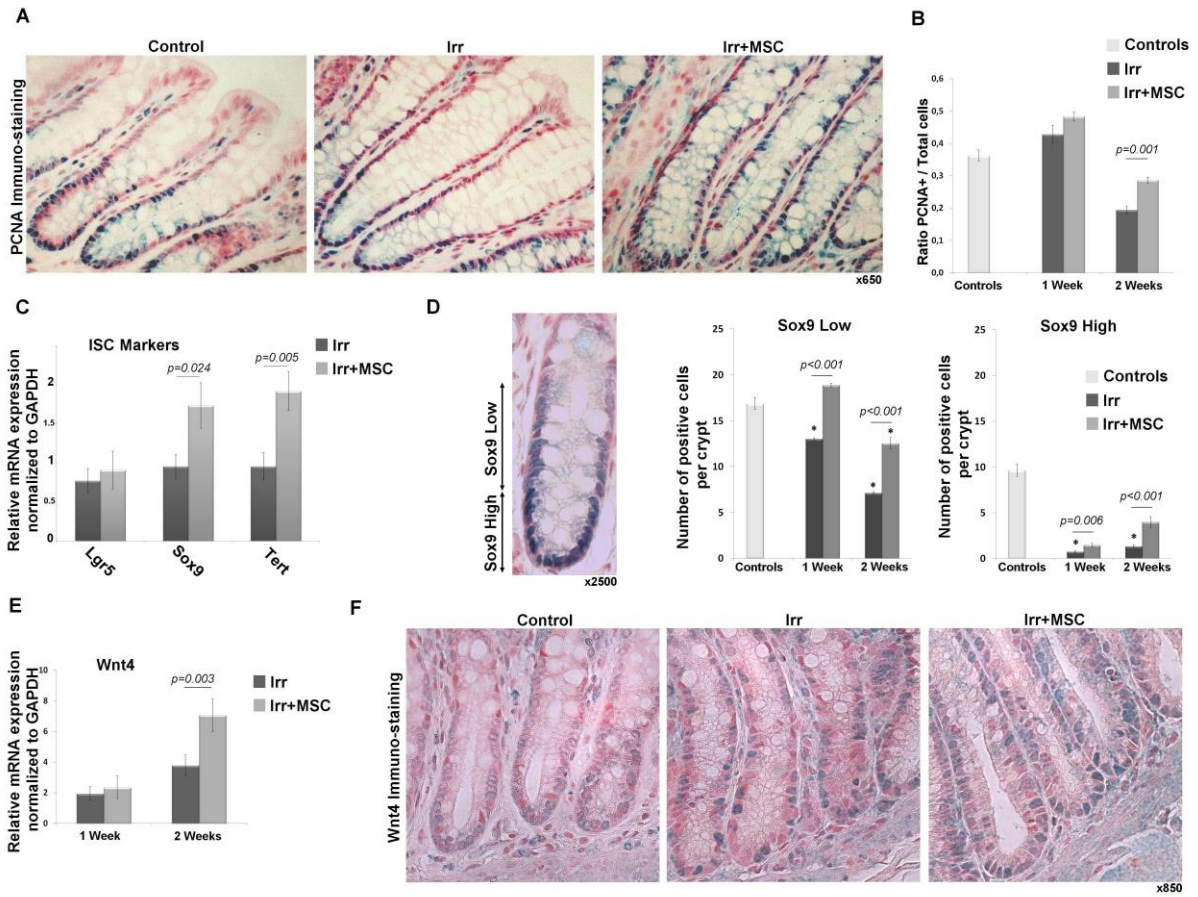


Figure 6

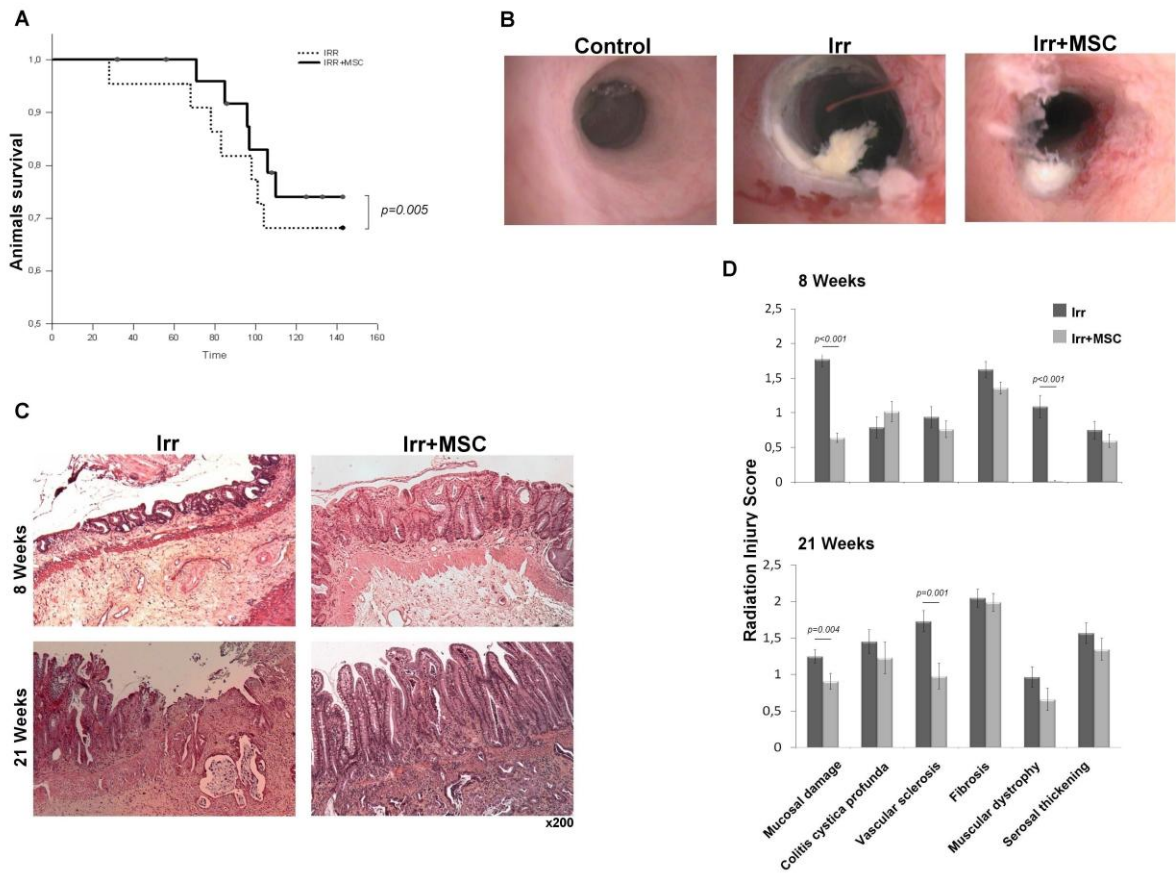
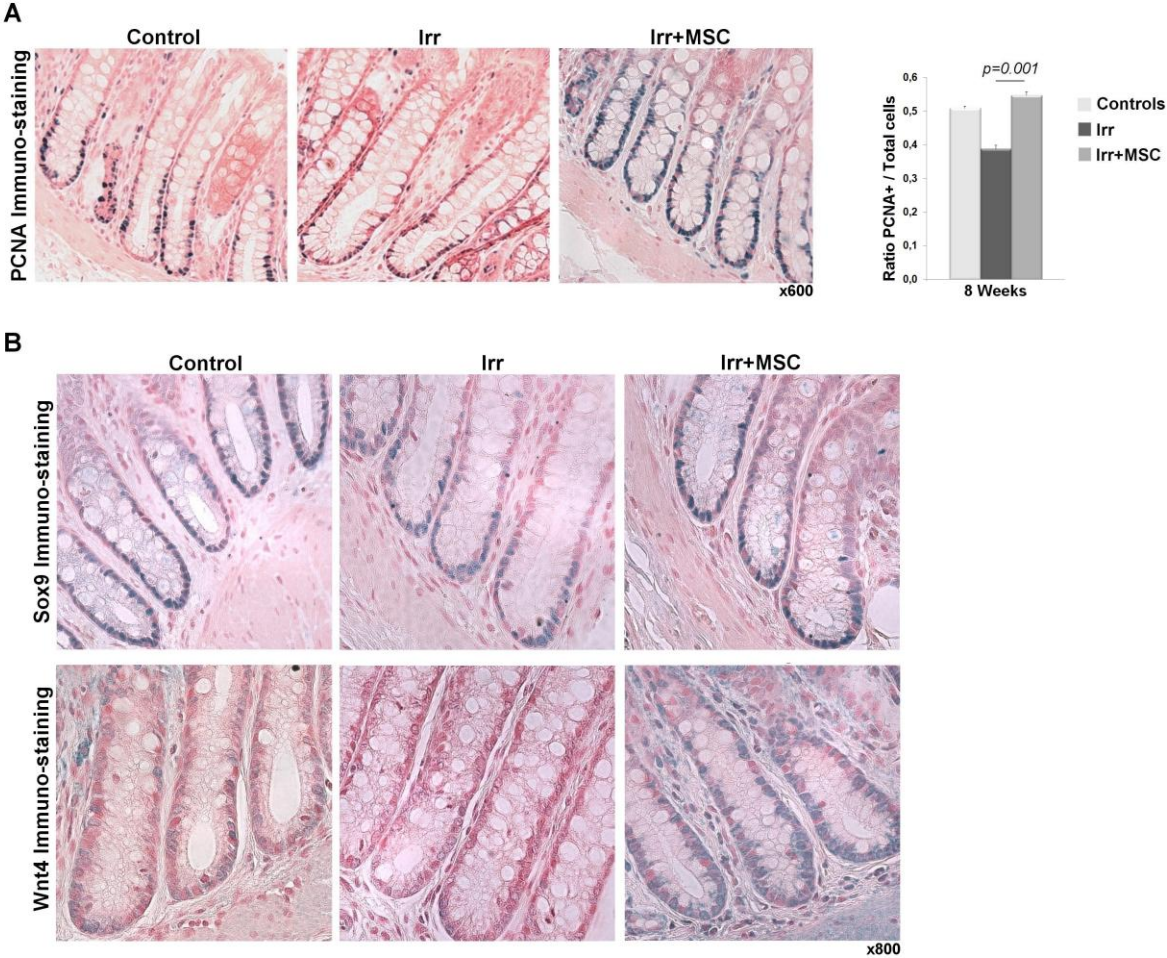


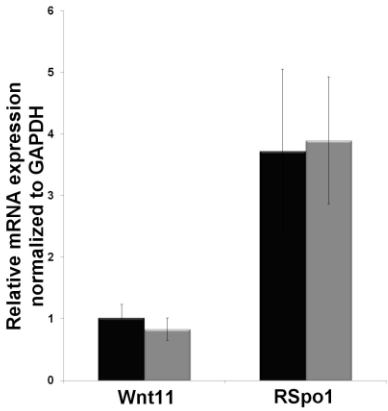
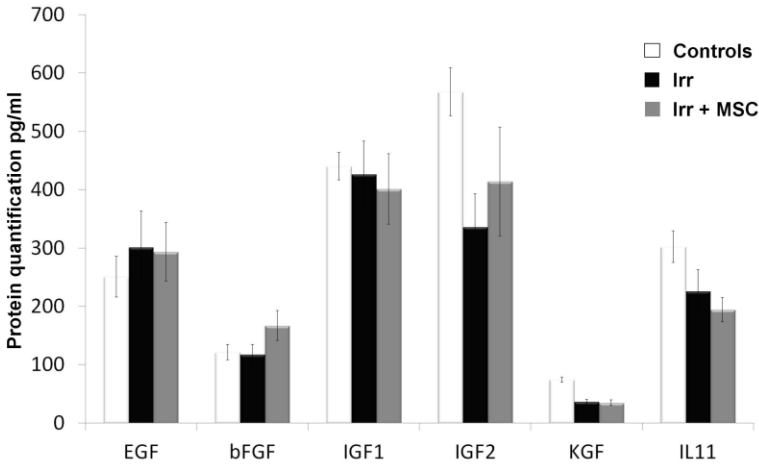
Figure 7



Supplementary datas

	MSC expression	IEC expression	IEC Stimulation by SN-MSC (fold)
ELISA	EGF	ND	
	β FGF	++	x 1,37
	HGF	++	
	KGF	++	x 1,47
	Il11	+	x 3,20
RNA expression	R-Spondin1	+++	
	Wnt1	ND	
	Wnt2	-	
	Wnt3	ND	
	Wnt4	++	x 1,17
	Wnt5	+++	
	Wnt6	ND	
	Wnt11	++	

Supplementary Data 1



Supplementary Data 2

Résultats 3

Résumé des résultats 3 : La thérapie par CSM isolées du tissu adipeux permet de réduire les lésions coliques radio-induite en inhibant les lymphocytes T

Introduction

Les méthodes d'irradiation anti-cancéreuses ont beaucoup évolué au cours des dernières décennies, aboutissant à une meilleure survie des patients traités. Bien que ces améliorations aient permis d'augmenter la durée de vie des patients après la radiothérapie, cette survie prolongée a également entraîné l'apparition de plus en plus de cas de lésions radiques tardives des tissus sains entourant la tumeur. Les symptômes gastro-intestinaux apparaissant suite à une irradiation abdomino-pelvienne sont ceux ayant l'impact le plus important sur la qualité de vie des patients. Le nombre grandissant de cas déclarés chaque année a amené les spécialistes à nommer ces symptômes « pelvic-radiation disease ». Les lésions intestinales radio-induites ont des composantes multiples, comprenant une destruction de la muqueuse colique ainsi qu'une altération des fonctions contractiles du muscle intestinal. Bien que les mécanismes à l'origine de ces conséquences néfastes ne soient pas encore élucidés, l'inflammation radio-induite est reconnue comme étant l'un des intervenants majeur du processus lésionnel. Les thérapies à base de cellules souches mésenchymateuses (CSM) ont déjà démontré leurs effets positifs dans le traitement de nombreuses pathologies inflammatoires intestinales. Leurs effets immunomodulateurs et pro-régénérants en font de ce fait des candidats intéressants dans le traitement des lésions intestinales radio-induites tardives. Nos précédentes études ont montré l'efficacité d'un traitement par CSM des lésions radio-induites précoces et tardives. Dans cette nouvelle étude, nous nous sommes focalisés sur l'utilisation de CSM issues non plus de la moelle osseuse mais du tissu adipeux, et avons cherché à mettre en évidence le lien pouvant exister entre la régulation du processus inflammatoire et l'amélioration du processus régénératif.

Résultats

Nous avons dans un premier temps analysé le bénéfice apporté par un traitement par CSM issues du tissu adipeux sur les lésions coliques radio-induites tardives. L'analyse histologique des colons nous a montré une diminution de la gravité des ulcères chez les animaux traités par

CSM une semaine après l'injection, soit 4 semaines après l'exposition aux rayonnements ionisants. Nous avons également mesuré la capacité du muscle circulaire colique à se contracter sous l'influence d'un agoniste de l'acétylcholine, le carbachol. Si les animaux irradiés montrent une diminution de la capacité contractile du muscle 4 semaines après l'exposition, les animaux traités par CSM 3 semaines après l'irradiation montrent une restauration de leurs capacités musculaires une semaine après le traitement.

Nous avons également analysé l'impact d'un traitement tardif sur l'évolution du processus inflammatoire radio-induit. De la même façon que dans nos études précédentes, le traitement par CSM permet de ramener le nombre de lymphocytes T CD4 et CD8 présents au sein de la muqueuse colique irradiée à des niveaux témoins dès 7 jours après l'injection, alors qu'ils ne cessent d'augmenter au cours du temps chez les animaux irradiés traités par placebo. Cette diminution est également retrouvée dans le sang des animaux traités, montrant à nouveau l'impact systémique de notre traitement.

Afin de déterminer l'impact de la diminution du processus inflammatoire sur la réparation de la muqueuse colique dans le cadre du traitement par CSM, nous avons inhibé la réponse immune adaptative grâce à un anticorps bloquant le CD3. Cette technique nous a permis de supprimer les lymphocytes T chez nos animaux sans impacter directement le processus de régénération. Les animaux des groupes contrôles (non-irradiés et irradiés) ont quant à eux reçu le même nombre d'injections de placebo (anticorps contrôle) que les animaux traités, soit une injection par jour pendant les 7 jours correspondant à la quatrième semaine post-irradiation. L'inhibition des lymphocytes T a été très concluante, avec une chute de 69,5% chez les contrôles non-irradiés à seulement 18,05% chez les animaux traités. L'analyse des dommages épithéliaux nous a montré une diminution de la gravité des lésions suite au traitement par anti-CD3. De la même manière, l'analyse de la contractibilité musculaire a montré une nette amélioration des capacités contractiles du muscle colique suite au traitement avec l'anticorps bloquant par rapport aux animaux irradiés ayant reçu le placebo.

L'activation lymphocytaire est un élément majeur permettant l'activation des fonctions effectrices ainsi que la prolifération des lymphocytes T. Quatre semaines après l'irradiation, les lymphocytes T présents dans les ganglions mésentériques montrent un fort taux d'activation, ainsi qu'une forte expression de l'IL-2, spécifique de l'activation lymphocytaire.

Cette activation est accompagnée chez les lymphocytes T CD8 par une expression accrue du couple Perforine/Granzyme, impliqué dans l'activité cytotoxique de ces cellules. Ces différents paramètres sont en revanche diminués suite au traitement des animaux par CSM.

Nous avons également évalué la capacité des lymphocytes T issus de nos animaux à coloniser des animaux Nude, c'est-à-dire dépourvus de lymphocytes T endogènes. Une semaine après le transfert adoptif, l'analyse du sang et des ganglions mésentériques des animaux nude nous a permis de mettre en évidence une colonisation plus importante chez les animaux ayant reçu des lymphocytes T provenant d'animaux irradiés-placebo par rapport à ceux ayant reçu des cellules provenant des animaux témoins ou traités par CSM. Cette différence dans la prise de greffe semble en outre être corrélée au niveau d'activation des lymphocytes T, puisque les animaux ayant reçu les lymphocytes T issus d'animaux irradiés-placebo montrent un fort taux de positivité pour le marqueur CD25.

Enfin, nous avons analysé la présence de cellules apoptotiques au sein de la muqueuse irradiée afin d'évaluer si l'activation lymphocytaire induite par l'irradiation pourrait ou non être à l'origine d'une partie des lésions tissulaires tardives. Quatre semaines après l'irradiation, les animaux ayant reçu le placebo montrent une quantité élevée de cellules apoptotiques. Les animaux traités par CSM montrent en revanche un taux de cellules apoptotiques plus faible qu'en absence de traitement. L'effet le plus drastique est obtenu chez les animaux ayant été traités par anti-CD3, chez qui le nombre de cellules apoptotiques est très proche de celui détectable chez les animaux non-irradiés. En outre, un co-marquage des cellules apoptotiques et des cellules CD3 positives montre une co-localisation de certaines cellules, nous permettant de supposer une implication directe des cellules inflammatoires adaptatives dans le phénomène d'apoptose tardive observé après irradiation.

Conclusions

Notre étude permet de montrer que l'utilisation de CSM issues de tissu adipeux dans le traitement des lésions radio-induites établies est concluant. Nous avons ainsi été en mesure de réparer une partie des lésions tissulaires ainsi que d'inhiber fortement le processus inflammatoire adaptatif établi. Le lien existant entre la dégradation muqueuse et le processus inflammatoire post-radiques sont encore peut étudiés. Dans cette étude, nous avons pu montrer que la disparition du processus inflammatoire adaptatif permet une amélioration

conséquence de la structure et de la fonction intestinale. Ce résultat nous pousse à penser que le bénéfice observé sur les lésions suite au traitement par CSM pourrait en partie être dû à leurs effets immunomodulateurs.

Ad-MSC therapy reduces established radiation-induced colic lesions by inhibition of T lymphocytes

Bessout R, Sémont A, Demarquay C, Durand C, Benderitter M and Mathieu N.

Institut de Radioprotection et de Sûreté Nucléaire (IRSN), PRP-HOM, SRBE, LRTE, Fontenay-aux-Roses, France

ABSTRACT

Radiation proctitis is an insidious disease associated with substantial morbidity and mortality. It results from the treatment of several cancers by radiotherapy in which normal rectal tissue is present in the irradiation field. Chronic radiation proctitis is an increasing problem as more patients receive radiotherapy and survive longer after treatment. Clinical expression of bowel complications associated to radiotherapy resembles chronic bowel disease of other etiologies; however recent studies claim differences and specialists proposed that complications following pelvic radiotherapy were recognized as a new disease. There is no unified approach to the assessment and treatment of this disease partly due to insufficient knowledge of the mechanism of radiation proctitis development. However, unresolved inflammation is hypothesized to have an important role in late side effects. Stem cell-based regenerative medicine is a promising approach as suggested by encouraging results from various clinical trials. In this study, we propose to use mesenchymal stem cells isolated from adipose tissue to improve damages induced by ionizing radiation. Experimental radiation proctitis was induced in rat, colic damages were verified by histological score and functional circular muscle contractibility. Increase number and activation of lymphocytes after irradiation were determined by molecular analysis and adoptive transfer of T cells in nude rats. We also demonstrated the preponderant role of T cells in late radiation-induced lesions using *in vivo* blocking experiment. Radiation established colic damages were improved by Ad-MSC therapy as measured by histological score reduction and restoration of muscle contractibility. We also demonstrated immunosuppressive effect of Ad-MSC associated with a decrease number of apoptotic cells. Overall, our data demonstrated that radiation-

activated lymphocytes participate to chronic lesions observed in radiation proctitis and that Ad-MS-C in reducing their activity reduces colic damages. This suggests that Ad-MS-C treatment may be used as therapeutic treatment to radiotherapy side effects.

INTRODUCTION

Radiotherapy is an established part of cancer treatment which efficacy requires an optimal compromise between tumor control and normal tissue damages. Cancer therapies increasingly achieve cure with the significant progress in irradiation technique (IMRT) and protocols combining radiotherapy with chemotherapy to sensitize tissue to ionizing radiation. Although this may enhance the number of cancer survivors it also increases the risk of severe late effects. Radiotherapy is used to treat more patients with pelvic cancer than any other tumor site. The gastro-intestinal symptoms following pelvic radiation are those with the worst impact on quality of life. It is estimated that 90% of patients subjected to pelvic radiotherapy develop acute side effects leading to permanent change in their bowel habits. Gastrointestinal problems sometimes improve over a long period, but some adverse effects can persist such as rectal bleeding, occlusion, tenesmus and diarrhea. Some of these effects are progressive and in the end require operative intervention (up to 20% over 20 years). The growing number of cases declared each year, partly due to progresses in the diagnostic of the newly described “pelvic-radiation disease”, highlights the importance to understand the involved mechanisms and to find effective therapies ¹.

Acute toxicity induced by pelvic radiation is associated with a variety of pathological changes, detectable predominantly in the bowel mucosa. Damages to highly dividing progenitor cells impair epithelium self-renewal inducing mucosal atrophy within few days after irradiation. Inflammation, immune cells infiltration and tight junction disruption also occur. The resultant barrier dysfunction leads to electrolytes imbalance and bacterial translocation exacerbating mucosal inflammation. The development of inflammatory process leads to crypt dystrophy and severe ulceration. Delayed radiation injury is characterized by abnormally sustained repair process which can progress to

transmural fibrosis involving changes in all compartments of the colon wall. Late radiation toxicity is complex, involving inflammation, excessive collagen deposition and vascular dystrophy. It is accompanied by alteration of gastrointestinal motility with altered function of enteric nerves, intestinal cells of Cajal (pacemaker cells of the gut) or/and muscle cells². The altered motility pattern observed after irradiation may influence the absorption of nutrients and may also be responsible of the abdominal cramping and associated pain. Mechanisms underlying radiation-induced dysmotility are not yet elucidated, however, it has been speculated that inflammatory response may be an important element that may directly or indirectly produce alteration in gastrointestinal contractile activity. It has been demonstrated that irradiation inhibits motility of the colon associated with diarrhea and acceleration of the transit. However these disturbances seem to be independent of the neutrophil infiltrate³. In inflammatory bowel disease several reports demonstrated that immunological events are closely correlated to motility disorders^{4,5}.

The lack of curative treatment and the potential severity of the disorders highlight the importance of novel and effective therapeutic strategies for gastrointestinal complications after radiation exposure. Stem cell-based approaches using mesenchymal stem cells (MSC) are promising since numerous studies suggest their immunosuppressive and regenerative capacities. Several reports demonstrated that allogeneic MSC are effective cellular therapies in the treatment of rodent models of human diseases. They documented the clinical improvements observed in animal models using systemically introduced MSC as therapy in models of intestinal inflammation^{6, 7}, infarct⁸, neurological diseases⁹ as well as diabetes¹⁰. These findings have encouraged the use of MSC in clinical trials to treat GVHD, multiple sclerosis, systemic lupus erythematosus and Crohn's disease, among others. The MSC capacity to regulate the immune response is independent of the CMH complex, which explains the so-called "immunoprivileged" status of MSC that allows their successful allogeneic transplantation in several animal models. Besides MSC isolated from bone marrow, two other major sources of MSC, umbilical cord blood and adipose tissue, have been described to have similar properties. The later have emerged as an attractive alternative because it can be obtained in

large quantity in subcutaneous adipose tissue (Ad-MSC), and are thus more easily used in clinic. Moreover, Ad-MSC share some of the immunomodulatory properties that characterize BM-MSC ¹¹.

To go forward in the clinical use of MSC in the treatment of patients with severe radiation-induced delayed side effects either after pelvic radiotherapy or after an accident ¹², we analyzed in a rat model, the ability of MSC obtained from adipose tissue to reverse established colic lesions induced by irradiation. We also examine the part of the regenerative process versus the immunomodulatory function after Ad-MSC treatment.

MATERIALS AND METHODS

Animals, treatments and sample collection

All experiments were performed in compliance with French laws and guidelines for animal experimentations (ethical protocol number P09-10). The 300g wild-type male Sprague-Dawley rats were purchased from Charles River Laboratories (France). Animals were anesthetized by isoflurane inhalation and a single 27 Gy dose was delivered by ⁶⁰Co source through a 2x3 cm window centered on the colorectal region. For MSC-treated groups, 5.10⁶ autologous MSC were injected in the tail vein of the rat 3 weeks after radiation exposure for irradiated MSC-treated animals. Cardiac puncture was made under anesthesia. Collected blood was transferred in EDTA sample collection tubes and centrifuged (2500rpm, 20min) to separate white blood cells from red cells and plasma. Mesenteric lymph nodes and colorectum were sampled and transferred into calcium and magnesium free Hank's Balanced Salt Solution (HBSS, Invitrogen). For histological analysis, colorectum was fixed in 4% formaldehyde and embedded in paraffin or freezed in liquid nitrogen.

Ad-MSC culture and characterization

Subcutaneous inguinal adipose tissue was removed, finely minced and enzymatically digested at 37°C in DMEM containing 0.1% collagenase type I (Sigma-Aldrich, MO USA) for 30min, 3 times. The digested tissue was filtered through 100 µm filter and undigested debris was removed. Collagenase

was then neutralized with culture medium containing 10% FBS. Cells were centrifuged at 1200 rpm for 7 min and the supernatant containing mature adipocytes was discarded. Pellet was resuspended in culture medium (MEM α containing 20% SVF), plated at 1000 cells by cm² and cultured at 37°C in humidified 5% CO₂ with media changes after 3 days. After 6 days, the monolayer of adherent cells was trypsinized, washed in PBS1X three times before injection in rats. The phenotype of amplified Ad-MSc was verified by flow cytometry. The percentage of CD90 (clone OX-7; BD Biosciences) and CD73 (clone 5F/B9 ; BD Biosciences) positive cells were analyzed and the absence of hematopoietic cells was verified with CD34 (clone ICO115, Santa Cruz) and CD45 (clone OX-1; Becton Dickinson, France) markers. On average, Ad-MSc expressed CD90 at 95.25% (+/-2.7), CD73 at 65.42% (+/-18.9), CD34 at 1.45% (+/-1.01) and CD45 at 0.575% (+/-0.2). Isotype identical antibodies served as controls. The potential of adipogenic, osteogenic and chondrogenic differentiation was also evaluated as described by Rochefort et al.

