



HAL
open science

Contribution au développement d'un produit de thérapie cellulaire à base de cellules stromales mésenchymateuses : effet de l'environnement et recherche de marqueurs de qualité

Naceur Charif

► To cite this version:

Naceur Charif. Contribution au développement d'un produit de thérapie cellulaire à base de cellules stromales mésenchymateuses : effet de l'environnement et recherche de marqueurs de qualité. Sciences du Vivant [q-bio]. Université de Lorraine, 2021. Français. NNT : 2021LORR0125 . tel-03387813

HAL Id: tel-03387813

<https://hal.univ-lorraine.fr/tel-03387813v1>

Submitted on 4 Jul 2023

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



AVERTISSEMENT

Ce document est le fruit d'un long travail approuvé par le jury de soutenance et mis à disposition de l'ensemble de la communauté universitaire élargie.

Il est soumis à la propriété intellectuelle de l'auteur. Ceci implique une obligation de citation et de référencement lors de l'utilisation de ce document.

D'autre part, toute contrefaçon, plagiat, reproduction illicite encourt une poursuite pénale.

Contact : ddoc-theses-contact@univ-lorraine.fr

LIENS

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 122. 4

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 335.2- L 335.10

http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg_droi.php

<http://www.culture.gouv.fr/culture/infos-pratiques/droits/protection.htm>

Ecole Doctorale BioSE (Biologie-Santé-Environnement)

Thèse

Présentée et soutenue publiquement pour l'obtention du titre de
DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE LORRAINE
Mention : « Sciences de la Vie et de la Santé »

Naceur CHARIF

**Contribution au développement d'un produit de
thérapie cellulaire à base de cellules stromales
mésenchymateuses : effet de l'environnement et
recherche de marqueurs de qualité**

Le 1^{er} Juin 2021

Membres du jury :

Mme Florence FIORETTI	MCU-PH, Université de Strasbourg	Rapporteur
Mr Hervé PETITE	DR, CNRS-INSERM, Université Paris Diderot	Rapporteur
Mr Jérôme LARGHERO	PU-PH, Hôpital Saint-Louis, Paris	Examineur
Mr Pascal REBOUL	PU, CNRS-Université de Lorraine, Nancy	Examineur
Mme Natalia de ISLA	MCU, CNRS- Université de Lorraine, Nancy	Directrice de thèse
Mme Isabelle BEHM	CR, CNRS- Université de Lorraine, Nancy	Co-directrice de thèse

UMR 7365 CNRS-Université de Lorraine
Ingénierie Moléculaire et Physiopathologie Articulaire (IMoPA)
Biopôle de l'Université de Lorraine
Campus Brabois-Santé
9 Avenue de la Forêt de Haye - BP 20199
F-54505 VANDOEUVRE-lès-NANC

Remerciements

A mes parents « **Bouy** » et « **Ma** » que j'aime, pour votre amour, pour nous avoir toujours soutenus et encouragés, et surtout pour les sacrifices faits afin de nous permettre d'étudier malgré les difficultés de la vie.

A mon épouse « **Radia** » que j'aime profondément,
pour son amour, son soutien inconditionnel, ses
encouragements et sa compréhension, mais aussi à
mes filles bien-aimées **Ines** et **Maïssa**.

A mes sœurs **Lila**, **Farida** et **Rakela** pour votre amour
et votre soutien.

Remerciements

Ce travail a été réalisé au sein de l'unité mixte de recherche « Ingénierie Moléculaire Physiopathologie Articulaires » (UMR 7365 IMoPA CNRS-UL) dirigée par le **Professeur Jean-Yves Jouzeau**, et co-dirigée par le **Professeur Bruno Charpentier** située au Biopôle de l'université de Lorraine au sein du Campus Brabois-Santé.

Je tiens à exprimer ma profonde gratitude à :

Monsieur le **Professeur Jean-François Stoltz** (PU-PH émérite à la Faculté de Médecine de Nancy) mon ancien chef d'équipe et le **Professeur Patrick Menu** (PU à la Faculté de Pharmacie de Nancy) mon ancien chef d'équipe 5, pour leur gentillesse, pour m'avoir encouragé et soutenu dans cette reprise d'étude.

Mesdames les **Professeurs Danièle Bensoussan** (PU-PH à la Faculté de Pharmacie de Nancy) et **Marie-Thérèse Rubio** (PU-PH à la Faculté de Médecine de Nancy) en tant que cheffes d'équipe 6, pour leur gentillesse et pour m'avoir soutenu et encouragé pour cette thèse.

Monsieur le Professeur **Jean-Yves Jouzeau** (PU-PH à la Faculté de Pharmacie de Nancy) directeur de l'UMR et le Monsieur le Professeur **Bruno Charpentier** (PU à la faculté de Sciences de Nancy) co-directeur de l'unité, pour avoir accepté, soutenu et encouragé cette thèse.

Madame **Stéphanie Grandemange** (PU à la faculté de Sciences de Nancy) et Madame **Nathalie Rouas Freiss** (Directrice de recherche au CEA à l'hôpital Saint-Louis, Paris) pour avoir accepté de faire partie de mon comité de suivi de thèse, pour leurs précieux conseils et pour leur disponibilité.

Madame le **Docteur Florence Fioretti** (MCU-PH à la faculté de chirurgie dentaire de Strasbourg) et Monsieur le **Docteur Hervé Petite** (DR à l'UMR CNRS 7052 INSERM U1271 de l'université Paris-Diderot) pour m'avoir fait l'honneur de juger cette thèse en tant que rapporteurs. Soyez assurés de ma sincère reconnaissance ainsi que de mon profond respect.

Monsieur le **Professeur Jérôme Larghero** (PU-PH à l'hôpital Saint-Louis à Paris) et Monsieur le Professeur **Pascal Reboul** (PU à la faculté de Médecine de Nancy), pour m'avoir fait l'honneur de juger cette thèse. Soyez assurés de ma sincère reconnaissance ainsi que de mon profond respect.

Madame le **Docteur Natalia de Isla** (MCU à la Faculté de Médecine de Nancy) pour avoir accepté de diriger cette thèse, pour son soutien et ses encouragements dans ma reprise d'étude, mais aussi pour sa gentillesse, sa disponibilité et les échanges scientifiques que nous avons pu avoir. C'est un grand plaisir de travailler ensemble.

Madame le **Docteur Isabelle Behm** (Chargée de recherche à l'UMR 7365 CNRS-UL) pour avoir accepté de codiriger cette thèse, pour sa disponibilité et les échanges scientifiques que nous avons pu avoir.

Madame **Ghislaine Cauchois**, ma collègue technicienne, qui a largement contribué à ce travail de thèse en me déchargeant de certaines tâches de l'équipe, pour son soutien et pour sa gentillesse.

Je tiens également à remercier :

Le Docteur **Caroline Gaucher**, pour les échanges que nous avons eu sur le stress oxydant.

Le **Docteur Jessica Schiavi** avec qui j'ai travaillé pendant sa thèse au laboratoire et qui m'a encouragé à reprendre mes études.

Mais aussi le **Docteur Hugette Louis**, responsable technique de la plateforme de cytométrie pour son aide en cytométrie et pour les échanges que nous avons pu avoir.

L'ambiance de notre équipe fut bénéfique pour ce travail, c'est pourquoi je voudrais remercier les étudiants de l'équipe avec qui j'ai aimé travailler **Laurie, Mériem, Romain, Cécile, Annebé, Charlotte,**

Remerciements

Allan, Jordan), étudiants, personnels techniques, chercheurs et enseignants chercheurs de l'unité, pour leur aide et pour avoir rendu ce travail agréable.

Mes amis **Mohammed-Salah** et **Anas** pour leur soutien.

Table des matières

REMERCIEMENTS	2
TABLE DES MATIERES	7
LISTE DES PUBLICATIONS ET COMMUNICATIONS	14
I. PRESENTATIONS ORALES	14
II. POSTERS:	14
III. PUBLICATIONS	15
LISTE DES ABREVIATIONS	16
LISTE DES FIGURES	20
LISTE DES TABLEAUX	24
INTRODUCTION GENERALE	25
CHAPITRE I : ETAT DE L'ART	26
I. LES CELLULES SOUCHES	26
A. LES CELLULES SOUCHES TOTIPOTENTES	26
B. LES CELLULES SOUCHES PLURIPOTENTES	27
1. <i>Les cellules souches embryonnaires</i>	27
2. <i>Les cellules souches pluripotentes induites</i>	28
3. <i>Les gènes de pluripotence</i>	28
C. LES CELLULES SOUCHES MULTIPOTENTES	29
1. <i>Les cellules souches hématopoïétiques</i>	29
2. <i>Les cellules souches mésenchymateuses</i>	30
3. <i>Les cellules progénitrices multipotentes adultes (MAPC)</i>	30
D. LES CELLULES SOUCHES UNIPOTENTES.....	30
E. LES CELLULES SOUCHES CANCEREUSES	30
II. LES CELLULES STROMALES/SOUCHES MESENCHYMATEUSES (CSM), DEFINITION ET CARACTERISTIQUES	31
A. DEFINITION DES CSM	31
B. CLONOGENICITE.....	31
C. PHENOTYPE : LES MARQUEURS DE SURFACE DES CSM	32
D. LES DIFFERENTES SOURCES DE CSM :	33
E. MULTIPOTENCE	33
F. CRITERES MINIMUMS IDENTIFIANT LES CSM	34
G. COMPARAISON DES CSM-MO OSSEUSE ET DE CSM-GW	35
III. LES PROPRIETES FONCTIONNELLES DES CSM	36
A. LE « HOMING »	36
B. LES PROPRIETES IMMUNOMODULATRICES DES CSM.....	37
1. <i>Les CSM et le système immunitaire inné</i>	37
2. <i>Les CSM et le système immunitaire adaptatif</i>	38
a) <i>Interactions entre les CSM et les lymphocytes T</i>	39
b) <i>Interactions entre les CSM et les lymphocytes B</i>	42

Table des matières

3.	Phénotype pro et anti-inflammatoire des CSM	43
a)	Les récepteurs TLR3 et TLR4	43
b)	Le récepteur à l'IFN- γ : CD119.....	45
4.	Les propriétés immunomodulatrices des CSM via le transfert d'organites : les mitochondries	46
a)	Transfert de mitochondries entre les CSM et les macrophages.....	46
b)	Transfert de mitochondries entre les CSM et les lymphocytes T.....	46
5.	Mise en évidence in vitro des propriétés immunomodulatrices des CSM.....	47
IV.	LES CSM ET LA MEDECINE REGENERATIVE	47
A.	DEFINITION GENERALE DE LA MEDECINE REGENERATIVE	47
B.	INGENIERIE TISSULAIRE	47
1.	Thérapie cellulaire à base de CSM	48
C.	UTILISATION DES CSM EN THERAPIE CELLULAIRE	49
1.	CSM et produits de thérapie cellulaire.....	49
a)	Les CSM en tant que médicament de thérapie innovante (MTI)	49
b)	Applications cliniques/essais cliniques.....	50
2.	Conditions de culture des CSM en grade clinique et en grade recherche	51
a)	Conditions de culture en grade recherche	51
b)	Conditions de culture en grade clinique.....	51
c)	Comparaison de la composition du lysat plaquettaire humain et du sérum de veau fœtal	52
d)	Comparaison de la composition biochimique et en facteurs de croissance du SVF et du LPH.....	53
e)	Utilisation de l'héparine.....	56
3.	Culture des CSM en hypoxie.....	56
D.	BIOMARQUEURS DE QUALITE DES CSM	57
1.	Les marqueurs de surface	58
2.	Autres marqueurs protéiques	60
3.	Les biomarqueurs moléculaires ARN	60
a)	Définition	60
b)	Les microARN.....	61
E.	SENESCENCE	63
1.	Définition	63
2.	Le phénotype sénescence.....	64
3.	Méthodes de mise en évidence du phénotype sénescence des CSM.....	65
F.	STRESS OXYDANT	66
1.	Définition	66
2.	Les systèmes pro-oxydants	67
a)	Les ROS	68
b)	Le RNS.....	68
3.	Les conséquences cellulaires induites par les ROS	69
a)	Oxydation des groupements thiol des protéines	69
b)	Induction de la sénescence.....	70
c)	Induction de l'apoptose	71
4.	Les systèmes anti-oxydants	71
a)	Les redox sensors	71
b)	La superoxyde dismutase (SOD)	71
c)	La catalase.....	72
d)	La glutathion peroxydase GPX, le glutathion réduit (GSH) et oxydé (GSSG).....	72
e)	Thiorédoxine, Péroxirédoxine	72
f)	Les vitamines C et E	72
5.	OS et les CSM.....	72

Table des matières

a) OS et homéostasie des cellules souches	72
b) OS et différenciation des CSM.....	73
c) OS et immunomodulation des CSM	73
d) OS lors de l'expansion in vitro des CSM	73
6. OS et conséquences in vivo	75
a) OS et réponse immunitaire	75
b) OS et GVHD.....	75
CHAPITRE II : MATERIEL ET METHODES	79
I. CULTURE CELLULAIRE.....	79
A. ISOLEMENT DES CSM	79
1. CSM-MO	79
2. CSM-GW	79
B. COMPOSITION DES MILIEUX DE CULTURE.....	79
C. LISTE DES PRELEVEMENTS UTILISES.....	80
D. PRE-CONDITIONNEMENT DES CSM.....	80
E. TRYPSINATION ET AMPLIFICATION.....	81
F. DENOMBREMENT.....	81
a) Bleu trypan	81
b) Leucoplate	82
G. CONGELATION.....	82
H. DECONGELATION	82
I. CALCUL DE LA PROLIFERATION	82
1. Le « Population Doubling » (PD).....	82
2. Le « doubling time » (DT).....	82
J. TEST DE CLONOGENICITE.....	82
K. EXPERIENCES EN PRESENCE D'ANTICORPS BLOQUANTS	83
L. TEST DE DIFFERENCIATION.....	83
1. Culture	83
2. Coloration	84
a) Coloration rouge alizarine	84
b) Marquage adipored.....	84
c) Coloration Bleu alcian/Kernechtrot	85
M. ANALYSE CARYOTYPIQUE	86
N. ACTIVITE TELOMERASE	86
O. SENESCENCE CELLULAIRE	87
1. Principe	87
2. Méthode	87
II. CYTOMETRIE EN FLUX	88
A. PRINCIPE DE LA CYTOMETRIE EN FLUX.....	88
B. IMMUNOPHENOTYPAGE	89
1. Principe	89
2. Méthode	89
C. VIABILITE : APOPTOSE NECROSE	91
1. Principe	91
2. Méthode	91
D. DOSAGE DES ESPECES REACTIVES DE L'OXYGENE INTRACELLULAIRES	91
1. Principe	91

Table des matières

2. Méthode	92
III. TESTS FONCTIONNELS	92
A. MIGRATION	92
1. Principe	92
2. Méthode	93
B. TEST DE PROLIFERATION LYMPHOCYTAIRE	94
1. Principe	94
2. Méthode	95
a) Extraction des cellules mononuclées	95
b) Tri cellulaire des lymphocytes T CD3+	95
c) Marquage des lymphocytes T CD3+ au cell trace	95
d) Activation des lymphocytes T CD3	96
e) Co-culture	96
f) Quantification de la prolifération des lymphocytes T activés	96
IV. MARQUAGE IMMUNOFLOUORESCENT	97
A. PRINCIPE	97
B. METHODE	97
V. DOSAGE PAR SPECTROPHOTOMETRIE OU SPECTROFLUORIMETRIE	98
A. ELISA	98
1. Principe	98
a) Test ELISA en sandwich	98
b) Test ELISA en compétition	98
2. Test ELISA pour FAS ligand	98
a) Méthode	98
b) Analyse des données	99
3. Test ELISA pour IDO et TGF- β 1	99
a) Méthode	99
b) Analyse des données	99
4. Test ELISA pour la kynurénine	99
a) Principe	99
b) Méthode	99
c) Analyse des données	100
5. Test ELISA pour PGE2	100
a) Méthode	100
b) Analyse des données	100
C. DOSAGE DU GSH ET GSSG	101
1. Principe	101
2. Méthode	101
a) Lyse cellulaire	101
b) Déprotéination	101
c) Dosage en plaque	102
d) Analyse des données	102
D. DOSAGE DU LACTATE ET DU GLUCOSE	102
1. Principe	102
a) Dosage du glucose	102
b) Dosage du lactate	102
2. Méthode	103

VI.	BIOLOGIE MOLECULAIRE.....	103
A.	EXTRACTION DES ARN TOTAUX.....	103
1.	<i>Principe</i>	103
2.	<i>Méthode</i>	103
a)	<i>Récupération des cellules</i>	103
b)	<i>Extraction des ARN totaux</i>	103
B.	QUANTIFICATION ET ESTIMATION DE LA PURETE DES ARN.....	104
C.	PRECIPITATION DE L'ARN PAR DE L'ETHANOL.....	104
D.	ESTIMATION DE LA QUALITE DES ARN.....	104
E.	TRAITEMENT DES ARN TOTAUX A LA DNASE.....	105
F.	ANALYSE SUR PUCES.....	105
G.	RT-QPCR QUANTITATIVE SYBR GREEN.....	106
1.	<i>Principe</i>	106
2.	<i>Retro-transcription</i>	106
3.	<i>qPCR SYBR® green</i>	106
4.	<i>Analyse</i>	108
H.	RT-PCR QUANTITATIVE TAQMAN.....	109
1.	<i>Principe</i>	109
2.	<i>Retro-transcription avec sonde tige-boucle</i>	110
3.	<i>qPCR en sonde Taqman</i>	110
VII.	ANALYSE STATISTIQUE.....	110
	CHAPITRE III : RESULTATS-DISCUSSION.....	111
	<i>Partie 1 : Effet de l'environnement de culture sur les caractéristiques et les propriétés fonctionnelles des CSM</i>	111
I.	PARTIE 1 : RESULTATS.....	111
A.	CONTROLE QUALITE DES CSM-GW ET CSM-MO AMPLIFIEES DANS LES 4 CONDITIONS DE CULTURE.....	111
1.	<i>Adhésion au plastique des CSM-GW et CSM-MO amplifiées dans les 4 conditions de culture</i>	111
2.	<i>Immunophénotypage des CSM-GW et CSM-MO amplifiées dans les 4 conditions de culture</i>	112
3.	<i>Différenciation des CSM-GW et CSM-MO amplifiées dans les 4 conditions de culture</i>	112
B.	CLONOGENICITE DES CSM-GW ET CSM-MO.....	114
C.	PROPRIETES DE PROLIFERATION DES CSM-GW ET CSM-MO.....	114
D.	IMPLICATION DES FACTEURS DE CROISSANCE CONTENUS DANS LE LPH DANS LES PROPRIETES DE PROLIFERATION ET DE CLONOGENICITE DES CSM-GW.....	116
E.	TRANSFORMATION DES CSM-GW.....	117
F.	MORPHOLOGIE DES CSM-GW ET CSM-MO.....	118
G.	SENESCENCE DES CSM-GW ET CSM-MO.....	121
H.	PROPRIETES DE MIGRATION DES CSM EN FONCTION DES CONDITIONS DE CULTURE.....	122
I.	PROPRIETES IMMUNOSUPPRESSIVES DES CSM-GW ET CSM-MO.....	123
1.	<i>Immunosuppression : Test d'inhibition de la prolifération lymphocytaire par les CSM-GW et CSM-MO amplifiées dans les 4 conditions de culture</i>	123
2.	<i>Mécanismes impliqués dans l'immunosuppression des CSM-GW</i>	125
a)	<i>Apoptose des lymphocytes T</i>	125
b)	<i>Molécules impliquées dans l'inhibition de la prolifération des lymphocytes T</i>	126
c)	<i>Implication du facteur de transcription HIF-1α</i>	127
d)	<i>Implication du métabolisme des CSM-GW</i>	129
II.	PARTIE 1 : DISCUSSION.....	131