Isolation of colonic leukocytes and flow cytometry analysis

Immediately after harvesting, distal colon was cut into 5mm pieces and transferred into a solution of HBSS containing 0.752Units/ml of Liberase TL (Roche Applied Science) and 0.1mg/ml of DNase I (Roche Applied Science) and incubated at 37°C for four digestion rounds. Obtained cells were then settled on a Percoll gradient. Shortly, cells were suspended in a 40% Percoll solution, layered on a 100% Percoll phase before centrifugation (20 min, 2300 rpm without break). Leukocytes recovered were analyzed by flow cytometry using direct labeled antibodies against CD3-FITC (G4-18, BD Biosciences), CD4-PeCy5 (Ox-35, BD Biosciences), CD8a-Pe or FITC (BD Biosciences), CD25-Pe (Ox-39, BD Biosciences). Isotype-identical antibodies served as controls. All experiments were made using a FACS Canto II (BD Biosciences) and all analyses were conducted with DIVA software (BD Biosciences). Results are expressed as the percentage of positive cells among the total leukocyte population.

Contractibility

Administration of blocking antibody

Three weeks after irradiation animals were injected intraperitoneally with G4.18 CD3 blocking antibody or irrelevant Ig control (BD Biosciences). Administration was made daily during 7 days and animals received a total dose of 2mg of antibody.

Sorting of CD4 and CD8 T lymphocytes

Separation of CD4 and CD8 T lymphocytes from draining MLN was done using MACS technology (Miltenyi Biotech) according to manufacturer's instructions. For the CD4 lymphocytes isolation, 1.10^8 total cells were stained with a biotin-coupled anti-CD4 antibody (OX-35, BD Biosciences) and then purified using streptavidin MicroBeads (Miltenyi Biotech). For CD8 cells, 1×10^8 total cells were incubated with CD8 α MicroBeads (Miltenyi Biotech). Stained cells were then purified on LS columns and pelleted for RNA preparation. Sorting efficacy was verified by Flow Cytometry (86.5% \pm 1.7% and 71.5% \pm 1.7% for CD4 and CD8 cells respectively).

CD4 and CD8 adoptive transfer to nude rats

Nude male rats were purchased from Charles Rivers Laboratories and hosted into sterile conditions. Animals were anesthetized by isoflurane inhalation and a single 20 Gy dose was delivered by ^{60}Co source through a 2x3 cm window centered on the colorectal region. One week after irradiation, animals were injected intraperitoneally with 8.10^6 CD4 and 4.10^6 CD8 cells purified from either un-irradiated, 4 weeks 27Gy irradiated or 4 weeks 27Gy irradiated and MSC treated rats. One week after lymphocytes transfer, therefore two weeks after 20Gy radiation exposure, cardiac puncture was made under anesthesia. Collected blood was transferred in EDTA sample collection tubes and centrifuged (2500rpm, 20min) to separate white blood cells from red cells and plasma. Mesenteric lymph nodes, jejunum and colorectum were collected. For histological analysis, colorectum and jejunum were fixed in 4% formaldehyde and embedded in paraffin or freezed in liquid nitrogen. FACS analyses were

made on blood and lymph nodes cells to measure the immunological colonization of the rats by transferred cells.

Real-time quantitative PCR analysis

Total RNA were extracted from CD4 and CD8 T cells with the RNeasy Mini kit (Qiagen) and cDNA were obtained with the High Capacity Reverse Transcriptase cDNA kit (Applied Biosystems). Real-time quantitative PCR was performed using Taqman gene expression assays (Applied Biosystems) with *GAPDH* as housekeeping gene. Relative mRNA was quantified using the $\Delta\Delta C_t$ method.

Immunofluorescence

Frozen colic tissue were cut into circular sections of 5 μ m and stained with M30 Cytodeath, fluorescein kit (Roche Applied Science) following manufacturer's instructions or CD3 for T lymphocytes localization. For CD3 staining, slides were fixed in 4% paraformaldehyde, permeabilized in PBS 0.1% triton. Then, rabbit anti-human CD3 (Sigma Aldrich) was incubated for 1 hour and revealed with goat anti-rabbit alexa 568 (Invitrogen). Slides were mounted with DAPI (Vectashield HardSet Mounting medium, Vector laboratory) and visualized onto Leica microscope.

Statistical analysis

Results are expressed as mean \pm SEM. Differences between groups were analyzed using the unpaired student t test or non-parametric Mann Whitney test when necessary. $P \leq 0.05$ was considered as statistically significant.

RESULTS

Ad-MSCT treatment decreases established colic damages induced by radiation

Three weeks after irradiation, damages to the rat colic mucosa were characterized by epithelial atypia, mucosal ulceration, submucosal edema, inflammatory infiltrate, collagen deposition and vascular

dystrophy (data not shown). To reduce lesions induced by irradiation, AdMSC were intravenously injected in irradiated rats and benefit on epithelial structure was scored 1 week after on histological slides (Figure 1A). We observed a 28.1% reduction of the severity of the ulcer after Ad-MSC treatment (Figure 1B). Contractibility of the colon is a primordial function allowing propelling of ingested food. Thus, we measured colic circular muscle contraction in response to increasing doses of carbachol in controls, irradiated and irradiated-AdMSC treated groups. Carbachol-induced contractions were expressed as a percentage of the maximal response to KCl (Figure 1C). Dose response analysis demonstrated that irradiation statistically decreases the contractile response to carbachol compare to controls. After stem cells treatment, we observed that contraction ability of the muscle is completely restored.

Ad-MSC treatment modulates radiation-induced T lymphocytes

We localized T cells in rat colon by immunofluorescence with CD3 antibody (Figure 2A). In controls, T cells are widely detected in Peyer Patches by CD3 cell membrane staining (upper left panel). Outside these zones few cells are detected in the lamina propria (upper right panel). After irradiation, an increased number of CD3 positive cells are detected. They are preferentially localized in the lamina propria (lower left panel) but can also be detected in sub-mucosa and muscle (lower right panel). To quantify lymphocyte infiltration after irradiation and irradiation and Ad-MSC treatment, we used flow cytometry on colic leukocytes obtained after tissue digestion and percoll gradient enrichment. Results obtained in colon demonstrate a statistic increase of the percentage of CD4 lymphocytes 3 weeks after irradiation. At this time, animals were injected either with vehicle alone or with Ad-MSC. One week after, the percentage of CD4 lymphocytes in vehicle -injected rats goes on increasing while it returns to sham level in animals treated with MSC (Figure 2B, left panel). The percentage of CD8 lymphocytes increases 3 weeks after irradiation and returns to control at 4 weeks. Ad-MSC treatment doesn't modify the percentage of CD8 in the colon in these conditions (Figure 2B, right panel).

Quantification realized in blood demonstrated for both CD4 and CD8 lymphocytes a decrease of the percentage after MSC treatment compare to untreated rats (Figure 2C).

Blocking T cells by CD3 antibody in irradiated animals improves colic structure and function.

Physiopathology of tissue damages induced by irradiation is complex because it combines stem cells depletion and chronic inflammation leading to impaired wounding. MSC treatment is a promising approach for the treatment of radiation effects since it exhibits regenerative and immunosuppressive capacities. To determine the part of MSC immunosuppressive effect in improving colic structure and function, we specifically blocked T cells using CD3 blocking antibody in irradiated animals and analyzed the effect on irradiated colic tissues. Blocking or irrelevant Ig antibody was injected three weeks after irradiation, daily during 1 week. The efficacy of the blocking antibody was verified by flow cytometry on mesenteric lymph nodes. In irradiated animals injected with Ig antibody we detected a mean of 69.5% of TCR positive T cells which falls to 18.05% after blocking CD3 antibody treatment (Figure 3A). We analyzed epithelial damages on histological slides and results obtained after scoring reveal a statistical decrease of the lesions severity in irradiated animals injected with blocking CD3 antibody (Figure 3B). We also analyzed the effect of this treatment on muscle contraction (Figure 3C). Controls and irradiated animals were injected by irrelevant Ig antibody. A statistic decrease of muscle contractibility for the $5 \cdot 10^{-5}$, 10^{-4} and $5 \cdot 10^{-4}$ M doses of carbachol was detected in irradiated-Ig animals compared to controls-Ig. In irradiated animals injected with blocking CD3 antibody, we found an improvement of muscle contractibility which is not different from controls level for the $5 \cdot 10^{-5}$ and 10^{-4} M doses of carbachol. The higher dose of carbachol ($5 \cdot 10^{-4}$ M) gave intermediate results with a statistical improvement compare with irradiated-Ig treated animals, however colic contractibility doesn't completely return to control-Ig animals level. Altogether these results demonstrated the importance of T cells on colic lesions induced by irradiation.

apoptosis after CD3 blocking antibody treatment in the same conditions, and we also found a decrease of CK18 positive cells number.

DISCUSSION

Despite constant progress in radiotherapy techniques, damages to normal gastro-intestinal tissues are inevitably associated with radiation therapy of pelvic tumors. Late radiation damages to normal tissues have not only a major impact on quality of life but also on overall survival. Moreover local symptoms may be underestimated because physicians and patients may be more concerned with metastatic disease or immediately life threatening conditions. By the way, treatments usually applied to manage radiation side effect are only symptomatic. However, researches in mechanistic process of normal tissue damages are important to pave the way for new therapeutic approaches to emerge. The complex physiopathology of radiation-induced damages limits the efficacy of treatments. As described earlier, ionizing radiation produces a burst of free radicals from the first minutes which causes DNA damages and proteins alteration inducing important cell apoptosis contributing to direct tissue injury^{13, 14}. Stem/progenitor cell depletion and therefore subsequent impairment of epithelial self-renewal account for mucosal atrophy. In this study, to generate radiation-induced lesions similar to those seen in patients suffering from the late side effect of radiotherapy, SD rats were irradiated at 27 Gy in a colorectal window. Three weeks after irradiation, deep colic ulcer associated with oedema and increase of immune cell infiltrate are observed, in accordance to colic tissue analysis from patients suffering from late radiotherapy side effects¹⁵. It has been previously shown that MSC could reduce radiation-induced intestinal damages when injected before mucosal atrophy in mice⁷ and rats (unpublished data). To go further on clinical applications, in this study we addressed the question of the efficacy of Ad-MSC injection on established irradiation damages. Thus, Ad-MSC were intravenously injected 3 weeks after irradiation. Results demonstrated an improvement of colic mucosa integrity and contractile function after one week. Hypothesis regarding the action mechanisms of MSC therapy benefits rely on combinatorial effect on regenerative and inflammatory processes¹⁶.

We previously demonstrated that MSC, injected before damages appearance in a regenerative model, favor the re-establishment of cellular homeostasis by both increasing endogenous proliferation process and inhibiting radiation-induced apoptosis ⁷. However, various studies highlighted the immunosuppressive abilities of MSC *in vitro* and *in vivo* ^{6, 17} which could participate to improve inflammatory microenvironment and then allowing effective regenerative process. Indeed after irradiation, chronic inflammatory response takes place and may play an important role in radiation disease. In animal model, characterization of immune cells after late colo-rectal irradiation highlights large infiltrate of innate immune cells as neutrophils, macrophages and mastocytes ¹⁸. We also found an increase number as well as activation status of T lymphocytes after irradiation (Bessout, article 1) and in this study we also demonstrated their ability to secrete cytotoxic molecules and to colonize nude rats. Moreover, blocking T cells with CD3 antibody after irradiation reduces apoptosis, epithelial lesions and improves circular colic muscle contractibility. To definitively demonstrate that T cells from irradiated rats are involved in intestinal lesions, it will be necessary to analyze colic lesions in rats adoptively transferred with T cells from irradiated rats compared with T cells from controls.

After Ad-MS*C* injection on established radio-induced lesions, associated to decrease colic damages (structure, function and apoptosis), we observed a decrease of lymphocyte infiltrate, activation, expression of cytotoxic molecules and abilities to colonize nude rats. The aim of this study was to analyze the part of the modulation of the regenerative process, the inflammatory process or both of them by Ad-MS*C* treatment to reduce colic damages induced by irradiation. Contractibility experiments demonstrate a complete restoration of muscle contractibility to sham level with Ad-MS*C* treatment while blocking T cells alone improve contraction but doesn't reach to sham level for the higher carbachol dose. This favors the hypothesis that T cells activated by irradiation are not the only mechanism by which Ad-MS*C* treatment improves late radiation-induced colic damages. Comparison of epithelial score of experiments using CD3 blocking antibody after irradiation (T cells are specifically blocked) with epithelial score of irradiated rats treated with Ad-MS*C*, gave similar results. However, scoring of epithelial lesions on histologic slide is a macroscopical view, it will be necessary to analyze the regenerative capacity of colic mucosa through analyzing epithelial cells proliferation

using PCNA immuno-staining. Indeed, in this model we previously demonstrated that MSC increase epithelial cells proliferation at the margin of the ulcer, increasing crypt size and crypt branching leading to the reduction of ulcer size (unpublished data). Counting PCNA positive cells in irradiated rats injected with blocking CD3 antibody compared with irradiated Ad-MSC treated rats could give interesting data of the effect of radiation-activated T cells on the proliferative process.

In the present study, we demonstrated that MSC derived from adipose tissue are able to reduce established colic damages similar of those seen in patients suffering of late radiotherapy side effects. We also characterized activation of T lymphocytes 3 and 4 weeks after irradiation and analyze their modulation after Ad-MSC treatment. To analyze the involvement of T lymphocytes from irradiated rats on colic damages, we blocked specifically T cells by CD3 antibody. Results showed decrease of apoptosis, improvement of epithelial structure and muscular function. Even if more experiments are necessary, these results demonstrate the preponderant role of MSC immunosuppressive ability to reduce the inflammation in the microenvironment after irradiation and then improving the wounding process.

REFERENCES

1. Andreyev HJ, Wotherspoon A, Denham JW, et al. Defining pelvic-radiation disease for the survivorship era. *Lancet Oncol* 2010;11:310-2.
2. MacNaughton WK. Review article: new insights into the pathogenesis of radiation-induced intestinal dysfunction. *Aliment Pharmacol Ther* 2000;14:523-8.
3. Picard C, Wysocki J, Fioramonti J, et al. Intestinal and colonic motor alterations associated with irradiation-induced diarrhoea in rats. *Neurogastroenterol Motil* 2001;13:19-26.
4. Ozaki H, Hori M, Kinoshita K, et al. Intestinal dysmotility in inflammatory bowel disease: mechanisms of the reduced activity of smooth muscle contraction. *Inflammopharmacology* 2005;13:103-11.
5. Akiho H, Ihara E, Motomura Y, et al. Cytokine-induced alterations of gastrointestinal motility in gastrointestinal disorders. *World J Gastrointest Pathophysiol* 2011;2:72-81.
6. Gonzalez MA, Gonzalez-Rey E, Rico L, et al. Adipose-derived mesenchymal stem cells alleviate experimental colitis by inhibiting inflammatory and autoimmune responses. *Gastroenterology* 2009;136:978-89.
7. Semont A, Mouiseddine M, Francois A, et al. Mesenchymal stem cells improve small intestinal integrity through regulation of endogenous epithelial cell homeostasis. *Cell Death Differ* 2010;17:952-61.

8. Amado LC, Saliaris AP, Schuleri KH, et al. Cardiac repair with intramyocardial injection of allogeneic mesenchymal stem cells after myocardial infarction. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005;102:11474-9.
9. Bouchez G, Sensebe L, Vourc'h P, et al. Partial recovery of dopaminergic pathway after graft of adult mesenchymal stem cells in a rat model of Parkinson's disease. *Neurochem Int* 2008;52:1332-42.
10. Ezquer FE, Ezquer ME, Parrau DB, et al. Systemic administration of multipotent mesenchymal stromal cells reverts hyperglycemia and prevents nephropathy in type 1 diabetic mice. *Biol Blood Marrow Transplant* 2008;14:631-40.
11. Puissant B, Barreau C, Bourin P, et al. Immunomodulatory effect of human adipose tissue-derived adult stem cells: Comparison with bone marrow mesenchymal stem cells. *British Journal of Haematology* 2005;129:118-129.
12. Peiffert D, Simon JM, Eschwege F. [Epinal radiotherapy accident: passed, present, future]. *Cancer Radiother* 2007;11:309-12.
13. Potten CS. Radiation, the Ideal Cytotoxic Agent for Studying the Cell Biology of Tissues such as the Small Intestine. *Radiation Research* 2004;161:123-136.
14. Paris F, Fuks Z, Kang A, et al. Endothelial apoptosis as the primary lesion initiating intestinal radiation damage in mice. *Science* 2001;293:293-297.
15. Theis VS, Sripadam R, Ramani V, et al. Chronic radiation enteritis. *Clin Oncol (R Coll Radiol)* 2010;22:70-83.
16. Caplan AI. Why are MSCs therapeutic? New data: new insight. *J Pathol* 2009;217:318-24.
17. Yagi H, Soto-Gutierrez A, Parekkadan B, et al. Mesenchymal stem cells: Mechanisms of immunomodulation and homing. *Cell Transplant* 2010;19:667-79.
18. Bliorando K, Milliat F, Martelly I, et al. Mast cells are an essential component of human radiation proctitis and contribute to experimental colorectal damage in mice. *Am J Pathol* 2011;178:640-51.

FIGURES LEGENDS

Figure 1. (A) Representative HES staining of colorectum from shams, 4 weeks irradiated and irradiated-Ad MSC treated animals. (B) Scoring of epithelial radiation-induced lesions in irradiated (black; n=6) and irradiated with Ad-MSC treatment (Grey; n=6) (C) Colic circular muscle contractibility curves in response to Carbachol. Results are expressed as a percentage of the maximal response to KCL. Irradiated animals (red line; n=) shams (blue line; n=) irradiated Ad-MSC-treated animals (green line; n=). All results are expressed as mean \pm SEM. S, $p < 0.05$ versus sham animals. I, $p < 0.05$ versus irradiated animals

Figure 2. (A) T cells localization onto microscopic slide of colorectum by CD3 membrane staining. Upper panels: sham animals show CD3 positive cells in Peyer Patches (upper left) and in the lamina propria (upper right). Lower panels: After radiation exposure, CD3 positive cells number is increased in the lamina propria (lower left) and few cells are also detected in muscle (lower right). (B, C) Flow cytometry quantification of CD4 and CD8 positive cells of shams (white bar; n=), irradiated 3 and 4 weeks after exposure (red bars; n=) and irradiated MSC-treated (green bar; n=) animals in colon (B) and blood (C). All results are expressed as mean \pm SEM. S, $p < 0.05$ versus sham animals. I, $p < 0.05$ versus irradiated animals.

Figure 3. (A) Efficacy of lymphocyte inhibition using CD3 blocking antibody was assessed by FACS analysis of TCR $\alpha\beta$ expression in MLN from irrelevant Ig treated and CD3 treated animals. CD3 treatment, but not irrelevant Ig, drastically decreased TCR expression, indicating a successful depletion of T cells. (B) Scoring of radiation-induced epithelial lesions by HES staining. Irradiated injected with Ig irrelevant antibody (black; n=6) and CD3 blocking antibody (light grey; n=6) (C) Colic circular muscle contraction in response to increasing doses of Carbachol. Results are expressed as a percentage of the maximal response to KCl. Shams injected with irrelevant Ig antibody (blue line; n=8), irradiated animals treated with irrelevant Ig (red line; n=8) and irradiated animals injected with CD3 blocking antibody (green line; n=8) All results are expressed as mean \pm SEM.

Figure 4. (A) Flow cytometry quantification of CD25 positive cells in shams (white bar), irradiated 3 and 4 weeks after exposure (red bars) and irradiated MSC-treated (green bar) animals in colon (left panel) and blood (right panel). (B) Relative *Interleukine 2*, *Perforin* and *Granzyme* mRNA expression in sorted CD8 cells of irradiated and irradiated MSC-treated rats. Results were normalized with *GAPDH* housekeeping gene and standardized to sham level (sham expression =1). (C) Adoptive transfer of CD4 and CD8 cells to nude rats. (D)

Figure 5. (A) Representative images of Cytokeratin 18 staining in shams, Irradiated, Irradiated AdMSC-treated and Irradiated CD3-treated animals. Slides were stained with CK18 (green spots, left panel) and counterstained with DAPI (right panel). (B) Quantification of CK18 positive cells per field in shams (white bar), Irradiated (red bar), Irradiated MSC-treated (green bar) and Irradiated CD3-treated (blue bar) animals. Results are expressed as mean \pm SEM.