Table des matières

<i>Partie 2 : Recherche de biomarqueurs en lien avec la prolifération des CSM</i>	138
I. PARTIE 2 : RESULTATS	138
A. LES MARQUEURS DE SURFACE	138
1. Expression des marqueurs de surface dans les 4 conditions de culture.....	138
2. Lien entre l'expansion en LPH et l'expression des marqueurs de surface	142
B. LES MARQUEURS MOLECULAIRES	144
1. Contrôle qualité des ARN extraits.....	144
2. Les microARN.....	144
a) Analyse de l'expression différentielle des miARN sur puces dans les CSM-MO	144
b) Validation des variations de miARN par PCR quantitative Taqman dans les CSM-MO	146
c) Expression de miR-9 et miR-675 dans les CSM-GW	147
3. Analyse de l'expression des ARN messagers et longs ARN non codants.....	148
a) Analyse de l'expression différentielle des gènes sur puces Affymetrix	148
b) Validation des variations d'expression des ARNm par PCR quantitative.....	149
c) Expression d'ATP11B dans les CSM-GW	150
II. PARTIE 2 : DISCUSSION	152
<i>Partie 3 : Effet du contexte de stress oxydant et inflammatoire sur les propriétés fonctionnelles des CSM</i>	156
I. PARTIE 3 : RESULTATS	156
A. AGENTS PRO- ET ANTIOXYDANTS DANS LES CSM-GW	156
1. Production d'espèces de réactives de l'oxygène (ROS) intracellulaires par les CSM-GW cultivées en hypoxie et en normoxie	156
2. Production de ROS intracellulaires par les CSM-GW en sénescence répllicative	157
3. Les systèmes antioxydants.....	158
a) Dosage du glutathion réduit (GSH).....	158
b) Expression de l'enzyme de protection contre le stress oxydant SOD2	159
B. STIMULATION PAR H ₂ O ₂ 150 µM.....	160
1. Production de ROS intracellulaires.....	160
2. Prolifération	161
3. Apoptose.....	162
4. Sénescence.....	163
5. Mise en évidence des cassures de l'ADN et de l'expression de la SOD2 après stimulation par l'H ₂ O ₂ 150 µM	164
C. STIMULATION PAR L'IFN-γ A 50 ET 100 NG/ML	166
1. Production de ROS intracellulaires.....	166
2. Prolifération	167
3. Apoptose.....	168
4. Sénescence.....	169
D. COMPARAISON DE LA REPOSE DES CSM-GW A LA STIMULATION PAR L'H ₂ O ₂ ET PAR L'IFN-γ	170
E. EFFET DE LA STIMULATION PAR H ₂ O ₂ ET IFN-γ SUR LES PROPRIETES DE MIGRATION DES CSM-GW	171
F. EFFET DE LA STIMULATION PAR H ₂ O ₂ ET IFN-γ SUR LES PROPRIETES DE IMMUNOSUPPRESSIVES DES CSM-GW	172
G. EFFET DE LA STIMULATION PAR H ₂ O ₂ ET IFN-γ SUR LE METABOLISME DES CSM-GW : CONSOMMATION DE GLUCOSE ET PRODUCTION DE LACTATE	174
H. RESEAU MITOCHONDRIAL DES CSM-GW EN SENESCENCE INDUITE ET REPLICATIVE.....	175
II. PARTIE 3 : DISCUSSION	178
DISCUSSION GENERALE	183

Table des matières

CONCLUSION GENERALE-PERSPECTIVES.....	186
BIBLIOGRAPHIE	190
ANNEXES.....	210

Liste des publications et communications

I. Présentations orales

Charif N*, El Ouafy M, Ghannoum D, Notarantonio A-B, Li Y, Cauchois G, Stoltz J-F, Rubio M-T, de Isla N

Impact of *in vitro* expansion on immunomodulation properties of mesenchymal stem cells
9th International Symposium Europe China on Stem Cells and Regenerative Medicine, Oct 2019, Strasbourg, France.

Charif N*, El Ouafy M, Targa L, LIU X, Zeh Eto'O A-F, Roeder E, Cauchois G, Stoltz J-F, Olmos Eric, Behm-Asmant I, de Isla N

Impact of culture conditions on the behavior of mesenchymal stem cells: choosing critical parameters related to cell quality
8th International Symposium China-Europe Stem Cells and Regenerative Medicine, June 19-21 2018, Wuhan, China

Targa L, **Charif N**, Liu X, Fortunat Zeh Eto'o A, Kacem M, Cauchois G, Vincourt J-B, De Isla N.

Mesenchymal stem cells heterogeneity considering surface markers and senescence
8th International Symposium China-Europe Stem Cells and Regenerative Medicine, June 19-21 2018, Wuhan, China

De Isla N, Targa L, **Charif N**, Roeder E, Cauchois G, Stoltz J-F, Rubio M-T, Bensoussan D

Senescence of mesenchymal stem cells and its impact on clinical applications
8th International Symposium China-Europe Stem Cells and Regenerative Medicine, June 19-21 2018, Wuhan, China

Targa L, Li Y, **Charif N**, Mainard D, Bensoussan D, Stoltz J-F, De Isla N

Comprendre l'hétérogénéité des CSM pour des produits de thérapie cellulaire personnalisés
FR CNRS-UL 3209 Bioingénierie Moléculaire Cellulaire & Thérapeutique "La médecine personnalisée", December 15 2016, Vandœuvre-lès-Nancy, France

*Présentateur

II. Posters:

Charif N*, El Ouafy M, Ghannoum D, Cauchois G, Reppel L, de Isla N

Impact of culture conditions on the behavior of mesenchymal stromal/stem cells: choosing critical parameters related to cell quality and immunomodulation properties
International Society for Cell and Gene Therapy, May 2020, Paris, France. Cytotherapy, 22 (5), pp.S74-S75, 2020, Supplement.

El Ouafy M, Ghannoum D, **Charif N**, Cauchois G, Notarantonio A-B, Rubio M-T, de Isla N

Evaluation of the therapeutic potential of mesenchymal stromal cells during *in vitro* production: search for markers related to immunomodulatory properties

International Society Cell and Gene Therapy, May 2020, Paris, France. *Cytotherapy*, 22 (5), pp.S80-S81, 2020, Supplement.

Ghannoum D, Roeder E, El Ouafy M, Cauchois G, **Charif N**, de Isla N
Evaluation of fetal mesenchymal stromal/stem cells senescence during in vitro amplification for therapeutic purpose: choice of cell quality parameters
International Society for Cellular and Gene Therapy, May 2020, Paris, France. Cytotherapy, 22 (5), pp.S85, 2020, Supplement.

Targa L, **Charif N**, Cauchois G, Stoltz J-F, Vincourt J-B, De Isla N
Replicative senescent bone marrow mesenchymal stem cells spotting by surface protein expression
ICSA Conference "The ins and outs of cellular senescence", May 16-19 2017, Paris, France

**Présentateur*

III. Publications

Charif N, El Ouafy M, Targa L, Cauchois G, Guedon E, Reppel L, Ghannoum D, de Isla N
Effect of culture conditions on mesenchymal stromal cells expansion, senescence and functionality: implications on clinical applications
Article soumis dans Stem Cells translational medicine

Li Y*, **Charif N***, Targa L, Mainard D, Toupance S, Cauchois G, Stoltz J-F, Behm-Asmant I, Li Y, de Isla N
Human bone marrow mesenchymal stromal cells from elderly donors show heterogeneity in proliferation capacity related to senescence and alteration of their surface phenotype
Soumis dans World Journal of Stem Cells
**Co-premiers auteurs*

Charif N, Li Y, Targa L, ZHANG L, Li Y, Mainard D, Stoltz J-F, de Isla N
Higher Proliferative Potential of Human Mesenchymal Stromal Cells from Wharton's Jelly Compared to Bone Marrow Is Linked to Decreased Senescence
Biomedical and Health Research; Stem Cells and Regenerative Medicine (2019) V79

Schiavi J, Reppel L, **Charif N**, de Isla N, Mainard D, Benkirane-Jessel N, Stoltz J-F, Rahouadj R, Huselstein C
Mechanical stimulations on human bone marrow mesenchymal stem cells enhance cells differentiation in a three-dimensional layered scaffold
Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine, John Wiley & Sons Ltd., 2017, 12 (2), pp.360 - 369.

Charif N, Li Y, Targa L, Zhang L, Ye J, Li Y, Stoltz J, Han H, De Isla N
Aging of bone marrow mesenchymal stromal / stem cells: Implications on autologous regenerative medicine
Bio-Medical Materials and Engineering (2017) 28(s1)

Liste des abréviations

A : différenciation adipocytaire
ABL : protéine ABeLson
ADN : Acide DésoxyriboNucléique
AMM : Autorisation de Mise sur le Marché
AOPP : Advanced Oxydation Protein Products
APC : AlloPhycoCyanin
APE1/Ref-1 : Apurinic/aprimidinic Endonuclease1/Redox factor-1
ARN : Acide RiboNucléique
ARE : Antioxydant Responsive Element
ATP : Adénosine triphosphate
ATP11B : ATPase Phospholipid Transporting 11B
ARNm : ARN messenger
 β -gal : β -galactosidase
bFGF : basic Fibroblast Growth Factor-Facteur de croissance fibroblastique de base
BPF : Bonnes Pratiques de Fabrication
BSA : Bovine Serum Albumine
BV : Brillant Violet
C : Différenciation chondrocytaire
 ϕ : Cellule
CD : Cluster de Différenciation-Cluster of Differentiation
CCL : Chemokine Ligand
CFSE : Ester Succinimidyle de CarboxyFluorescéine
CFU-f : Colony Forming Unit fibroblast
CHRU : Centre hospitalier régional universitaire
Cm² : centimètre carré
CMH : Complexe Majeur d'Histocompatibilité
cm² : centimètre carré
COT : service de Chirurgie Orthopédique et Traumatologique
COX-1 et COX-2 : Cyclooxygenase 1 et 2
CPA : Cellules Présentatrices d'Antigène
CS : Cellule Souche
CSC : Cellule Souche Cancéreuse
CSE : Cellule Souche Embryonnaire
CSH : Cellule Souche Hématopoïétique
CSM : Cellule Stromale/Souche Mésoenchymateuse
CSM-GW : Cellule Stromale/Souche Mésoenchymateuse de Gelée de Wharton
CSM-MO : Cellule Stromale/Souche Mésoenchymateuse de Moelle Osseuse
CSM-TA : CSM de tissus adipeux
CT : Cycle Threshold
CTV : Cell Trace Violet

CXCR : Chemokine (C-X-C motif) Receptor
DFO : deferoxamine mesylate
DMLA : Dégénérescence Maculaire Liée à l'Âge
DMOG : dimethyloxaloylglycine
E3 UL : E3-ubiquitin ligase
EBMT : European Society for Blood and Marrow Transplantation
EGF : Epidermal Growth Factor-Facteur de croissance épidermique
ELISA : Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
EPHE : école pratique de hautes études
ERA/RNS : Espèces Réactives de l'Azote
ERO/ROS : Espèces Réactives de l'Oxygène
Em : émission
Ex : excitation
FITC : Isothiocyanate fluorescein
FoxO : Forkhead box O
FSC : Forward Scatter Channel
GAM : GSH Assay Mixture
 γ -H2AX : gamma-H2A histone family member X
GPX : Glutathion Peroxydase
GSH : Glutathion réduit
GSSG : Glutathion oxydé
GVHD : Graft-Versus-Host Disease
GVL : Graft Versus Leukemia
H : hypoxie
HIF-1 α : Hypoxoxia Inducible Factor -1 α
HIF-1 β : Hypoxoxia Inducible Factor -1 β
HRE : Hypoxia Response Element
HLA : Human Leucocyte Antigen
HGF : Hepatocyte Growth Factor
H₂O₂ : peroxyde d'hydrogène
HSP : Heat Shock Protein
IDO-1 : Indoleamine 2,3-dioxygenase-1
IL : Interleukine
IgG : Immunoglobulin G
IGF : Insuline-like Growth Factor-Facteur de croissance insuline-like
IMF : intensité moyenne de fluorescence
IP : Iodure de Propidium
iPS : induced Pluripotent Stem cell/ Cellule souche pluripotente induite
ISCT : International Society for Cellular Therapy
JAK : JAnus Kinase
JNK : voie de signalization (c-Jun NH(2)-terminal kinase)
 λ : lamda, longueur d'onde
LB : Lymphocytes B
lncRNA : long ARN non codant, « long non coding RNA »

LIH : Laboratoire Institute of Health
LPH : Lysat Plaquettaire Humain
LRGP : Laboratoire Réactions et Génie des Procédés
LT : Lymphocyte T
LTh17 : LT helper 17
LTreg : LT régulateurs
LRGP : Laboratoire de Réactions et Génie des Procédés
min : minutes
miR : miRNA, miARN : microARN
mL : millilitre
MMP : Métalloprotéinase Matricielle
MTI : Médicament de Thérapie Innovante
MTI-PP : MTI Préparé Ponctuellement
N : normoxie
N.C. : non concerné
NO : Oxyde Nitrique
NO₂⁻ : nitrites
NO₃⁻ : nitrate
NOX : NADPH oxidase
NRF2 : Nuclear actor Erythroid 2-Related Factor 2
O/N : over night
ONOO⁻ : peroxyne nitrite
OS : Stress Oxydant
PBMC : Peripheral Blood Mononuclear Cell, cellules périphériques du sang total
PD : Population Doubling
PDGF : Platelet Derived Growth Factor-Facteur de croissance dérivé des plaquettes
PD-1: Programmed cell Death -1
PD-L1/PD-L2 : Programmed cell Death Ligand 1/2
PE :R-Phycoerythrin
PeCy7 :R-phycoerythrin and Cyanin 7 tandem
PercpCy5.5 : Percp and Cyanin 5.5 tandem
PG : Prostaglandine
PGE2 : Prostaglandine E2
PGES : Prostaglandin E Synthase
PHD : Prolyl Hydroxylase
PPAR- γ : Peroxisome Proliferator-Activated Receptor- γ
PS : PhosphatidylSérine
qPCR : quantitative Polymerase Chain Reaction
RNS : Reactiv Nitrogen Species (RNS) ou Espèces réactives de l'Oxygène (ERA)
ROS : Reactiv Oxygen Species (ROS) ou Espèces réactives de l'Oxygène (ERO)
RP29 : Ribosomal Protein 29
RT : Reverse Transcriptase
SASP : Senescence-Associated Secretory Phenotype
SCAP : Stem Cells from the Apical Papilla

Listes des abréviations

SDRA : Syndrome de Détresse Respiratoire Aiguë
sHLA : soluble Human Leukocyte Antigen
SOD : SuperOxyde Sismutase
STAT1 : Signal Transducer and Activator of Transcription 1
STF-1 : Stromal Derived Factor-1
MO : Moelle Osseuse
MRUN : Maternité Régionale Universitaire de Nancy
MSL : milieu de Séparation des Lymphocytes
O : différenciation ostéocytaire
P : passage
PDGF : Platelet Derived Growth Factor
PD-L1 : Programmed Death-Ligand 1
pré-ARNm : pré ARN messenger
PS : PhosphatidylSérine
SDF-1 : stromal cell-derived factors 1
snoRNA : small nuclear RNA
SOFA : Sequential Organ Failure Assesment
SSC : Side Scatter Channel
SVF : Sérum de veau fœtal
TA : Température Ambiante
TLR : Toll-like receptors
TGF- β 1 : Transforming growth factor beta 1
TGAM : Total Glutathione Assay Mixture
TGF- β 1 : Transforming Growth Factor
TGI : Thiol Green Indicator
TNF :Tumor Necrosis Factor
TNT : Tunneling Nanotube
Tm : melting temperature ou température de fusion
TSG-6 : TNF- stimulated gene 6 protein
UsnRNA : Usmall nuclear RNA
UTCT : Unité de Thérapie Cellulaire et banque de Tissus
VCAM-1 : Vascular Cell Adhesion Molecule-1
VHL : Von Hippel-Lindau

Liste des figures

Figure 1 : Les différents types de cellules souches (Bréchet C, 2002)	26
Figure 2 : FoxO1 et la régulation de la pluripotence (Rimmelé et al., 2012)	28
Figure 3 : Représentation schématique de la niche hématopoïétique au niveau de la moelle osseuse (Lataillade et al., 2010)	29
Figure 4 : Numérisation de CFU obtenues CSM-MO à passage 3 (<i>Résultats personnels</i>)	32
Figure 5 : Les différentes sources de CSM d'après www.cancerlink.ru/en/mesenchymalstem.html	33
Figure 6 : Schéma de différenciation des CSM humaines de moelle osseuse (Singer and Caplan, 2011)	34
Figure 7 : Schéma récapitulatif des mécanismes de « homing » des CSM vers le site de lésion d'après (Yagi et al., 2010)	36
Figure 8 : Effet des CSM sur les cellules de l'immunité innée (Ménard and Tarte, 2011)	38
Figure 9 : Effet des CSM sur les cellules de l'immunité adaptative (Ménard and Tarte, 2011)	39
Figure 10 : Activation des lymphocytes T par les cellules présentatrices d'antigènes d'après (Escors et al., 2013)	41
Figure 11 : Polarisation des CSM en phénotype pro- et anti-inflammatoire d'après (Bernardo and Fibbe, 2013; Waterman et al., 2012)	44
Figure 12 : Interaction entre les CSM et les monocytes : Balance entre la polarisation de monocytes vers les macrophages M1 et M2 d'après (Bernardo and Fibbe, 2013)	45
Figure 13 : Schéma du principe de l'ingénierie tissulaire à partir de cellules autologues (George, 2009)	48
Figure 14 : Schéma du principe de la thérapie cellulaire	49
Figure 15 : Essais cliniques à base de CSM en 2020 d'après (Juárez-Navarro et al., 2020)	50
Figure 16 : Les différentes étapes et contrôles qualités à réaliser lors de la production de CSM-GW et CSM-MO en conditions de grade clinique existants ou en développement (Laroye et al., 2019)	52
Figure 17 : Comparaison du mode de préparation du SVF et du LPH (Hemeda et al., 2014)	53
Figure 18 : Les différentes méthodes d'obtention d'unités/concentrés plaquettaires	55
Figure 19 : Régulation de la transcription par HIF-1 α en conditions de normoxie et d'hypoxie	57
Figure 20 : Biogenèse des microARN d'après (Filipowicz et al., 2008; Jardin et al., 2008; Swarbrick et al., 2019)	61
Figure 21 : Les différents stimuli pouvant induire la sénescence (Coppé et al., 2010)	64
Figure 22 : Effet du phénotype sénescence sur la fonctionnalité des CSM humaines d'après (Turinetti et al., 2016)	65
Figure 23 : Production mitochondriale et prise en charge de l'anion superoxyde d'après Carrière et al, 2006	67
Figure 24 : Les différentes sources de ROS et RNS intracellulaires et mécanismes de défense d'après (Curtin et al., 2002; Wang et al., 2013)	68
Figure 25 : Oxydation réversible et irréversible des groupements thiols des protéines d'après (Ren et al., 2015)	70
Figure 26 : Représentation schématique de la chaîne de transports des électrons, fonction du complexe III d'après (Curtin et al., 2002; Guzy and Schumacker, 2006)	74

Figure 27 : Schéma récapitulatif des différents paramètres qui sont étudiés durant l'expansion <i>in vitro</i> des CSM.....	81
Figure 28 : Schéma de principe du test de sénescence : expression de l'enzyme β -galactosidase (Adapté à partir de Dimri et al., 1995)	87
Figure 29 : Schéma du principe de la cytométrie en flux	89
Figure 30 : Schéma de principe du test d'apoptose à l'annexine V (www.biomol.de)	91
Figure 31 : Principe du dosage des ROS intracellulaires basé sur l'utilisation de la sonde CM-H ₂ DCFDA par cytométrie en flux d'après (Curtin et al., 2002).....	92
Figure 32 : Principe du test fonctionnel de migration.....	93
Figure 33 : Test fonctionnel d'activation lymphocytaire : Principe et stratégie de gating pour l'analyse des résultats	94
Figure 34 : Schéma de principe du dosage du glutathion réduit (GSH) et du glutathion oxydé (GSSG)	101
Figure 35 : Résultats d'analyse d'échantillon d'ARN par l'appareil Agilent 2100 Bioanalyzer (AGILENT TECHNOLOGIES)	105
Figure 36 : Etapes de la qPCR en temps réel d'après le logiciel « Stepone Software V2.1 »	107
Figure 37 : Programme de la « courbe de fusion » d'après le logiciel « Stepone Software V2.1 ». ...	108
Figure 38 : Principe de la détection des miR par PCR en temps réel par la méthode Taqman.....	109
Figure 39 : Critères de l'ISCT des CSM-GW et CSM-MO amplifiées dans les 4 conditions de culture	113
Figure 40 : Clonogénicité des CSM-GW et CSM-MO amplifiées dans les 4 conditions de culture	114
Figure 41 : Prolifération des CSM-GW et des CSM-MO amplifiées dans les 4 conditions de culture.	115
Figure 42 : Prolifération et clonogénicité des CSM-GW amplifiées en LPH en présence d'anticorps neutralisants.....	117
Figure 43 : Morphologie des CSM-GW et CSM-MO amplifiées dans les 4 conditions de culture.....	119
Figure 44 : Marquage immunofluorescent du cytosquelette d'actine, des microtubules et du noyau au DAPI des CSM -GW amplifiées dans les 4 conditions de culture.....	120
Figure 45 : Marquage immunofluorescent des microtubules, des fibres d'actine à la phalloïdine couplée à l'Alexa 488 et du noyau au DAPI des CSM -GW amplifiées dans les 4 conditions de culture	121
Figure 46 : Sénescence des CSM-GW et CSM-MO amplifiées dans les 4 conditions de culture.....	122
Figure 47 : Migration des CSM-GW et CSM-MO amplifiées dans les 4 conditions de culture.....	123
Figure 48 : Immunosuppression des CSM-GW et CSM-MO amplifiées dans les 4 conditions de culture	124
Figure 49 : Molécules impliquées dans la mort et l'inhibition de la prolifération des lymphocytes T activés.....	125
Figure 50 : Expression des ARNm des molécules impliquées dans l'inhibition de la prolifération des lymphocytes T dans les CMS-GW	126
Figure 51 : Marquage immunofluorescent de HIF-1 α et à la phalloïdine couplée à l'Alexa 488 des fibres d'actine et immunosuppression après des traitements modulant l'action et/ou la localisation de HIF-1 α	128
Figure 52 : Métabolisme et immunosuppression des CSM-GW	129
Figure 53 : Schéma récapitulatif des résultats obtenus dans la partie 1	137
Figure 54 : Expression des marqueurs de surface (en % de cellules positives) dans les CSM-GW et CSM-MO amplifiées dans les 4 conditions de culture.....	140

Figure 55 : Expression des marqueurs de surface (en ratio d'Intensité Médiane de Fluorescence ou IMF) dans les CSM-GW et CSM-MO amplifiées dans les 4 conditions de culture.....	141
Figure 56 : Comparaison des ratios d'IMF des marqueurs de surface dans les CSM-GW et CSM-MO amplifiées avec du LPH versus SVF.....	143
Figure 57 : Expression différentielle de miARN dans les Cellules Stromales Souches Mésoenchymateuses de moelle osseuse (CSM-MO) provenant de donneurs âgés (n=3) versus jeunes (n=3) à passage 1.....	145
Figure 58 : Top 20 des miARNs sur- et sous -exprimés dans les Cellules Stromales Souches Mésoenchymateuses de moelle osseuse (CSM-MO) provenant de donneurs âgés (n=3) versus jeunes (n=3) à passage 1.....	146
Figure 59 : Expression de miR-9 et miR-675 par RT-PCR Taqman dans les Cellules Stromales Souches Mésoenchymateuses de moelle osseuse (CSM-MO) provenant de donneurs âgés versus jeunes à passage 1.....	147
Figure 60 : Expression de miR-9 et miR-675 par RT-PCR Taqman dans les Cellules Stromales Souches Mésoenchymateuses de gelée de Wharton (CSM-GW) comparée aux CSM de moelle osseuse (CSM-MO) provenant de donneurs âgés versus jeunes à passage 1.....	148
Figure 61 : Expression de l'ARNm ATP11B par RT-PCR SYBR-green dans les Cellules Stromales Souches Mésoenchymateuses de moelle osseuse (CSM-MO) provenant de donneurs âgés versus jeunes à passage 1.....	150
Figure 62 : Expression de l'ARNm ATP11B par RT-PCR SYBR-green dans les Cellules Stromales Souches Mésoenchymateuses de gelée de Wharton (CSM-GW) et de moelle osseuse (CSM-MO) provenant de donneurs âgés versus jeunes à passage 1.....	151
Figure 63 : Schéma récapitulatif des principaux résultats obtenus dans la partie 2	155
Figure 64 : Production d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) intracellulaires dans les CSM-GW amplifiées à passage précoce en hypoxie et en normoxie.....	157
Figure 65 : Production d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) intracellulaires dans les CSM-GW amplifiées en hypoxie et normoxie à passage tardif (sénescence répllicative) versus précoce.....	158
Figure 66 : Dosage du glutathion réduit (GSH) dans les CSM-GW amplifiées avec du lysat plaquettaire humain (LPH) à passage précoce en hypoxie et normoxie	159
Figure 67 : Expression de la superoxyde dismutase 2 (SOD2) dans les CSM-GW amplifiées avec du lysat plaquettaire humain (LPH) à passage précoce en normoxie et hypoxie.....	160
Figure 68 : Production d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) intracellulaires dans les CSM-GW amplifiées en normoxie et hypoxie : sonde CM-H ₂ DCFDA.....	161
Figure 69 : Effet de la stimulation par du peroxyde d'hydrogène sur la prolifération des CSM-GW amplifiées en normoxie et en hypoxie avec du lysat plaquettaire humain (LPH) à passage précoce	162
Figure 70 : Effet de la stimulation par du peroxyde d'hydrogène sur l'apoptose des CSM-GW amplifiées en normoxie et en hypoxie avec du lysat plaquettaire humain (LPH) à passage précoce	163
Figure 71 : Effet de la stimulation par du peroxyde d'hydrogène sur la sénescence des CSM-GW amplifiées en normoxie et en hypoxie avec du lysat plaquettaire humain (LPH) à passage précoce	164
Figure 72 : Mise en évidence de cassures de l'ADN (γ -H2AX : gamma H2A histone family member X) et de l'expression de la superoxyde dismutase 2 (SOD2) dans les CSM-GW amplifiées avec du lysat plaquettaire humain (LPH) à passage précoce en normoxie et hypoxie après stimulation par H ₂ O ₂ à 150 μ M	165
Figure 73 : Contrôle de l'effet de la stimulation par de l'interféron- γ sur la production de ROS intracellulaires par les CSM-GW à passage précoce	167

Figure 74 : Contrôle de l'effet de la stimulation des CSM-GW par de l'interféron- γ sur la prolifération à passage précoce	167
Figure 75 : Contrôle de l'effet de la stimulation par de l'interféron- γ l'apoptose des CSM-GW à passage précoce	168
Figure 76 : Contrôle de l'effet de la stimulation par de l'interféron- γ sur la sénescence des CSM-GW à passage précoce	169
Figure 77 : Production de ROS intracellulaires par les CSM-GW amplifiées en normoxie et en hypoxie avec du lysat plaquettaire humain (LPH) stimulées par de l'interféron- γ ou du peroxyde d'hydrogène	171
Figure 78 : Propriétés de migration des CSM-GW amplifiées avec du lysat plaquettaire humain (LPH) à passage précoce en normoxie (N) et hypoxie (H) après stimulation par H_2O_2 à 150 μ M et IFN- γ (50 et 100 ng/mL)	172
Figure 79 : Effet de la stimulation par H_2O_2 à 150 μ M et IFN- γ (50 et 100 ng/mL) des CSM-GW amplifiées avec du lysat plaquettaire humain (LPH) en normoxie (N) et hypoxie (H) sur les propriétés d'inhibition de la prolifération des LT CD4 activés.....	173
Figure 80 : Consommation du glucose et production de lactate par les CSM-GW amplifiées avec du lysat plaquettaire humain (LPH) à passage précoce en normoxie et hypoxie après stimulation par H_2O_2 à 150 μ M et IFN- γ (50 et 100 ng/mL).....	175
Figure 81 : Images en microscopie de fluorescence montrant les filaments d'actine, cytochrome C et les noyaux dans les CSM-GW amplifiées avec du lysat plaquettaire humain (LPH) à passage précoce, en sénescence induite par H_2O_2 à 150 μ M et en sénescence répllicative en normoxie et en hypoxie	176
Figure 82 : Schéma récapitulatif des principaux résultats obtenus dans la partie 3	182
Figure 83 : Schéma récapitulatif de conclusion générale et perspectives	189

Liste des tableaux

Tableau 1 : Liste des principaux marqueurs de surface exprimés ou non par les CSM de moelle osseuse humaine.....	33
Tableau 2 : Résumé des critères minimums permettant l'identification des CSM (Dominici et al., 2006).....	34
Tableau 3 : Principaux points communs entre les CSM de moelle osseuse (CSM-MO) et de gelée de Wharton (CSM-GW)	35
Tableau 4 : Principales différences entre les CSM de moelle osseuse (CSM-MO) et de gelée de Wharton (CSM-GW)	35
Tableau 5 : Comparaison des paramètres biochimiques entre le LPH et le SVF d'après (Shanskii et al., 2013).....	54
Tableau 6 : Concentrations en facteurs de croissance dans le LPH et le SVF d'après (Doucet et al., 2005; Shanskii et al., 2013).....	55
Tableau 7 : Liste de marqueurs de surface potentiels pour sélectionner les CSM	59
Tableau 8 : Composition du milieu de culture des CSM.....	80
Tableau 9 : Liste des prélèvements utilisés dans ce travail.....	80
Tableau 10 : Liste des anticorps bloquants	83
Tableau 11 : Composition du milieu de différenciation adipocytaire (A)	84
Tableau 12 : Composition du milieu de différenciation ostéocytaire (O)	84
Tableau 13 : Composition du milieu de différenciation chondrocytaire (C)	84
Tableau 14 : Protocole de coloration Bleu Alcian	86
Tableau 15 : Liste des anticorps et marqueurs de viabilité utilisés pour le phénotypage	90
Tableau 16 : Liste des combinaisons d'anticorps pour le phénotypage	90
Tableau 17 : Composition du milieu complet dit de « co-culture »	95
Tableau 18 : Liste des anticorps utilisés pour révéler la co-culture	96
Tableau 19 : Liste des anticorps et marqueurs utilisés pour les marquages immunofluorescents	98
Tableau 20 : Liste des séquences des amorces utilisées lors de la PCR quantitative et synthétisées par la société Eurogentec (Angers, France)	107
Tableau 21 : Temps de doublement des CSM-GW et CSM-MO amplifiées dans les 4 conditions de culture	116
Tableau 22 : Transformation des CSM-GW amplifiées dans les 4 conditions de culture	118
Tableau 23 : Tableau récapitulatif des résultats obtenus dans la partie 1 concernant l'effet des conditions de culture sur le comportement des CSM-GW et CSM-MO.....	130
Tableau 24 : Tableau de l'analyse de l'expression différentielle sur puces Affymetrix des gènes de Cellules Stromales Souches Mésoenchymateuses de moelle osseuse (CSM-MO) provenant de donneurs âgés (n=3) versus jeunes (n=3) à passage 1	149
Tableau 25 : Tableau récapitulatif des principaux résultats de la partie 2 concernant l'expression de marqueurs de surface et moléculaires dans les CSM-GW et CSM-MO	151
Tableau 26 : Récapitulatif de la comparaison des résultats obtenus après stimulation des CSM-GW par l'H ₂ O ₂ 150 µM et par l'IFN-γ à 50 et 100 ng/mL par rapport aux CSM-GW non stimulées	177

Introduction générale

Les cellules souches/stromales mésenchymateuses (CSM) sont des cellules multipotentes qui ont des capacités d'autorenouvellement et se différencient en cellules spécifiques de certains organes d'origine mésodermique. Les CSM peuvent être isolées à partir de tissus adultes (moelle osseuse, tissu adipeux...) et fœtaux (cordon ombilical, placenta...) et participent activement à l'homéostasie tissulaire grâce à leur capacité à régénérer les tissus.

Les CSM ont un certain profil d'expression d'antigènes de surface mais il n'existe, à ce jour, aucun marqueur spécifique pour les identifier. De plus, les CSM sont peu immunogènes et ont des **propriétés fonctionnelles** intéressantes telles que les propriétés de **homing/migration** et les propriétés **d'immunomodulatrices** liées à la production de facteurs solubles inductibles. Ces propriétés fonctionnelles confèrent aux CSM un réel intérêt thérapeutique et font qu'elles sont considérées aujourd'hui comme médicament de thérapie innovante (MTI). C'est pourquoi des essais cliniques basés sur l'utilisation des **CSM en thérapie cellulaire** sont en cours, notamment dans le cadre de pathologies telles que **le syndrome de détresse respiratoire aiguë (SDRA)** une des complications graves de la Covid-19 ou la **maladie du greffon contre l'hôte** ou « **Graft-Versus-Host Disease** » (**GVHD**).

Néanmoins, l'obtention d'un produit de thérapie cellulaire à base de CSM dans un contexte allogénique ou en situation autologue nécessite une étape préalable d'expansion *in vitro* qui peut affecter la qualité des CSM et qui nécessite d'être contrôlée afin de ne pas impacter l'efficacité thérapeutique. Par ailleurs, il existe des paramètres propres au donneur qui peuvent affecter la qualité des cellules. Enfin, le **contexte de stress oxydant** est un troisième paramètre à prendre en compte. Il peut être induit par l'expansion *in vitro* (*i*), et est également associé au **contexte inflammatoire** retrouvé au niveau du patient, chez qui les CSM seront injectées. Ce projet de thèse abordera différents aspects en lien avec l'utilisation des CSM en thérapie cellulaire : leur expansion *in vitro*, la recherche des marqueurs de leur qualité et l'étude des facteurs impactant leurs propriétés fonctionnelles.

L'introduction bibliographique de ce manuscrit dressera l'état des connaissances quant aux propriétés des CSM et leur utilisation en thérapie cellulaire. Elle sera suivie de la présentation des différents objectifs de ce travail de thèse, puis d'un chapitre méthodologique décrivant les matériels, les méthodes ainsi que les principes des techniques utilisés lors de ce travail. Le troisième chapitre comportera 3 parties contenant chacune les résultats et la discussion correspondante. Ces parties permettront de répondre aux 3 objectifs de la thèse. Puis, une discussion générale sur le projet de thèse sera présentée avant la conclusion et les perspectives de ce travail. Enfin, les références bibliographiques qui ont permis d'argumenter ce travail seront listées.