Figure 1

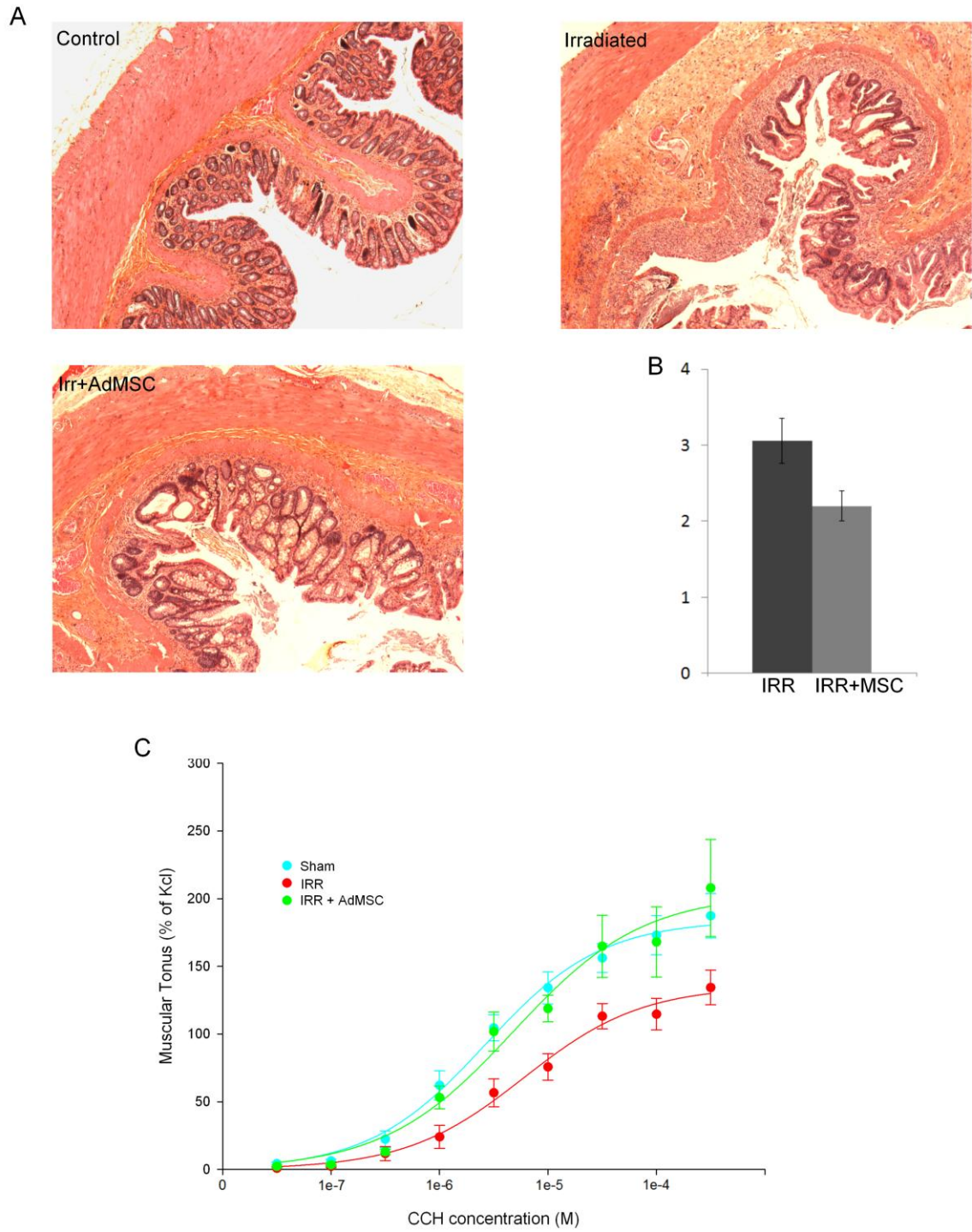


Figure 2

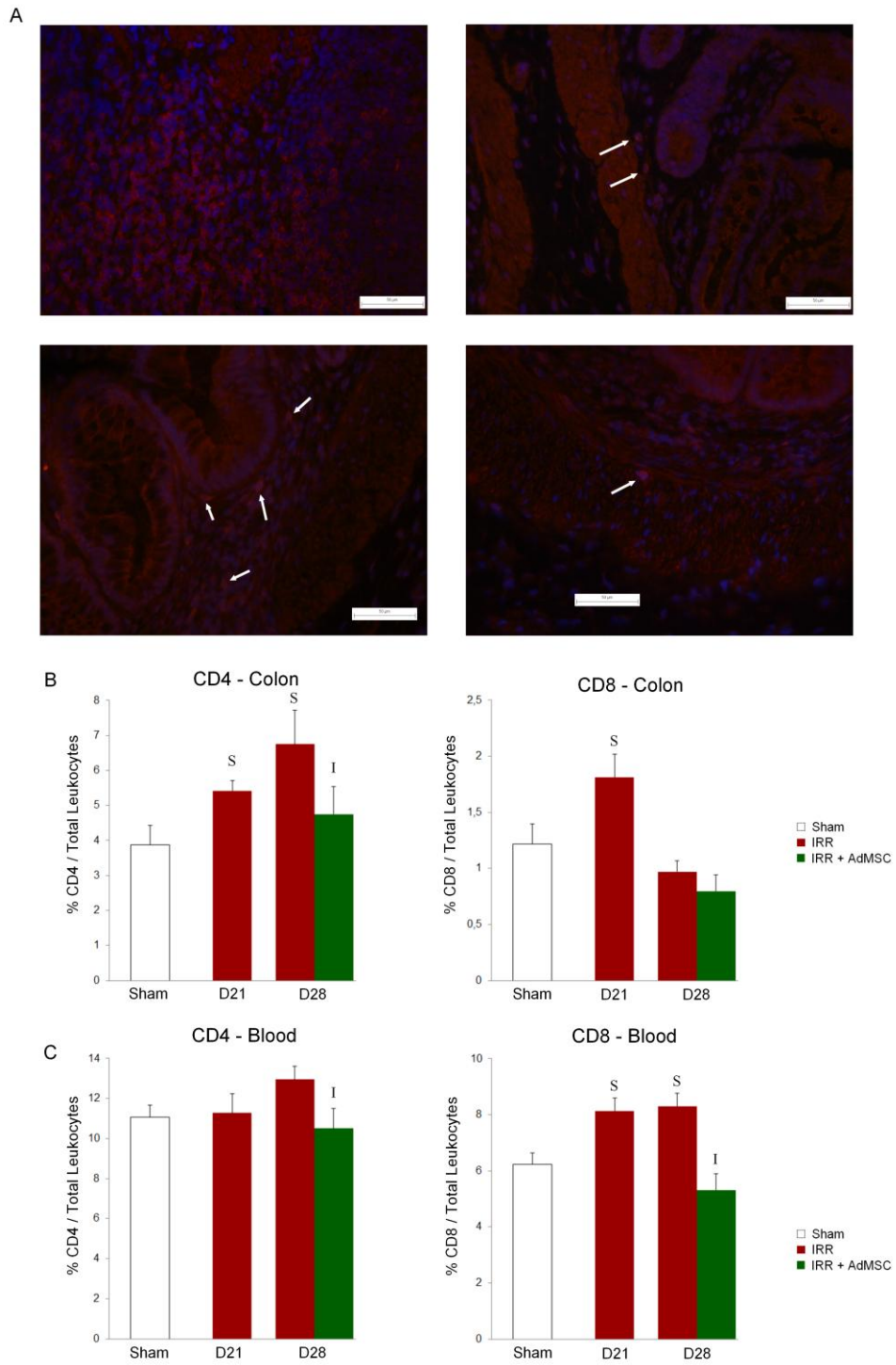


Figure 3

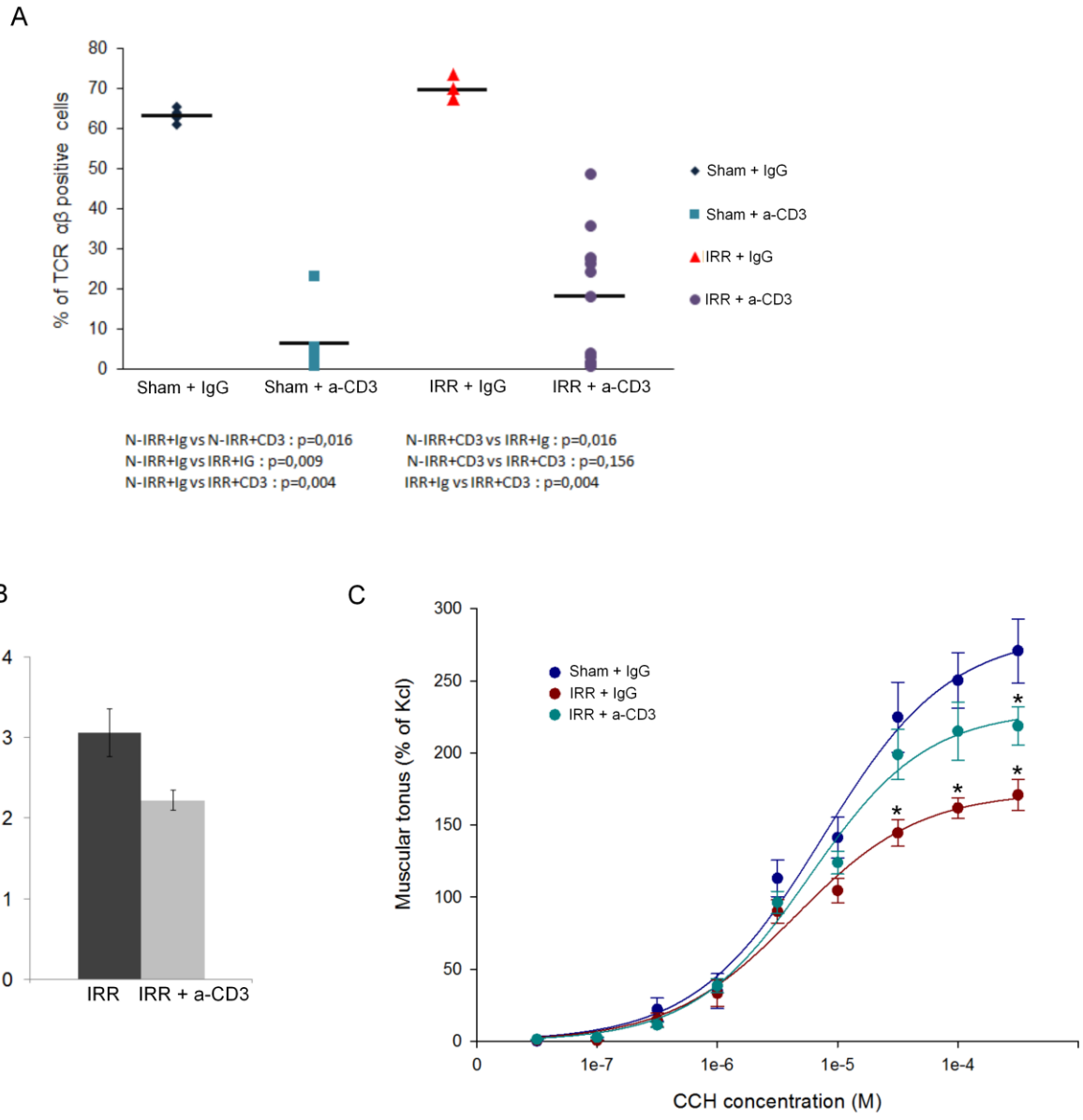


Figure 4

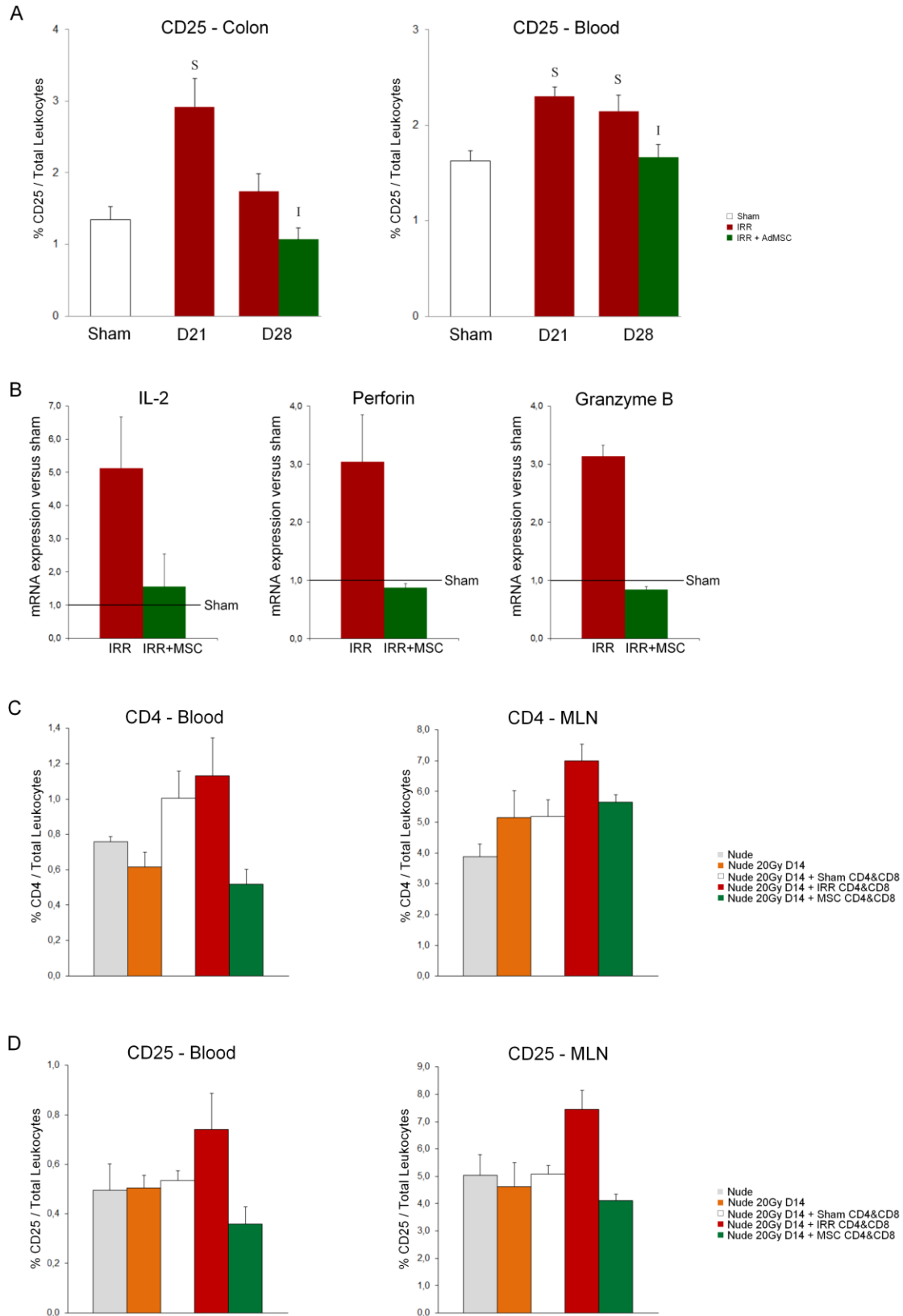
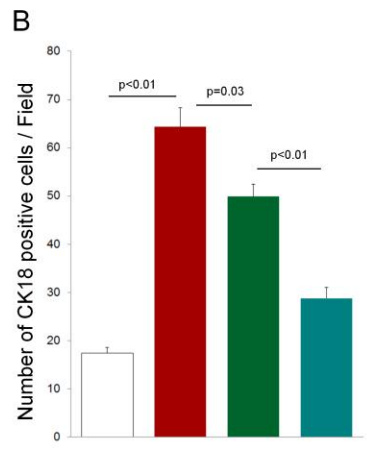
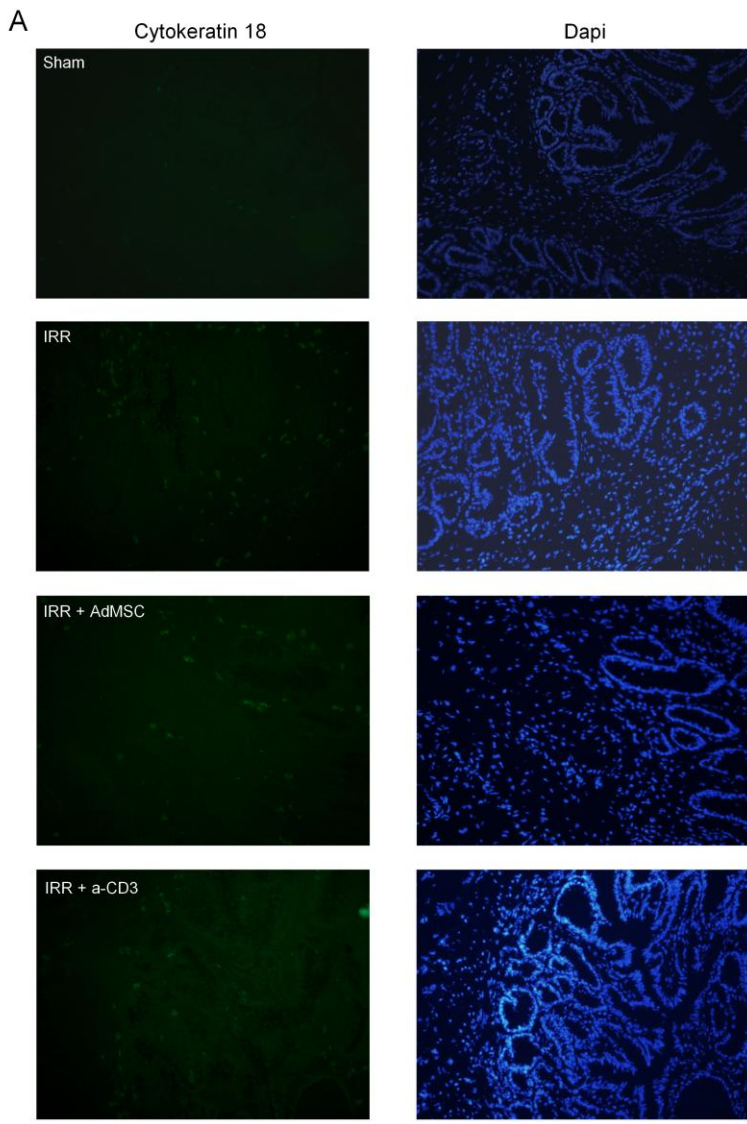


Figure 5



Discussion / Perspectives

En 2011, 365 500 nouveaux cancers ont été diagnostiqués en France et 906 735 patients ont dû subir un traitement anti-cancéreux (source Institut National du Cancer). Si la chimiothérapie reste le traitement le plus couramment utilisé avec 261 664 patients traités en 2010, la radiothérapie est elle aussi un traitement de choix dans le traitement des cancers localisés, avec 173 852 patients pris en charge cette même année. Souvent utilisée en combinaison avec la chimiothérapie, la radiothérapie est ainsi actuellement considérée comme le traitement préférentiel dans les cas des cancers du sein, du rectum ou encore de la prostate. Bien que les évolutions technologiques aient permis d'importants progrès dans le traitement des tumeurs par radiothérapie, elle reste associée à des effets secondaires parfois graves, principalement dus à la toxicité des rayonnements ionisants pour les tissus sains entourant la tumeur. Les nombreux progrès réalisés en imagerie médicale, ainsi que ceux concernant le ciblage balistique des tumeurs, ont permis d'améliorer l'efficacité thérapeutique du traitement anti-tumoral tout en diminuant le volume et la dose d'irradiation des tissus sains irradiés. En dépit de ces nombreuses avancées, l'utilisation des rayonnements ionisants reste associée à des effets secondaires aigus et tardifs, que nous avons présentés en introduction. Cette toxicité résultant de l'irradiation des tissus sains est en outre un facteur limitant les doses pouvant être délivrées aux tumeurs, diminuant ainsi le bénéfice anti-tumoral de la radiothérapie (Bentzen 2006). L'amélioration de la détection des cancers et des traitements radiothérapeutiques a permis d'augmenter fortement la survie des patients traités. Cette augmentation du nombre de patients survivants à leur cancer, ainsi que de la durée de vie après le traitement, explique en partie l'augmentation du nombre de patients développant des lésions tardives des tissus sains, rendant nécessaire de développer rapidement de nouveaux traitements « réellement » curatifs afin de soulager ces patients. De nombreuses recherches ont été menées dans ce sens au cours des dernières années, aboutissant à l'utilisation d'antioxydants, de facteurs de croissance, d'anti-inflammatoires ou encore d'anti-apoptotiques, sans toutefois apporter de solution pleinement satisfaisante, que ce soit dû à leur faible efficacité, à leurs effets secondaires ou à la protection tumorale qu'ils confèrent.

Comme nous l'avons précisé en introduction, les organes ne présentent pas tous la même sensibilité aux rayonnements ionisants. Le tractus gastro-intestinal regroupe des organes parmi les plus radiosensibles de l'organisme. Il occupe une large zone que l'on peut assimiler

à l'abdomen et au pelvis, et se trouve de ce fait dans le champ d'irradiation de nombreuses tumeurs uro-génitales et digestives. Ces deux caractéristiques font de l'intestin un organe fortement à risque lors du traitement des tumeurs de la sphère abdomino-pelvienne. Au sein du tractus gastro-intestinal, le colon et le rectum sont des zones particulièrement exposées dans le traitement des tumeurs uro-génitales, telles que les tumeurs prostatiques. Les symptômes inflammatoires contribuent aux manifestations aiguës de l'irradiation et perdurent pendant la phase chronique du développement des lésions. En clinique, la réaction inflammatoire aiguë, qui affecte environ 80% des patients sous traitement radiothérapeutique, fait l'objet d'une prise en charge symptomatique qui permet la disparition des symptômes dans les semaines suivant la fin du protocole de radiothérapie. La persistance de l'inflammation après l'arrêt de la radiothérapie et son évolution en processus chronique vont participer au développement des lésions tardives en favorisant la prolifération des cellules mésenchymateuses et les dépôts de collagènes. La survenue d'effets secondaires tels que des épisodes de diarrhées et/ou de constipation vont affecter la qualité de vie des patients, de même que le développement d'un syndrome occlusif ou de fistules, qui vont alors parfois compromettre leur survie (Theis et al. 2010). La compréhension des liens existants entre l'inflammation et les lésions post-radiques est donc un enjeu important dans la recherche de nouvelles thérapies afin de prévenir et de traiter les lésions post-radiothérapeutiques.

Les cellules souches mésenchymateuses (CSM) sont connues pour leurs capacités pro-régénérantes et anti-inflammatoires. Leur utilisation en médecine régénérative ainsi que dans le traitement des pathologies inflammatoires s'est d'ailleurs rapidement développée au cours de la dernière décennie (Garcia-Olmo et al. 2009) (Guadalajara et al. 2012) (Karussis et al. 2010) (Le Blanc et al. 2008). Les lésions sévères créées lors d'une exposition aux rayonnements ionisants et leur association avec un processus inflammatoire exacerbé ont poussé les équipes de recherche à utiliser les CSM afin de traiter les patients souffrant de telles lésions. Les résultats obtenus lors du traitement à titre compassionnel par CSM de patients ayant été accidentellement irradiés à de très fortes doses sur différentes parties du corps ont été spectaculaires (Bey et al. 2010) (voir figure 27).



Figure 27 : Réparation cutanée d'un patient accidentellement irradié à forte dose (plus de 30Gy) et ayant de ce fait un mauvais pronostic vital. Le traitement à titre compassionnel par CSM associé à une autogreffe de peau a permis une cicatrisation complète de la lésion ainsi qu'une bonne récupération fonctionnelle (Images IRSN / CTSA)

Certains des patients sur-irradiés lors de l'accident d'Epinal, dans le cadre du traitement de leur cancer prostatique, ont également pu bénéficier d'un traitement à titre compassionnel par greffe de CSM afin de tenter de soulager les complications gastro-intestinales liées à leur surexposition. Bien que le suivi à long terme ait été difficile du fait de l'âge des patients lors du traitement, les effets immédiats furent prometteurs, avec notamment une disparition rapide des douleurs, pourtant résistantes aux morphiniques, un arrêt des saignements ainsi qu'une diminution du processus inflammatoire (données internes au laboratoire). Suite à ces résultats cliniques encourageants, notre laboratoire a cherché à affiner l'analyse des mécanismes à l'origine des effets bénéfiques résultant de l'injection de CSM afin de traiter les lésions intestinales post-radiques. L'inflammation est l'un des acteurs majeurs intervenant dans les dommages radio-induits et est également modulée par les CSM. C'est pourquoi nous nous sommes intéressés au cours de cette thèse à l'étude de l'inflammation colorectale induite par une exposition à de fortes doses de rayonnements ionisants, ainsi qu'aux effets d'un traitement par CSM sur cette inflammation. Nous nous sommes également penchés sur le lien existant entre la régénération colique et la modulation de l'inflammation observées suite au traitement par CSM. Ces études auront permis de faire évoluer notre connaissance de l'inflammation colique radio-induite et de son rôle dans l'apparition des lésions tissulaires, ainsi que de mettre en lumière de nouveaux mécanismes d'immunomodulation par les CSM, apportant ainsi de nouvelles pistes pour de futures études et améliorations thérapeutiques.

1. Caractéristiques de l'inflammation colique radio-induite à forte dose

L'inflammation post-radique est un processus très complexe et encore mal compris. Dans les cas d'irradiation intestinale, la richesse du système immunitaire local complexifie encore la réponse inflammatoire. Cette compréhension des processus inflammatoires post-radiques est également rendue difficile par leur nature bi-phasique. En effet, si la phase inflammatoire aiguë et la phase tardive pro-fibrotique ont été assez bien étudiées, les événements temporels plus intermédiaires, et menant à la mise en place de la chronicité inflammatoire, restent encore peu connus.

Comme nous l'avons dit en introduction, le système immunitaire est séparé en deux grands groupes : l'immunité innée et l'immunité adaptative. Les deux types immunitaires vont être impliqués dans la réponse inflammatoire intestinale radio-induite.

1.1. Cellules immunitaires impliquées dans le processus inflammatoire colique radio-induit

L'étude menée par Blirando *et al* sur un modèle murin d'irradiation localisée identique à celui utilisé dans nos études a permis de mettre en évidence une infiltration rapide, importante et persistante des tissus irradiés par des cellules de l'immunité innée : macrophages, neutrophiles et mastocytes (Blirando et al. 2011). Une infiltration similaire des macrophages a également été mise en évidence par Linard *et al* suite à une irradiation abdominale de 10Gy, avec une augmentation importante de leur présence 3 et 7 jours après l'irradiation (Linard et al. 2008). Dans un modèle d'irradiation corps entier, Garg *et al* ont montré une disparition rapide et persistante des neutrophiles intestinaux, avec un retour à des taux normaux 30 jours après l'irradiation. A l'inverse, les macrophages sont diminués 4h et 3,5 jours post-exposition mais augmentés après 14 jours (Garg et al. 2010). Les conséquences de l'exposition aux rayonnements ionisants sont donc variables en fonction du mode d'exposition et de la dose reçue, avec, selon les cas, une augmentation ou une diminution de la présence des cellules. En effet, dans le cas d'une exposition du corps entier aux rayonnements ionisants, la moelle osseuse va être exposée, ce qui va induire une inhibition transitoire de la production des cellules immunitaires et donc de leur présence dans le sang et les tissus. A l'inverse, une irradiation localisée ne va pas provoquer d'atteinte de la moelle. Les cellules immunitaires seront de ce fait toujours produites et à même de venir infiltrer les tissus irradiés. Dans notre modèle d'irradiation colorectale, nous avons pu observer une évolution de l'infiltrat des

neutrophiles, macrophages et mastocytes similaire à celle observée par Blirando *et al*, avec une augmentation rapide et persistante jusqu'à 28 jours post-irradiation des cellules immunes de type inné au sein du colon irradié (Blirando et al. 2011).

En ce qui concerne les cellules de l'immunité adaptative, les études disponibles sont peu nombreuses et donnent des résultats plus variables en fonction des modèles expérimentaux. En effet, dans le cadre de leur modèle d'irradiation corps entier, Garg *et al* ont observé une diminution de la présence des lymphocytes T CD4 au sein de la muqueuse intestinale dès 3,5 jours après l'exposition, avec un retour à la normale 14 jours après l'irradiation (Garg et al. 2010). Lors d'une irradiation abdominale de 10Gy, Strup-Perrot *et al* ont observé une diminution de la présence des lymphocytes T CD8 dès 24h post-exposition (Strup-Perrot et al. 2005). Ces études tendent donc à montrer que l'exposition intestinale aux rayonnements ionisants induit une disparition rapide des lymphocytes T au sein de la muqueuse irradiée. Cependant, plusieurs études menées sur les personnes ayant été exposées lors de l'accident de Tchernobyl, ou suite à la contamination environnementale post-catastrophe, montrent des résultats contrastés, probablement du fait de la grande disparité d'exposition des sujets inclus dans les différentes études. En effet, si Kurjane *et al* ont observé une diminution du nombre de CD4 et de CD8 circulant chez les travailleurs ayant été exposés lors du nettoyage du site suite à la catastrophe (Kurjane et al. 2001), Sheikh Sajjadieh *et al* ont quant à eux observé une augmentation du nombre de lymphocytes T CD8 circulants chez les enfants ayant vécu en zone contaminée (Sheikh Sajjadieh et al. 2010). Enfin, Kuzmenok *et al* ont montré que, bien qu'aucune modification du nombre de cellules circulantes n'ait pu être constatée, les cellules issues de travailleurs exposés ont une réponse anormale à une stimulation *in vitro*, avec une diminution de la prolifération des CD4 et une augmentation de celle des CD8 par rapport aux cellules issues de personnes non irradiées (Kuzmenok et al. 2003). Il faut cependant noter que les résultats obtenus lors de l'étude des patients exposés lors de l'accident de Tchernobyl correspondent le plus souvent aux effets d'une irradiation mixte externe/interne. En effet, les patients ont été exposés de façon externe lors de l'accident puis ont ingéré des produits contaminés, provoquant une irradiation interne.

Dans notre modèle d'irradiation localisée, et contrairement aux modèles d'irradiation corps entier ou abdominale, nous n'avons observé aucune disparition post-radique des leucocytes. Le taux de lymphocytes T CD4 et CD8 est en effet resté constant au sein du colon irradié

jusqu'à 3 jours post-exposition. Nous avons en revanche pu mettre en évidence une augmentation de l'infiltration des lymphocytes T dès une semaine après l'exposition aux rayonnements ionisants, avec une persistance de cette augmentation à 3 et 4 semaines post-irradiation. Cette augmentation de la quantité de lymphocytes T CD4 et CD8 est également associée à une augmentation de leur niveau d'activation, avec une augmentation de l'expression du marqueur CD25 et de leur capacité de prolifération. Cette présence accrue des cellules de l'immunité adaptative au sein du tissu irradié se reflète également au niveau systémique. En effet, l'augmentation du nombre et de l'activation des lymphocytes CD4 et CD8 est également visible au sein des ganglions mésentériques, i.e. les ganglions drainants la zone irradiée, et du sang circulant. Nous avons donc pour la première fois réussi à démontrer que l'irradiation localisée du colon donne naissance à une forte réaction immunitaire locale mais également systémique, démontrant ainsi la gravité des conséquences d'une irradiation colique localisée à forte dose.

1.2. Molécules impliquées dans le processus inflammatoire colique radio-induit

Les cytokines et chémokines sont fortement impliquées dans le développement et le maintien des réactions inflammatoires. De la même façon que les cellules, les molécules issues de l'immunité innée vont être fortement impliquées dans la réponse inflammatoire post-radique. Ainsi, Blirando *et al*, Linard *et al*, Grémy *et al*, Strup-Perrot *et al* ou encore Garg *et al* ont montré une augmentation de l'expression de CXCL-1, CXCL-2, IL-1, MCP-1, COX-2, RANTES (Blirando *et al*. 2011) (Garg *et al*. 2010) (Strup-Perrot *et al*. 2005) (Gremy *et al*. 2006) (Linard *et al*. 2008). Les données disponibles concernant l'évolution tardive des cytokines pro-inflammatoires d'origine innée sont moins nombreuses que les données sur leur évolution précoce. Cependant, Grémy *et al* ont montré une diminution de l'expression de MCP-1, d'iNOS et de l'IFN γ 26 semaines après une exposition abdominale fractionnée à une dose totale d'irradiation de 52Gy (Gremy *et al*. 2008). Dans notre modèle, nous avons obtenu des résultats similaires à ceux de Blirando *et al*, avec une augmentation de l'expression de l'IL-1, de l'IL-8 et de MCP-1 au sein de la muqueuse irradiée 21 jours après l'exposition (Blirando *et al*. 2011). Ces résultats ont par ailleurs été confirmés par l'analyse de leur expression protéique.

Les résultats concernant les molécules issues de l'immunité adaptative sont très variables en fonction du protocole d'irradiation utilisé. En effet, dans leurs modèles d'irradiation

abdominale mono-dose et fractionnée, Grémy *et al* ont été en mesure de caractériser la réponse immunitaire adaptative comme étant orientée vers un profil de type Th2, avec une diminution de la sécrétion de facteurs de type Th1 (IFN- γ , IL-2, CXCR3, CCR5) et un maintien de celle des facteurs de type Th2 (IL-4, IL-13, CCR4), dès 24h après l'exposition (Gremy et al. 2006; Gremy et al. 2008). Garg *et al* ont quant à eux observé une diminution de l'IL-6 24 heures après exposition corps entier, suivie d'une augmentation à 3,5 jours. Ils ont également pu observer une diminution de l'IL-4 à 21 jours post-irradiation (Garg et al. 2010). Enfin, leur analyse de l'orientation Th1/Th2 de la réponse immunitaire intestinale post-irradiation corps entier les a mené à conclure à une alternance de profil au cours du temps. Enfin, dans leur modèle d'irradiation colique localisée, Blirando *et al* n'ont quant à eux détecté que peu de cytokines de type adaptatif, avec une faible augmentation de l'expression de l'IL-6 et de l'IL-10 14 jours après exposition, sans corrélation protéique (Blirando et al. 2011). A long terme, les seules données actuellement disponibles sont celles obtenues par Grémy *et al* dans leur modèle d'irradiation abdominale fractionnée, et montre une persistance du dérèglement cytokinique (Gremy et al. 2008). En effet, l'analyse de l'expression des cytokines et des facteurs de transcriptions spécifiques de chaque orientation lymphocytaire montre une diminution du profil Th1 au profit du profil Th2 jusqu'à 26 semaines après la dernière exposition. Lors de notre étude, nous n'avons pas été en mesure de détecter une variation d'expression et de synthèse significative des cytokines produites par les cellules de l'immunité adaptative au sein de la muqueuse irradiée. En revanche, l'analyse des lymphocytes T CD4 purifiés à partir des ganglions mésentériques 21 jours après irradiation nous a permis d'observer une augmentation de leur expression d'IL-4, d'IL-10, d'IL-2 et d'IFN γ .

Comme nous l'avons dit en introduction, la réponse inflammatoire post-radique est complexe et dépend fortement des modalités d'irradiation (dose reçue et configuration de l'irradiation). Le modèle d'irradiation colorectale localisée que nous avons utilisé tout au long de la thèse donne ainsi des résultats très différents de ceux obtenus lors d'irradiation corps entier ou abdominale. En revanche, nos résultats concordent avec ceux obtenus par Blirando *et al* en utilisant le même protocole d'irradiation chez la souris, prouvant ainsi la dépendance directe de la réponse observée au modèle utilisé (Blirando et al. 2011). Malgré les études citées ci-avant, les composants de la réponse inflammatoire post-radique restent peu connus, notamment comparé aux modèles utilisés afin d'étudier les MICI. En effet, s'il est établi que

l'instillation de DSS ou de TNBS induit une réponse inflammatoire importante avec une forte augmentation des sécrétions cytokiniques similaire à celle observée dans les cas de maladie de Crohn (TNF α , IL-6, MIP-2, RANTES, IL-1 β , IL-12, IFN γ), la réponse aux rayonnements ionisants sera spécifique à chaque configuration ainsi qu'à chaque modèle animal. Ces spécificités rendent nécessaire l'analyse poussée de chaque modèle expérimental, mais aussi celle des prélèvements effectués sur les patients afin d'établir les lignes générales sous-jacentes à chaque processus particulier observé dans une étude donnée.

La faible présence des cytokines pro-inflammatoires liées à l'immunité adaptative est surprenante vue la présence et le taux d'activation élevé des lymphocytes T observés dans notre modèle. On peut cependant émettre l'hypothèse que cette absence pourrait être due à la nature particulière de l'inflammation intestinale radio-induite. En effet, deux types d'inflammation peuvent être distingués : l'inflammation septique, qui a lieu lors de l'invasion de l'organisme par un pathogène exogène, et l'inflammation stérile, provoquée par un stimulus tel que la mort cellulaire par nécrose, l'hypoxie ou encore les traumatismes mécaniques (Chen et al. 2010). Dans le cas d'une irradiation intestinale, le processus inflammatoire qui va se mettre en place sera mixte. En effet, les rayonnements ionisants vont directement provoquer la mort des cellules intestinales par apoptose puis nécrose. Cette mort cellulaire va par la suite aboutir à la création de brèches dans la barrière épithéliale, ce qui va permettre le passage des pathogènes luminaux au sein de l'organisme. Le processus inflammatoire post-radique sera donc à la fois stérile et septique. L'inflammation classique, dirigée contre les pathogènes, a une forte composante cytokinique. Ce n'est en revanche pas toujours le cas de l'inflammation stérile. En effet, la nécrose des cellules endogènes va provoquer le relargage de molécules du soi (acide urique, ADN, ...) normalement intracellulaires et donc inaccessibles au système immunitaire. Cette exposition de molécules normalement non-exposées va initier une réaction inflammatoire contre ces molécules, avec une importante intervention des neutrophiles ainsi que de la sécrétion d'IL-1 β , cytokine fortement retrouvée au sein de la muqueuse irradiée (Rock et al. 2011). En ce qui concerne l'immunité adaptative, il a été proposé que les cellules mortes ou mourantes présenteraient une forte activité adjuvante, augmentant ainsi l'activation des cellules CD4 et CD8 sans qu'un signal cytokinique soit nécessaire (Rock et al. 2011). Il serait donc intéressant de doser les molécules impliquées dans l'inflammation stérile (acide urique, acides nucléiques libres, HMGB1, heat shock proteins, S100,...) au sein des muqueuses provenant de nos animaux

irradiés afin de confirmer cette hypothèse d'inflammation mixte ainsi que son lien avec la faible production de cytokines de type adaptatif.

2. Modulation de l'inflammation colique radio-induite par les CSM

2.1. Modulation de l'immunité innée

Les CSM sont connues pour interagir avec tous les composants de l'immunité, qu'ils soient de type innés ou adaptatifs, et sont de ce fait largement utilisées dans le traitement des pathologies inflammatoires. Dans notre modèle d'irradiation colorectale, aucun effet du traitement par CSM n'a pu être mis en évidence en ce qui concerne l'immunité innée. En effet, bien que Raffaghello *et al* aient démontré un effet direct de CSM sur les neutrophiles via une inhibition du burst oxydatif (Raffaghello et al. 2008), aucune différence n'a pu être mise en évidence après traitement, aussi bien en ce qui concerne leur nombre que la sécrétion de cytokines telles que l'IL-1 β et l'IL-8. De même, aucune variation de la présence des macrophages n'a pu être détectée suite au traitement par CSM. Cette absence d'inhibition de la part innée de l'inflammation peut être due à la nécessité de maintenir une réponse antimicrobienne dans le contexte septique intestinal. En effet, différentes études ont montré que les CSM peuvent orienter leurs effets en fonction du contexte septique, permettant ainsi de maintenir les réponses inflammatoires antimicrobiennes bénéfiques pour l'organisme lorsque le contexte le nécessite (English et al. 2011). Notre difficulté à mettre en évidence une variation de la présence des macrophages au sein de la muqueuse irradiée ne nous a pas permis d'évaluer l'impact du traitement par CSM sur ces cellules. Cependant, bien que leur nombre semble inchangé au cours de la réaction inflammatoire post-radique, il se peut que le contexte inflammatoire, et à fortiori le traitement par CSM, crée une orientation différentielle de ces cellules. Il a en effet été montré au cours des dernières années que les macrophages pourraient s'orienter différemment en fonction du contexte inflammatoire dans lequel ils se trouvent en cellules de type M1 ou M2. Le type M1, activé selon la voie « classique », apparaît lorsque les cellules immatures sont mises en contact avec les cytokines canoniquement produites par les lymphocytes T CD4 de type Th1 (IFN γ , TNF α , LPS). Les cellules ainsi activées présentent une forte capacité microbicide ainsi qu'une importante sécrétion de cytokines pro-inflammatoires afin de renforcer la réponse cellulaire adaptative. Le type M2, ou cellules activées de façon « alternative », apparaît quant à lui lorsque les cellules immatures sont en contact avec des cytokines produites par les cellules CD4 de type

Th2 (IL-4 et IL-13). Ces cellules particulières jouent un rôle important dans la lutte antiparasitaire mais aussi dans les phénomènes d'allergie, de réparation tissulaire ainsi que dans le remodelage tissulaire. La catégorie M2 est elle-même divisée en 3 sous-familles : les cellules M2a, induites par l'IL-4 et l'IL-13 ; les cellules M2b, induites par les complexes immuns et les ligands de TLR et les cellules M2c, induites par des signaux anti-inflammatoires tels que les glucocorticoïdes, l'IL-10 ou encore le TGF β (Cassetta et al. 2011). Nemeth *et al* ont montré que le traitement par CSM permet de réorienter les macrophages vers un phénotype anti-inflammatoire et une production d'IL-10 (Nemeth et al. 2009). Dans ce contexte, il serait donc intéressant d'étudier spécifiquement la polarisation des macrophages coliques suite à l'irradiation avec et sans traitement par CSM, afin de déterminer si le traitement favorise ou non une orientation de type M2c, favorable à l'arrêt de la réaction inflammatoire et à la régénération tissulaire. L'analyse de la présence des cytokines au sein de la muqueuse irradiée n'ayant pas permis de trancher, il serait intéressant d'étudier l'impact du traitement sur des macrophages isolés à partir de lavages intrapéritonéaux, riches en macrophages.

2.2. Modulation de l'immunité adaptative

L'inhibition de la part adaptative de l'immunité par les CSM a également été largement démontrée dans la littérature. Dans notre modèle, le traitement des animaux irradiés par CSM permet de maintenir un taux constant de lymphocytes T CD4 et CD8 au sein de la muqueuse irradiée. De même, le taux d'activation et la capacité de prolifération des lymphocytes T restent inchangés chez les animaux irradiés et traités par CSM par rapport aux animaux non-irradiés. Lors d'une injection curative, i.e 3 semaines après l'irradiation, l'inflammation présente lors de l'injection, et qui persiste à 4 semaines en absence de traitement, disparaît 7 jours après l'administration des CSM, avec un retour à des taux normaux de lymphocytes CD4 et CD8. Cette inhibition de la réponse immunitaire T est en adéquation avec les études déjà publiées. En effet, Bartholomew *et al* et Di Nicola *et al* ont montré *in vitro* que les CSM sont capables d'inhiber l'activation et la prolifération des lymphocytes T (Bartholomew et al. 2002) (Di Nicola et al. 2002). De même, Rasmusson *et al* ont montré que les CSM inhibent la cytotoxicité médiée par les lymphocytes CD8 ainsi que leur capacité de prolifération (Rasmusson et al. 2003). Les mécanismes sous-jacents de ces effets inhibiteurs des CSM ont été étudiés dans de nombreux modèles, aussi bien *in vitro* qu'*in vivo*. Plusieurs études ont

ainsi montré que le traitement par CSM permet d'inhiber les processus inflammatoires T dépendants via l'induction d'une réponse cytokinique de type anti-inflammatoire, ainsi que via une inhibition des réponses Th1, Th2 et Th17 (Nemeth et al. 2009) (Rafei et al. 2009) (Ghannam et al. 2010). En outre, Aggarwal *et al* et Selmani *et al* ont montré que la co-culture de lymphocytes T CD4 naïfs avec des CSM induit les lymphocytes à se différencier en lymphocytes T régulateurs sécréteurs d'IL-10 (Aggarwal et al. 2005) (Selmani et al. 2008). Ces résultats sur les lymphocytes T régulateurs ont également été démontrés par Gonzalez et Gonzalez-Rey *et al* dans leurs études du traitement par CSM des colites chimio-induites, dans lesquelles l'injection de CSM aux souris permet d'induire une augmentation du nombre de lymphocytes T régulateurs ainsi que de la sécrétion d'IL-10, anti-inflammatoire, au sein de l'intestin lésé (Gonzalez-Rey et al. 2009; Gonzalez et al. 2009). Cette implication des lymphocytes T régulateurs a en outre été récemment retrouvée chez les patients atteints de maladie de Crohn et traités par CSM (Guadalajara et al. 2012).

Dans notre modèle, la faible présence des cytokines de type adaptatif au sein de la muqueuse intestinale ne nous ayant pas permis de définir si la réponse est de type Th1 ou Th2 après irradiation, la modulation de cette orientation par les CSM n'a de ce fait pas pu être établie. En outre, à l'inverse des résultats obtenus par Gonzalez et Guadalajara, aucune augmentation du nombre de lymphocytes T régulateurs ni de la sécrétion d'IL-10 n'a pu être mise en évidence suite au traitement par CSM. L'inhibition de la prolifération et de l'activation des lymphocytes T par les CSM dans notre modèle d'irradiation dépend donc d'un autre mécanisme immunomodulateur.

3. La modulation de l'inflammation colique radio-induite par les CSM dépend d'une synthèse locale de glucocorticoïdes

Dans notre modèle d'irradiation colorectale localisée à forte dose, nous avons pu observer pour la première fois une augmentation locale de la synthèse de corticostéroïdes au sein de la muqueuse irradiée suite au traitement par CSM. La production de cortisol (corticostérone chez le rongeur) est majoritairement assurée par les glandes surrénales. Cependant, une production extra-surrénaliennne a pu être mise en évidence au sein de nombreux tissus (organes lymphoïdes, peau, système nerveux central, système cardio-vasculaire) (Taves et al. 2011) et notamment par les cellules épithéliales intestinales (Cima et al. 2004). Cette synthèse extra-surrénaliennne de cortisol permet une régulation locale des processus sous le contrôle des

corticostéroïdes, et notamment celle des réponses inflammatoires localisées. Plusieurs études menées sur des animaux atteints de colite induite par DSS ou TNBS ont mis en évidence une modification du métabolisme de la corticostérone au sein de la muqueuse des animaux instillés. Ces études ont permis de mettre en évidence une modification de l'activité des deux enzymes contrôlant l'activation et l'inactivation de la corticostérone : les 11 β -hydroxystéroïde déshydrogénases de type 1 et 2 (11 β -HSD1 et 2) (Ergang et al. 2011). Les animaux atteints de colite montrent ainsi une augmentation de l'expression de la 11 β -HSD1, responsable de la production de corticostérone active, et une inhibition de la 11 β -HSD2, responsable de l'inactivation de la corticostérone. Cette modification de la balance normale existant entre l'activation et l'inactivation de la corticostérone est également retrouvée chez les patients souffrant de colite ulcéreuse (Bryndova et al. 2004; Zbankova et al. 2007). Ces modifications spontanées de la production locale de glucocorticoïdes montrent l'implication de cette synthèse dans la régulation des processus inflammatoires intestinaux. Dans notre étude, nous avons retrouvé cette augmentation de l'expression de la 11 β -HSD1 au sein de la muqueuse irradiée, mais elle n'est pas associée à augmentation détectable de la synthèse de corticostérone post-irradiation. Cette absence de modification de la présence de corticostérone peut être due à une augmentation de l'expression et/ou de l'activité de la 11 β -HSD2, enzyme inhibitrice de la corticostérone. A l'inverse, le traitement par CSM induit une expression accrue de la 11 β -HSD1 au sein de la muqueuse irradiée, associée cette fois à une augmentation de la synthèse de corticostérone. Il sera donc intéressant de tester l'expression de la 11 β -HSD2 dans les muqueuses coliques des animaux irradiés et irradiés et traités par CSM afin de voir si l'effet anti-inflammatoire apporté par les CSM est ou non en partie dû à une modification de la balance 11 β -HSD1/11 β -HSD2 en faveur de la 11 β -HSD1 et de l'augmentation de la production de corticostérone.

4. L'inhibition du processus inflammatoire post-radique par les CSM favorise la régénération tissulaire colique

Les études menées au cours de cette thèse ont permis de démontrer les effets bénéfiques du traitement par CSM sur l'inflammation colorectale post-radique. Cependant, en plus de leurs capacités d'immunomodulation, les CSM ont également montré une forte capacité de régénération des organes lésés. Morigi *et al* ont par exemple montré qu'un traitement par CSM permet de limiter les dommages tissulaires dans un modèle de lésion aiguë du rein

(Morigi et al. 2008). Dans le contexte des lésions radio-induites, les effets pro-régénérants du traitement par CSM ont déjà été démontrés dans le cadre des lésions de la peau et du foie (Francois et al. 2007; Mouiseddine et al. 2012). En ce qui concerne les lésions radiques intestinales, les travaux de Sémont *et al* sur l'irradiation abdominale de la souris nude ont permis de montrer qu'un traitement par CSM humaines permet d'améliorer la survie des animaux via l'induction d'une meilleure régénération de l'épithélium intestinal (Semont et al. 2010).

4.1. Les CSM restaurent la prolifération entérocytaire post-radique via un mécanisme Wnt dépendant

Dans notre modèle d'irradiation colorectale localisée, nous avons pu observer une nette amélioration de la structure épithéliale suite au traitement par CSM, associée à une diminution significative du score lésionnel une et deux semaines après l'irradiation et l'injection. Cette diminution des lésions post-radiques est associée à une stimulation accrue de la prolifération cellulaire, visualisée grâce au marqueur de prolifération PCNA. Cette augmentation de la prolifération des cellules épithéliales suite au traitement par CSM est également associée à un nombre accru de cellules souches intestinales, Sox9 positives, par rapport aux animaux irradiés non-traités. Nos résultats ont également permis de démontrer que l'effet bénéfique observé suite au traitement par CSM est dépendant de la voie de prolifération cellulaire des Wnt, et plus particulièrement de leur voie non-canonique via la molécule Wnt4, exprimée de façon endogène par les cellules intestinales (Gregorieff et al. 2005). Cette implication des facteurs de croissance dans l'effet bénéfique des CSM a déjà été montré par Bai *et al* dans leur étude sur l'EAE, dans laquelle ils ont démontré le rôle critique de l'HGF dans l'amélioration obtenue après traitement par CSM (Bai et al. 2012). Cependant, dans notre modèle, aucun facteur de croissance autre que Wnt4 n'a pu être impliqué dans l'effet pro-régénérant des CSM. D'autres études ont également montré une amélioration de la régénération des lésions suite au traitement par CSM impliquant la voie des Wnt, et plus spécifiquement la voie non-canonique et Wnt 4 (Chang et al. 2007; Leroux et al. 2010).

4.2. L'inhibition du processus inflammatoire adaptatif par les CSM favorise la cicatrisation des lésions colorectales radio-induites

Suite aux résultats positifs obtenus au cours de nos études à la fois sur l'inhibition du processus inflammatoire et sur l'amélioration de la régénération tissulaire après traitement par CSM, nous nous sommes demandé quel lien pourrait exister entre ces deux effets, et quelle serait la part de l'inhibition de la réponse inflammatoire dans le bénéfice lésionnel observé. Dans notre modèle de traitement précoce des lésions colorectales radio-induites, l'amélioration de la régénération épithéliale précède l'inhibition du processus inflammatoire. Le bénéfice observé sur les lésions est en effet maximal 14 jours après l'exposition aux rayonnements et le traitement par CSM, alors que l'inhibition des lymphocytes T est maximale à 21 jours post-exposition (Voir figure 28).

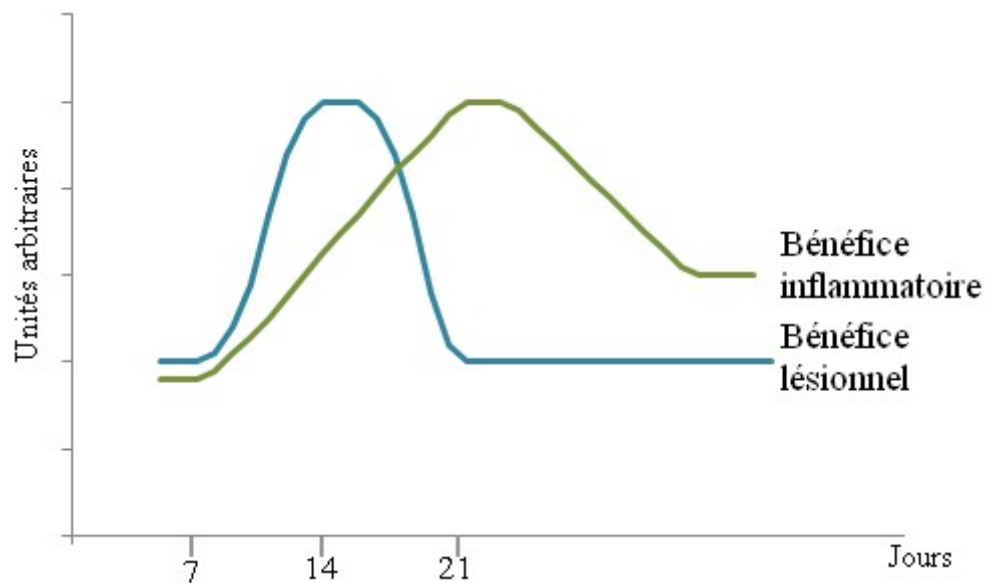


Figure 28 : Evolution des bénéfices lésionnels et inflammatoires au cours du temps

On peut donc se demander si la diminution des lésions est à l'origine de la régression de l'inflammation, ou si le traitement par CSM a un impact direct à la fois sur la régénération et sur l'inflammation, indépendamment l'une de l'autre. Afin de répondre à cette question, nous avons utilisé un protocole d'étude différent, basé sur l'analyse des effets d'une injection de CSM non plus juste après l'exposition mais 3 semaines après, lorsque les lésions et le processus inflammatoire sont d'ores et déjà établis. Ce nouveau protocole d'étude nous permet de nous rapprocher des conditions cliniques, puisque les patients ne sont généralement pas pris en charge dès la fin de l'exposition mais lorsque les lésions sont déjà présentes.

Dans le cadre de ce nouveau protocole, nous avons analysé l'impact du traitement par CSM 7 jours après son administration, soit 4 semaines après l'irradiation. Dans ces conditions,

l'évaluation de la gravité des lésions nous a montré un net bénéfice du traitement par CSM, avec une diminution du score des atteintes de la muqueuse par rapport aux animaux irradiés non-traités. Nous avons également pu observer un retour à une contractibilité, i.e. une fonctionnalité du muscle colique, similaire à celle des animaux témoins non-irradiés, contrairement aux animaux irradiés non-traités qui montrent une diminution de la capacité contractile du muscle colique. De la même façon, l'analyse du processus inflammatoire a montré une nette diminution du nombre et de l'activation des lymphocytes T une semaine après l'injection de CSM, et ce aussi bien au niveau local que systémique. Ces résultats nous permettent donc de confirmer que le traitement tardif par CSM apporte des bénéfices similaires à ceux observés lors de son administration précoce après l'irradiation, et ce malgré le caractère établi des lésions et du processus inflammatoire. Cette amélioration des lésions établies se rapproche des résultats obtenus en clinique par Garcia-Olmo *et al* lors du traitement des lésions créées par la maladie de Crohn, qui sont également des lésions établies (Garcia-Olmo et al. 2005; Garcia-Olmo et al. 2009). En outre, des résultats obtenus au sein de notre laboratoire montrent que le traitement des lésions établies par injections répétées de CSM suite à une irradiation colorectale chez le minipig permet une amélioration satisfaisante des paramètres histologiques et inflammatoires étudiés (Linard et al, en cours de publication).

Dans la plupart des modèles utilisant les CSM dans un but thérapeutique, la diminution des lésions semble fortement liée à une diminution du processus inflammatoire. Ce lien apparaît notamment clairement lors de l'analyse de pathologies de type auto-immun. Ainsi, Gonzalez-Rey *et al* ont montré que la diminution des atteintes coliques causées par le DSS est liée à une diminution de l'activité lymphocytaire via une induction de lymphocytes T régulateurs par les CSM (Gonzalez-Rey et al. 2009). En effet, leur étude montre que le transfert non plus de CSM mais de lymphocytes issus d'animaux souffrant de colite et traités par CSM à des animaux non-traités induit une diminution des lésions chez les animaux receveurs. Ces résultats laissent donc penser que, dans ce cas précis, l'amélioration des lésions passe majoritairement, voire même exclusivement, par l'inhibition du processus inflammatoire.

Afin de déterminer l'impact réel de l'inhibition du processus inflammatoire sur l'évolution des lésions colorectales radio-induites, nous avons inhibé la réaction immunitaire adaptative en administrant à nos animaux irradiés depuis 3 semaines un anticorps bloquant le CD3, tous les jours pendant 7 jours. Ce traitement nous a permis d'obtenir une disparition quasi complète des lymphocytes T CD4 et CD8, nous assurant ainsi une inhibition efficace du

processus inflammatoire adaptatif. Suite à l'inhibition des lymphocytes T, nous avons pu observer une diminution de la gravité des lésions tissulaires ainsi qu'une amélioration de la fonction contractile du muscle colique. Bien que les résultats obtenus soient moins drastiques que lors du traitement par CSM, ils nous montrent tout de même que l'inhibition du processus inflammatoire adaptatif post-radique permet de favoriser la réparation des lésions tissulaires en absence de traitement par les CSM. L'inhibition du processus inflammatoire adaptatif par les CSM semble donc bien jouer un rôle dans la diminution des lésions radio-induites. Il serait maintenant intéressant d'étudier si l'inhibition totale des lymphocytes T induit des modifications de l'environnement intestinal au même titre que les CSM. Pour ce faire, nous souhaitons étudier l'impact de cette inhibition sur la prolifération des cellules épithéliales via les marqueurs PCNA et Sox9, dont nous avons montré l'implication dans l'effet bénéfique du traitement par CSM. Une modification de ces facteurs en absence de traitement par CSM confirmerait l'implication directe de l'inhibition de l'inflammation sur le processus de régénération suite à l'administration des CSM.

L'analyse de nos prélèvements sur les animaux traités par anti-CD3 nous a permis d'envisager quelques mécanismes par lesquels le processus inflammatoire post-radique pourrait inhiber la réparation tissulaire et ainsi participer au développement des lésions radiques tardives, ces effets étant annulés lors d'un traitement par CSM ou anti-CD3. En effet, l'analyse de la mort cellulaire au sein de la muqueuse irradiée nous a montré une forte augmentation du nombre de cellules apoptotiques 4 semaines après l'exposition. Si le traitement par CSM permet de diminuer significativement le nombre de cellules apoptotiques, l'administration d'anti-CD3 permet quant à elle un retour à un taux d'apoptose similaire à celui des animaux non-irradiés. Ces résultats nous laissent donc penser que les cellules de l'immunité adaptative pourraient être à l'origine de cette apoptose des cellules épithéliales, et donc à l'origine d'au moins une partie des lésions tardives radio-induites. En effet, plusieurs études ont montré que les cytokines produites par les lymphocytes T, tels que l'IFN γ ou l'IL-2, peuvent avoir un effet pro-apoptotique sur les cellules environnantes. Cependant, la faible présence de ces molécules au sein de la muqueuse irradiée nous a orienté vers une autre cytokine pro-inflammatoire et pro-apoptotique : l'IL-17, produite par des lymphocytes T CD4 orientés spécifiquement, les Th17. Les lymphocytes de type Th17 sont connus pour être impliqués dans de nombreuses pathologies auto-immunes cliniques, ainsi que dans leurs modélisations expérimentales, telles que la SEP (Lock et al. 2002) (Tzartos et al. 2008), le psoriasis (Teunissen et al. 1998) ou

encore la maladie de Crohn et la rectocolite hémorragique (Fujino et al. 2003) (Zhang et al. 2006). En outre, plusieurs études ont montré leur implication dans des phénomènes apoptotiques tels que la destruction des oligodendrocytes dans la SEP (Paintlia et al. 2011) ou encore celle des cellules endothéliales dans l'athérosclérose, aboutissant dans ce cas précis à l'apparition d'un syndrome coronarien aigu (Zhu et al. 2011). L'implication des lymphocytes TH17 dans l'inflammation radio-induite n'a pour l'instant pas été démontrée. Nos résultats préliminaires nous laissent cependant penser que l'exposition colorectale à une forte dose de rayonnements ionisants pourrait induire l'apparition d'une réponse Th17. En effet, les premières analyses menées sur les lymphocytes isolés chez nos animaux irradiés nous ont montré une expression importante de l'ARN messager de l'IL-17, suggérant la présence de lymphocytes Th17. Cette orientation Th17 expliquerait notre difficulté à établir une orientation Th1/Th2 et pourrait être expliquée par le contexte septique intestinal. Corrina *et al* ont en effet montré que l'infection par certaines bactéries, et l'apoptose cellulaire qui en résulte, induisent une réponse Th17 chez le rongeur (Brereton et al. 2011). L'irradiation créant une brèche dans la barrière intestinale, l'invasion bactérienne ainsi permise pourrait de ce fait être à l'origine d'une orientation de la réaction inflammatoire vers une réponse de type Th17.