Chapitre I : Etat de l'art

I. Les cellules souches

Les « Cellules Souches » (CS) sont des cellules indifférenciées caractérisées par deux propriétés essentielles : l'**autorenewement** ou capacité à se diviser à l'identique *in vitro* sans perdre leur caractère indifférencié (i), et la **différenciation** en cellules spécialisées (ii) dans un environnement donné. Elles peuvent être originaires de l'embryon, du fœtus ou de tissus adultes. Cependant, toutes les CS ne disposent pas du même potentiel de différenciation (*Figure 1*).

De plus, la majorité des cellules souches adultes sont maintenues dans un état de quiescence caractérisé par une activité métabolique et un besoin en facteurs de croissance réduit (Rimmelé et al., 2012). L'hypothèse que la quiescence des CS les protégerait de potentielles agressions qui les endommageraient et leur permettrait de remplir leurs fonctions tout au long de la vie n'a toujours pas été vérifiée. Cependant, il est clairement établi qu'une balance finement régulée entre quiescence et progression dans le cycle cellulaire assure le maintien du pool de cellules souches et une production adéquate des lignages différenciés (Rimmelé et al., 2012).

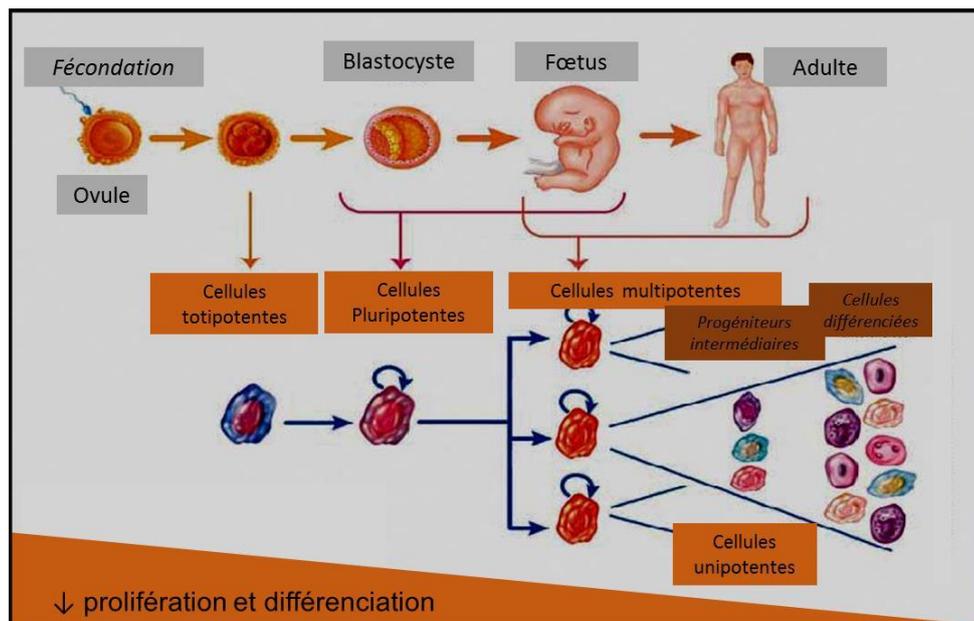


Figure 1 : Les différents types de cellules souches (Bréchet C, 2002)

Un destin qui s'affirme par étapes. Au cours du développement embryonnaire précoce, les cellules souches embryonnaires du blastocyste, pluripotentes, donnent naissance à trois feuillets embryonnaires distincts -l'ectoderme, l'endoderme et le mésoderme- recelant des cellules souches multipotentes à l'origine des différentes cellules différenciées.

Selon leur capacité de différenciation quatre groupes des cellules souches peuvent être définies : les **CS totipotentes (i)**, **pluripotentes (ii)**, **multipotentes (iii)** et **unipotentes (iv)**.

A. Les cellules souches totipotentes

Les CS totipotentes sont capables de donner naissance à un organisme entier. En effet ces cellules ont la capacité de se différencier en cellules des 3 feuillets embryonnaires (endoderme, mésoderme, ectoderme) ainsi que de former des annexes embryonnaires (vésicule vitelline, amnios, membrane

séreuse, chorion, ...), soit jusque 4 jours après la fécondation. De plus, ces cellules ne sont observées que du stade zygote au stade morula (8-16 cellules) (Jacques Poirier et al., 2011). A savoir que pour des raisons d'éthique, ces cellules ne sont pas utilisées en médecine régénérative.

B. Les cellules souches pluripotentes

Les cellules souches pluripotentes sont capables de se différencier en cellules issues des 3 feuillets embryonnaires à l'exception des cellules issues des annexes embryonnaires. Ces cellules, présentes au niveau de la masse interne du blastocyste du 5^{ème} au 7^{ème} jour après la fécondation (Jacques Poirier et al., 2011), peuvent être isolées et constituent les **cellules souches embryonnaires (CSE)** (Thomson et al., 1998). D'autres cellules pluripotentes ont été obtenues de manière artificielle par reprogrammation de cellules somatiques adultes : les **cellules souches pluripotentes induites (iPS)** (Takahashi and Yamanaka, 2006; Takahashi et al., 2007).

1. Les cellules souches embryonnaires

Les CSE humaines isolées à partir de la masse interne du blastocyste conservent peu de temps leur caractère pluripotent *in vivo* car ces cellules se spécialisent dans les étapes suivantes de l'embryogénèse. Ainsi, des travaux de Thomson et al ont permis de développer des lignées de CSE capables de proliférer indéfiniment tout en conservant leur pluripotence *in vitro* (Thomson et al., 1998). Les CSE ont une forte activité télomérase directement liée à leur forte capacité de prolifération et une forte activité phosphatase alcaline. De plus, elles expriment des marqueurs de surface tels que SSEA3 et SSEA4 (Stage Specific Embryonic Antigens, qui sont des gangliosides) ou les clusters de différenciation CD133 et CD117 (Thomson et al., 1998).

Les CSE expriment également les gènes de pluripotence tels que Oct-3/4 (Octamer-binding transcription factor), Sox2 (SRX-box 2), Nanog, Klf4 (Krüppel-like factor 4) (Zhao et al., 2012).

Les CSE utilisées proviennent d'embryons surnuméraires créés dans le cadre d'une fécondation *in vitro* et ne faisant plus l'objet d'un projet parental (Thomson et al., 1998). En France, la loi de bioéthique de 2011 (Loi 2011-814 du 7 juillet 2011) interdisant l'utilisation de CSE humaines était assortie de dérogations pérennes dans des conditions très strictes (Reppel et al., 2012) dans un premier temps, puis la loi fut modifiée en août 2013 afin d'autoriser sous certaines conditions la recherche sur l'embryon et les CSE (Loi n° 2013-715 du 6 août 2013). Actuellement, la loi de bioéthique est en cours de révision afin d'être adoptée à l'assemblée nationale. Ce nouveau projet de loi devrait faciliter les recherches sur les CSE en distinguant le régime de recherches sur les CSE de celui propre à l'embryon (solidarité-santé.gouv.fr). Les CSE sont notamment utilisées dans le cadre de pathologies cardiaques. Une des premières applications cliniques a été réalisée à partir de cellules progénitrices cardiaques dérivées de CSE humaines intégrées dans un patch de fibrine afin de traiter un patient souffrant d'insuffisance cardiaque (Menasché et al., 2015). La faisabilité de la production en grade clinique de ces cellules progénitrices a ensuite été démontrée dans le cadre d'un essai clinique incluant 6 patients atteints d'insuffisance cardiaque (Menasché et al., 2018). L'utilisation des CSE en médecine régénérative présente des contraintes d'ordre éthique, c'est pourquoi certains travaux sont réalisés avec d'autres cellules pluripotentes telles que les cellules souches pluripotentes induites ou iPS (induced Pluripotent Stem cells) afin de comprendre les mécanismes régulateurs de la pluripotence.

2. Les cellules souches pluripotentes induites

Les iPS sont obtenues après reprogrammation de cellules somatiques adultes, telles que les fibroblastes grâce à des techniques de transfection permettant l'expression de facteurs de transcription tels que Oct3/4, Sox2, Myc-C, Klf-4, Nanog et Lin28 (Takahashi and Yamanaka, 2006; Takahashi et al., 2007). Ces iPS, d'abord obtenues à partir de cellules murines (Takahashi and Yamanaka, 2006), puis de cellules humaines (Takahashi et al., 2007), ont la capacité de proliférer indéfiniment en conservant leur pluripotence comme les CSE.

L'utilisation des iPS en ingénierie tissulaire et thérapie cellulaire nécessite un contrôle de leur intégrité génomique et notamment l'absence de mutations. Ces iPS ont pour la première fois été utilisées dans un essai clinique au Japon afin de traiter une patiente atteinte de dégénérescence maculaire liée à l'âge (DMLA) (Cyranoski, 2014b, 2014a). Par la suite, les auteurs ont été autorisés à utiliser ces iPS pour la première fois dans le cadre de pathologies cardiaques en clinique (Cyranoski, 2018). Par ailleurs, un essai clinique est en cours au Japon afin de traiter des cardiomyopathies ischémiques (www.clinicaltrials.gov, NCT04696328). Les iPS sont encore utilisées aujourd'hui dans le cadre d'essais cliniques, mais plus pour comprendre la contribution génétique dans certaines pathologies telles que la maladie de Parkinson, l'autisme ou autres en créant des modèles cellulaires d'iPS à partir de ces patients (www.clinicaltrials.gov, NCT04476225).

3. Les gènes de pluripotence

Les cellules souches pluripotentes expriment les gènes Oct4, Sox2 et Nanog. D'après la littérature, il y aurait un quatrième gène caractéristique des cellules souches pluripotentes : le gène FOXO1 (Rimmelé et al., 2012). En effet, le maintien de la pluripotence des cellules souches est possible grâce à une boucle formée par Oct4, Nanog, Sox2 et FOXO1 (Figure 2). Ce dernier facteur de transcription contrôle l'expression des gènes de pluripotence tels Oct4 et Sox2 par fixation sur leurs promoteurs. Ainsi, les facteurs de transcription FOXO sont importants pour le maintien des propriétés de cellules souches. L'expression des gènes de pluripotence Oct4 et Nanog a été mise en évidence également dans certaines cellules souches adultes (Rimmelé et al., 2012).

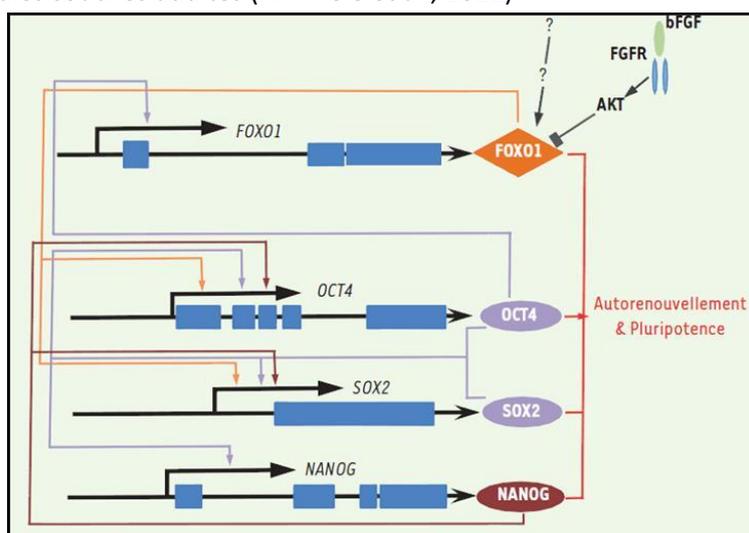


Figure 2 : FoxO1 et la régulation de la pluripotence (Rimmelé et al., 2012)

Le trio de facteurs de transcription OCT4, NANOG et SOX2 constitue la base du réseau transcriptionnel qui maintient la pluripotence et l'autorenouveaulement des cellules souches embryonnaires (CSE). Ces facteurs forment une boucle régulatrice contrôlant leur propre expression. FOXO1 a été identifié comme un membre de ce réseau : il contrôle directement l'expression des gènes pluripotents OCT4 et SOX2, occupant et activant leurs promoteurs respectifs. Le mécanisme de régulation de FOXO1 dans les CSE dépend notamment de la voie PI3K/AKT. Les exons sont représentés par des rectangles bleus.

C. Les cellules souches multipotentes

Les CS multipotentes sont des cellules ayant des capacités de différenciation en un nombre restreint de cellules appartenant à un seul feuillet embryonnaire (endoderme, mésoderme ou ectoderme) dont elles sont issues. Contrairement aux CS pluripotentes, ces cellules ont des capacités de différenciation plus restreintes et ne peuvent pas se multiplier indéfiniment *in vitro*. En effet, ces cellules entrent en sénescence après un certain nombre de réplifications *in vitro* (Heo et al., 2009). On distingue entre autres parmi les CS multipotentes adultes les **cellules souches hématopoïétiques (CSH)** et les **cellules stromales/souches mésenchymateuses (CSM)**. Ces deux types de CS multipotentes sont localisés dans des sites anatomiques particuliers appelés « niches ». Cette entité spatio-temporelle permet aux CS de se maintenir en quiescence et/ou de s'autorenouveler sous le contrôle de signaux cellulaires intrinsèques ou extrinsèques (Lataillade et al., 2010) (Figure 3).

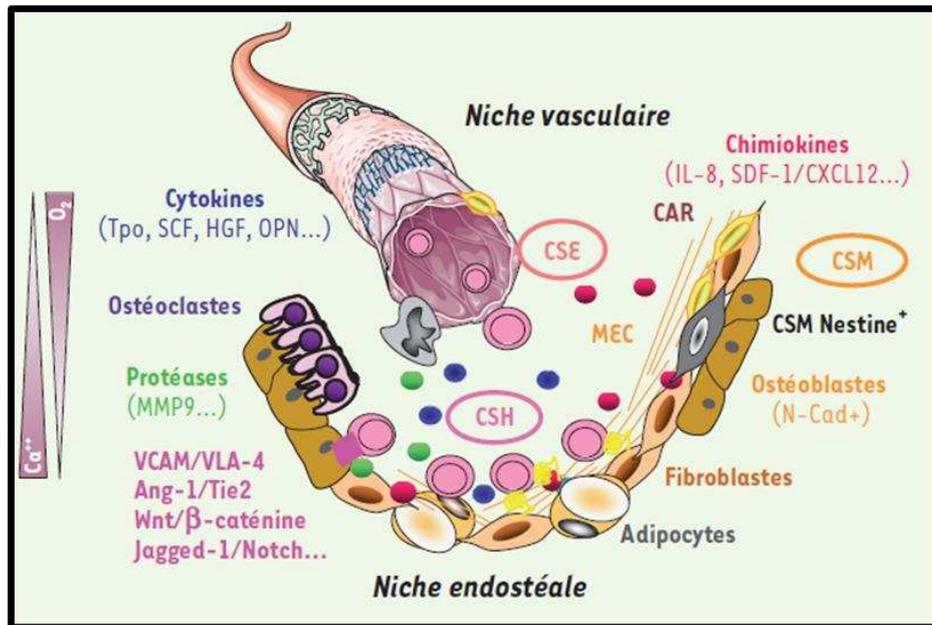


Figure 3 : Représentation schématique de la niche hématopoïétique au niveau de la moelle osseuse (Lataillade et al., 2010)

Les CSH entretiennent un dialogue constant avec leurs niches où elles sont régulées via des contacts directs avec différentes cellules stromales, ainsi que par des facteurs diffusibles et environnementaux. La niche endostéale, au contact de l'os, est majoritairement composée d'ostéoblastes et d'ostéoclastes, impliqués dans la résorption osseuse ainsi que de fibroblastes et d'adipocytes. La niche vasculaire consiste en un réseau de vaisseaux fenêtrés formés par des cellules endothéliales provenant de cellules souches endothéliales. **CSH** : cellule souche hématopoïétique ; **CSE** : cellule souche endothéliale ; **CSM** : cellule souche mésenchymateuse ; **MEC** : matrice extracellulaire ; **CAR** : **CXCL12** abondant reticular cells ; **N-Cad+** : N-cadhérine+ ; **MMP9** : membrane métalloprotéinase 9 ; **Ca** : calcium ; **O₂** : oxygène.

1. Les cellules souches hématopoïétiques

Les cellules souches hématopoïétiques (CSH) sont des cellules multipotentes pouvant se différencier en précurseurs myéloïdes ou lymphoïdes à l'origine des cellules sanguines (les globules rouges, les globules blancs et les plaquettes) permettant ainsi d'assurer l'homéostasie du tissu sanguin. Elles sont donc à l'origine de l'hématopoïèse, qui a lieu au niveau de la moelle osseuse (MO) chez l'adulte (niche hématopoïétique).

Ces cellules ont un certain profil d'expression d'antigènes de surface. Elles expriment les clusters de différenciation CD34, CD90, CD117 (c-kit), CD133 ou d'autres protéines telles que CXCR4 et VLA (4 et 5) et n'expriment pas les clusters de différenciation CD38 et CD10 (Chotinantakul and Leraanaksiri, 2012).

Ces cellules peuvent être obtenues à partir de sources adultes telles que la MO, dans laquelle les cellules CD34+ représentent un faible pourcentage des cellules mononuclées. Le sang périphérique peut également être envisagé comme une autre source adulte de CSH après avoir stimulé le donneur par des facteurs de croissance afin de mobiliser les CSH de la MO dans le sang périphérique. Aussi, il existe des sources fœtales telles que le sang de cordon (Wu et al., 1999).

2. Les cellules souches mésenchymateuses

Les cellules souches/stromales mésenchymateuses (CSM) sont des cellules multipotentes d'origine fœtale ou adulte qui ont des capacités d'autorenouvellement et qui se différencient en cellules spécifiques de certains organes d'origine mésodermique. Les caractéristiques de CSM sont détaillées plus bas.