Les mécanismes par lesquels les CSM modifient la réponse inflammatoire radioinduite établie restent encore à définir. Il faudra en effet savoir si les mécanismes impliqués sont les mêmes que ceux observés lors du traitement des lésions non-établies, ou s'ils sont totalement différents. Dans ce contexte particulier d'inflammation établie, nous pouvons émettre l'hypothèse que les CSM pourraient agir en favorisant la résolution naturelle du processus inflammatoire et ainsi permettre la disparition des cellules et molécules pro-inflammatoires impliquées (lymphocytes T, IL-17...). En effet, lors de toute inflammation, le retour à un contexte immunitaire normal via le processus de résolution est un élément essentiel afin de permettre une réparation complète des tissus lésés. L'absence ou le mauvais déroulement de la résolution sont d'ailleurs impliqués dans de nombreuses pathologies inflammatoires chroniques (Serhan et al. 2008). En inhibant totalement l'activité des cellules immunitaires adaptatives, nous avons en quelque sorte reproduit l'aboutissement de la résolution, c'est-à-dire la disparition des stimuli inflammatoires produits par les cellules immunitaires activées. La résolution étant une étape essentielle du processus de réparation, la reproduction des effets de cette dernière grâce au traitement par CSM nous a permis d'obtenir une régénération

muqueuse se rapprochant de celle observée lors d'une résolution physiologique. Bien que ne nous permettant pas de valider l'hypothèse d'une implication exclusive de l'inhibition de l'inflammation dans l'effet bénéfique observé après traitement par CSM, cette analyse de l'inhibition du processus inflammatoire adaptatif nous permet de valider la forte implication de l'immunomodulation dans l'efficacité de notre traitement. En outre, la diminution de l'apoptose cellulaire suite au traitement par CSM et par anti-CD3 nous permet de lier les deux processus d'inflammation et de dégradation tissulaire, et de postuler que la modulation du premier phénomène permettrait celle du second. Cependant, il ne faut pas perdre de vue que l'inhibition des lymphocytes T par injection d'un anticorps bloquant est un phénomène extrême, qui ne reflète pas réellement la réaction des animaux au traitement par CSM. En effet, les CSM n'éliminent en aucun cas la totalité des cellules présentes au sein du colon mais rétablissent une présence et un niveau d'activation normaux des cellules immunitaires. La part de l'inhibition du processus inflammatoire dans le bénéfice observé après traitement par CSM doit donc être appréhendée avec précautions, et est vraisemblablement associée à un effet pro-régénérant des CSM.

Les résultats obtenus au cours de ma thèse montrent que le traitement par CSM des lésions colorectales radio-induites est efficace mais aussi que cette efficacité n'est actuellement que partielle. L'inhibition du processus inflammatoire radio-induit associé à l'augmentation des capacités de régénération de l'épithélium colique permettent en effet d'obtenir une amélioration de 25% du score lésionnel suite au traitement par CSM. Ce bénéfice de 25% représente un réel encouragement à continuer nos recherches. Nous devons donc maintenant développer de nouvelles méthodes de traitement nous permettant d'augmenter ce bénéfice, et ainsi favoriser le passage à une utilisation clinique des CSM.

PERSPECTIVES

1. Comment améliorer l'efficacité des traitements par CSM ?

Différents axes de recherche sont envisageables afin d'améliorer l'efficacité thérapeutique du traitement des lésions coliques radio-induites par les CSM. Dans notre équipe, deux axes d'amélioration sont envisagés : l'utilisation de biomatériaux afin d'apporter directement les CSM au niveau local et une co-thérapie faisant intervenir d'autres cellules en association avec les CSM. L'apport des cellules en local permettrait d'augmenter leur nombre au niveau du site lésé et ainsi d'augmenter l'efficacité du traitement. L'utilisation d'autres cellules en co-thérapie avec les CSM permettrait d'élargir le spectre d'action en combinant les effets bénéfiques des chaque type cellulaire.

1.1. Amélioration de l'efficacité des CSM grâce à une injection locale et à l'utilisation de biomatériaux

Malgré les bénéfices observés dans de nombreux modèles expérimentaux et de nombreux essais cliniques suite à l'administration de CSM, la localisation des cellules injectées reste infime par rapport à la quantité administrée. L'injection par voie systémique, bien qu'apportant un bénéfice réel, ne permet en effet que très peu la localisation des cellules au sein des tissus lésés. Bien que des hypothèses d'action à distance aient été proposées (Wang et al. 2012) une amélioration de la prise de greffe au sein des tissus lésés pourrait permettre d'augmenter le bénéfice thérapeutique grâce à une action non plus à distance mais locale. Différents protocoles ont de ce fait été mis en place afin de favoriser l'administration locale des CSM directement au niveau des lésions. Cependant, là encore, les cellules n'ont pas montré d'implantation durable dans les tissus. L'utilisation de biomatériaux afin d'emprisonner les CSM, et ainsi de les maintenir au contact des sites lésionnels, a donc été proposée. Les premières utilisations combinées de CSM et de biomatériaux ont été menées dans le cadre de la régénération osseuse. L'utilisation de matrices « chargées » en CSM dans le cadre de la réparation des traumatismes osseux non-jointifs a ainsi montré d'excellents résultats, avec une récupération de la fonctionnalité de la jambe chez tous les patients traités (Quarto et al. 2001). Dans le cadre des lésions intestinales, l'équipe de Garcia-Olmo a combiné l'utilisation d'une colle de fibrine et des CSM afin de collapser les fistules péri-anales provoquées par la maladie de Crohn (Garcia-Olmo et al. 2009). Les résultats de leurs études cliniques de phase I et II ont été très encourageants, avec une nette amélioration de la fermeture des plaies ainsi qu'une diminution de la récurrence fistulaire suite au co-traitement par rapport à la glue seule. Une étude est actuellement en cours dans notre laboratoire afin

d'évaluer la faisabilité d'une injection locale de CSM couplées à un biomatériau directement au sein du colon irradié.

1.2. Utilisation des CSM en co-thérapie avec d'autres types cellulaires

Une autre possibilité afin d'améliorer les traitements par CSM serait de pratiquer une co-injection avec d'autres cellules, souches ou non, nécessaires à la régénération tissulaire. Ce type de protocole a d'ailleurs déjà été pratiqué en clinique dans le cadre des greffes de moelle osseuse, dans lesquelles les CSM sont alors co-greffées avec les cellules souches hématopoïétiques. On pourrait donc envisager des protocoles similaires afin d'améliorer les protocoles de thérapie cellulaire en les adaptant aux organes ciblés. Un protocole de ce type a d'ailleurs d'ores et déjà prouvé son efficacité. En effet, Bell et al ont montré dans leur étude portant sur le traitement du diabète que la co-administration de CSM avec des cellules progénitrices issues de cellules souches de sang de cordon permet une amélioration de l'hyperglycémie et de la tolérance au glucose (Bell et al. 2012). Ces améliorations sont dues à une augmentation du nombre de cellules bêtas, associée à augmentation de la densité des capillaires sanguins intra-îlots. Dans le cas de l'irradiation intestinale, les récentes réussites dans la caractérisation, l'isolement et la culture des cellules souches intestinales (CSI) (Yui et al. 2012) (Jung et al. 2011) (Li et al. 2012) pourraient nous permettre d'envisager une co-injection de nos CSM avec des CSI. Une telle co-injection, combinant le renouvellement immédiat des CSI détruites par l'irradiation aux effets anti-inflammatoires et pro-régénérants des CSM, pourrait permettre d'améliorer le bénéfice structural et fonctionnel ainsi que d'accélérer le processus de régénération post-radique.

Une autre source importante de cellules utilisable en thérapie cellulaire serait les induced pluripotent stem cells (iPS). Les iPS sont des cellules souches pluripotentes obtenues suite à la dédifférenciation forcée d'une cellule somatique différenciée. Cette acquisition du potentiel souche s'obtient par une série de transfection de 4 gènes identifiés comme étant associés au caractère souche des cellules souches embryonnaires (Takahashi et al. 2006). Une fois obtenues, ces cellules souches pluripotentes peuvent être induites *in vitro* à se différencier en un grand nombre de cellules, aussi bien complètement différenciées que progénitrices (Song et al. 2012) (Hayashi et al. 2012) (Kuo et al. 2012). L'utilisation des iPs pourrait donc être envisagée afin de produire des cellules progénitrices épithéliales qui pourraient, tout comme les CSI, être co-injectées avec les CSM afin d'accélérer le processus de régénération des

lésions radiques. Il faut en outre garder en tête que la destruction de la muqueuse n'est pas la seule conséquence de l'irradiation colique à forte dose. Une altération de la structure et de la fonction du système nerveux intestinal a également été mise en évidence au sein de notre laboratoire (Semont et al, en cours de publication). L'isolement de cellules nerveuses intestinales directement à partir de prélèvements et leur amplification *in vitro* en vue d'un traitement est actuellement impossible. L'orientation d'iPS vers un caractère de progéniteurs neuronaux, et leur co-injection avec des CSM et/ou des CSI, pourrait permettre de cibler chaque compartiment lésé lors de l'irradiation, et permettre ainsi une réparation d'ensemble des lésions colorectales post-radiques. L'utilisation thérapeutique des iPs reste cependant à l'heure actuelle théorique. Les risques liés à l'utilisation de cellules transgéniques destinées à s'implanter durablement au sein de l'organisme sont en effet encore trop peu connus pour permettre le passage en clinique. Il faut toutefois noter que des études sont actuellement menées afin de trouver des voies alternatives aux transgènes afin d'obtenir des iPS dont l'utilisation thérapeutique présenterait moins de risque pour les patients (Drews et al. 2012).

2. Vers une utilisation clinique des CSM pour soigner les lésions radio-induites?

Bien qu'un certain nombre d'essais cliniques utilisant les CSM aient pu être menés en Europe et dans le monde, les autorités sanitaires françaises n'autorisent actuellement leur utilisation que dans le cadre de traitements compassionnels. En effet, malgré maintenant plusieurs dizaines d'années de recul sur leur utilisation, les risques potentiels liés à l'utilisation de ces cellules vivantes non différenciées amplifiées *in vitro* demeurent, et ce bien que ces risques ne soient encore que peu connus.

L'un des obstacles soulevés par les autorités sanitaires est le risque de dérive génétique des CSM suite à leur amplification *in vitro*. Deux études publiées par Rubio *et al* ainsi que par Rosland *et al* font en effet état d'une transformation spontanée des CSM cultivées en cellules malignes (Rubio et al. 2005) (Rosland et al. 2009). Cependant, ces résultats furent infirmés par la rétractation des auteurs suite à la découverte d'une contamination croisée de leurs cultures de CSM par une lignée de cellules cancéreuses également cultivée au sein de leurs laboratoires (de la Fuente et al. 2010) (Torsvik et al. 2010). L'étude menée par Tarte et al sur 20 cultures de CSM humaines utilisées dans des essais cliniques a quant à elle montré que,

bien que des phénomènes d'aneuploïdie soient détectés dans certaines cultures, ces phénomènes ne sont pas culture mais donneur-dépendant (Tarte et al. 2010). Cette étude a en outre permis de montrer que les CSM cultivées arrêtent progressivement de proliférer et entrent en sénescence, sans montrer aucun signe de transformation en cellules malignes, aussi bien *in vitro* qu'*in vivo* (analyses chez la souris et après prélèvements chez l'un des patients traités).

Des études ont montré que les CSM peuvent migrer vers les sites tumoraux afin de s'y implanter au sein du tissu de soutien tumoral (Nakamura et al. 2004) (Khakoo et al. 2006) (Karnoub et al. 2007). Les cellules sont alors localisées dans le stroma au niveau des sites inflammatoires et à proximité des cellules tumorales, et participent au phénomène de remodelage tissulaire observé dans les tumeurs. Cette migration préférentielle des CSM vers les sites tumoraux a également été mise en évidence dans le cas des métastases (Studený et al. 2002; Studený et al. 2004). Cependant, ces deux études étant menées sur des métastases pulmonaires, on peut se poser la question de la spécificité de cette migration au vue du phénomène de rétention pulmonaire des cellules observé suite à toute injection de CSM (Gao et al. 2001) (Barbash et al. 2003).

Cette affinité des CSM pour les tumeurs, initialement considérée comme négative, pourrait cependant être exploitée comme outil dans la lutte anti-tumorale. Un nombre grandissant d'études suggèrent en effet d'utiliser les CSM comme « transporteurs » de molécules anti-tumorales, permettant ainsi une délivrance ciblée du traitement afin d'en diminuer les effets secondaires systémiques. Vilalta *et al* ont ainsi montré que l'administration de CSM porteuses d'un gène suicide codant la thymidine kinase (TK) du virus herpes simplex, qui permet la conversion du ganciclovir, non toxique pour les cellules TK négatives, en un métabolite phosphorylé aux propriétés anti-tumorales, permet de réduire fortement la croissance des tumeurs prostatiques (Vilalta et al. 2009). D'autres études ont également montré l'efficacité de l'expression forcée de molécules directement anti-tumorales par les CSM, telle que le tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) (Loebinger et al. 2009). Enfin, d'autres équipes ont modifié les CSM afin de les forcer à exprimer des molécules pro-inflammatoires. En effet, l'environnement tumoral est connu pour inhiber la réponse immunitaire via une sécrétion de molécules anti-inflammatoires, poussant ainsi le système immunitaire du porteur de la tumeur à y devenir tolérogène, i.e. à la considérer comme du soi, inhibant ainsi sa destruction. L'apport en molécules pro-inflammatoires via les CSM

transgéniques permet de rétablir une réaction inflammatoire normale au sein des tumeurs, favorisant ainsi leur destruction tout en préservant le reste de l'organisme des effets délétères liés à une inflammation systémique (Chen et al. 2006) (Li et al. 2006).

Malgré la multiplication des études visant à établir le caractère pro ou anti-tumoral des CSM, aucune réponse définitive n'a pu à ce jour être apportée. Les résultats diffèrent ainsi fortement d'une étude à l'autre. En effet, si différentes études ont montré qu'une co-injection de cellules tumorales et de CSM favorisent la croissance tumorale ainsi qu'une nécrose et une angiogenèse accrues par rapport aux animaux n'ayant reçu que les cellules tumorales (Zhu et al. 2006), d'autres équipes ont quant à elles montré qu'une co-injection cellules tumorales/CSM permet d'inhiber la croissance de la tumeur (Khakoo et al. 2006). On peut donc se demander d'où provient cette disparité de résultats. Plusieurs critères sont à prendre en compte :

- L'origine des CSM : leur effet sur les tumeurs pourrait en effet différer selon qu'elles sont isolées à partir de la moelle osseuse ou du tissu adipeux ;
- L'origine des cellules cancéreuses : les cellules utilisées sont issues d'un grand nombre d'organes différents, et l'on peut penser que les CSM peuvent avoir des effets organe-dépendants sur les cancers ;
- La co-injection CSM/Cellules tumorales : il s'agit du mode d'administration préférentiel dans les modèles animaux, mais le ratio des deux populations cellulaires varie fortement d'une étude à l'autre. En outre, il faut noter que ce type de protocoles n'est pas du tout représentatif des conditions cliniques, dans lesquelles les CSM sont administrées après le traitement anti-tumoral.
- Le mode d'administration des CSM : l'effet des cellules semble différer en fonction de leur mode d'administration, très variable d'une étude à l'autre (sous-cutanée, intraveineuse, intra-tibiale, etc).
- Le modèle animal utilisé : l'utilisation de modèles immunodéficients ou immunodéprimés peut fausser les résultats au vue de l'importance reconnue du système immunitaire dans la lutte anti-tumorale.

Malgré ces résultats contradictoires concernant l'effet pro ou anti-tumoral des CSM, un point positif important appuyant le passage à leur utilisation clinique est que, au cours de toutes les

études cliniques menées dans le monde, et avec maintenant près de 20 ans de suivi de certains patients, aucun cas de cancer n'a été détecté suite au traitement par CSM.

Notre laboratoire s'intéresse de près aux interactions existant entre les CSM et les tumeurs. Des études sont actuellement en cours afin de déterminer l'impact d'un traitement par CSM sur des tumeurs solides chimio-induites *in situ*, directement au niveau du colon-rectum, chez le rat. Les analyses confirment la migration préférentielle des CSM au sein des foyers tumoraux et montrent une régression tumorale chez les animaux traités par rapport aux animaux non-traités. Cette régression tumorale semble par ailleurs être due à une modification du contexte immunitaire tumoral suite à l'injection de CSM (données en cours de publication au sein du laboratoire).

Conclusion

Les travaux menés au cours de cette thèse sur les effets immunomodulateurs des CSM dans le cadre du traitement des lésions coliques post-radiques montrent une forte inhibition de la réaction inflammatoire adaptative suite au traitement, et suggèrent une implication de cette inhibition dans l'amélioration du processus de réparation colique. Ces résultats s'insèrent dans un vaste programme de recherche mené au laboratoire de Radiopathologie et Thérapies Expérimentales, dont le but final est d'aboutir à une utilisation des CSM en clinique.

Les résultats obtenus pendant ma thèse apportent une nouvelle lumière sur les mécanismes sous-jacents à l'effet bénéfique du traitement par CSM dans le cadre des lésions radio-induites. Nous avons ainsi pu mettre en évidence une modulation du processus inflammatoire radio-induit, dépendant d'une augmentation locale de la production de corticostérone. Cette inhibition de l'inflammation est en outre associée à une amélioration des capacités de régénération de la muqueuse colique, elle-même dépendante de la sécrétion de Wnt4 par les CSM. Cette compréhension des mécanismes à l'origine des effets bénéfiques des CSM est essentielle afin de pouvoir améliorer l'efficacité des traitements. C'est pourquoi les résultats obtenus au cours de ma thèse pourraient être approfondis, notamment en s'intéressant plus spécifiquement aux effets du traitement par CSM sur l'immunité innée. En effet, si les résultats obtenus à ce jour ne nous ont pas permis de mettre en évidence un impact du traitement sur cette partie de la réaction inflammatoire, une étude spécifique des cellules impliquées (neutrophiles, macrophages, mastocytes) et de leur sécrétion cytokinique permettrait de mettre en lumière de potentiels effets.

Références bibliographiques

- Abbasoglu, S. D., Y. Erbil, et al. (2006). "The effect of heme oxygenase-1 induction by octreotide on radiation enteritis." *Peptides* **27**(6): 1570-1576.
- Abbott, J. D., Y. Huang, et al. (2004). "Stromal cell-derived factor-1alpha plays a critical role in stem cell recruitment to the heart after myocardial infarction but is not sufficient to induce homing in the absence of injury." *Circulation* **110**(21): 3300-3305.
- Abkowitz, J. L., A. E. Robinson, et al. (2003). "Mobilization of hematopoietic stem cells during homeostasis and after cytokine exposure." *Blood* **102**(4): 1249-1253.
- Aggarwal, S. and M. F. Pittenger (2005). "Human mesenchymal stem cells modulate allogeneic immune cell responses." *Blood* **105**(4): 1815-1822.
- Al-Khalidi, A., H. Al-Sabti, et al. (2003). "Therapeutic angiogenesis using autologous bone marrow stromal cells: improved blood flow in a chronic limb ischemia model." *Ann Thorac Surg* **75**(1): 204-209.
- Alviano, F., V. Fossati, et al. (2007). "Term Amniotic membrane is a high throughput source for multipotent Mesenchymal Stem Cells with the ability to differentiate into endothelial cells in vitro." *BMC Dev Biol* **7**: 11.
- Amado, L. C., A. P. Saliaris, et al. (2005). "Cardiac repair with intramyocardial injection of allogeneic mesenchymal stem cells after myocardial infarction." *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**(32): 11474-11479.
- Amin, E. M., B. A. Reza, et al. (2008). "Microanatomical evidences for potential of mesenchymal stem cells in amelioration of striatal degeneration." *Neurol Res* **30**(10): 1086-1090.
- Andreyev, H. J. (2007). "Gastrointestinal problems after pelvic radiotherapy: the past, the present and the future." *Clin Oncol (R Coll Radiol)* **19**(10): 790-799.
- Andreyev, H. J. N., A. Wotherspoon, et al. (2011). "'Pelvic radiation disease': New understanding and new solutions for a new disease in the era of cancer survivorship." *Scandinavian Journal of Gastroenterology* **46**(4): 389-397.
- Andreyev, J. (2007). "Gastrointestinal symptoms after pelvic radiotherapy: a new understanding to improve management of symptomatic patients." *Lancet Oncology* **8**(11): 1007-1017.
- Angelopoulou, M., E. Novelli, et al. (2003). "Cotransplantation of human mesenchymal stem cells enhances human myelopoiesis and megakaryocytopoiesis in NOD/SCID mice." *Exp Hematol* **31**(5): 413-420.
- Arinzeh, T. L., S. J. Peter, et al. (2003). "Allogeneic mesenchymal stem cells regenerate bone in a critical-sized canine segmental defect." *J Bone Joint Surg Am* **85-A**(10): 1927-1935.
- Arnhold, S., Y. Absenger, et al. (2007). "Transplantation of bone marrow-derived mesenchymal stem cells rescue photoreceptor cells in the dystrophic retina of the rhodopsin knockout mouse." *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* **245**(3): 414-422.
- Askari, A. T., S. Unzek, et al. (2003). "Effect of stromal-cell-derived factor 1 on stem-cell homing and tissue regeneration in ischaemic cardiomyopathy." *Lancet* **362**(9385): 697-703.
- Assmus, B., V. Schachinger, et al. (2002). "Transplantation of Progenitor Cells and Regeneration Enhancement in Acute Myocardial Infarction (TOPCARE-AMI)." *Circulation* **106**(24): 3009-3017.

- Augello, A., R. Tasso, et al. (2007). "Cell therapy using allogeneic bone marrow mesenchymal stem cells prevents tissue damage in collagen-induced arthritis." *Arthritis Rheum* **56**(4): 1175-1186.
- Bai, L., D. P. Lennon, et al. (2012). "Hepatocyte growth factor mediates mesenchymal stem cell-induced recovery in multiple sclerosis models." *Nat Neurosci* **15**(6): 862-870.
- Bai, L., D. P. Lennon, et al. (2009). "Human bone marrow-derived mesenchymal stem cells induce Th2-polarized immune response and promote endogenous repair in animal models of multiple sclerosis." *Glia* **57**(11): 1192-1203.
- Ballinger, W. F. and P. E. Lacy (1972). "Transplantation of intact pancreatic islets in rats." *Surgery* **72**(2): 175-186.
- Barbash, I. M., P. Chouraqui, et al. (2003). "Systemic delivery of bone marrow-derived mesenchymal stem cells to the infarcted myocardium: feasibility, cell migration, and body distribution." *Circulation* **108**(7): 863-868.
- Barkholt, L., M. Bregni, et al. (2006). "Allogeneic haematopoietic stem cell transplantation for metastatic renal carcinoma in Europe." *Annals of Oncology* **17**(7): 1134-1140.
- Bartholomew, A., D. Polchert, et al. (2009). "Mesenchymal stem cells in the induction of transplantation tolerance." *Transplantation* **87**(9 Suppl): S55-57.
- Bartholomew, A., C. Sturgeon, et al. (2002). "Mesenchymal stem cells suppress lymphocyte proliferation in vitro and prolong skin graft survival in vivo." *Exp Hematol* **30**(1): 42-48.
- Batten, P., P. Sarathchandra, et al. (2006). "Human mesenchymal stem cells induce T cell anergy and downregulate T cell allo-responses via the TH2 pathway: relevance to tissue engineering human heart valves." *Tissue Eng* **12**(8): 2263-2273.
- Battula, V. L., S. Treml, et al. (2008). "Prospective isolation and characterization of mesenchymal stem cells from human placenta using a frizzled-9-specific monoclonal antibody." *Differentiation* **76**(4): 326-336.
- Baum, C. M., I. L. Weissman, et al. (1992). "Isolation of a candidate human hematopoietic stem-cell population." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **89**(7): 2804-2808.
- Baxter, M. A., R. F. Wynn, et al. (2004). "Study of telomere length reveals rapid aging of human marrow stromal cells following in vitro expansion." *Stem Cells* **22**(5): 675-682.
- Beaulieu, J. F. (1999). "Integrins and human intestinal cell functions." *Front Biosci* **4**: D310-321.
- Bell, G. I., M. T. Meschino, et al. (2012). "Combinatorial human progenitor cell transplantation optimizes islet regeneration through secretion of paracrine factors." *Stem Cells Dev* **21**(11): 1863-1876.
- Ben-Hur, T., M. Idelson, et al. (2004). "Transplantation of human embryonic stem cell-derived neural progenitors improves behavioral deficit in parkinsonian rats." *Stem Cells* **22**(7): 1246-1255.
- Bentzen, S. M. (2006). "Preventing or reducing late side effects of radiation therapy: Radiobiology meets molecular pathology." *Nature Reviews Cancer* **6**(9): 702-713.
- Berbee, M., Q. Fu, et al. (2009). "gamma-Tocotrienol ameliorates intestinal radiation injury and reduces vascular oxidative stress after total-body irradiation by an HMG-CoA reductase-dependent mechanism." *Radiat Res* **171**(5): 596-605.
- Berg, D. J., N. Davidson, et al. (1996). "Enterocolitis and colon cancer in interleukin-10-deficient mice are associated with aberrant cytokine production and CD4(+) TH1-like responses." *J Clin Invest* **98**(4): 1010-1020.

- Bey, E., P. Duhamel, et al. (2007). "[Treatment of radiation burns with surgery and cell therapy. A report of two cases]." Bull Acad Natl Med **191**(6): 971-978; discussion 979.
- Bey, E., M. Prat, et al. (2010). "Emerging therapy for improving wound repair of severe radiation burns using local bone marrow-derived stem cell administrations." Wound Repair Regen **18**(1): 50-58.
- Beyth, S., Z. Borovsky, et al. (2005). "Human mesenchymal stem cells alter antigen-presenting cell maturation and induce T-cell unresponsiveness." Blood **105**(5): 2214-2219.
- Bhanja, P., S. Saha, et al. (2009). "Protective role of R-spondin1, an intestinal stem cell growth factor, against radiation-induced gastrointestinal syndrome in mice." PLoS One **4**(11): e8014.
- Blandini, F., L. Cova, et al. (2010). "Transplantation of undifferentiated human mesenchymal stem cells protects against 6-hydroxydopamine neurotoxicity in the rat." Cell Transplant **19**(2): 203-217.
- Bliando, K., F. Milliat, et al. (2011). "Mast cells are an essential component of human radiation proctitis and contribute to experimental colorectal damage in mice." Am J Pathol **178**(2): 640-651.
- Blondet, J. J., A. M. Carlson, et al. (2007). "The Role of Total Pancreatectomy and Islet Autotransplantation for Chronic Pancreatitis." Surgical Clinics of North America **87**(6): 1477-1501.
- Blondheim, N. R., Y. S. Levy, et al. (2006). "Human mesenchymal stem cells express neural genes, suggesting a neural predisposition." Stem Cells and Development **15**(2): 141-164.
- Bonab, M. M., K. Alimoghaddam, et al. (2006). "Aging of mesenchymal stem cell in vitro." BMC Cell Biology **7**.
- Bouchez, G., L. Sensebe, et al. (2008). "Partial recovery of dopaminergic pathway after graft of adult mesenchymal stem cells in a rat model of Parkinson's disease." Neurochem Int **52**(7): 1332-1342.
- Bouma, G. and W. Strober (2003). "The immunological and genetic basis of inflammatory bowel disease." Nat Rev Immunol **3**(7): 521-533.
- Braat, H., P. Rottiers, et al. (2006). "A phase I trial with transgenic bacteria expressing interleukin-10 in Crohn's disease." Clin Gastroenterol Hepatol **4**(6): 754-759.
- Brereton, C. F. and J. M. Blander (2011). "The unexpected link between infection-induced apoptosis and a TH17 immune response." J Leukoc Biol **89**(4): 565-576.
- Brittan, M., T. Hunt, et al. (2002). "Bone marrow derivation of pericryptal myofibroblasts in the mouse and human small intestine and colon." Gut **50**(6): 752-757.
- Brittberg, M., A. Lindahl, et al. (1994). "Treatment of deep cartilage defects in the knee with autologous chondrocyte transplantation." N Engl J Med **331**(14): 889-895.
- Brooke, G., H. Tong, et al. (2008). "Molecular trafficking mechanisms of multipotent mesenchymal stem cells derived from human bone marrow and placenta." Stem Cells Dev **17**(5): 929-940.
- Bruder, S. P., K. H. Kraus, et al. (1998). "The effect of implants loaded with autologous mesenchymal stem cells on the healing of canine segmental bone defects." J Bone Joint Surg Am **80**(7): 985-996.
- Bryndova, J., S. Zbankova, et al. (2004). "Colitis up-regulates local glucocorticoid activation and down-regulates inactivation in colonic tissue." Scand J Gastroenterol **39**(6): 549-553.
- Burdelya, L. G., V. I. Krivokrysenko, et al. (2008). "An agonist of toll-like receptor 5 has radioprotective activity in mouse and primate models." Science **320**(5873): 226-230.