3. Les cellules progénitrices multipotentes adultes (MAPC)

Les cellules progénitrices multipotentes adultes ou « multipotent adult progenitor cells » (MAPC) appartiennent à la famille des CSM et peuvent être isolées à partir de MO, du cœur ou du foie (Beltrami et al., 2007). Bien que les MAPC possèdent des propriétés d'adhérence au plastique et d'immunosuppression comme les CSM, elles présentent tout de même des différences au niveau des marqueurs de surface (i), de leur expansion (ii), de leur capacité de différenciation (iii), et de leur sécrétome (iv) (Ahangar et al., 2020; Khan and Newsome, 2019; Roobrouck et al., 2011). En effet, les MAPC peuvent être amplifiées plus longtemps *in vitro*. Par ailleurs, ces MAPC ont été utilisées dans des essais cliniques afin de traiter la maladie du greffon contre l'hôte (GVHD) ou l'ischémie cardiaque (www.clinicaltrials.gov : NCT00677859, NCT00677222).

D. Les cellules souches unipotentes

Les cellules souches unipotentes sont capables de s'auto-renouveler et peuvent se différencier en un seul type cellulaire. Ces cellules, localisées au niveau de différents tissus adultes tels que le foie, les gonades, les muscles, les épithéliums (muqueuse intestinale, cornée, peau, follicule pileux), permettent de renouveler les tissus des organes où elles se trouvent tout au long de la vie (Jacques Poirier et al., 2011). Par exemple, les cellules souches de l'épiderme situées dans la couche la plus profonde, au niveau de la couche basale, permettent le renouvellement des kératinocytes qui recouvrent la peau.

E. Les cellules souches cancéreuses

Les cellules souches cancéreuses (CSC) sont des cellules tumorales ayant des capacités d'autorenouvellement et de différenciation. En effet, les CSC peuvent reformer d'autres CSC lors du processus de division cellulaire et se différencier vers l'ensemble des composants cellulaires présents dans le tissu/organe en question (Felipe de Sousa E Melo et al., 2011). Une organisation hiérarchique tumorale similaire à celle de l'organe sain a pu être démontrée grâce à l'identification et l'isolement de CSC dans des carcinomes de sein ou pancréas (Felipe de Sousa E Melo et al., 2011). Bien que la théorie des CSC nécessite de mieux identifier les marqueurs souches de ces CSC, ces cellules pourraient être utilisées dans des stratégies thérapeutiques permettant de traiter le cancer. En effet, les CSC sont liées au développement tumoral, aux métastases et à la résistance thérapeutique (Babaei et al., 2021; Felipe de Sousa E Melo et al., 2011; Peiris-Pagès et al., 2016). L'une des stratégies thérapeutiques consisterait à forcer les CSC à se différencier et donc à être sensibles aux thérapies existantes telles que la chimiothérapie (Felipe de Sousa E Melo et al., 2011). Aussi les CSC seraient résistantes aux chimiothérapies grâce à l'autophagie (Babaei et al., 2021). Ce mécanisme aussi appelé autolyse ou

autophagocytose est un mécanisme physiologique qui permet le recyclage d'éléments d'organelles (péroxyosomes, réticulum endoplasmique, mitochondries) afin d'assurer le maintien de l'homéostasie *via* les lysosomes. Par ailleurs, beaucoup d'études rapportent que les CSC ont un métabolisme glycolytique, mais disposent d'une plasticité métabolique leur permettant de s'adapter à leur environnement. La mitochondrie *via* le métabolisme pourrait être ciblée en tant que thérapie (Peiris-Pagès et al., 2016).

II. Les cellules stromales/souches mésenchymateuses (CSM), définition et caractéristiques

A. Définition des CSM

Les cellules stromales/souches mésenchymateuses (CSM) sont des CS multipotentes provenant de tissus adultes ou fœtaux caractérisées par leur capacité à se différencier en cellules spécifiques de certains organes d'origine mésodermique. De plus, les CSM participent activement à l'homéostasie tissulaire grâce à leur capacité à régénérer les tissus. Une des propriétés des CSM est d'adhérer au plastique lorsque qu'elles sont isolées à partir du tissu où elles se trouvent. Initialement, ces cellules multipotentes pouvant adhérer au plastique étaient communément appelées cellules souches mésenchymateuses, terme introduit par Caplan en 1991 (Caplan, 1991). Cependant, Owen proposa le terme « stromale » en 1988 pour ces mêmes cellules (Owen, 1988). La société internationale de thérapie cellulaire (ISCT) proposa le terme de « cellules stromales mésenchymateuses multipotentes » pour ces cellules souches mésenchymateuses ayant la propriété d'adhérer au plastique pour plusieurs raisons. Tout d'abord, *in vitro* ces cellules qui adhèrent au plastique constituent une population hétérogène et ne forment pas toutes des clones ce qui montre que toutes ces cellules ne sont pas « souches », l'ISCT suggère d'ailleurs de supprimer le terme souche pour les qualifier (Horwitz et al., 2005). De plus, ces cellules adhérentes et multipotentes sont dites mésenchymateuses à cause de leur origine mésodermique (Horwitz et al., 2005). D'après l'ISCT, ces cellules sont aussi qualifiées de « stromales » car elles sont retrouvées dans certains tissus appartenant au compartiment stromal comme la moelle osseuse (Horwitz et al., 2005). En effet, parmi les quatre types cellulaires principaux jouant un rôle dans le support de l'hématopoïèse, un type est d'origine hématopoïétique (les macrophages) tandis que les 3 autres sont dérivés des cellules souches mésenchymateuses (les adipocytes, les ostéoblastes et les cellules réticulaires) (Dazzi et al., 2006). Enfin l'ISCT propose de conserver l'acronyme CSM (ou MSC en anglais) étant donné les travaux antérieurs afin de maintenir une continuité dans le discours scientifique et dans les données électroniques mais il sera nécessaire de bien définir l'acronyme dans chaque travail (Horwitz et al., 2005).

Ainsi pour ce travail de recherche il a été décidé d'utiliser l'acronyme « CSM » pour désigner les cellules stromales/souches mésenchymateuses.

B. Clonogénicité

Les CSM isolées à partir de moelle osseuse (CSM-MO) et présentant des propriétés d'adhésion au plastique ont été identifiées pour la première fois par Friedenstein et al. comme des progéniteurs capables de produire des colonies de cellules d'allure fibroblastique (Friedenstein et al., 1976, 1987) (*Figure 4*). Ces progéniteurs ont été appelés CFU-F pour « Colony Forming Unit-Fibroblast », capables de se différencier en tissus osseux ou cartilagineux, et de soutenir l'hématopoïèse. Ce n'est que plus récemment que le concept de l'existence de CSM a émergé pour des utilisations thérapeutiques. Les travaux de Pittenger et al. ont permis l'identification, parmi la population des CFU-F, de cellules

possédant des propriétés biologiques de cellules souches ; et depuis, de nombreuses études ont montré que ces CSM constituaient un outil intéressant pour l'ingénierie cellulaire et tissulaire grâce à leur multipotence (Pittenger et al., 1999).

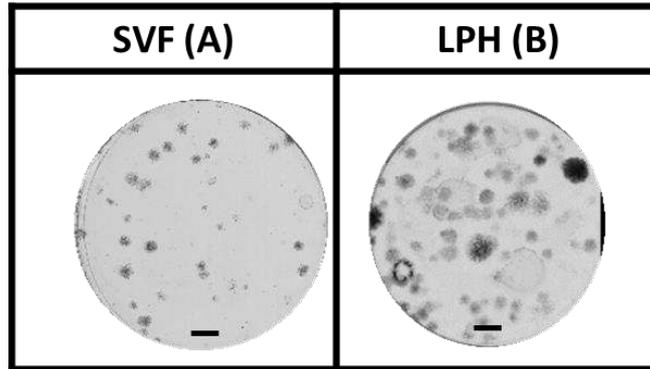


Figure 4 : Numérisation de CFU obtenues CSM-MO à passage 3 (Résultats personnels)

Numérisation des CFU (colony forming unit) de CSM-MO d'un donneur âgé de 9 ans à passage 2 après 14 jours de culture avec du milieu supplémenté en sérum de veau fœtal (SVF) ou lysat plaquettaire humain (LPH). Les cellules ont été colorées au cristal violet et les colonies observées ont été numérisées. Echelle : 1 cm.

C. Phénotype : les marqueurs de surface des CSM

Les CSM ont un certain profil d'expression d'antigènes de surface mais il n'existe, à ce jour, aucun marqueur spécifique pour les identifier. Elles sont caractérisées principalement par l'expression des clusters de différenciation (CD) CD105 (endogline), CD73 (5' terminal nucleotidase), CD90 (Thy-1), Stro-1, CD49a (chaîne α 1 des intégrines), CD29 (chaîne β des intégrines), ainsi que CD166 (ALCAM). En revanche, les CSM n'expriment ni les antigènes CD34 et CD45 (spécifiques des CSH), ni les glycophorines (spécifiques des hématies), ni les antigènes de différenciation des différentes populations leucocytaires (CD14, CD33, CD3, CD19), ni HLA-DR. Des études réalisées au sein de notre équipe ont permis de montrer qu'au cours de l'expansion en monocouche, ce profil d'expression des antigènes de surface cités précédemment restait stable à partir du 2ème passage et au moins jusqu'au 4^{ème} passage (Cournil-Henrionnet et al., 2008). En revanche, ces cellules d'aspect fusiforme sont connues pour adhérer au plastique contrairement aux autres cellules de la moelle telles que les cellules souches hématopoïétiques (Charbord and Casteilla, 2011). Les différents marqueurs de surface exprimés par les CSM de moelle osseuse humaine actuellement connus sont regroupés dans le [Tableau 1](#) (Al-Nbaheen et al., 2013; Kolf et al., 2007; Lv et al., 2014; P et al., 2011; Pittenger et al., 2004; Pontikoglou et al., 2011). Cependant, bien que les CSM de différents tissus partagent des similitudes dans leur profil d'expression génique et leurs phénotypes, les CSM isolées des différents tissus ne sont pas équivalentes et leur fonction reste à déterminer expérimentalement (Deschaseaux et al., 2009).

Tableau 1 : Liste des principaux marqueurs de surface exprimés ou non par les CSM de moelle osseuse humaine

Marqueurs présents	Marqueurs absents
<p>CD13, CD29, CD44, CD49a, b, c, e, f, CD51, CD54 (ICAM1), CD58, CD61, CD62, CD71, CD73, CD90 (Thy-1), CD102, CD104, CD105, CD106 (VCAM), CDw119, CD120a, CD120b, CD123, CD124, CD126 (ALCAM), CD127, CD130, CD140a, CD140b, CD146, CD157, CD164, CD166, CD200, CD271, b2 microglobuline, MSCA1, GD2, HLA-(A, B, C), nestin, P75, PODXL, SSEA-3, SSEA-4, STRO1, STRO4, TGFβIR, TGFβIIR, TRK (A, B, C).</p>	<p>CD3, CD4, CD6, CD9, CD10, CD11a, CD11b, CD14, CD15, CD18, CD21, CD25, CD31, CD34, CD36, CD38, CD45, CD49d, CD50, CD56, CD62E,L,S, CD80, CD86, CD95, CD117 (c-kit), CD133, HLA-(DR-DQ-DP), SSEA-1</p>

CD = Cluster of differentiation ; TGFβIR = Transform growth factor β receptor type I; TGFβIIR = Transform growth factor β receptor type II; HLA = Human leukocyte antigen; SSEA = Stage specific embryonic antigen, TRK = Tyrosine kinase, GD = ganglioside.

D. Les différentes sources de CSM :

Les relatives facilitées d'obtention (bien que pour certaines invasives) et de manipulation ainsi que leurs propriétés de différenciation font des CSM un outil très intéressant en médecine régénératrice (thérapie cellulaire ou ingénierie tissulaire). Ces CSM peuvent en effet être isolées à partir de prélèvements adultes de tissu adipeux, de périoste, de membrane synoviale, de muscle, de derme ou de moelle osseuse entre autres. Elles se retrouvent également en grande quantité dans le tissu protégeant les vaisseaux du cordon ombilical du fœtus appelé gelée de Wharton (GW) et ont aussi été retrouvées au niveau du placenta (Charbord and Casteilla, 2011) (cf Figure 5).

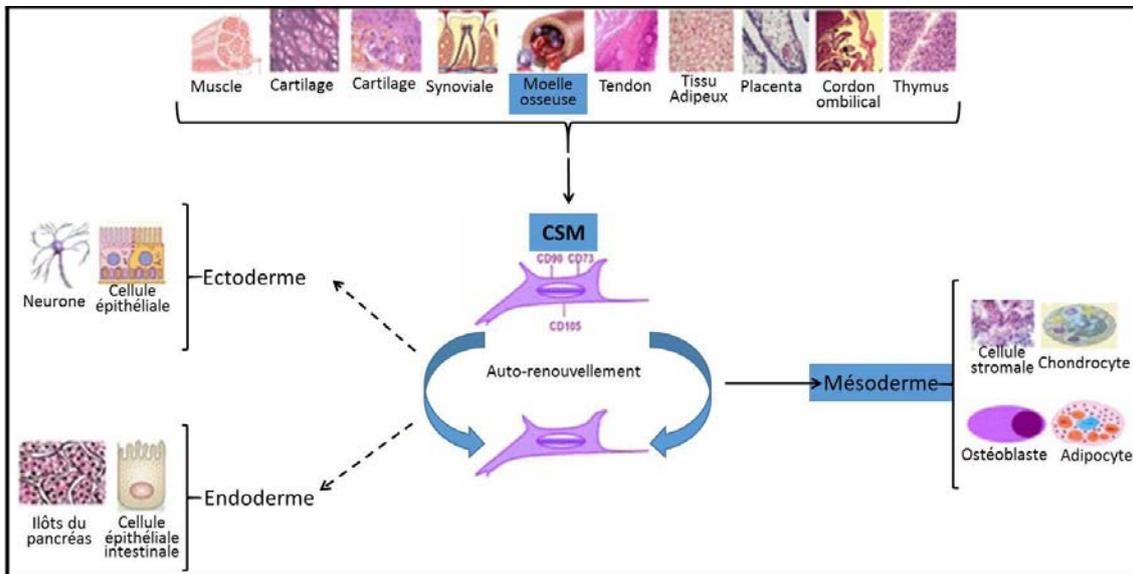


Figure 5 : Les différentes sources de CSM d'après www.cancerlink.ru/enmesenchymalstem.html

Les CSM peuvent être isolées à partir de différents tissus. Elles ont des propriétés d'autorenouvellement et peuvent se différencier en cellules appartenant à des tissus d'origine mésodermique. Certains travaux indiquent que les CSM peuvent se différencier en cellules d'origine non mésodermique telle que l'endoderme ou le mésoderme.

E. Multipotence

Les CSM sont des cellules multipotentes qui donnent naissance, lorsqu'elles sont cultivées dans des conditions adaptées, à des cellules des tissus conjonctifs : ostéoblastes, chondrocytes, ténocytes, adipocytes et cellules stromales de soutien de l'hématopoïèse. Elles se différencient aussi vers la voie

du muscle lisse vasculaire, des cellules musculaires sarcomériques (squelettiques et cardiaques) et des cellules endothéliales. Enfin, certaines publications indiquent qu'elles peuvent donner lieu à des dérivés non mésodermiques tels que les hépatocytes et les neurones ou les astrocytes (Bahat-Stroomza et al., 2009)(Lin et al., 2010)(Zeng et al., 2011) (Figure 5 et Figure 6).

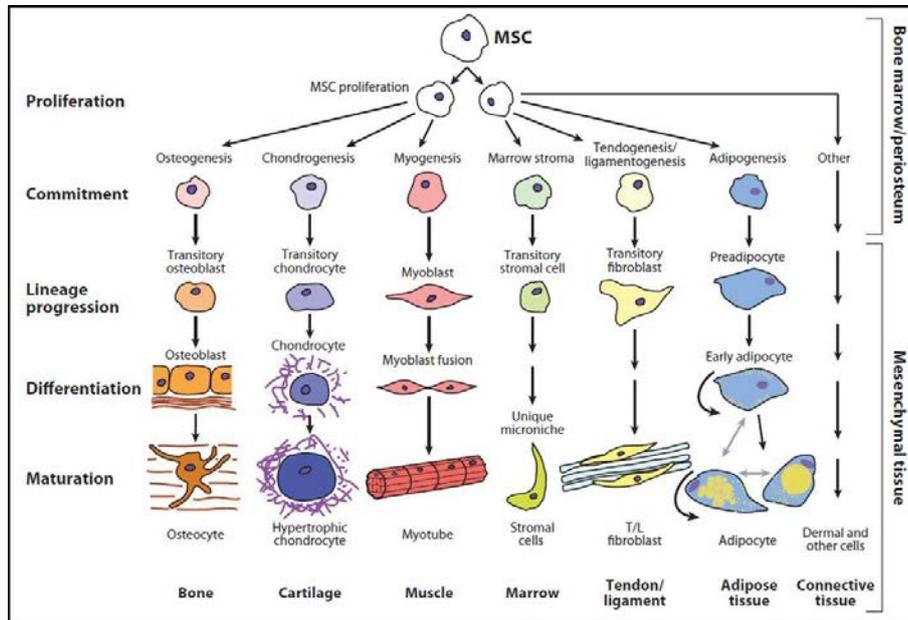


Figure 6 : Schéma de différenciation des CSM humaines de moelle osseuse (Singer and Caplan, 2011)

Les CSM de moelle osseuse peuvent se différencier en tissu osseux, musculaire ou adipeux en fonction du stimulus (facteur biochimique ou mécanique) auquel elles sont exposées *in vitro*.

F. Critères minimums identifiant les CSM

La société internationale de thérapie cellulaire (ISCT) a proposé un nombre minimal de critères afin de définir les CSM (Dominici et al., 2006) (Tableau 2). Les CSM présentent des propriétés d'adhésion au plastique dans des conditions standards de culture (i), expriment certains antigènes de surface (ii) et peuvent se différencier *in vitro* en chondrocytes, ostéocytes et adipocytes (iii).

Tableau 2 : Résumé des critères minimums permettant l'identification des CSM (Dominici et al., 2006)

1)	Adhérence au plastique dans des conditions standards de culture		
2)	Phénotype	Positive ($\geq 95\%$) CD105, CD73, CD90	Négatif ($\leq 2\%$) CD45, CD34, CD14 ou CD11b, CD79a ou CD19, HLA-DR
3)	Différenciation <i>in vitro</i> en :	Ostéocytes	Adipocytes
	Mise en évidence par	Coloration Alizarine red ou Von Kossa	Coloration Oil red
			Coloration Bleu alcian /Immunohistochimie du collagène de type II

CD = Cluster de Différenciation

En pratique, afin d'identifier les CSM, il sera nécessaire de les faire adhérer au plastique, de vérifier leur phénotype et leur multipotence (Tableau 1), mais aussi de vérifier la formation de colonies en réalisant le test des CFU-F.

G. Comparaison des CSM-MO osseuse et de CSM-GW

Les CSM-MO d'origine adulte sont la première source de CSM utilisées en médecine régénérative. Néanmoins, de plus en plus de travaux sur les CSM-GW sont publiés pour des applications en médecine régénérative étant donné leur fort potentiel prolifératif comparé aux CSM-MO. Ainsi, les CSM-MO et CSM-GW possèdent plusieurs propriétés communes résumées dans le [Tableau 3](#) parmi lesquelles la morphologie cellulaire, la multipotence, les capacités d'autorenouvellement et d'immunomodulation. Néanmoins ces cellules présentent des différences reprises dans le [Tableau 4](#).

Tableau 3 : Principaux points communs entre les CSM de moelle osseuse (CSM-MO) et de gelée de Wharton (CSM-GW)

Critères	CSM-MO	CSM-GW	Références
Adhésion au plastique	Oui		
Phénotype	CD105+, CD90+, CD73+, CD45-, CD34-, HLADR-		(*), (El Omar et al., 2014; Reppel et al., 2014)
Multipotence	Différenciation, ostéocytaire et chondrocytaire		(*), (El Omar et al., 2014; Reppel et al., 2014)
Clonogénicité	CFU		(*), (El Omar et al., 2014; Reppel et al., 2014)
Morphologie	Allure fibroblastique		(*)
Immunomodulation	Oui		(El Omar et al., 2014)
Contrainte éthique	Aucune		
Transfection	Efficacité de transfection comparable		(Baksh et al., 2007)

(*) données personnelles

Tableau 4 : Principales différences entre les CSM de moelle osseuse (CSM-MO) et de gelée de Wharton (CSM-GW)

Critères	CSM-MO	CSM-GW	Références
Prélèvement	Potentiellement douloureux et iatrogène	Non douloureux ni iatrogène	
Prolifération	Bonne, mais varie avec l'âge des donneurs	Bonne	(*), (El Omar et al., 2014; Reppel et al., 2014)
Différenciation adipocytaire		Plus faible/CSM-MO	(Reppel et al., 2014)
Impact de l'âge du donneur	Oui	Non#	(*)(**)(Penolazzi et al., 2009)
Phénotype	CD106 plus exprimé/CSM-GW	HLA-ABC plus exprimé, CD200 plus exprimé/CSM-MO(**)	(El Omar et al., 2014)(**)
Type d'utilisation	Autologue et allogénique	Allogénique	
Activité télomérase	faible	Plus élevée/CSM-MO	(Reppel et al., 2014)

(*) données personnelles ; (**) résultats obtenus au laboratoire, #difficulté de s'engager dans une différenciation ostéocytaire pour les CSM-GW provenant de mères dont l'âge est supérieur à 32 ans (Penolazzi et al., 2009).

III. Les propriétés fonctionnelles des CSM

A. Le « homing »

Le « homing » est un processus par lequel les cellules peuvent migrer vers un tissu afin d'exercer un effet biologique *via* 3 étapes principales : activation (i), roulement et adhésion ferme (ii) et extravasation (iii) (Figure 7). Après activation par les cytokines pro-inflammatoires telles que TNF α et IL-1 au niveau du foyer inflammatoire, les CSM sur-expriment l'intégrine $\beta 1$ et/ou l'intégrine $\alpha 4/\beta 1$ et vont migrer de manière sélective vers le site de lésion (Ortiz et al., 2003) et interagir avec VCAM-1 (vascular adhesion molecule 1) (Palecek et al., 1997) des cellules endothéliales. Dans un contexte inflammatoire, les CSM expriment également des niveaux élevés de récepteurs aux chimiokines tels que CXCR4 (Chemokine (C-X-C motif) receptor 4) qui va interagir avec son ligand SDF-1 (stromal cell-derived factors 1) exprimé fortement au niveau de l'endothélium lésé renforçant ainsi l'adhésion des CSM à l'endothélium. Lors de l'extravasation, les CSM vont pouvoir migrer via l'endothélium vers la matrice extracellulaire grâce à l'ensemble des interactions entre l'intégrine $\alpha 4/\beta 1$ et la fibronectine, la voie de signalisation TLR (toll-like receptors), le bFGF (basic fibroblast growth factor) et les MMP2 (métalloprotéinase matricielle) sécrétées par les CSM (Yagi et al., 2010).

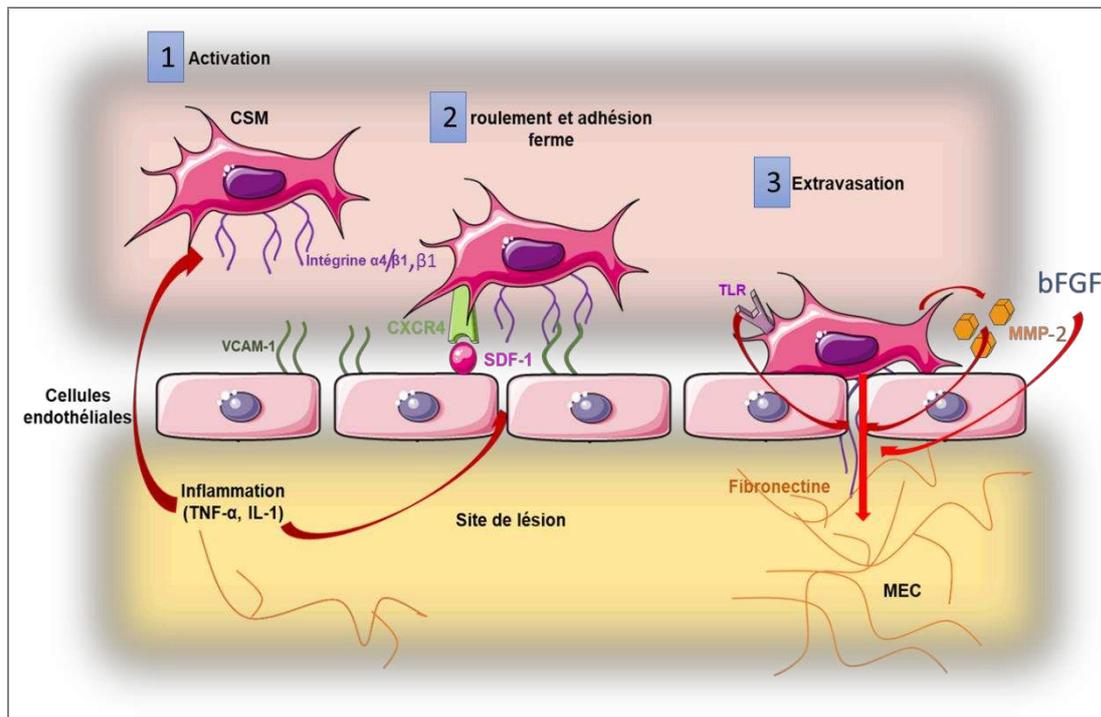


Figure 7 : Schéma récapitulatif des mécanismes de « homing » des CSM vers le site de lésion d'après (Yagi et al., 2010)

Lors de la première étape du « homing » appelée « activation » (1), les CSM s'adaptent et expriment l'intégrine $\beta 1$ et/ou l'intégrine $\alpha 4/\beta 1$ après stimulation par les cytokines pro-inflammatoires telles que TNF α , IL-1 afin d'interagir avec VCAM-1 exprimé par les cellules endothéliales des vaisseaux du tissu cible stimulés par l'inflammation locale. Lors de la seconde étape appelée « roulement et adhésion » (2), de CXCR4 est exprimé dans les CSM suite à l'activation et module les contacts cellules/cellules via l'interaction avec son ligand SDF-1 surexprimé par les cellules endothéliales au niveau du foyer inflammatoire. Les CSM se rapproche donc par chimiotaxie du site de lésion et l'interaction intégrine $\alpha 4/\beta 1$ -VCAM induit une adhésion ferme. Enfin, lors de la dernière étape « d'extravasation » (3), les CSM migrent via l'endothélium vers la matrice extracellulaire grâce aux interactions entre les intégrines et le domaine V de la fibronectine, dont l'expression est régulée par le bFGF, la voie de signalisation TLR ou MMP2 exprimée par les CSM. **CSM** : cellules stromales/souches mésenchymateuses ; **CXCR4** : Chemokine (C-X-C motif) receptor 4 ; **SDF-1** : stromal cell-derived factors 1 ; **TLR** : Toll-like receptors ; **VCAM-1** : vascular cell adhesion molecule-1

B. Les propriétés immunomodulatrices des CSM

Les CSM présentent des propriétés immunosuppressives importantes liées à la production de facteurs solubles inductibles qui inhibent les principaux effecteurs de l'immunité. Ces propriétés immunosuppressives ont été décrites à partir de CSM *in vitro* et *in vivo* chez la souris ou dans les CSM humaines (Castro-Manreza and Montesinos, 2015; Ménard and Tarte, 2011). Ces propriétés confèrent aux CSM un grand intérêt d'où leur utilisation dans les essais cliniques chez des patients atteints de la maladie du greffon contre l'hôte, une complication fréquente et grave des allogreffes de cellules souches hématopoïétiques (Castro-Manreza and Montesinos, 2015; Ménard and Tarte, 2011). Les mécanismes d'action des CSM dans l'immunité sont dits pléiotropes car ils impliquent les effecteurs **de l'immunité innée et adaptative** (Larghero et al., 2009; Ménard and Tarte, 2011) (*Figure 9 et Figure 8*).

Des études ont montré que les CSM interférait avec les cellules dendritiques et les lymphocytes T, et qu'elles pouvaient produire un microenvironnement local immunosuppresseur en sécrétant des cytokines (Ryan et al., 2005). Il a également été montré que la fonction immunomodulatrice des CSM humaines est renforcée lorsque les cellules sont exposées à un environnement inflammatoire caractérisé par une élévation locale d'interféron-gamma (Ryan et al., 2007).

1. Les CSM et le système immunitaire inné

Le **système immunitaire inné** désigne l'ensemble des mécanismes entraînant une réponse immunitaire innée ou non spécifique permettant la défense de l'organisme contre les agents infectieux de façon immédiate. Ce système constitue la première ligne de défense face à une infection et implique différents types cellulaires : les cellules NK (Natural Killer) (i), les granulocytes (mastocytes, éosinophiles et basophiles) (ii) et les phagocytes (macrophages, neutrophiles et cellules dendritiques) (iii)

Les CSM interagissent avec les **cellules NK**, cellules capables de tuer des cellules tumorales et les cellules infectées. Les CSM sécrètent des facteurs solubles tels que PGE2,IDO et sHLA-G qui vont inhiber la prolifération, la cytotoxicité et la sécrétion d'IFN- γ par les cellules NK (Ménard and Tarte, 2011) (*Figure 8*). Les CSM augmentent les propriétés de phagocytose des **macrophages** grâce au transfert des mitochondries *via* des nanotubes et des vésicules dérivées des CSM (Jackson et al., 2016) et peuvent induire un phénotype anti-inflammatoire M2 grâce à leur sécrétion de PGE2 (Bernardo and Fibbe, 2013; Waterman et al., 2012) (*Figure 8, Figure 12*). Les CSM augmentent la survie des neutrophiles *via* la sécrétion d'IL6 et inhibent leur migration et leur burst oxydatif (*Figure 8*) (Ménard and Tarte, 2011).

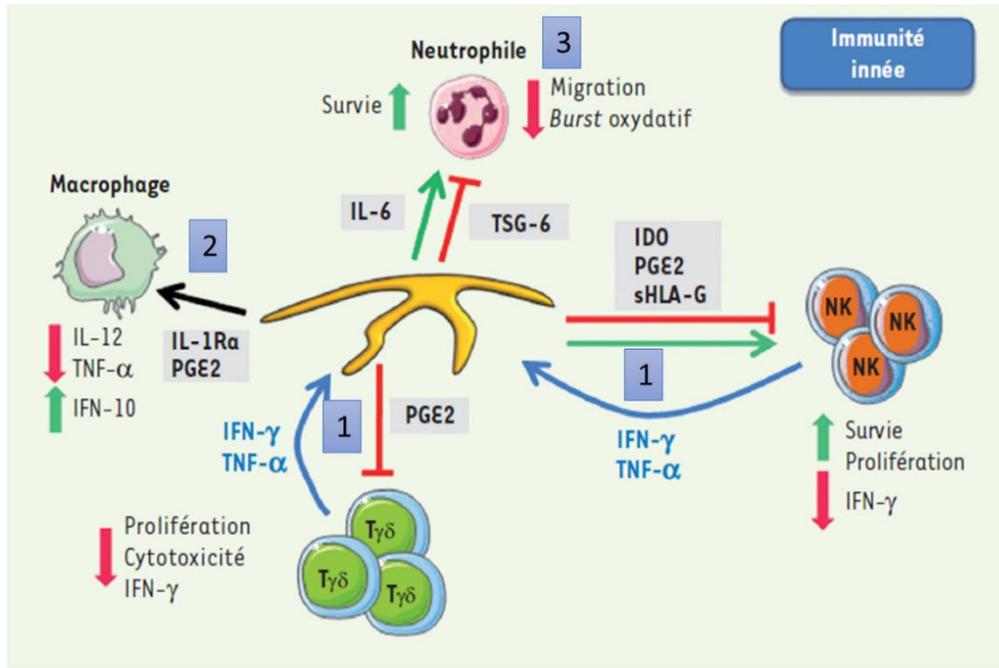


Figure 8 : Effet des CSM sur les cellules de l'immunité innée (Ménard and Tarte, 2011)

Les CSM inhibent la prolifération, la cytotoxicité et la synthèse d'IFN- γ (Interferon- γ) par les lymphocytes $T\gamma\delta$ et les cellules NK (Natural Killer) qui produisent l'IFN- γ et le TNF- α (Tumor Necrosis Factor- α) indispensables à l'induction de ce phénotype inhibiteur (1). Par ailleurs, les CSM modifient le profil d'activation des macrophages qui produisent moins de cytokines pro-inflammatoires et plus d'IL-10 (Interleukine-10) en réponse aux PGE2 (prostaglandine E2) et au blocage de l'IL-1 par l'antagoniste du récepteur de l'IL-1 (IL-1Ra) (2). Enfin, alors que la survie des polynucléaires neutrophiles est augmentée par les CSM, ces dernières inhibent la migration et le burst oxydatif de ces polynucléaires via la synthèse respectivement d'IL-6 et de TSG-6 (TNF- stimulated gene 6 protein) (3).

2. Les CSM et le système immunitaire adaptatif

Le **système immunitaire adaptatif** ou acquis produit une réponse spécifique à un antigène (virus, bactérie...) en gardant en mémoire cet antigène, permettant ainsi une réponse plus efficace lors d'une prochaine exposition. L'immunité adaptative désigne d'une part, les **lymphocytes B** qui produisent les anticorps (immunoglobulines) caractérisant la réponse immunitaire à la médiation humorale et d'autre part, les **lymphocytes T** qui s'attaquent directement à l'antigène et jouent un rôle de coordination caractérisant la réponse immunitaire à médiation cellulaire (Castro-Manrreza and Montesinos, 2015; Ménard and Tarte, 2011). Ces deux populations cellulaires ont des propriétés et des fonctions distinctes des cellules du système immunitaire inné et confèrent une protection plus tardive, mais plus durable que le système immunitaire inné.