- Campagnoli, C., I. A. Roberts, et al. (2001). "Identification of mesenchymal stem/progenitor cells in human first-trimester fetal blood, liver, and bone marrow." Blood **98**(8): 2396-2402.
- Caplan, A. I. and J. E. Dennis (2006). "Mesenchymal stem cells as trophic mediators." J Cell Biochem **98**(5): 1076-1084.
- Carrion, F., E. Nova, et al. (2010). "Autologous mesenchymal stem cell treatment increased T regulatory cells with no effect on disease activity in two systemic lupus erythematosus patients." Lupus **19**(3): 317-322.
- Cassetta, L., E. Cassol, et al. (2011). "Macrophage polarization in health and disease." ScientificWorldJournal **11**: 2391-2402.
- Chamberlain, J., T. Yamagami, et al. (2007). "Efficient generation of human hepatocytes by the intrahepatic delivery of clonal human mesenchymal stem cells in fetal sheep." Hepatology **46**(6): 1935-1945.
- Chang, C. J., M. L. Yen, et al. (2006). "Placenta-derived multipotent cells exhibit immunosuppressive properties that are enhanced in the presence of interferon-gamma." Stem Cells **24**(11): 2466-2477.
- Chang, J., W. Sonoyama, et al. (2007). "Noncanonical Wnt-4 signaling enhances bone regeneration of mesenchymal stem cells in craniofacial defects through activation of p38 MAPK." J Biol Chem **282**(42): 30938-30948.
- Chen, G. Y. and G. Nunez (2010). "Sterile inflammation: sensing and reacting to damage." Nat Rev Immunol **10**(12): 826-837.
- Chen, J., Y. Li, et al. (2001). "Therapeutic benefit of intravenous administration of bone marrow stromal cells after cerebral ischemia in rats." Stroke **32**(4): 1005-1011.
- Chen, L., W. Zhang, et al. (2007). "Effects of human mesenchymal stem cells on the differentiation of dendritic cells from CD34+ cells." Stem Cells Dev **16**(5): 719-731.
- Chen, S. L., W. W. Fang, et al. (2004). "Effect on left ventricular function of intracoronary transplantation of autologous bone marrow mesenchymal stem cell in patients with acute myocardial infarction." Am J Cardiol **94**(1): 92-95.
- Chen, X. C., R. Wang, et al. (2006). "Prophylaxis against carcinogenesis in three kinds of unestablished tumor models via IL12-gene-engineered MSCs." Carcinogenesis **27**(12): 2434-2441.
- Cheng, L., P. Qasba, et al. (2000). "Human mesenchymal stem cells support megakaryocyte and pro-platelet formation from CD34+ hematopoietic progenitor cells." Journal of Cellular Physiology **184**(1): 58-69.
- Chichester, C. O., M. Fernández, et al. (1993). "Extracellular matrix gene expression by human bone marrow stroma and by marrow fibroblasts." Cell adhesion and communication **1**(2): 93-99.
- Childs, R. W., E. Clave, et al. (1999). "Successful treatment of metastatic renal cell carcinoma with a nonmyeloablative allogeneic peripheral-blood progenitor-cell transplant: Evidence for a graft-versus-tumor effect." Journal of Clinical Oncology **17**(7): 2044-2049.
- Choi, H., R. H. Lee, et al. (2011). "Anti-inflammatory protein TSG-6 secreted by activated MSCs attenuates zymosan-induced mouse peritonitis by decreasing TLR2/NF-kappaB signaling in resident macrophages." Blood **118**(2): 330-338.
- Chute, J. P. (2006). "Stem cell homing." Curr Opin Hematol **13**(6): 399-406.
- Ciccocioppo, R., M. E. Bernardo, et al. (2011). "Autologous bone marrow-derived mesenchymal stromal cells in the treatment of fistulising Crohn's disease." Gut **60**(6): 788-798.
- Cima, I., N. Corazza, et al. (2004). "Intestinal epithelial cells synthesize glucocorticoids and regulate T cell activation." J Exp Med **200**(12): 1635-1646.

- Corcione, A., F. Benvenuto, et al. (2006). "Human mesenchymal stem cells modulate B-cell functions." Blood **107**(1): 367-372.
- Corsten, M. F. and K. Shah (2008). "Therapeutic stem-cells for cancer treatment: hopes and hurdles in tactical warfare." Lancet Oncol **9**(4): 376-384.
- Corti, S., M. Nizzardo, et al. (2010). "Embryonic stem cell-derived neural stem cells improve spinal muscular atrophy phenotype in mice." Brain **133**(2): 465-481.
- Coulombel, L. (2003). "[Adult stem cells: seing is not being]." Med Sci (Paris) **19**(6-7): 683-694.
- Coutinho, A. E. and K. E. Chapman (2011). "The anti-inflammatory and immunosuppressive effects of glucocorticoids, recent developments and mechanistic insights." Mol Cell Endocrinol **335**(1): 2-13.
- Crop, M. J., C. C. Baan, et al. (2009). "Donor-derived mesenchymal stem cells suppress alloreactivity of kidney transplant patients." Transplantation **87**(6): 896-906.
- Cui, X., J. Chen, et al. (2007). "Nitric oxide donor upregulation of stromal cell-derived factor-1/chemokine (CXC motif) receptor 4 enhances bone marrow stromal cell migration into ischemic brain after stroke." Stem Cells **25**(11): 2777-2785.
- Dai, W., S. L. Hale, et al. (2005). "Allogeneic mesenchymal stem cell transplantation in postinfarcted rat myocardium: short- and long-term effects." Circulation **112**(2): 214-223.
- De Bari, C., F. Dell'Accio, et al. (2001). "Human periosteum-derived cells maintain phenotypic stability and chondrogenic potential throughout expansion regardless of donor age." Arthritis Rheum **44**(1): 85-95.
- De Bari, C., F. Dell'Accio, et al. (2001). "Multipotent mesenchymal stem cells from adult human synovial membrane." Arthritis Rheum **44**(8): 1928-1942.
- de la Fuente, R., A. Bernad, et al. (2010). "Retraction: Spontaneous human adult stem cell transformation." Cancer Res **70**(16): 6682.
- De Ugarte, D. A., Z. Alfonso, et al. (2003). "Differential expression of stem cell mobilization-associated molecules on multi-lineage cells from adipose tissue and bone marrow." Immunol Lett **89**(2-3): 267-270.
- Demetriou, A. A., S. M. Levenson, et al. (1986). "Survival, organization, and function of microcarrier-attached hepatocytes transplanted in rats." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **83**(19): 7475-7479.
- Deng, J., B. E. Petersen, et al. (2006). "Mesenchymal stem cells spontaneously express neural proteins in culture and are neurogenic after transplantation." Stem Cells **24**(4): 1054-1064.
- Dennis, J. E. and P. Charbord (2002). "Origin and differentiation of human and murine stroma." Stem Cells **20**(3): 205-214.
- Denton, A. S., H. J. N. Andreyev, et al. (2002). "Systematic review for non-surgical interventions for the management of late radiation proctitis." British Journal of Cancer **87**(2): 134-143.
- Desmouliere, A., M. Redard, et al. (1995). "Apoptosis mediates the decrease in cellularity during the transition between granulation tissue and scar." Am J Pathol **146**(1): 56-66.
- Devine, S. M., C. Cobbs, et al. (2003). "Mesenchymal stem cells distribute to a wide range of tissues following systemic infusion into nonhuman primates." Blood **101**(8): 2999-3001.
- Devogelaer, J. P. and C. Coppin (2006). "Osteogenesis imperfecta : current treatment options and future prospects." Treat Endocrinol **5**(4): 229-242.
- Di Nicola, M., C. Carlo-Stella, et al. (2002). "Human bone marrow stromal cells suppress T-lymphocyte proliferation induced by cellular or nonspecific mitogenic stimuli." Blood **99**(10): 3838-3843.

- Djouad, F., C. Bony, et al. (2005). "Transcriptional profiles discriminate bone marrow-derived and synovium-derived mesenchymal stem cells." Arthritis Res Ther **7**(6): R1304-1315.
- Djouad, F., L. M. Charbonnier, et al. (2007). "Mesenchymal stem cells inhibit the differentiation of dendritic cells through an interleukin-6-dependent mechanism." Stem Cells **25**(8): 2025-2032.
- Djouad, F., V. Fritz, et al. (2005). "Reversal of the immunosuppressive properties of mesenchymal stem cells by tumor necrosis factor alpha in collagen-induced arthritis." Arthritis Rheum **52**(5): 1595-1603.
- Dominici, M., K. Le Blanc, et al. (2006). "Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement." Cytotherapy **8**(4): 315-317.
- Drews, K., J. Jozefczuk, et al. (2012). "Human induced pluripotent stem cells--from mechanisms to clinical applications." J Mol Med (Berl) **90**(7): 735-745.
- Duckers, H. J., J. Houtgraaf, et al. (2011). "Final results of a phase IIa, randomised, open-label trial to evaluate the percutaneous intramyocardial transplantation of autologous skeletal myoblasts in congestive heart failure patients: The SEISMIC trial." EuroIntervention **6**(7): 805-812.
- Duerr, R. H., K. D. Taylor, et al. (2006). "A genome-wide association study identifies IL23R as an inflammatory bowel disease gene." Science **314**(5804): 1461-1463.
- Duijvestein, M., A. C. Vos, et al. (2010). "Autologous bone marrow-derived mesenchymal stromal cell treatment for refractory luminal Crohn's disease: results of a phase I study." Gut **59**(12): 1662-1669.
- Ebrahimian, T. G., F. Pouzoulet, et al. (2009). "Cell therapy based on adipose tissue-derived stromal cells promotes physiological and pathological wound healing." Arterioscler Thromb Vasc Biol **29**(4): 503-510.
- Eliopoulos, N., J. Stagg, et al. (2005). "Allogeneic marrow stromal cells are immune rejected by MHC class I- and class II-mismatched recipient mice." Blood **106**(13): 4057-4065.
- Elson, C. O., R. B. Sartor, et al. (1995). "Experimental models of inflammatory bowel disease." Gastroenterology **109**(4): 1344-1367.
- English, K., F. P. Barry, et al. (2007). "IFN-gamma and TNF-alpha differentially regulate immunomodulation by murine mesenchymal stem cells." Immunol Lett **110**(2): 91-100.
- English, K., F. P. Barry, et al. (2008). "Murine mesenchymal stem cells suppress dendritic cell migration, maturation and antigen presentation." Immunol Lett **115**(1): 50-58.
- English, K. and B. P. Mahon (2011). "Allogeneic mesenchymal stem cells: agents of immune modulation." J Cell Biochem **112**(8): 1963-1968.
- English, K., J. M. Ryan, et al. (2009). "Cell contact, prostaglandin E(2) and transforming growth factor beta 1 play non-redundant roles in human mesenchymal stem cell induction of CD4+CD25(High) forkhead box P3+ regulatory T cells." Clin Exp Immunol **156**(1): 149-160.
- Ergang, P., K. Vytackova, et al. (2011). "Upregulation of 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase 1 in lymphoid organs during inflammation in the rat." J Steroid Biochem Mol Biol **126**(1-2): 19-25.
- Erices, A., P. Conget, et al. (2000). "Mesenchymal progenitor cells in human umbilical cord blood." Br J Haematol **109**(1): 235-242.
- Ezquer, F. E., M. E. Ezquer, et al. (2008). "Systemic administration of multipotent mesenchymal stromal cells reverts hyperglycemia and prevents nephropathy in type 1 diabetic mice." Biol Blood Marrow Transplant **14**(6): 631-640.

- Fang, B., M. Shi, et al. (2004). "Systemic infusion of FLK1(+) mesenchymal stem cells ameliorate carbon tetrachloride-induced liver fibrosis in mice." Transplantation **78**(1): 83-88.
- Fedyk, E. R., D. Jones, et al. (2001). "Expression of stromal-derived factor-1 is decreased by IL-1 and TNF and in dermal wound healing." J Immunol **166**(9): 5749-5754.
- Fernandez, M., V. Simon, et al. (1997). "Detection of stromal cells in peripheral blood progenitor cell collections from breast cancer patients." Bone Marrow Transplant **20**(4): 265-271.
- Fiegel, H. C., C. Lange, et al. (2006). "Fetal and adult liver stem cells for liver regeneration and tissue engineering." J Cell Mol Med **10**(3): 577-587.
- Followill, D. S., D. Kester, et al. (1993). "Histological changes in mouse colon after single- and split-dose irradiation." Radiat Res **136**(2): 280-288.
- Followill, D. S. and E. L. Travis (1995). "Differential expression of collagen types I and III in consequential and primary fibrosis in irradiated mouse colon." Radiat Res **144**(3): 318-328.
- Francois, S., M. Bensidhoum, et al. (2006). "Local irradiation not only induces homing of human mesenchymal stem cells at exposed sites but promotes their widespread engraftment to multiple organs: a study of their quantitative distribution after irradiation damage." Stem Cells **24**(4): 1020-1029.
- Francois, S., M. Mouiseddine, et al. (2007). "Human mesenchymal stem cells favour healing of the cutaneous radiation syndrome in a xenogenic transplant model." Ann Hematol **86**(1): 1-8.
- Friedenstein, A. J., R. K. Chailakhyan, et al. (1974). "Stromal cells responsible for transferring the microenvironment of the hemopoietic tissues. Cloning in vitro and retransplantation in vivo." Transplantation **17**(4): 331-340.
- Friedenstein, A. J., U. F. Deriglasova, et al. (1974). "Precursors for fibroblasts in different populations of hematopoietic cells as detected by the in vitro colony assay method." Exp Hematol **2**(2): 83-92.
- Fu, X., L. Fang, et al. (2006). "Enhanced wound-healing quality with bone marrow mesenchymal stem cells autografting after skin injury." Wound Repair Regen **14**(3): 325-335.
- Fujikawa, T., S. H. Oh, et al. (2005). "Teratoma formation leads to failure of treatment for type I diabetes using embryonic stem cell-derived insulin-producing cells." American Journal of Pathology **166**(6): 1781-1791.
- Fujino, S., A. Andoh, et al. (2003). "Increased expression of interleukin 17 in inflammatory bowel disease." Gut **52**(1): 65-70.
- Fujita, Y., R. Abe, et al. (2010). "Bone marrow transplantation restores epidermal basement membrane protein expression and rescues epidermolysis bullosa model mice." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **107**(32): 14345-14350.
- Gabbiani, G. (1994). "Modulation of fibroblastic cytoskeletal features during wound healing and fibrosis." Pathol Res Pract **190**(9-10): 851-853.
- Galotto, M., G. Berisso, et al. (1999). "Stromal damage as consequence of high-dose chemo/radiotherapy in bone marrow transplant recipients." Exp Hematol **27**(9): 1460-1466.
- Gao, J., J. E. Dennis, et al. (2001). "The dynamic in vivo distribution of bone marrow-derived mesenchymal stem cells after infusion." Cells Tissues Organs **169**(1): 12-20.
- Garcia-Olmo, D., M. Garcia-Arranz, et al. (2005). "A phase I clinical trial of the treatment of Crohn's fistula by adipose mesenchymal stem cell transplantation." Dis Colon Rectum **48**(7): 1416-1423.

- Garcia-Olmo, D., D. Herreros, et al. (2009). "Expanded adipose-derived stem cells for the treatment of complex perianal fistula: a phase II clinical trial." Dis Colon Rectum **52**(1): 79-86.
- Garg, S., M. Boerma, et al. (2010). "Influence of sublethal total-body irradiation on immune cell populations in the intestinal mucosa." Radiat Res **173**(4): 469-478.
- Gatti, R. A., H. J. Meuwissen, et al. (1968). "Immunological reconstitution of sex-linked lymphopenic immunological deficiency." Lancet **2**(7583): 1366-1369.
- Gazdag, A. R., J. M. Lane, et al. (1995). "Alternatives to Autogenous Bone Graft: Efficacy and Indications." J Am Acad Orthop Surg **3**(1): 1-8.
- Geissmann, F., M. G. Manz, et al. (2010). "Development of monocytes, macrophages, and dendritic cells." Science **327**(5966): 656-661.
- Gerdoni, E., B. Gallo, et al. (2007). "Mesenchymal stem cells effectively modulate pathogenic immune response in experimental autoimmune encephalomyelitis." Ann Neurol **61**(3): 219-227.
- Ghannam, S., J. Pene, et al. (2010). "Mesenchymal stem cells inhibit human Th17 cell differentiation and function and induce a T regulatory cell phenotype." J Immunol **185**(1): 302-312.
- Glennie, S., I. Soeiro, et al. (2005). "Bone marrow mesenchymal stem cells induce division arrest anergy of activated T cells." Blood **105**(7): 2821-2827.
- Gojo, S., N. Gojo, et al. (2003). "In vivo cardiovascularogenesis by direct injection of isolated adult mesenchymal stem cells." Exp Cell Res **288**(1): 51-59.
- Gonzalez-Rey, E., P. Anderson, et al. (2009). "Human adult stem cells derived from adipose tissue protect against experimental colitis and sepsis." Gut **58**(7): 929-939.
- Gonzalez-Rey, E., M. A. Gonzalez, et al. (2010). "Human adipose-derived mesenchymal stem cells reduce inflammatory and T cell responses and induce regulatory T cells in vitro in rheumatoid arthritis." Ann Rheum Dis **69**(1): 241-248.
- Gonzalez, M. A., E. Gonzalez-Rey, et al. (2009). "Adipose-derived mesenchymal stem cells alleviate experimental colitis by inhibiting inflammatory and autoimmune responses." Gastroenterology **136**(3): 978-989.
- Gordon, D., G. Pavlovska, et al. (2008). "Human mesenchymal stem cells abrogate experimental allergic encephalomyelitis after intraperitoneal injection, and with sparse CNS infiltration." Neurosci Lett **448**(1): 71-73.
- Gorin, N. C., A. Najman, et al. (1977). "Autologous bone-marrow transplantation in acute myelocytic leukaemia." Lancet **1**(8020): 1050.
- Gou Young, K., M. G. Klug, et al. (1993). "Differentiation and long-term survival of C2C12 myoblast grafts in heart." Journal of Clinical Investigation **92**(3): 1548-1554.
- Gregorieff, A., D. Pinto, et al. (2005). "Expression pattern of Wnt signaling components in the adult intestine." Gastroenterology **129**(2): 626-638.
- Gremy, O., M. Benderitter, et al. (2006). "Caffeic acid phenethyl ester modifies the Th1/Th2 balance in ileal mucosa after gamma-irradiation in the rat by modulating the cytokine pattern." World J Gastroenterol **12**(31): 4996-5004.
- Gremy, O., M. Benderitter, et al. (2008). "Acute and persisting Th2-like immune response after fractionated colorectal gamma-irradiation." World J Gastroenterol **14**(46): 7075-7085.
- Gronthos, S., D. M. Franklin, et al. (2001). "Surface protein characterization of human adipose tissue-derived stromal cells." J Cell Physiol **189**(1): 54-63.
- Gronthos, S., A. C. W. Zannettino, et al. (2003). "Molecular and cellular characterisation of highly purified stromal stem cells derived from human bone marrow." Journal of Cell Science **116**(9): 1827-1835.

- Grunewald, M., I. Avraham, et al. (2006). "VEGF-induced adult neovascularization: recruitment, retention, and role of accessory cells." Cell **124**(1): 175-189.
- Guadalajara, H., D. Herreros, et al. (2012). "Long-term follow-up of patients undergoing adipose-derived adult stem cell administration to treat complex perianal fistulas." Int J Colorectal Dis **27**(5): 595-600.
- Hagège, A. A., J. P. Marolleau, et al. (2006). "Skeletal myoblast transplantation in ischemic heart failure: Long-term follow-up of the first phase I cohort of patients." Circulation **114**(SUPPL. 1): I108-I113.
- Hanauer, S. B., W. J. Sandborn, et al. (2006). "Human anti-tumor necrosis factor monoclonal antibody (adalimumab) in Crohn's disease: the CLASSIC-I trial." Gastroenterology **130**(2): 323-333; quiz 591.
- Hauer-Jensen, M., K. K. Richter, et al. (1998). "Changes in transforming growth factor beta1 gene expression and immunoreactivity levels during development of chronic radiation enteropathy." Radiat Res **150**(6): 673-680.
- Hauger, O., E. E. Frost, et al. (2006). "MR evaluation of the glomerular homing of magnetically labeled mesenchymal stem cells in a rat model of nephropathy." Radiology **238**(1): 200-210.
- Hayashi, R., Y. Ishikawa, et al. (2012). "Generation of corneal epithelial cells from induced pluripotent stem cells derived from human dermal fibroblast and corneal limbal epithelium." PLoS One **7**(9): e45435.
- Hayashi, Y., S. Tsuji, et al. (2008). "Topical implantation of mesenchymal stem cells has beneficial effects on healing of experimental colitis in rats." J Pharmacol Exp Ther **326**(2): 523-531.
- Haydont, V., B. L. Riser, et al. (2008). "Specific signals involved in the long-term maintenance of radiation-induced fibrogenic differentiation: a role for CCN2 and low concentration of TGF-beta1." Am J Physiol Cell Physiol **294**(6): C1332-1341.
- Haynesworth, S. E., M. A. Baber, et al. (1996). "Cytokine expression by human marrow-derived mesenchymal progenitor cells in vitro: Effects of dexamethasone and IL-1 α ." Journal of Cellular Physiology **166**(3): 585-592.
- He, K. L., G. H. Yi, et al. (2005). "Autologous skeletal myoblast transplantation improved hemodynamics and left ventricular function in chronic heart failure dogs." Journal of Heart and Lung Transplantation **24**(11): 1940-1949.
- Heller, F., P. Florian, et al. (2005). "Interleukin-13 is the key effector Th2 cytokine in ulcerative colitis that affects epithelial tight junctions, apoptosis, and cell restitution." Gastroenterology **129**(2): 550-564.
- Henson, C. (2010). "Chronic radiation proctitis: issues surrounding delayed bowel dysfunction post-pelvic radiotherapy and an update on medical treatment." Therap Adv Gastroenterol **3**(6): 359-365.
- Hentschke, P., L. Barkholt, et al. (2003). "Low-intensity conditioning and hematopoietic stem cell transplantation in patients with renal and colon carcinoma." Bone Marrow Transplantation **31**(4): 253-261.
- Herrera, M. B., B. Bussolati, et al. (2004). "Mesenchymal stem cells contribute to the renal repair of acute tubular epithelial injury." Int J Mol Med **14**(6): 1035-1041.
- Hill, J. M., A. J. Dick, et al. (2003). "Serial cardiac magnetic resonance imaging of injected mesenchymal stem cells." Circulation **108**(8): 1009-1014.
- Honczarenko, M., Y. Le, et al. (2006). "Human bone marrow stromal cells express a distinct set of biologically functional chemokine receptors." Stem Cells **24**(4): 1030-1041.
- Horowitz, M. M., R. P. Gale, et al. (1990). "Graft-versus-leukemia reactions after bone marrow transplantation." Blood **75**(3): 555-562.

- Horwitz, E. M., P. L. Gordon, et al. (2002). "Isolated allogeneic bone marrow-derived mesenchymal cells engraft and stimulate growth in children with osteogenesis imperfecta: Implications for cell therapy of bone." Proc Natl Acad Sci U S A **99**(13): 8932-8937.
- Horwitz, E. M., D. J. Prockop, et al. (1999). "Transplantability and therapeutic effects of bone marrow-derived mesenchymal cells in children with osteogenesis imperfecta." Nature Medicine **5**(3): 309-313.
- Horwitz, E. M., D. J. Prockop, et al. (2001). "Clinical responses to bone marrow transplantation in children with severe osteogenesis imperfecta." Blood **97**(5): 1227-1231.
- Hung, S. C., H. Cheng, et al. (2002). "In vitro differentiation of size-sieved stem cells into electrically active neural cells." Stem Cells **20**(6): 522-529.
- Hung, S. C., R. R. Pochampally, et al. (2007). "Angiogenic effects of human multipotent stromal cell conditioned medium activate the PI3K-Akt pathway in hypoxic endothelial cells to inhibit apoptosis, increase survival, and stimulate angiogenesis." Stem Cells **25**(9): 2363-2370.
- in 't Anker, P. S., W. A. Noort, et al. (2003). "Mesenchymal stem cells in human second-trimester bone marrow, liver, lung, and spleen exhibit a similar immunophenotype but a heterogeneous multilineage differentiation potential." Haematologica **88**(8): 845-852.
- In 't Anker, P. S., S. A. Scherjon, et al. (2003). "Amniotic fluid as a novel source of mesenchymal stem cells for therapeutic transplantation." Blood **102**(4): 1548-1549.
- Ip, J. E., Y. Wu, et al. (2007). "Mesenchymal stem cells use integrin beta1 not CXC chemokine receptor 4 for myocardial migration and engraftment." Mol Biol Cell **18**(8): 2873-2882.
- Iso, Y., J. L. Spees, et al. (2007). "Multipotent human stromal cells improve cardiac function after myocardial infarction in mice without long-term engraftment." Biochem Biophys Res Commun **354**(3): 700-706.
- Itskovitz-Eldor, J., M. Schuldiner, et al. (2000). "Differentiation of human embryonic stem cells into embryoid bodies compromising the three embryonic germ layers." Molecular medicine (Cambridge, Mass.) **6**(2): 88-95.
- Jain, M., H. DerSimonian, et al. (2001). "Cell therapy attenuates deleterious ventricular remodeling and improves cardiac performance after myocardial infarction." Circulation **103**(14): 1920-1927.
- Jiang, X. X., Y. Zhang, et al. (2005). "Human mesenchymal stem cells inhibit differentiation and function of monocyte-derived dendritic cells." Blood **105**(10): 4120-4126.
- Jiang, Y., B. N. Jahagirdar, et al. (2002). "Pluripotency of mesenchymal stem cells derived from adult marrow." Nature **418**(6893): 41-49.
- Johnstone, B., T. M. Hering, et al. (1998). "In vitro chondrogenesis of bone marrow-derived mesenchymal progenitor cells." Experimental Cell Research **238**(1): 265-272.
- Jones, E. A., S. E. Kinsey, et al. (2002). "Isolation and characterization of bone marrow multipotential mesenchymal progenitor cells." Arthritis Rheum **46**(12): 3349-3360.
- Jung, K. H., S. U. Song, et al. (2011). "Human bone marrow-derived clonal mesenchymal stem cells inhibit inflammation and reduce acute pancreatitis in rats." Gastroenterology **140**(3): 998-1008.
- Jung, P., T. Sato, et al. (2011). "Isolation and in vitro expansion of human colonic stem cells." Nat Med **17**(10): 1225-1227.
- Justesen, J., K. Stenderup, et al. (2002). "Maintenance of osteoblastic and adipocytic differentiation potential with age and osteoporosis in human marrow stromal cell cultures." Calcified Tissue International **71**(1): 36-44.