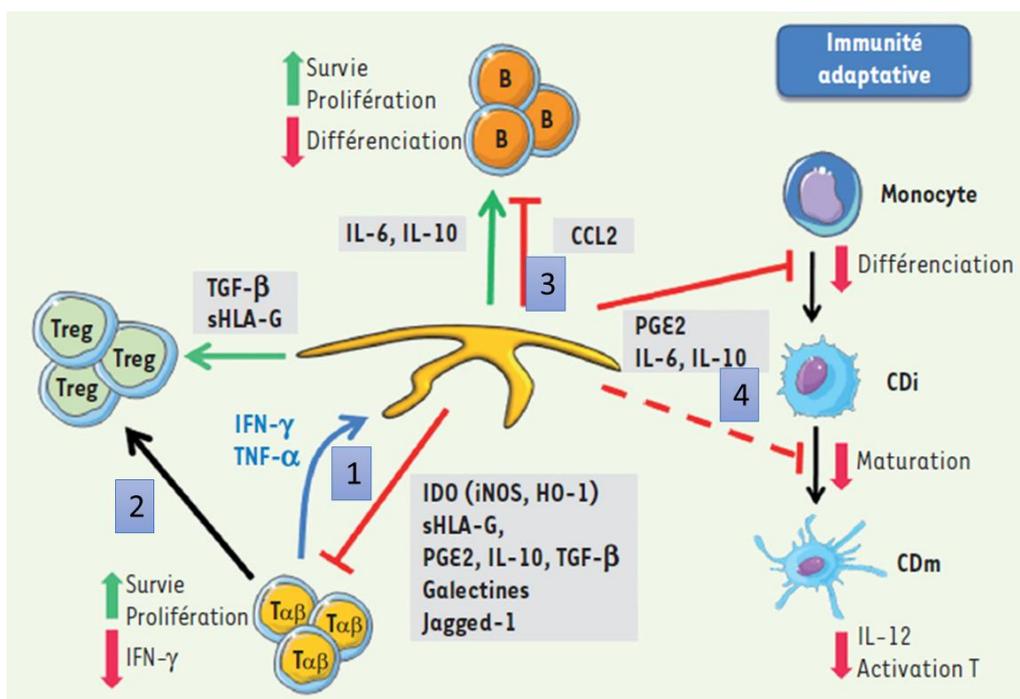


Figure 9 : Effet des CSM sur les cellules de l'immunité adaptative (Ménard and Tarte, 2011)

Les CSM permettent la survie des lymphocytes $T\alpha\beta$ ($LT\alpha\beta$) tout en inhibant leur prolifération et leur synthèse d'IFN- γ (Interferon- γ) via la production d'une combinaison de facteurs solubles (IDO-indoleamine 2,3-dioxygénase ; iNOS/nitric oxide synthase inducible ; HO-1/hème oxygénase, sHLA-G/Human leucocyte antigen-G soluble ; PGE2/prostaglandine E2 ; IL-10/Interleukine 10 ; TGF- β /Transforming Growth Factor- β ; Galectine 1 et 3 et Jagged-1 un ligand du récepteur Notch et membranaire dont la plupart sont induits par l'IFN- γ (Interféron gamma) et le TNF- α (Tumor Necrosis Factor alpha) produits par les lymphocytes T activés (1). Elles favorisent également la différenciation des lymphocytes $T\alpha\beta$ en lymphocytes T régulateurs (Treg) via la synthèse de TGF- β (Transforming Growth Factor- β) et de sHLA-G (2). Par ailleurs, en l'absence de facteurs inflammatoires, les CSM permettent la survie et la prolifération des lymphocytes B par la production des facteurs de croissance IL-6 et IL-10, tout en inhibant leur différenciation terminale via des mécanismes mal identifiés. Ceux-ci incluent, chez la souris, la synthèse d'une forme clivée de la chimiokine CCL2 (3). Enfin, les CSM inhibent la différenciation et la maturation des cellules dendritiques (CD) de façon dépendante des PGE2 (prostaglandine E2), de l'IL-6 et de l'IL-10 (CDi : CD immature et CDm : CD mature) (4).

a) Interactions entre les CSM et les lymphocytes T

Les CSM interagissent avec les différentes populations de lymphocytes T par différents mécanismes tels que l'inhibition de la prolifération des lymphocytes T (LT) (i), l'induction de l'anergie des LT (ii) ou l'induction de Treg (iii). Ces mécanismes sont d'ailleurs à l'étude dans le cadre de certaines pathologies telles que le choc septique ou la maladie du greffon contre l'hôte (GVHD).

i. Inhibition de la prolifération des lymphocytes T

Les facteurs solubles

Les CSM ont la propriété de sécréter des facteurs solubles qui vont, entre autres, moduler la réponse immunitaire. Ces facteurs solubles sont essentiellement des cytokines anti-inflammatoires telles que le TGF- β (transforming growth factor), HGF (hepatocyte growth factor), l'IL-6 et l'IL-10 (interleukine 6 et 10) qui vont inhiber la prolifération des lymphocytes T. Des enzymes telles que l'indoléamine 2,3-Dioxygénase (IDO) ou des prostaglandines comme PGE2 (prostaglandine E2) sont également impliquées. Dans les expériences de ce travail de thèse, nous nous sommes limités aux 3 principaux facteurs qui étaient décrits dans la littérature : IDO, PGE2 et TGF- β 1.

✓ **IDO :**

C'est une enzyme exprimée par les CSM impliquée dans le métabolisme du tryptophane. Cette enzyme déplete le milieu extracellulaire en tryptophane en le dégradant et en produisant la kynurénine. Le tryptophane est un acide aminé essentiel à la prolifération des LT, tandis que la kynurénine est un métabolite toxique (Larghero et al., 2009; Ménard and Tarte, 2011; Salami et al., 2018). L'activité d'IDO est stimulée par l'interféron gamma (INF γ) exogène ou secrété par les lymphocytes activés (Liu et al., 2019; Ménard and Tarte, 2011)

✓ **PGE2 :**

Les prostaglandines (PG) sont libérées de la membrane des phospholipides sous l'action de phospholipases, métabolisés en PGG2 et PGH2 par les enzymes COX-1 et COX-2 (cyclooxygénase 1 et 2) et converties en PGE2 par la PGES (prostaglandin E synthase). Les CSM expriment COX-1 et COX-2 qui permettent la synthèse de PGE2 (à partir de l'acide arachidonique) qui joue un rôle important dans l'inhibition de la prolifération des LT en induisant des LT régulateurs Treg (Ménard and Tarte, 2011; Najjar et al., 2010; Salami et al., 2018).

✓ **TGF- β 1**

Il agit en synergie avec HGF en induisant des effets immunosuppresseurs de l'ensemble des populations lymphocytaires du système immunitaire (Castro-Manrreza and Montesinos, 2015; Larghero et al., 2009; Ménard and Tarte, 2011; Salami et al., 2018).

Les CSM secrètent d'autres facteurs solubles tels que :

✓ **Les galectines :**

Une famille de protéines qui lie spécifiquement le β -galactoside. La galectine-1 inhibe la prolifération des LT par les CSM-MO et induit des LTreg (Salami et al., 2018) et les galectines-3 et -9 seraient également impliquées dans l'inhibition de la prolifération des LT (Castro-Manrreza and Montesinos, 2015).

✓ **L'IL-6 et le M-CSF :**

L'IL-6 et le Monocyte Colony-Stimulating Factor (M-CSF) inhibent la différenciation des cellules dendritiques/cellules présentatrices d'antigènes et affectent ainsi la réponse immunitaire. Ces cytokines vont aussi induire la polarisation des monocytes en macrophages de phénotype M2 anti-inflammatoire (Nauta et al., 2006)

✓ **L'IL-10 :**

Elle stimule la sécrétion de HLA-G5 et est surtout détectée dans les surnageants de co-culture entre les CSM humaines/fœtales et les LT (Castro-Manrreza and Montesinos, 2015).

✓ **sHLA-G5 :**

sHLA-G5 (soluble human leukocyte antigen-G5) : la forme soluble d'HLA-G interagit avec les LT en induisant un effet immunosuppresseur (Castro-Manrreza and Montesinos, 2015; Selmani et al., 2008).

Les interactions directes

Les CSM expriment également des marqueurs protéiques de surface assez connus qui vont pouvoir directement interagir avec les lymphocytes et induire la mort des lymphocytes T.

✓ **PD-L1 (Programmed death-ligand 1) :**

En effet, il a été décrit dans la littérature que les CSM pouvaient se comporter comme des cellules présentatrices d'antigènes (CPA) (Chan et al., 2006; Yagi et al., 2010) et interagir avec les LT ([Figure 10](#)). Cette interaction permet d'induire l'activation de la prolifération des LT, en présentant l'antigène

via les molécules du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) de classe 2 (i), en activant les LT via les molécules de co-stimulation CD80-86/CD40 (ii) et en sécrétant des facteurs solubles (iii) (Escors et al., 2013). Néanmoins, comme les CPA, les CSM expriment le PD-L1 qui va interagir avec le récepteur PD-1 (programmed cell death 1) des LT afin d'induire leur mort cellulaire (Escors et al., 2013; Gu et al., 2013; Krampera et al., 2013; Wobma et al., 2018).

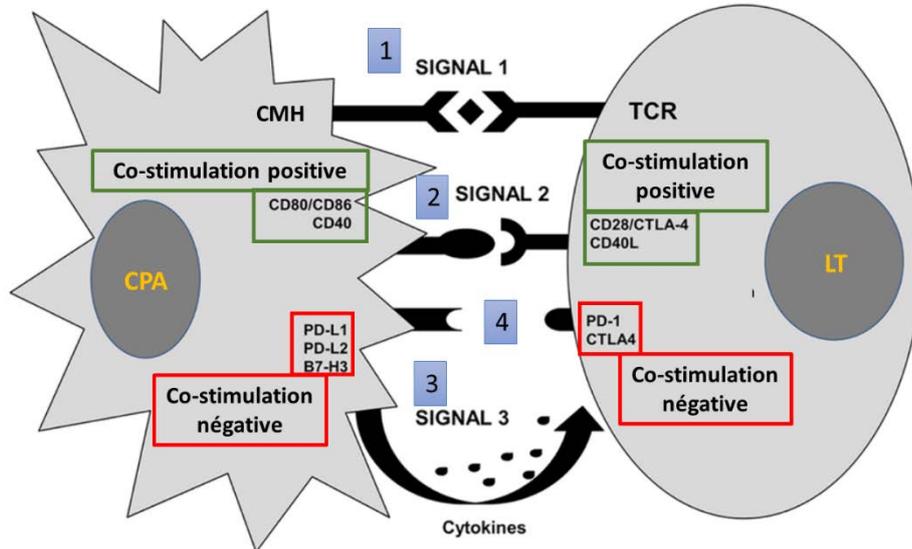


Figure 10 : Activation des lymphocytes T par les cellules présentatrices d'antigènes d'après (Escors et al., 2013)

Les cellules présentatrices d'antigènes (CPA) présentent le peptide antigénique via leurs molécules du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) de classe 2 au récepteur TCR (cogante T-cell receptor) à la surface des lymphocytes T (LT) délivrant le premier signal d'activation (SIGNAL 1) (1). Un second signal (SIGNAL 2) est délivré via la co-stimulation positive (2) et négative (4) en fonction de l'interaction spécifique entre les ligands à la surface des CPA et des récepteurs à la surface des LT. Un troisième signal (SIGNAL 3) est délivré via la sécrétion de cytokines (3). CD40L, CD40 ligand; CTLA4, cytotoxic T lymphocyte-associated protein 4; PD-1, programmed cell death 1; PD-L1, PD-1 ligand 1; PD-L2, PD-1 ligand 2.

✓ **FasL :**

Un autre mécanisme d'inhibition de la prolifération lymphocytaire a été décrit dans la littérature : l'induction de la mort cellulaire des lymphocytes T activés par apoptose par les CSM-MO, qui serait associée à la conversion du tryptophane en kynurénine par IDO (Noël et al., 2007; Plumas et al., 2005). Cette induction de l'apoptose des LT par apoptose a également été suggérée avec les CSM-TA (CSM de tissu adipeux) (Wobma et al., 2018) ou dans les CSM de pulpe dentaire (Jiang et al., 2015). En effet, les CSM expriment le FasL membranaire (Gu et al., 2013) en plus du FasL soluble.

Il existe également d'autres marqueurs protéiques de surface qui vont interagir avec les LT :

✓ **CD200**

CD200 est une glycoprotéine membranaire appartenant à la superfamille des immunoglobulines, dont l'interaction avec son récepteur CD200R, exprimé à la surface des cellules myéloïdes et lymphoïdes, est impliquée dans la régulation de la réponse immunitaire (Wright et al., 2003) et dans la tolérance de l'allogreffe et la grossesse (Clark, 2005). De plus, CD200 est plus exprimé par les CSM-GW qui seraient plus immunosuppressives que les CSM-TA ou CSM-MO (Najar et al., 2012).

✓ **Notch 1**

Les protéines Notch appartiennent à une famille de récepteurs transmembranaires impliqués dans différents processus dans l'organisme humain notamment lors du développement et de la régulation de l'homéostasie des cellules hématopoïétiques. Les CSM expriment 4 isoformes de Notch (Notch 1 à

4), mais Notch 1 qui est majoritaire, est impliqué dans leurs propriétés immunosuppressives. Il existe 5 ligands de Notch : Delta 1,3 et 4 et Jagged 1 et 2 (Na et al., 2015). L'inhibition de la voie de signalisation de Notch entraîne une diminution de la synthèse d'IDO par les CSM associée à une baisse de leurs propriétés immunosuppressives (Na et al., 2015).

ii. **Induction de l'anergie des lymphocytes T**

En réponse à une stimulation antigénique, les lymphocytes T naïfs sont activés par le signal 1 et 2. Le signal 1 nécessite l'interaction entre le TCR des LT et les molécules du CMH de classe 2 des CPA. Le signal 2 appelé le signal de costimulation nécessite l'interaction entre le récepteur CD28 des LT et les molécules de costimulation (CD80, CD40, CD86) exprimés par les CPA (*Figure 10*). En absence de signal de co-stimulation, les LT deviennent anergiques et ne peuvent ni proliférer, ni sécréter le l'IL-2 en réponse à une stimulation antigénique. Comme les CSM n'expriment pas de molécules de costimulation, elles peuvent induire l'anergie des lymphocytes T et un blocage de leur prolifération aux stades G0/G1 du cycle cellulaire (Larghero et al., 2009).

iii. **Induction de lymphocytes T régulateurs**

Les LT CD4+ peuvent se différencier en différents sous-types, en fonction du micro-environnement dans lequel ils se trouvent, LT helper 1 (Th1), 2 Th2, 17 (Th17) et LTreg (Castro-Manrreza and Montesinos, 2015). Les CSM favorisent la différenciation des LT en LTreg *via* la sécrétion de TGF- β 1 et sHLA-G (Ménard and Tarte, 2011) et Th2 anti-inflammatoires et inhibent la différenciation en LTh17 pro-inflammatoires *via* l'enzyme IDO qui déplete le milieu en tryptophane (Castro-Manrreza and Montesinos, 2015).

Les LTreg (CD4+, CD25+) (Treg) appartiennent donc à une sous-population des lymphocytes T qui joue un rôle important dans l'homéostasie du système immunitaire et dans les phénomènes de tolérance de soi. Les LTreg peuvent subir une maturation dans le thymus et sont donc appelés tTreg ou en périphérie à partir des lymphocytes T naïfs (pTreg). Malgré leur implication majeure dans la régulation de la réponse immunitaire ils ne représentent que 5 à 10% des lymphocytes T périphériques. Il existe 2 sous types de LTreg : les cellules T helper 3 (Th3) et les cellules T régulatrices de type 1 (Tr1). La différenciation des cellules Th3 et Tr1 est favorisée par TGF β et IL10 respectivement, la différence phénotypique entre les deux types cellulaires est que les Th3 sont Foxp3+ tandis que les cellules Tr1 sont Foxp3-. Forkhead 9 box P3 (Foxp3) est un facteur de transcription exprimé de manière constitutive dans les cellules Treg et certains types de cellules pTreg. FoxP3 est essentiel au développement et aux fonctions des Treg, il permet notamment d'augmenter l'expression du récepteur de l'IL2 (CD25). La liaison de l'IL2 à CD25 augmenterait l'expression des gènes associés aux cellules Treg et régulerait l'inflammation en supprimant la prolifération des cellules T effectrices ou en modifiant la fonction des cellules présentatrices d'antigène (Ma and Chan, 2016).

b) Interactions entre les CSM et les lymphocytes B

Les lymphocytes B (LB) CD19+ sont des cellules du système immunitaire adaptatif, elles orchestrent la réponse humorale en se différenciant en plasmocytes, cellules productrices d'anticorps, et en lymphocytes B mémoire qui permettent une amélioration des défenses de l'organisme en cas d'un deuxième contact avec le même antigène. De plus, elles secrètent différentes cytokines qui peuvent influencer le profil des différentes cellules du système immunitaire et préserver l'architecture des tissus lymphoïdes et sont impliquées dans des pathologies auto-immunes telles que le lupus érythémateux disséminé et la polyarthrite rhumatoïde (Cho et al., 2017). Les CSM exercent des

propriétés immunomodulatrices sur les LB et peuvent induire des LB régulateurs (LBreg). Ces propriétés immunomodulatrices se font *via* la sécrétion de facteurs solubles, mais aussi *via* des vésicules extracellulaires (Carreras-Planella et al., 2019)

3. Phénotype pro et anti-inflammatoire des CSM

Il est clairement établi que les CSM présentent une faible immunogénicité caractérisée par l'absence d'expression des antigènes HLA de classe II tels que HLA-DR d'où leur intérêt en thérapie cellulaire. Par ailleurs, Il a été montré que les CSM sont capables d'adopter un phénotype pro-inflammatoire (MSC1) et anti-inflammatoire (MSC2) en fonction de l'environnement dans lequel elles se trouvent et en interférant avec les réponses immunitaires innée et acquise (Bernardo and Fibbe, 2013; Sangiorgi and Panepucci, 2016; Waterman et al., 2012). Cette balance entre effets pro- et anti-inflammatoire permet de maintenir un équilibre entre la défense de l'organisme et l'homéostasie tissulaire (*Figure 11*).

a) Les récepteurs TLR3 et TLR4

Les récepteurs de type Toll Like Receptor (TLR) reconnaissent les modèles moléculaires associés aux agents pathogènes (PAMPs : pathogen-associated molecular patterns) dérivés de divers microbes et sont de ce fait impliqués dans le système immunitaire inné. Les CSM expriment les récepteurs TLR2, TLR3, TL4 et TLR9, quelle que soit leur source (Sangiorgi and Panepucci, 2016). L'activation des voies de TLR dans les CSM en réponse à des signaux exogènes et endogènes modifie leur profil inflammatoire et leurs effets immunomodulateurs sur les cellules des systèmes immunitaires inné et adaptatif (Bernardo and Fibbe, 2013; Sangiorgi and Panepucci, 2016; Waterman et al., 2012).

Polarisation des CSM en phénotype pro- et anti-inflammatoire

Les CSM sensibilisées *via* le TLR4 présenteraient un profil essentiellement pro-inflammatoire appelé MSC1 avec une augmentation de la sécrétion des molécules telles que l'IL-6, l'IL-8 ou le TGF- β , alors que les CSM sensibilisées *via* le TLR3 développeraient un profil anti-inflammatoire appelé MSC2 avec une augmentation de la sécrétion de molécules telles que l'IL-10, l'IDO et la PGE2 (Bernardo and Fibbe, 2013; Sangiorgi and Panepucci, 2016; Waterman et al., 2012) (*Figure 11*).