- Kadivar, M., S. Khatami, et al. (2006). "In vitro cardiomyogenic potential of human umbilical vein-derived mesenchymal stem cells." Biochemical and Biophysical Research Communications **340**(2): 639-647.
- Karlsson, H., S. Samarasinghe, et al. (2008). "Mesenchymal stem cells exert differential effects on alloantigen and virus-specific T-cell responses." Blood **112**(3): 532-541.
- Karnoub, A. E., A. B. Dash, et al. (2007). "Mesenchymal stem cells within tumour stroma promote breast cancer metastasis." Nature **449**(7162): 557-563.
- Karussis, D., C. Karageorgiou, et al. (2010). "Safety and immunological effects of mesenchymal stem cell transplantation in patients with multiple sclerosis and amyotrophic lateral sclerosis." Archives of Neurology **67**(10): 1187-1194.
- Karussis, D., I. Kassis, et al. (2008). "Immunomodulation and neuroprotection with mesenchymal bone marrow stem cells (MSCs): a proposed treatment for multiple sclerosis and other neuroimmunological/neurodegenerative diseases." J Neurol Sci **265**(1-2): 131-135.
- Kasper, G., J. D. Glaeser, et al. (2007). "Matrix metalloprotease activity is an essential link between mechanical stimulus and mesenchymal stem cell behavior." Stem Cells **25**(8): 1985-1994.
- Kassem, M., L. Ankersen, et al. (1997). "Demonstration of cellular aging and senescence in serially passaged long-term cultures of human trabecular osteoblasts." Osteoporosis International **7**(6): 514-524.
- Kassem, M., L. Mosekilde, et al. (1993). "1,25-Dihydroxyvitamin D3 potentiates fluoride-stimulated collagen type I production in cultures of human bone marrow stromal osteoblast-like cells." Journal of Bone and Mineral Research **8**(12): 1453-1458.
- Kassis, I., N. Grigoriadis, et al. (2008). "Neuroprotection and immunomodulation with mesenchymal stem cells in chronic experimental autoimmune encephalomyelitis." Archives of Neurology **65**(6): 753-761.
- Katritsis, D. G., P. A. Sotiropoulou, et al. (2005). "Transcoronary transplantation of autologous mesenchymal stem cells and endothelial progenitors into infarcted human myocardium." Catheter Cardiovasc Interv **65**(3): 321-329.
- Kern, S., H. Eichler, et al. (2006). "Comparative analysis of mesenchymal stem cells from bone marrow, umbilical cord blood, or adipose tissue." Stem Cells **24**(5): 1294-1301.
- Khakoo, A. Y., S. Pati, et al. (2006). "Human mesenchymal stem cells exert potent antitumorigenic effects in a model of Kaposi's sarcoma." J Exp Med **203**(5): 1235-1247.
- Kim, D. W., Y. J. Chung, et al. (2004). "Cotransplantation of third-party mesenchymal stromal cells can alleviate single-donor predominance and increase engraftment from double cord transplantation." Blood **103**(5): 1941-1948.
- Kim, J. H., J. M. Auerbach, et al. (2002). "Dopamine neurons derived from embryonic stem cells function in an animal model of Parkinson's disease." Nature **418**(6893): 50-56.
- Kinnaird, T., E. Stabile, et al. (2004). "Marrow-derived stromal cells express genes encoding a broad spectrum of arteriogenic cytokines and promote in vitro and in vivo arteriogenesis through paracrine mechanisms." Circ Res **94**(5): 678-685.
- Kinnaird, T., E. Stabile, et al. (2004). "Local delivery of marrow-derived stromal cells augments collateral perfusion through paracrine mechanisms." Circulation **109**(12): 1543-1549.
- Koc, O. N., J. Day, et al. (2002). "Allogeneic mesenchymal stem cell infusion for treatment of metachromatic leukodystrophy (MLD) and Hurler syndrome (MPS-IH)." Bone Marrow Transplant **30**(4): 215-222.

- Koç, O. N., J. Day, et al. (2002). "Allogeneic mesenchymal stem cell infusion for treatment of metachromatic leukodystrophy (MLD) and Hurler syndrome (MPS-IH)." Bone Marrow Transplantation **30**(4): 215-222.
- Koc, O. N., S. L. Gerson, et al. (2000). "Rapid hematopoietic recovery after coinfusion of autologous-blood stem cells and culture-expanded marrow mesenchymal stem cells in advanced breast cancer patients receiving high-dose chemotherapy." J Clin Oncol **18**(2): 307-316.
- Koc, O. N., C. Peters, et al. (1999). "Bone marrow-derived mesenchymal stem cells remain host-derived despite successful hematopoietic engraftment after allogeneic transplantation in patients with lysosomal and peroxisomal storage diseases." Exp Hematol **27**(11): 1675-1681.
- Komoda, H., H. Okura, et al. (2010). "Reduction of N-glycolylneuraminic acid xenoantigen on human adipose tissue-derived stromal cells/mesenchymal stem cells leads to safer and more useful cell sources for various stem cell therapies." Tissue Eng Part A **16**(4): 1143-1155.
- Komori, M., S. Tsuji, et al. (2005). "Involvement of bone marrow-derived cells in healing of experimental colitis in rats." Wound Repair Regen **13**(1): 109-118.
- Kon, E., A. Muraglia, et al. (2000). "Autologous bone marrow stromal cells loaded onto porous hydroxyapatite ceramic accelerate bone repair in critical-size defects of sheep long bones." J Biomed Mater Res **49**(3): 328-337.
- Kopen, G. C., D. J. Prockop, et al. (1999). "Marrow stromal cells migrate throughout forebrain and cerebellum, and they differentiate into astrocytes after injection into neonatal mouse brains." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **96**(19): 10711-10716.
- Korf-Klingebiel, M., T. Kempf, et al. (2008). "Bone marrow cells are a rich source of growth factors and cytokines: implications for cell therapy trials after myocardial infarction." Eur Heart J **29**(23): 2851-2858.
- Kotton, D. N., B. Y. Ma, et al. (2001). "Bone marrow-derived cells as progenitors of lung alveolar epithelium." Development **128**(24): 5181-5188.
- Kountouras, J. and C. Zavos (2008). "Recent advances in the management of radiation colitis." World J Gastroenterol **14**(48): 7289-7301.
- Kullberg, M. C., D. Jankovic, et al. (2006). "IL-23 plays a key role in Helicobacter hepaticus-induced T cell-dependent colitis." J Exp Med **203**(11): 2485-2494.
- Kuo, Y. C. and Y. H. Chang (2012). "Differentiation of induced pluripotent stem cells toward neurons in hydrogel biomaterials." Colloids Surf B Biointerfaces **102C**: 405-411.
- Kurjane, N., R. Bruvere, et al. (2001). "Analysis of the immune status in Latvian Chernobyl clean-up workers with nononcological thyroid diseases." Scand J Immunol **54**(5): 528-533.
- Kuzmenok, O., M. Potapnev, et al. (2003). "Late effects of the Chernobyl radiation accident on T cell-mediated immunity in cleanup workers." Radiat Res **159**(1): 109-116.
- Kuznetsov, S. A., M. H. Mankani, et al. (2001). "Circulating skeletal stem cells." J Cell Biol **153**(5): 1133-1140.
- Laflamme, M. A., K. Y. Chen, et al. (2007). "Cardiomyocytes derived from human embryonic stem cells in pro-survival factors enhance function of infarcted rat hearts." Nature Biotechnology **25**(9): 1015-1024.
- Lakhan, S. E. and A. Kirchgessner (2010). "Neuroinflammation in inflammatory bowel disease." J Neuroinflammation **7**: 37.
- Langberg, C. W., M. Hauer-Jensen, et al. (1994). "Expression of fibrogenic cytokines in rat small intestine after fractionated irradiation." Radiother Oncol **32**(1): 29-36.

- Lataillade, J. J., C. Doucet, et al. (2007). "New approach to radiation burn treatment by dosimetry-guided surgery combined with autologous mesenchymal stem cell therapy." Regen Med **2**(5): 785-794.
- Le Blanc, K., F. Frassoni, et al. (2008). "Mesenchymal stem cells for treatment of steroid-resistant, severe, acute graft-versus-host disease: a phase II study." Lancet **371**(9624): 1579-1586.
- Le Blanc, K., C. Gotherstrom, et al. (2005). "Fetal mesenchymal stem-cell engraftment in bone after in utero transplantation in a patient with severe osteogenesis imperfecta." Transplantation **79**(11): 1607-1614.
- Le Blanc, K., I. Rasmusson, et al. (2004). "Treatment of severe acute graft-versus-host disease with third party haploidentical mesenchymal stem cells." Lancet **363**(9419): 1439-1441.
- Le Blanc, K., H. Samuelsson, et al. (2007). "Transplantation of mesenchymal stem cells to enhance engraftment of hematopoietic stem cells." Leukemia **21**(8): 1733-1738.
- Le Blanc, K., C. Tammik, et al. (2003). "HLA expression and immunologic properties of differentiated and undifferentiated mesenchymal stem cells." Experimental Hematology **31**(10): 890-896.
- Lee, E., L. R. Schiller, et al. (1988). "Quantification of colonic lamina propria cells by means of a morphometric point-counting method." Gastroenterology **94**(2): 409-418.
- Lee, O. K., T. K. Kuo, et al. (2004). "Isolation of multipotent mesenchymal stem cells from umbilical cord blood." Blood **103**(5): 1669-1675.
- Lee, P. H., J. W. Kim, et al. (2008). "Autologous mesenchymal stem cell therapy delays the progression of neurological deficits in patients with multiple system atrophy." Clin Pharmacol Ther **83**(5): 723-730.
- Lee, R. H., A. A. Pulin, et al. (2009). "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 **5**(1): 54-63.
- Lee, R. H., M. J. Seo, et al. (2006). "Multipotent stromal cells from human marrow home to and promote repair of pancreatic islets and renal glomeruli in diabetic NOD/scid mice." Proc Natl Acad Sci U S A **103**(46): 17438-17443.
- Lee, S. H., P. M. Starkey, et al. (1985). "Quantitative analysis of total macrophage content in adult mouse tissues. Immunochemical studies with monoclonal antibody F4/80." J Exp Med **161**(3): 475-489.
- Lee, S. T., J. H. Jang, et al. (2002). "Treatment of high-risk acute myelogenous leukaemia by myeloablative chemoradiotherapy followed by co-infusion of T cell-depleted haematopoietic stem cells and culture-expanded marrow mesenchymal stem cells from a related donor with one fully mismatched human leucocyte antigen haplotype." Br J Haematol **118**(4): 1128-1131.
- Léobon, B., I. Garcin, et al. (2003). "Myoblasts transplanted into rat infarcted myocardium are functionally isolated from their host." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **100**(13): 7808-7811.
- Leroux, L., B. Descamps, et al. (2010). "Hypoxia preconditioned mesenchymal stem cells improve vascular and skeletal muscle fiber regeneration after ischemia through a Wnt4-dependent pathway." Mol Ther **18**(8): 1545-1552.
- Leser, T. D. and L. Molbak (2009). "Better living through microbial action: the benefits of the mammalian gastrointestinal microbiota on the host." Environ Microbiol **11**(9): 2194-2206.
- Li, H., Z. K. Guo, et al. (2007). "Functional and phenotypic alteration of intrasplenic lymphocytes affected by mesenchymal stem cells in a murine allosplenocyte transfusion model." Cell Transplant **16**(1): 85-95.

- Li, R. K., D. A. G. Mickle, et al. (1996). "In vivo survival and function of transplanted rat cardiomyocytes." Circulation Research **78**(2): 283-288.
- Li, V. S. and H. Clevers (2012). "In vitro expansion and transplantation of intestinal crypt stem cells." Gastroenterology **143**(1): 30-34.
- Li, X., Y. Lu, et al. (2006). "In vitro effect of adenovirus-mediated human Gamma Interferon gene transfer into human mesenchymal stem cells for chronic myelogenous leukemia." Hematol Oncol **24**(3): 151-158.
- Li, Y., J. Chen, et al. (2005). "Gliosis and brain remodeling after treatment of stroke in rats with marrow stromal cells." Glia **49**(3): 407-417.
- Liang, J., H. Zhang, et al. (2009). "Allogeneic mesenchymal stem cells transplantation in treatment of multiple sclerosis." Mult Scler **15**(5): 644-646.
- Liang, L., C. Dong, et al. (2011). "Human umbilical cord mesenchymal stem cells ameliorate mice trinitrobenzene sulfonic acid (TNBS)-induced colitis." Cell Transplant **20**(9): 1395-1408.
- Liechty, K. W., T. C. Mackenzie, et al. (2000). "Human mesenchymal stem cells engraft and demonstrate site-specific differentiation after in utero transplantation in sheep." Nature Medicine **6**(11): 1282-1286.
- Linard, C., O. Gremy, et al. (2008). "Reduction of peroxisome proliferation-activated receptor gamma expression by gamma-irradiation as a mechanism contributing to inflammatory response in rat colon: modulation by the 5-aminosalicylic acid agonist." J Pharmacol Exp Ther **324**(3): 911-920.
- Liotta, F., R. Angeli, et al. (2008). "Toll-like receptors 3 and 4 are expressed by human bone marrow-derived mesenchymal stem cells and can inhibit their T-cell modulatory activity by impairing Notch signaling." Stem Cells **26**(1): 279-289.
- Liu, D., F. Wang, et al. (2010). "Long-term repopulation effects of donor BMDCs on intestinal epithelium." Dig Dis Sci **55**(8): 2182-2193.
- Lock, C., G. Hermans, et al. (2002). "Gene-microarray analysis of multiple sclerosis lesions yields new targets validated in autoimmune encephalomyelitis." Nat Med **8**(5): 500-508.
- Loebinger, M. R., A. Eddaoudi, et al. (2009). "Mesenchymal stem cell delivery of TRAIL can eliminate metastatic cancer." Cancer Res **69**(10): 4134-4142.
- Lordick, F., H. Geinitz, et al. (2006). "Increased risk of ischemic bowel complications during treatment with bevacizumab after pelvic irradiation: Report of three cases." International Journal of Radiation Oncology Biology Physics **64**(5): 1295-1298.
- Lu, X., T. Liu, et al. (2009). "Immunomodulatory effects of mesenchymal stem cells involved in favoring type 2 T cell subsets." Transpl Immunol **22**(1-2): 55-61.
- Mackay, A. M., S. C. Beck, et al. (1998). "Chondrogenic differentiation of cultured human mesenchymal stem cells from marrow." Tissue Engineering **4**(4): 415-428.
- Macpherson, A. J. and T. Uhr (2004). "Induction of protective IgA by intestinal dendritic cells carrying commensal bacteria." Science **303**(5664): 1662-1665.
- Maggini, J., G. Mirkin, et al. (2010). "Mouse bone marrow-derived mesenchymal stromal cells turn activated macrophages into a regulatory-like profile." PLoS One **5**(2): e9252.
- Maitra, B., E. Szekely, et al. (2004). "Human mesenchymal stem cells support unrelated donor hematopoietic stem cells and suppress T-cell activation." Bone Marrow Transplant **33**(6): 597-604.
- Majumdar, M. K., M. Keane-Moore, et al. (2003). "Characterization and functionality of cell surface molecules on human mesenchymal stem cells." Journal of Biomedical Science **10**(2): 228-241.

- Majumdar, M. K., M. A. Thiede, et al. (1998). "Phenotypic and functional comparison of cultures of marrow-derived mesenchymal stem cells (MSCs) and stromal cells." Journal of Cellular Physiology **176**(1): 57-66.
- Makino, S., K. Fukuda, et al. (1999). "Cardiomyocytes can be generated from marrow stromal cells in vitro." J Clin Invest **103**(5): 697-705.
- Mannon, P. J., I. J. Fuss, et al. (2004). "Anti-interleukin-12 antibody for active Crohn's disease." N Engl J Med **351**(20): 2069-2079.
- Mansilla, E., G. H. Marin, et al. (2006). "Bloodstream cells phenotypically identical to human mesenchymal bone marrow stem cells circulate in large amounts under the influence of acute large skin damage: new evidence for their use in regenerative medicine." Transplant Proc **38**(3): 967-969.
- Mantovani, A., A. Sica, et al. (2005). "Macrophage polarization comes of age." Immunity **23**(4): 344-346.
- Mantovani, A., A. Sica, et al. (2007). "New vistas on macrophage differentiation and activation." Eur J Immunol **37**(1): 14-16.
- Martin, J., K. Helm, et al. (2008). "Adult lung side population cells have mesenchymal stem cell potential." Cytotherapy **10**(2): 140-151.
- Martin, M., S. Delanian, et al. (2000). "[Radiation-induced superficial fibrosis and TGF-alpha 1]." Cancer Radiother **4**(5): 369-384.
- Massberg, S., P. Schaerli, et al. (2007). "Immunosurveillance by hematopoietic progenitor cells trafficking through blood, lymph, and peripheral tissues." Cell **131**(5): 994-1008.
- Matsumoto, T., R. Okamoto, et al. (2005). "Increase of bone marrow-derived secretory lineage epithelial cells during regeneration in the human intestine." Gastroenterology **128**(7): 1851-1867.
- Mazzini, L., I. Ferrero, et al. (2010). "Mesenchymal stem cell transplantation in amyotrophic lateral sclerosis: A Phase I clinical trial." Exp Neurol **223**(1): 229-237.
- McFarlin, K., X. Gao, et al. (2006). "Bone marrow-derived mesenchymal stromal cells accelerate wound healing in the rat." Wound Repair Regen **14**(4): 471-478.
- Meirelles Lda, S., A. M. Fontes, et al. (2009). "Mechanisms involved in the therapeutic properties of mesenchymal stem cells." Cytokine Growth Factor Rev **20**(5-6): 419-427.
- Menasché, P., A. A. Hagege, et al. (2001). "Myoblast transplantation for heart failure." Lancet **357**(9252): 279-280.
- Menasché, P., A. A. Hagege, et al. (2003). "Autologous skeletal myoblast transplantation for severe postinfarction left ventricular dysfunction." Journal of the American College of Cardiology **41**(7): 1078-1083.
- Miranville, A., C. Heeschen, et al. (2004). "Improvement of postnatal neovascularization by human adipose tissue-derived stem cells." Circulation **110**(3): 349-355.
- Mirza, A., J. M. Hyvelin, et al. (2008). "Undifferentiated mesenchymal stem cells seeded on a vascular prosthesis contribute to the restoration of a physiologic vascular wall." J Vasc Surg **47**(6): 1313-1321.
- Mito, M., M. Kusano, et al. (1992). "Hepatocyte transplantation in man." Transplantation Proceedings **24**(6): 3052-3053.
- Miura, M., S. Gronthos, et al. (2003). "SHED: stem cells from human exfoliated deciduous teeth." Proc Natl Acad Sci U S A **100**(10): 5807-5812.
- Mohamadnejad, M., K. Alimoghaddam, et al. (2007). "Phase 1 trial of autologous bone marrow mesenchymal stem cell transplantation in patients with decompensated liver cirrhosis." Arch Iran Med **10**(4): 459-466.

- Mohyeddin-Bonab, M., M. R. Mohamad-Hassani, et al. (2007). "Autologous in vitro expanded mesenchymal stem cell therapy for human old myocardial infarction." Arch Iran Med **10**(4): 467-473.
- Mohyeddin Bonab, M., S. Yazdanbakhsh, et al. (2007). "Does mesenchymal stem cell therapy help multiple sclerosis patients? Report of a pilot study." Iran J Immunol **4**(1): 50-57.
- Morigi, M., M. Introna, et al. (2008). "Human bone marrow mesenchymal stem cells accelerate recovery of acute renal injury and prolong survival in mice." Stem Cells **26**(8): 2075-2082.
- Mouiseddine, M., S. Francois, et al. (2012). "Intravenous human mesenchymal stem cells transplantation in NOD/SCID mice preserve liver integrity of irradiation damage." Methods Mol Biol **826**: 179-188.
- Mourcin, F., N. Grenier, et al. (2005). "Mesenchymal stem cells support expansion of in vitro irradiated CD34(+) cells in the presence of SCF, FLT3 ligand, TPO and IL3: potential application to autologous cell therapy in accidentally irradiated victims." Radiat Res **164**(1): 1-9.
- Muguruma, Y., T. Yahata, et al. (2006). "Reconstitution of the functional human hematopoietic microenvironment derived from human mesenchymal stem cells in the murine bone marrow compartment." Blood **107**(5): 1878-1887.
- Müller-Ehmsen, J., K. L. Peterson, et al. (2002). "Rebuilding a damaged heart: Long-term survival of transplanted neonatal rat cardiomyocytes after myocardial infarction and effect on cardiac function." Circulation **105**(14): 1720-1726.
- Mumy, K. L. and B. A. McCormick (2009). "The role of neutrophils in the event of intestinal inflammation." Curr Opin Pharmacol **9**(6): 697-701.
- Murphy, J. M., K. Dixon, et al. (2002). "Reduced chondrogenic and adipogenic activity of mesenchymal stem cells from patients with advanced osteoarthritis." Arthritis Rheum **46**(3): 704-713.
- Murphy, J. M., D. J. Fink, et al. (2003). "Stem cell therapy in a caprine model of osteoarthritis." Arthritis Rheum **48**(12): 3464-3474.
- Murry, C. E., R. W. Wiseman, et al. (1996). "Skeletal myoblast transplantation for repair of myocardial necrosis." Journal of Clinical Investigation **98**(11): 2512-2523.
- Myung, S. C., Y. E. Lee, et al. (2008). "Highly efficient and large-scale generation of functional dopamine neurons from human embryonic stem cells." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **105**(9): 3392-3397.
- Nagaya, N., T. Fujii, et al. (2004). "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 **287**(6): H2670-2676.
- Nagaya, N., K. Kangawa, et al. (2005). "Transplantation of mesenchymal stem cells improves cardiac function in a rat model of dilated cardiomyopathy." Circulation **112**(8): 1128-1135.
- Nakagawa, H., S. Akita, et al. (2005). "Human mesenchymal stem cells successfully improve skin-substitute wound healing." Br J Dermatol **153**(1): 29-36.
- Nakamura, K., Y. Ito, et al. (2004). "Antitumor effect of genetically engineered mesenchymal stem cells in a rat glioma model." Gene Ther **11**(14): 1155-1164.
- Nasef, A., N. Mathieu, et al. (2007). "Immunosuppressive effects of mesenchymal stem cells: Involvement of HLA-G." Transplantation **84**(2): 231-237.
- Nauta, A. J., A. B. Kruisselbrink, et al. (2006). "Mesenchymal stem cells inhibit generation and function of both CD34+-derived and monocyte-derived dendritic cells." J Immunol **177**(4): 2080-2087.

- Nauta, A. J., G. Westerhuis, et al. (2006). "Donor-derived mesenchymal stem cells are immunogenic in an allogeneic host and stimulate donor graft rejection in a nonmyeloablative setting." *Blood* **108**(6): 2114-2120.
- Nejdfors, P., M. Ekelund, et al. (2000). "Intestinal permeability in humans is increased after radiation therapy." *Dis Colon Rectum* **43**(11): 1582-1587; discussion 1587-1588.
- Nemeth, K., A. Leelahavanichkul, et al. (2009). "Bone marrow stromal cells attenuate sepsis via prostaglandin E(2)-dependent reprogramming of host macrophages to increase their interleukin-10 production." *Nat Med* **15**(1): 42-49.
- Neuman, M. G. (2007). "Immune dysfunction in inflammatory bowel disease." *Transl Res* **149**(4): 173-186.
- Neuss, S., E. Becher, et al. (2004). "Functional expression of HGF and HGF receptor/c-met in adult human mesenchymal stem cells suggests a role in cell mobilization, tissue repair, and wound healing." *Stem Cells* **22**(3): 405-414.
- Niyazi, M., C. Maihoefer, et al. (2011). "Radiotherapy and "new" drugs - new side effects?" *Radiation Oncology*: 177.
- O'Flaherty, E., R. Sparrow, et al. (1995). "Bone marrow stromal function from patients after bone marrow transplantation." *Bone Marrow Transplant* **15**(2): 207-212.
- Oh, H., J. Seong, et al. (2010). "Recombinant human epidermal growth factor (rhEGF) protects radiation-induced intestine injury in murine system." *J Radiat Res* **51**(5): 535-541.
- Okamoto, R., T. Yajima, et al. (2002). "Damaged epithelia regenerated by bone marrow-derived cells in the human gastrointestinal tract." *Nat Med* **8**(9): 1011-1017.
- Onken, J., T. Jaffe, et al. (2008). "W1237 Long-Term Safety of Prochymal Adult Mesenchymal Stem Cells in Crohn's Disease." *Gastroenterology* **134**(4, Supplement 1): A-661.
- Orlic, D., J. Kajstura, et al. (2001). "Mobilized bone marrow cells repair the infarcted heart, improving function and survival." *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**(18): 10344-10349.
- Ortiz, L. A., M. Dutreil, et al. (2007). "Interleukin 1 receptor antagonist mediates the antiinflammatory and antifibrotic effect of mesenchymal stem cells during lung injury." *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**(26): 11002-11007.
- Ortiz, L. A., F. Gambelli, et al. (2003). "Mesenchymal stem cell engraftment in lung is enhanced in response to bleomycin exposure and ameliorates its fibrotic effects." *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**(14): 8407-8411.
- Osawa, M., K. I. Hanada, et al. (1996). "Long-term lymphohematopoietic reconstitution by a single CD34- low/negative hematopoietic stem cell." *Science* **273**(5272): 242-245.
- Otaki, S., S. Ueshima, et al. (2007). "Mesenchymal progenitor cells in adult human dental pulp and their ability to form bone when transplanted into immunocompromised mice." *Cell Biol Int* **31**(10): 1191-1197.
- Paintlia, M. K., A. S. Paintlia, et al. (2011). "Synergistic activity of interleukin-17 and tumor necrosis factor-alpha enhances oxidative stress-mediated oligodendrocyte apoptosis." *J Neurochem* **116**(4): 508-521.
- Parekkadan, B., D. van Poll, et al. (2007). "Mesenchymal stem cell-derived molecules reverse fulminant hepatic failure." *PLoS One* **2**(9): e941.
- Park, H. J., P. H. Lee, et al. (2008). "Mesenchymal stem cells therapy exerts neuroprotection in a progressive animal model of Parkinson's disease." *J Neurochem* **107**(1): 141-151.
- Peiffert, D., J. M. Simon, et al. (2007). "Épinal radiotherapy accident: passed, present, future." *L'accident d'Épinal : passé, présent, avenir* **11**(6-7): 309-312.
- Pereira, R. F., M. D. O'Hara, et al. (1998). "Marrow stromal cells as a source of progenitor cells for nonhematopoietic tissues in transgenic mice with a phenotype of osteogenesis imperfecta." *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**(3): 1142-1147.

- Petersen, B. E., W. C. Bowen, et al. (1999). "Bone marrow as a potential source of hepatic oval cells." Science **284**(5417): 1168-1170.
- Petersenn, S., N. Unger, et al. (2012). "Pasireotide (SOM230), a Novel Multireceptor-Targeted Somatostatin Analogue, Is Well Tolerated When Administered as a Continuous 7-Day Subcutaneous Infusion in Healthy Male Volunteers." J Clin Pharmacol **52**(7): 1017-1027.
- Pevsner-Fischer, M., V. Morad, et al. (2007). "Toll-like receptors and their ligands control mesenchymal stem cell functions." Blood **109**(4): 1422-1432.
- Pittenger, M. F., A. M. Mackay, et al. (1999). "Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells." Science **284**(5411): 143-147.
- Planat-Benard, V., C. Menard, et al. (2004). "Spontaneous cardiomyocyte differentiation from adipose tissue stroma cells." Circ Res **94**(2): 223-229.
- Pochampally, R. R., B. T. Neville, et al. (2004). "Rat adult stem cells (marrow stromal cells) engraft and differentiate in chick embryos without evidence of cell fusion." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **101**(25): 9282-9285.
- Poggi, A., C. Prevosto, et al. (2005). "Interaction between human NK cells and bone marrow stromal cells induces NK cell triggering: role of NKp30 and NKG2D receptors." J Immunol **175**(10): 6352-6360.
- Polchert, D., J. Sobinsky, et al. (2008). "IFN-gamma activation of mesenchymal stem cells for treatment and prevention of graft versus host disease." Eur J Immunol **38**(6): 1745-1755.
- Ponte, A. L., E. Marais, et al. (2007). "The in vitro migration capacity of human bone marrow mesenchymal stem cells: comparison of chemokine and growth factor chemotactic activities." Stem Cells **25**(7): 1737-1745.
- Popp, F. C., P. Renner, et al. (2009). "Mesenchymal stem cells as immunomodulators after liver transplantation." Liver Transpl **15**(10): 1192-1198.
- Potten, C. S., G. Owen, et al. (1990). "The temporal and spatial changes in cell proliferation within the irradiated crypts of the murine small intestine." Int J Radiat Biol **57**(1): 185-199.
- Quarto, R., M. Mastrogiacomo, et al. (2001). "Repair of large bone defects with the use of autologous bone marrow stromal cells." N Engl J Med **344**(5): 385-386.
- Rafei, M., P. M. Campeau, et al. (2009). "Mesenchymal stromal cells ameliorate experimental autoimmune encephalomyelitis by inhibiting CD4 Th17 T cells in a CC chemokine ligand 2-dependent manner." J Immunol **182**(10): 5994-6002.
- Raffaghello, L., G. Bianchi, et al. (2008). "Human mesenchymal stem cells inhibit neutrophil apoptosis: a model for neutrophil preservation in the bone marrow niche." Stem Cells **26**(1): 151-162.
- Ramasamy, R., C. K. Tong, et al. (2008). "The immunosuppressive effects of human bone marrow-derived mesenchymal stem cells target T cell proliferation but not its effector function." Cell Immunol **251**(2): 131-136.
- Rasmusson, I., K. Le Blanc, et al. (2007). "Mesenchymal stem cells stimulate antibody secretion in human B cells." Scand J Immunol **65**(4): 336-343.
- Rasmusson, I., O. Ringdén, et al. (2003). "Mesenchymal stem cells inhibit the formation of cytotoxic T lymphocytes, but not activated cytotoxic T lymphocytes or natural killer cells." Transplantation **76**(8): 1208-1213.
- Ravanti, L. and V. M. Kahari (2000). "Matrix metalloproteinases in wound repair (review)." Int J Mol Med **6**(4): 391-407.

- Ren, G., L. Zhang, et al. (2008). "Mesenchymal stem cell-mediated immunosuppression occurs via concerted action of chemokines and nitric oxide." Cell Stem Cell **2**(2): 141-150.
- Ries, C., V. Egea, et al. (2007). "MMP-2, MT1-MMP, and TIMP-2 are essential for the invasive capacity of human mesenchymal stem cells: differential regulation by inflammatory cytokines." Blood **109**(9): 4055-4063.
- Ringden, O., M. Uzunel, et al. (2006). "Mesenchymal stem cells for treatment of therapy-resistant graft-versus-host disease." Transplantation **81**(10): 1390-1397.
- Rippon, H. J., J. M. Polak, et al. (2006). "Derivation of distal lung epithelial progenitors from murine embryonic stem cells using a novel three-step differentiation protocol." Stem Cells **24**(5): 1389-1398.
- Rock, K. L., J. J. Lai, et al. (2011). "Innate and adaptive immune responses to cell death." Immunol Rev **243**(1): 191-205.
- Roddy, G. W., J. Y. Oh, et al. (2011). "Action at a distance: Systemically administered adult stem/progenitor cells (MSCs) reduce inflammatory damage to the cornea without engraftment and primarily by secretion of TNF- α stimulated gene/protein 6." Stem Cells **29**(10): 1572-1579.
- Rojas, M., J. Xu, et al. (2005). "Bone marrow-derived mesenchymal stem cells in repair of the injured lung." Am J Respir Cell Mol Biol **33**(2): 145-152.
- Romieu-Mourez, R., M. Francois, et al. (2009). "Cytokine modulation of TLR expression and activation in mesenchymal stromal cells leads to a proinflammatory phenotype." J Immunol **182**(12): 7963-7973.
- Rosland, G. V., A. Svendsen, et al. (2009). "Long-term cultures of bone marrow-derived human mesenchymal stem cells frequently undergo spontaneous malignant transformation." Cancer Res **69**(13): 5331-5339.
- Rubart, M., K. B. S. Pasumarthi, et al. (2003). "Physiological coupling of donor and host cardiomyocytes after cellular transplantation." Circulation Research **92**(11): 1217-1224.
- Rubio, D., J. Garcia-Castro, et al. (2005). "Spontaneous human adult stem cell transformation." Cancer Res **65**(8): 3035-3039.
- Ruiz-Ortega, M., J. Rodriguez-Vita, et al. (2007). "TGF-beta signaling in vascular fibrosis." Cardiovasc Res **74**(2): 196-206.
- Ruster, B., S. Gottig, et al. (2006). "Mesenchymal stem cells display coordinated rolling and adhesion behavior on endothelial cells." Blood **108**(12): 3938-3944.
- Ryan, E. A., B. W. Paty, et al. (2005). "Five-year follow-up after clinical islet transplantation." Diabetes **54**(7): 2060-2069.
- Ryan, J. M., F. P. Barry, et al. (2005). "Mesenchymal stem cells avoid allogeneic rejection." Journal of Inflammation **2**.
- Sabat, R., G. Grutz, et al. (2010). "Biology of interleukin-10." Cytokine Growth Factor Rev **21**(5): 331-344.
- Sakaida, I., S. Terai, et al. (2004). "Transplantation of bone marrow cells reduces CCl₄-induced liver fibrosis in mice." Hepatology **40**(6): 1304-1311.
- Sato, Y., H. Araki, et al. (2005). "Human mesenchymal stem cells xenografted directly to rat liver are differentiated into human hepatocytes without fusion." Blood **106**(2): 756-763.
- Scharp, D. W., P. E. Lacy, et al. (1991). "Results of our first nine intraportal islet allografts in type 1, insulin-dependent diabetic patients." Transplantation **51**(1): 76-85.
- Schaue, D. and W. H. McBride (2010). "Links between innate immunity and normal tissue radiobiology." Radiat Res **173**(4): 406-417.

- Schmidt, A., D. Ladage, et al. (2006). "Mesenchymal stem cells transmigrate over the endothelial barrier." Eur J Cell Biol **85**(11): 1179-1188.
- Schraufstatter, I. U., R. G. Discipio, et al. (2009). "C3a and C5a are chemotactic factors for human mesenchymal stem cells, which cause prolonged ERK1/2 phosphorylation." J Immunol **182**(6): 3827-3836.
- Segers, V. F., I. Van Riet, et al. (2006). "Mesenchymal stem cell adhesion to cardiac microvascular endothelium: activators and mechanisms." Am J Physiol Heart Circ Physiol **290**(4): H1370-1377.
- Segev, H., B. Fishman, et al. (2004). "Differentiation of human embryonic stem cells into insulin-producing clusters." Stem Cells **22**(3): 265-274.
- Selmani, Z., A. Naji, et al. (2008). "Human leukocyte antigen-G5 secretion by human mesenchymal stem cells is required to suppress T lymphocyte and natural killer function and to induce CD4⁺CD25^{high}FOXP3⁺ regulatory T cells." Stem Cells **26**(1): 212-222.
- Semont, A., M. Mouiseddine, et al. (2010). "Mesenchymal stem cells improve small intestinal integrity through regulation of endogenous epithelial cell homeostasis." Cell Death Differ **17**(6): 952-961.
- Serhan, C. N., S. Yacoubian, et al. (2008). "Anti-inflammatory and proresolving lipid mediators." Annu Rev Pathol **3**: 279-312.
- Sheikh Sajjadih, M. R., L. V. Kuznetsova, et al. (2010). "Affects of ionizing radiation on T-cell population lymphocyte: a risk factor of irritable bowel syndrome." Toxicol Ind Health **26**(6): 323-330.
- Siminiak, T., R. Kalawski, et al. (2004). "Autologous skeletal myoblast transplantation for the treatment of postinfarction myocardial injury: Phase I clinical study with 12 months of follow-up." American Heart Journal **148**(3): 531-537.
- Simoneau, A., F. E. Herring-Gillam, et al. (1998). "Identification, distribution, and tissular origin of the alpha5(IV) and alpha6(IV) collagen chains in the developing human intestine." Dev Dyn **212**(3): 437-447.
- Simonsen, J. L., C. Rosada, et al. (2002). "Telomerase expression extends the proliferative life-span and maintains the osteogenic potential of human bone marrow stromal cells." Nature Biotechnology **20**(6): 592-596.
- Smythies, L. E., M. Sellers, et al. (2005). "Human intestinal macrophages display profound inflammatory anergy despite avid phagocytic and bacteriocidal activity." J Clin Invest **115**(1): 66-75.
- Song, B., A. M. Smink, et al. (2012). "The Directed Differentiation of Human iPS Cells into Kidney Podocytes." PLoS One **7**(9): e46453.
- Sonis, S. T. (2004). "The pathobiology of mucositis." Nat Rev Cancer **4**(4): 277-284.
- Sorrell, J. M., M. A. Baber, et al. (2009). "Influence of adult mesenchymal stem cells on in vitro vascular formation." Tissue Eng Part A **15**(7): 1751-1761.
- Spaggiari, G. M., A. Capobianco, et al. (2008). "Mesenchymal stem cells inhibit natural killer-cell proliferation, cytotoxicity, and cytokine production: role of indoleamine 2,3-dioxygenase and prostaglandin E2." Blood **111**(3): 1327-1333.
- Spaggiari, G. M., A. Capobianco, et al. (2006). "Mesenchymal stem cell-natural killer cell interactions: evidence that activated NK cells are capable of killing MSCs, whereas MSCs can inhibit IL-2-induced NK-cell proliferation." Blood **107**(4): 1484-1490.
- Spangrude, G. J., S. Heimfeld, et al. (1988). "Purification and characterization of mouse hematopoietic stem cells." Science **241**(4861): 58-62.
- Springer, T. A. (1990). "Adhesion receptors of the immune system." Nature **346**(6283): 425-434.
- Steinman, L. (2001). "Multiple sclerosis: a two-stage disease." Nat Immunol **2**(9): 762-764.

- Stenderup, K., J. Justesen, et al. (2003). "Aging is associated with decreased maximal life span and accelerated senescence of bone marrow stromal cells." *Bone* **33**(6): 919-926.
- Stout, R. D., S. K. Watkins, et al. (2009). "Functional plasticity of macrophages: in situ reprogramming of tumor-associated macrophages." *J Leukoc Biol* **86**(5): 1105-1109.
- Strom, S. C., R. A. Fisher, et al. (1997). "Hepatocyte transplantation as a bridge to orthotopic liver transplantation in terminal liver failure." *Transplantation* **63**(4): 559-569.
- Strup-Perrot, C., M. C. Vozenin-Brotons, et al. (2005). "Expression of matrix metalloproteinases and tissue inhibitor metalloproteinases increases in X-irradiated rat ileum despite the disappearance of CD8a T cells." *World J Gastroenterol* **11**(40): 6312-6321.
- Studený, M., F. C. Marini, et al. (2002). "Bone marrow-derived mesenchymal stem cells as vehicles for interferon-beta delivery into tumors." *Cancer Res* **62**(13): 3603-3608.
- Studený, M., F. C. Marini, et al. (2004). "Mesenchymal stem cells: potential precursors for tumor stroma and targeted-delivery vehicles for anticancer agents." *J Natl Cancer Inst* **96**(21): 1593-1603.
- Sun, J., Z. B. Han, et al. (2011). "Intrapulmonary delivery of human umbilical cord mesenchymal stem cells attenuates acute lung injury by expanding CD4CD25+ forkhead Boxp3 (FOXP3) + regulatory T cells and balancing anti- and pro-inflammatory factors." *Cellular Physiology and Biochemistry* **27**(5): 587-596.
- Sundin, M., O. Ringdén, et al. (2007). "No alloantibodies against mesenchymal stromal cells, but presence of anti-fetal calf serum antibodies, after transplantation in allogeneic hematopoietic stem cell recipients." *Haematologica* **92**(9): 1208-1215.
- Takahashi, K. and S. Yamanaka (2006). "Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors." *Cell* **126**(4): 663-676.
- Takashima, Y., T. Era, et al. (2007). "Neuroepithelial Cells Supply an Initial Transient Wave of MSC Differentiation." *Cell* **129**(7): 1377-1388.
- Tanaka, F., K. Tominaga, et al. (2008). "Exogenous administration of mesenchymal stem cells ameliorates dextran sulfate sodium-induced colitis via anti-inflammatory action in damaged tissue in rats." *Life Sci* **83**(23-24): 771-779.
- Tarte, K., J. Gaillard, et al. (2010). "Clinical-grade production of human mesenchymal stromal cells: occurrence of aneuploidy without transformation." *Blood* **115**(8): 1549-1553.
- Tateishi-Yuyama, E., H. Matsubara, et al. (2002). "Therapeutic angiogenesis for patients with limb ischaemia by autologous transplantation of bone-marrow cells: a pilot study and a randomised controlled trial." *Lancet* **360**(9331): 427-435.
- Taves, M. D., C. E. Gomez-Sanchez, et al. (2011). "Extra-adrenal glucocorticoids and mineralocorticoids: evidence for local synthesis, regulation, and function." *Am J Physiol Endocrinol Metab* **301**(1): E11-24.
- Taylor, D. A., B. Z. Atkins, et al. (1998). "Regenerating functional myocardium: Improved performance after skeletal myoblast transplantation." *Nature Medicine* **4**(8): 929-933.
- Ter Huurne, M., R. Schelbergen, et al. (2012). "Intra-articular injection of adipose stem cells cause anti-inflammatory and chondro protective effects in an experimental model of osteoarthritis." *Arthritis Rheum*.
- Teunissen, M. B., C. W. Koomen, et al. (1998). "Interleukin-17 and interferon-gamma synergize in the enhancement of proinflammatory cytokine production by human keratinocytes." *J Invest Dermatol* **111**(4): 645-649.
- Theis, V. S., R. Sripadam, et al. (2010). "Chronic Radiation Enteritis." *Clinical Oncology* **22**(1): 70-83.

- Thomas, E. D., H. L. Lochte Jr, et al. (1957). "Intravenous infusion of bone marrow in patients receiving radiation and chemotherapy." The New England journal of medicine **257**(11): 491-496.
- Thomson, J. A. (1998). "Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts." Science **282**(5391): 1145-1147.
- Thomson, J. A., J. Kalishman, et al. (1995). "Isolation of a primate embryonic stem cell line." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **92**(17): 7844-7848.
- Togel, F., K. Weiss, et al. (2007). "Vasculotropic, paracrine actions of infused mesenchymal stem cells are important to the recovery from acute kidney injury." Am J Physiol Renal Physiol **292**(5): F1626-1635.
- Toksoy, A., V. Muller, et al. (2007). "Biphasic expression of stromal cell-derived factor-1 during human wound healing." Br J Dermatol **157**(6): 1148-1154.
- Tolar, J., I. Y. Akemi, et al. (2009). "Amelioration of epidermolysis bullosa by transfer of wild-type bone marrow cells." Blood **113**(5): 1167-1174.
- Toma, C., M. F. Pittenger, et al. (2002). "Human mesenchymal stem cells differentiate to a cardiomyocyte phenotype in the adult murine heart." Circulation **105**(1): 93-98.
- Tomchuck, S. L., K. J. Zvezdaryk, et al. (2008). "Toll-like receptors on human mesenchymal stem cells drive their migration and immunomodulating responses." Stem Cells **26**(1): 99-107.
- Tomita, S., R. K. Li, et al. (1999). "Autologous transplantation of bone marrow cells improves damaged heart function." Circulation **100**(19 Suppl): II247-256.
- Torres, S., L. Thim, et al. (2007). "Glucagon-like peptide-2 improves both acute and late experimental radiation enteritis in the rat." Int J Radiat Oncol Biol Phys **69**(5): 1563-1571.
- Torsvik, A., G. V. Rosland, et al. (2010). "Spontaneous malignant transformation of human mesenchymal stem cells reflects cross-contamination: putting the research field on track - letter." Cancer Res **70**(15): 6393-6396.
- Tse, H. F., K. H. Yiu, et al. (2007). "Bone marrow stem cell therapy for myocardial angiogenesis." Curr Vasc Pharmacol **5**(2): 103-112.
- Tse, W. T., J. D. Pendleton, et al. (2003). "Suppression of allogeneic T-cell proliferation by human marrow stromal cells: Implications in transplantation." Transplantation **75**(3): 389-397.
- Tu, Z., Q. Li, et al. (2010). "Mesenchymal stem cells inhibit complement activation by secreting factor H." Stem Cells Dev **19**(11): 1803-1809.
- Tykodi, S. S., E. H. Warren, et al. (2004). "Allogeneic hematopoietic cell transplantation for metastatic renal cell carcinoma after nonmyeloablative conditioning: Toxicity, clinical response, and immunological response to minor histocompatibility antigens." Clinical Cancer Research **10**(23): 7799-7811.
- Tzartos, J. S., M. A. Friese, et al. (2008). "Interleukin-17 production in central nervous system-infiltrating T cells and glial cells is associated with active disease in multiple sclerosis." Am J Pathol **172**(1): 146-155.
- Uccelli, A., L. Moretta, et al. (2008). "Mesenchymal stem cells in health and disease." Nat Rev Immunol **8**(9): 726-736.
- Vantighem, M. C., J. Kerr-Conte, et al. (2009). "Primary graft function, metabolic control, and graft survival after islet transplantation." Diabetes Care **32**(8): 1473-1478.
- Vercelli, A., O. M. Mereuta, et al. (2008). "Human mesenchymal stem cell transplantation extends survival, improves motor performance and decreases neuroinflammation in mouse model of amyotrophic lateral sclerosis." Neurobiol Dis **31**(3): 395-405.

- Vijay-Kumar, M., J. D. Aitken, et al. (2008). "Flagellin treatment protects against chemicals, bacteria, viruses, and radiation." *J Immunol* **180**(12): 8280-8285.
- Vilalta, M., I. R. Degano, et al. (2009). "Human adipose tissue-derived mesenchymal stromal cells as vehicles for tumor bystander effect: a model based on bioluminescence imaging." *Gene Ther* **16**(4): 547-557.
- Von Luttichau, I., M. Notohamiprodjo, et al. (2005). "Human adult CD34- progenitor cells functionally express the chemokine receptors CCR1, CCR4, CCR7, CXCR5, and CCR10 but not CXCR4." *Stem Cells Dev* **14**(3): 329-336.
- Wagner, J. E., A. Ishida-Yamamoto, et al. (2010). "Bone marrow transplantation for recessive dystrophic epidermolysis bullosa." *New England Journal of Medicine* **363**(7): 629-639.
- Wagner, W., F. Wein, et al. (2005). "Comparative characteristics of mesenchymal stem cells from human bone marrow, adipose tissue, and umbilical cord blood." *Exp Hematol* **33**(11): 1402-1416.
- Wakabayashi, K., A. Nagai, et al. (2010). "Transplantation of human mesenchymal stem cells promotes functional improvement and increased expression of neurotrophic factors in a rat focal cerebral ischemia model." *J Neurosci Res* **88**(5): 1017-1025.
- Wakitani, S., K. Imoto, et al. (2002). "Human autologous culture expanded bone marrow mesenchymal cell transplantation for repair of cartilage defects in osteoarthritic knees." *Osteoarthritis Cartilage* **10**(3): 199-206.
- Wang, D., D. L. Haviland, et al. (2007). "A pure population of lung alveolar epithelial type II cells derived from human embryonic stem cells." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **104**(11): 4449-4454.
- Wang, J., K. K. Richter, et al. (1999). "Upregulation and spatial shift in the localization of the mannose 6-phosphate/insulin-like growth factor II receptor during radiation enteropathy development in the rat." *Radiother Oncol* **50**(2): 205-213.
- Wang, J., H. Zheng, et al. (1999). "The synthetic somatostatin analogue, octreotide, ameliorates acute and delayed intestinal radiation injury." *Int J Radiat Oncol Biol Phys* **45**(5): 1289-1296.
- Wang, J., H. Zheng, et al. (1998). "Cellular sources of transforming growth factor-beta isoforms in early and chronic radiation enteropathy." *Am J Pathol* **153**(5): 1531-1540.
- Wang, J. S., D. Shum-Tim, et al. (2001). "The coronary delivery of marrow stromal cells for myocardial regeneration: pathophysiologic and therapeutic implications." *J Thorac Cardiovasc Surg* **122**(4): 699-705.
- Wang, N., Q. Li, et al. (2012). "Mesenchymal Stem Cells Attenuate Peritoneal Injury through Secretion of TSG-6." *PLoS One* **7**(8): e43768.
- Wang, Q., B. Sun, et al. (2008). "Murine bone marrow mesenchymal stem cells cause mature dendritic cells to promote T-cell tolerance." *Scand J Immunol* **68**(6): 607-615.
- Wang, Y., Y. Deng, et al. (2008). "SDF-1alpha/CXCR4-mediated migration of systemically transplanted bone marrow stromal cells towards ischemic brain lesion in a rat model." *Brain Res* **1195**: 104-112.
- Wang, Y., H. E. Johnsen, et al. (2006). "Changes in circulating mesenchymal stem cells, stem cell homing factor, and vascular growth factors in patients with acute ST elevation myocardial infarction treated with primary percutaneous coronary intervention." *Heart* **92**(6): 768-774.
- Weiden, P. L., K. M. Sullivan, et al. (1981). "Antileukemic effect of chronic graft-versus-host disease. Contribution to improved survival after allogeneic marrow transplantation." *New England Journal of Medicine* **304**(25): 1529-1533.

- Wilkins, A., K. Kemp, et al. (2009). "Human bone marrow-derived mesenchymal stem cells secrete brain-derived neurotrophic factor which promotes neuronal survival in vitro." Stem Cell Res.
- Wright, D. E., A. J. Wagers, et al. (2001). "Physiological migration of hematopoietic stem and progenitor cells." Science **294**(5548): 1933-1936.
- Wu, Y., L. Chen, et al. (2007). "Mesenchymal stem cells enhance wound healing through differentiation and angiogenesis." Stem Cells **25**(10): 2648-2659.
- Wynn, R. F., C. A. Hart, et al. (2004). "A small proportion of mesenchymal stem cells strongly expresses functionally active CXCR4 receptor capable of promoting migration to bone marrow." Blood **104**(9): 2643-2645.
- Xia, X., W. Chen, et al. (2012). "Mesenchymal stem cells administered after liver transplantation prevent acute graft-versus-host disease in rats." Liver Transpl.
- Yamada, Y., A. Fujimoto, et al. (2006). "Cluster analysis and gene expression profiles: a cDNA microarray system-based comparison between human dental pulp stem cells (hDPSCs) and human mesenchymal stem cells (hMSCs) for tissue engineering cell therapy." Biomaterials **27**(20): 3766-3781.
- Yamout, B., R. Hourani, et al. (2010). "Bone marrow mesenchymal stem cell transplantation in patients with multiple sclerosis: a pilot study." J Neuroimmunol **227**(1-2): 185-189.
- Young, H. E., T. A. Steele, et al. (2001). "Human reserve pluripotent mesenchymal stem cells are present in the connective tissues of skeletal muscle and dermis derived from fetal, adult, and geriatric donors." Anat Rec **264**(1): 51-62.
- Yui, S., T. Nakamura, et al. (2012). "Functional engraftment of colon epithelium expanded in vitro from a single adult Lgr5(+) stem cell." Nat Med **18**(4): 618-623.
- Zappia, E., S. Casazza, et al. (2005). "Mesenchymal stem cells ameliorate experimental autoimmune encephalomyelitis inducing T-cell anergy." Blood **106**(5): 1755-1761.
- Zbankova, S., J. Bryndova, et al. (2007). "11beta-hydroxysteroid dehydrogenase 1 and 2 expression in colon from patients with ulcerative colitis." J Gastroenterol Hepatol **22**(7): 1019-1023.
- Zetterquist, H., P. Hentschke, et al. (2001). "A graft-versus-colonic cancer effect of allogeneic stem cell transplantation." Bone Marrow Transplantation **28**(12): 1161-1166.
- Zhang, J., Y. Li, et al. (2005). "Human bone marrow stromal cell treatment improves neurological functional recovery in EAE mice." Exp Neurol **195**(1): 16-26.
- Zhang, J., Y. Li, et al. (2006). "Bone marrow stromal cells reduce axonal loss in experimental autoimmune encephalomyelitis mice." J Neurosci Res **84**(3): 587-595.
- Zhang, Q., S. Shi, et al. (2009). "Mesenchymal stem cells derived from human gingiva are capable of immunomodulatory functions and ameliorate inflammation-related tissue destruction in experimental colitis." J Immunol **183**(12): 7787-7798.
- Zhang, W., W. Ge, et al. (2004). "Effects of mesenchymal stem cells on differentiation, maturation, and function of human monocyte-derived dendritic cells." Stem Cells Dev **13**(3): 263-271.
- Zhang, Z., M. Zheng, et al. (2006). "Critical role of IL-17 receptor signaling in acute TNBS-induced colitis." Inflamm Bowel Dis **12**(5): 382-388.
- Zhao, C. P., C. Zhang, et al. (2007). "Human mesenchymal stromal cells ameliorate the phenotype of SOD1-G93A ALS mice." Cytotherapy **9**(5): 414-426.
- Zhao, D. C., J. X. Lei, et al. (2005). "Bone marrow-derived mesenchymal stem cells protect against experimental liver fibrosis in rats." World J Gastroenterol **11**(22): 3431-3440.
- Zhao, J., K. A. Kim, et al. (2009). "R-Spondin1 protects mice from chemotherapy or radiation-induced oral mucositis through the canonical Wnt/beta-catenin pathway." Proc Natl Acad Sci U S A **106**(7): 2331-2336.

- Zheng, Z. H., X. Y. Li, et al. (2008). "Allogeneic mesenchymal stem cell and mesenchymal stem cell-differentiated chondrocyte suppress the responses of type II collagen-reactive T cells in rheumatoid arthritis." Rheumatology (Oxford) **47**(1): 22-30.
- Zhou, H. P., D. H. Yi, et al. (2006). "Administration of donor-derived mesenchymal stem cells can prolong the survival of rat cardiac allograft." Transplant Proc **38**(9): 3046-3051.
- Zhu, F., Q. Wang, et al. (2011). "IL-17 induces apoptosis of vascular endothelial cells: a potential mechanism for human acute coronary syndrome." Clin Immunol **141**(2): 152-160.
- Zhu, J., H. Yamane, et al. (2010). "Differentiation of effector CD4 T cell populations (*)." Annu Rev Immunol **28**: 445-489.
- Zhu, W., W. Xu, et al. (2006). "Mesenchymal stem cells derived from bone marrow favor tumor cell growth in vivo." Exp Mol Pathol **80**(3): 267-274.
- Zimmermann, S., M. Voss, et al. (2003). "Lack of telomerase activity in human mesenchymal stem cells." Leukemia **17**(6): 1146-1149.
- Zuk, P. A., M. Zhu, et al. (2002). "Human adipose tissue is a source of multipotent stem cells." Mol Biol Cell **13**(12): 4279-4295.
- Zvaifler, N. J., L. Marinova-Mutafchieva, et al. (2000). "Mesenchymal precursor cells in the blood of normal individuals." Arthritis Res **2**(6): 477-488.