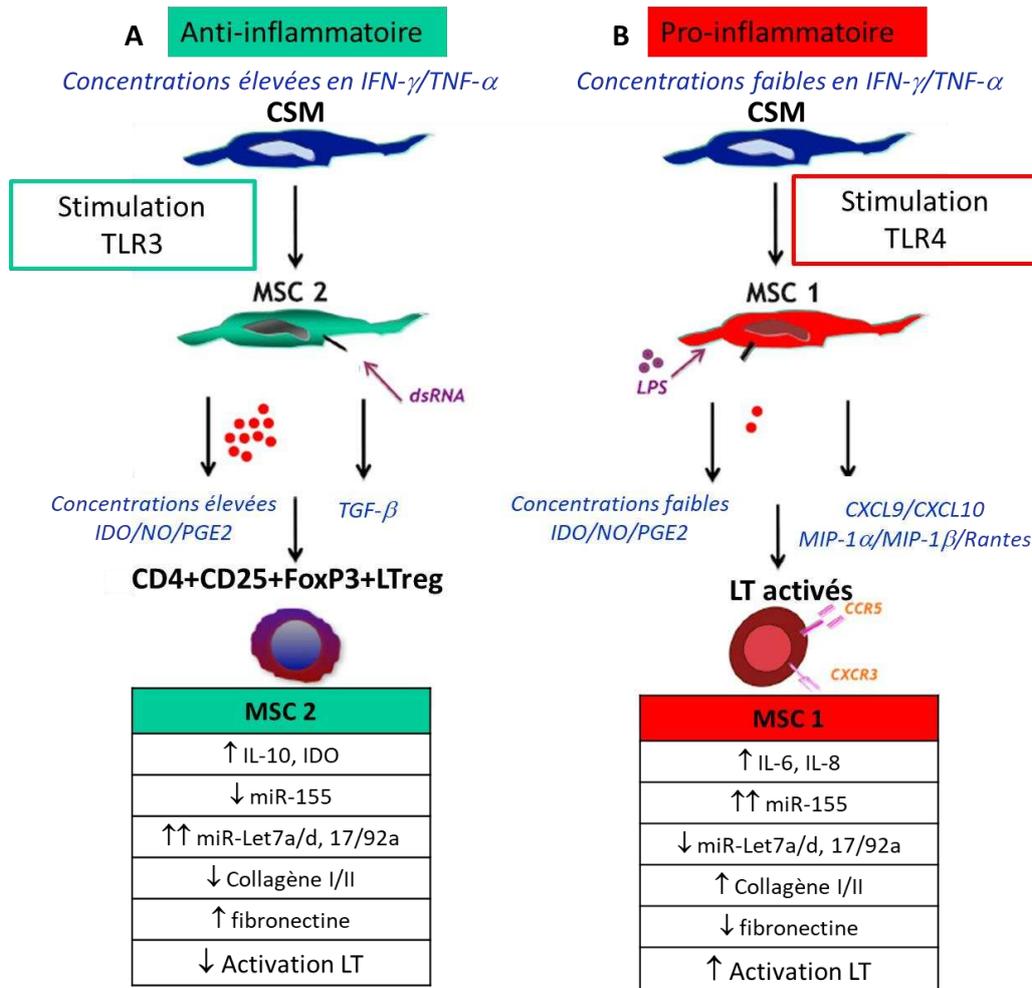


Figure 11 : Polarisation des CSM en phénotype pro- et anti-inflammatoire d'après (Bernardo and Fibbe, 2013; Waterman et al., 2012)

(A) Dans un environnement inflammatoire (concentrations élevées en TNF- α et IFN- γ), les CSM s'activent et adoptent un phénotype anti-inflammatoire MSC2 dit immunosuppresseur et sécrètent de fortes concentrations en facteurs solubles tels que IDO, IL-10, NO, PGE2, TGF- β . La polarisation vers le phénotype anti-inflammatoire MSC2 peut aussi être induite par la stimulation du TLR3 par le dsRNA de virus. La sécrétion de TGF- β va induire une sous-population de LTreg.

(B) En absence d'environnement inflammatoire (concentrations faibles en TNF- α et IFN- γ), les CSM adoptent un phénotype pro-inflammatoire MSC1 et augmente la réponse des LT en sécrétant des cytokines qui vont recruter les LT au niveau du site d'inflammation (CXCL9, CXCL10, MIP-1 α , MIP-1 β , Rantes). Ces cytokines vont se fixer au niveau des récepteurs présents à la surface des LT. La polarisation vers le phénotype pro-inflammatoire MSC1 est aussi influencée par la stimulation du TLR4 par des concentrations faibles en LPS dérivé des bactérie Gram (-).

CD : cluster of differentiation ; **CSM** : cellules stromales/souches mésenchymateuses ; **CXCL9 ou 10** : Chemokine (C-X-C motif) ligand 9 ou 10 ; **dsRNA** : acide ribonucleique double brin ; **FoxP3** : forkhead box P3 ; **IDO** : indoleamine 2,3-dioxygénase ; **IL-10** : interleukine 10 ; **IFN- γ** : interféron gamma ; **LPS** : lipopolysaccharide ; **LT** : Lymphocytes T ; **LTreg** : LT régulateurs **MIP-1 α** : macrophage inflammatory protein 1 alpha ; **MIP-1 β** : macrophage inflammatory protein 1 beta ; **NO** : nitric oxide ; **PGE2** : prostaglandine E2 ; **TGF- β** : transforming growth factor beta ; **TLR3 ou 4** : toll like receptor 3 ou 4 ; **TNF- α** : tumor necrosis factor alpha.

Interaction entre les CSM et les monocytes : Balance entre la polarisation de monocytes vers les macrophages M1 et M2

Les CSM interagissent également avec les monocytes circulants, qui, une fois arrivés dans les tissus, peuvent se différencier en macrophages. Ces derniers jouent un rôle important dans l'immunité innée par phagocytose des agents pathogènes et débris cellulaires d'une part. D'autre part, ils sont impliqués dans l'immunité adaptative par les mécanismes d'opsonisation et de présentation d'antigènes. Les

macrophages sont impliqués dans des pathologies comme le syndrome de détresse respiratoire aiguë (SDRA) une des complications graves de la Covid-19 (Laroye et al., 2020). Les CSM peuvent induire la polarisation des monocytes en macrophages M2 anti-inflammatoires au détriment du profil pro-inflammatoire M1. Les macrophages M2 ont une production en cytokine anti-inflammatoire IL-10 augmentée, qui peut agir sur les autres populations lymphocytaires et leucocytaires (*Figure 12*) (Bernardo and Fibbe, 2013; Waterman et al., 2012).

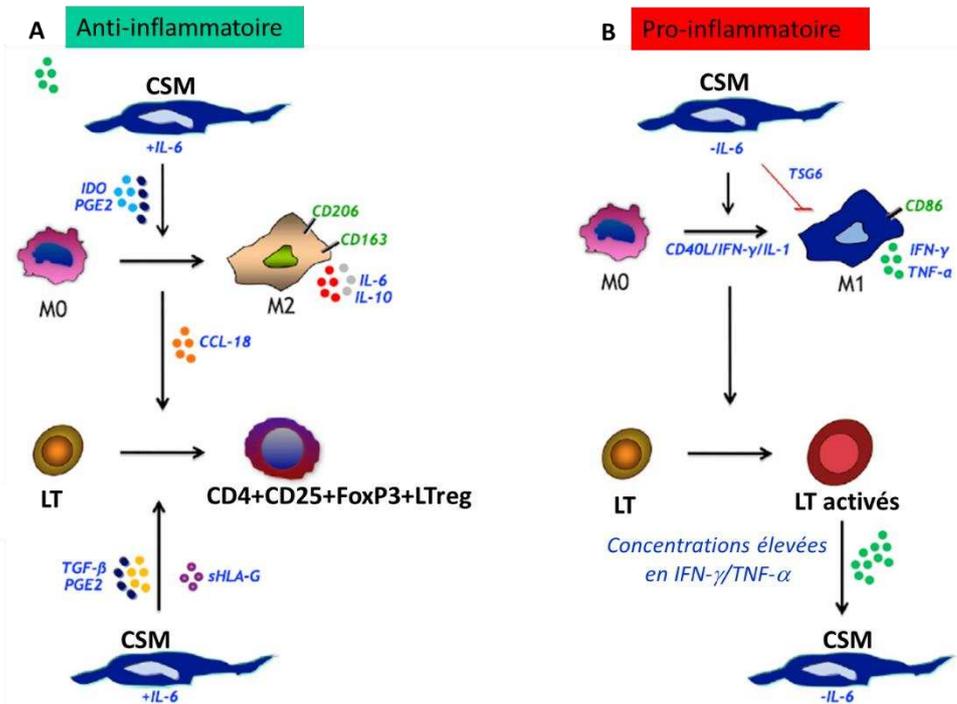


Figure 12 : Interaction entre les CSM et les monocytes : Balance entre la polarisation de monocytes vers les macrophages M1 et M2 d'après (Bernardo and Fibbe, 2013)

(A) Les CSM produisent de manière constitutive de l'IL-6 ce qui induit la polarisation des MO en macrophages M2. Cette polarisation est initiée et est dépendante des mécanismes de contacts cellule-cellule et de la sécrétion de facteurs solubles incluant IDO et PGE2. De plus, cette polarisation est étroitement liée aux capacités des CSM à favoriser l'émergence de LT CD4+CD25+FoxP3+. L'émergence de LTreg peut être supportée par des mécanismes directs et indirects : indirectement via la production de CCL18 par les CSM ayant induit les macrophages M2 et directement via la production de TGF-β par les CSM. D'autres molécules telles que PGE2 et sHLA-G sont aussi impliquées.

(B) En absence d'IL-6 les CSM induisent la polarisation des MO en macrophages M1 via la sécrétion d'IFN-γ et de TNF-α et l'expression du marqueur de surface CD40L. Les macrophages M1 sécrètent l'IFN-γ et le TNF-α et expriment les molécules de co-stimulation à leur surface permettant l'activation des LT. De hauts niveaux de signaux pro-inflammatoires, incluant l'IFN-γ et le TNF-α produits par les LT activés ou les macrophages M1 agissent comme un mécanisme de rétroaction et induisent la voie anti-inflammatoire en (A).

CCL18 : Chémokine (C-C motif) ligand 18 ; **CD** : cluster of differentiation ; **CD40L** : CD40 ligand ; **IDO** : indoleamine 2,3-dioxygénase ; **IL-6** : interleukine 6 ; **IFN-γ** : interféron gamma ; **LT** : Lymphocytes T ; **LTreg** : LT régulateurs ; **M** : macrophages ; **MO** : monocytes ; **PGE2** : prostaglandine E2 ; **sHLA-G** : soluble human leukocyte antigen G ; **TNF-α** : tumor necrosis factor alpha.

b) Le récepteur à l'IFN-γ: CD119

Le récepteur à l'IFN-γ est composé de 2 sous-unités : IFN-γ R1 (CD119) et IFN-γ R2. IFN-γ R1 correspond au site de liaison au ligand (IFN-γ), tandis que IFN-γ R2 correspond à la chaîne accessoire nécessaire à la transduction du signal (Pestka et al., 1997). En effet, la liaison de l'IFN-γ à son récepteur entraîne l'oligomérisation des 2 sous-unités du récepteur entraînant la transduction du signal : l'activation des récepteurs Jak1 et Jak2 associés aux protéines tyrosine kinases, la phosphorylation du domaine intracellulaire de l'IFN-γ R1 suivi de la phosphorylation et de l'activation du facteur de

transcription stat1 α (Pestka et al., 1997). Il a d'ailleurs été montré que la production d'IFN- γ par les LT activés était corrélée à l'induction de l'expression deIDO dans les CSM de différentes sources (moelle osseuse, tissus adipeux, cordon ombilical et gelée de Wharton) (Kim et al., 2018). De plus, une stimulation des CSM par l'IFN- γ *in vitro* entraîne une augmentation de l'expression deIDO, mais aussi de COX-2, PGE2 et de facteurs solubles impliqués dans l'immunosuppression *via* l'induction d'un métabolisme glycolytique chez les CSM (Liu et al., 2019). Cependant, une stimulation avec une faible dose d'IFN- γ entraîne une augmentation des molécules du CMH de classe II accompagnée d'une présentation antigénique, tandis qu'une forte dose entraîne la diminution de ces molécules du CMH de classe II accompagnée d'une augmentation des propriétés immunosuppressives (Chan et al., 2006). La dose d'IFN- γ est à prendre en compte pour assurer un équilibre entre les propriétés immunosuppressives des CSM et leur comportement en tant que CPA pour des applications de thérapie cellulaire (Yagi et al., 2010).

4. Les propriétés immunomodulatrices des CSM *via* le transfert d'organites : les mitochondries

Le métabolisme cellulaire, et notamment l'activité mitochondriale est primordiale pour le maintien de l'homéostasie cellulaire. Le concept de transfert de mitochondries a été initialement décrit en 2004 par Rustom et al comme une interaction entre cellules *via* des structures en nanotubes en continuité avec la membrane cellulaire afin de réaliser un transfert intracellulaire d'organites (Rustom et al., 2004). En 2004, Spees et al ont décrit ce concept de transfert de mitochondrie dans les CSM qui permettait de restaurer une fonction mitochondriale défaillante (Spees et al., 2006). Le transfert de mitochondries a également été décrit dans d'autres types cellulaires tels que : les cardiomyocytes, les ostéocytes, les cellules endothéliales et les cellules du système nerveux central. Ce transfert peut se faire de différents moyens : tunneling nanotubes (TNT) (i), dendrites (ii), microvésicules (iii), mitochondries libres (iv) (Liu et al., 2021).

De plus, ce transfert a été décrit entre les CSM saines et CSM stressées par H₂O₂ (peroxyde d'hydrogène) (Li et al., 2017b) et entre les CSM et d'autres types cellulaires du système immunitaire tels que les macrophages et les LT, montrant l'implication du transfert de mitochondries dans les propriétés immunomodulatrices des CSM.

a) Transfert de mitochondries entre les CSM et les macrophages

Il a été montré que les CSM pouvaient transférer leurs mitochondries vers les macrophages *via* formation de nanotubes TNT (tunneling nanotubes) ou par le relargage de microvésicules contenant les mitochondries afin d'augmenter la capacité de phagocytose (i) et la phosphorylation oxydative (ii) et de diminuer l'expression de cytokines pro-inflammatoires telles que l'IL-4 (Jackson et al., 2016). Ce mécanisme est prometteur pour les effets antimicrobiens des CSM dans le cas de SDRA.

b) Transfert de mitochondries entre les CSM et les lymphocytes T

Il a été montré que les CSM transfèrent leurs mitochondries principalement vers les LT CD4+ plutôt que vers les LT CD8+ ou les LB CD19+ (Court et al., 2020). De même, ce transfert de mitochondries entraîne une augmentation de l'expression des ARN messagers impliqués dans l'activation des LT et la différenciation en LTreg tels que FoxP3, IL2RA, CTLA4 et TGF- β 1, entraînant une augmentation dans la population CD25+FoxP3+. Ce transfert de mitochondries permet *in fine* de diminuer la réponse inflammatoire (Court et al., 2020).

Il a également été montré que le transfert de mitochondries entre les CSM-MO et les LT helper 17 (LTh17) entraînait une baisse de leur production d'IL-17 associée à une augmentation de la

consommation d'oxygène et leur conversion en LTreg (Luz-Crawford et al., 2019). De plus, dans les CSM-MO de souris, l'inactivation de l'hypoxia-inducible factor 1 α (HIF-1 α), un régulateur du changement métabolique, diminue le potentiel inhibiteur des CSM-MO sur la génération de LTh1 et TH17 et limite la génération des LTreg. De plus, dans ces CSM-MO la baisse des propriétés immunosuppressives suite à l'inactivation de HIF-1 α est associée à un *switch* métabolique de la glycolyse vers la phosphorylation oxydative dans les CSM (Contreras-Lopez et al., 2020).

5. Mise en évidence *in vitro* des propriétés immunomodulatrices des CSM

Au laboratoire, les propriétés immunomodulatrices des CSM sont évaluées grâce à des co-cultures entre les CSM et des populations de cellules du système immunitaire adaptatif : cellules mononuclées du sang périphérique ou PBMC (peripheral blood mononuclear cell) (i) ou populations enrichies en LT CD3+ (ii) ou CD4+ (iii) ou CD8+(iv). Les tests consistent à analyser l'inhibition de la prolifération des cellules immunitaires activées par les cellules immunosuppressives telles que les CSM. Dans le cas des PBMC, deux populations de PBMC sont utilisées pour être en situation allogénique, dont la première sera irradiée et ne prolifèrera pas mais pourra induire la prolifération de la seconde. Pour les populations enrichies en LT (CD3, CD4 ou CD8), les cellules seront activées par la phytohémagglutinine (PHA) ou des anticorps anti-CD3/CD28 sous formes de billes ou de coating (Castro-Manrreza and Montesinos, 2015). La prolifération cellulaire est détectée grâce à un marqueur perméable aux membranes tel que l'ester succinimidyle de carboxyfluorescéine (CFSE) ou le Cell trace violet (CTV), qui se lie de façon covalente à toutes les amines libres à l'intérieur ou à la surface des cellules. Lors de la division cellulaire il se répartit sur les deux cellules filles induisant ainsi une diminution de la fluorescence détectée par cytométrie en flux. Dans la littérature, la capacité des CSM à inhiber la prolifération des cellules immunitaires a pu être mise en évidence quel que soit le test. Cependant, les mécanismes d'immunosuppression des CSM dépendent de certains paramètres : populations cellulaires, mode d'activation, et la présence ou non de contacts entre les cellules (Castro-Manrreza and Montesinos, 2015).

Pour cette thèse, nous avons décidé de travailler avec des populations enrichies en LT CD3+ activées par des billes anti CD3/CD28, étant donné que la GVHD (graft-versus host disease) est l'une des applications de l'équipe.

IV. Les CSM et la médecine régénérative

A. Définition générale de la médecine régénérative

La médecine régénérative a pour objectif *via* la **thérapie cellulaire** ou l'**ingénierie cellulaire** de remplacer ou régénérer des cellules, des tissus ou des organes endommagés afin de rétablir une fonction normale. Cela est réalisé par l'activation de cellules endogènes, ou par l'injection de cellules exogènes pour la thérapie cellulaire, ou par le remplacement des tissus lésés par la fabrication de biotissus *in vitro* dans le cadre de la médecine régénérative. La médecine régénérative fait souvent appel à des cellules. Parmi les différents types cellulaires possibles, les CS et en particulier les CSM constituent un outil intéressant.

B. Ingénierie tissulaire

Bien que certains tissus comme le foie ou la peau se régénèrent rapidement suite à une lésion, d'autres comme le cartilage, ne se régénèrent pas. Ainsi le but de l'ingénierie tissulaire est de développer des substituts fonctionnels afin de remplacer les tissus ou les organes endommagés. Avant l'implantation au niveau de la lésion, des cellules sont prélevées chez le patient dans le cas d'une greffe

autologue, amplifiées *in vitro* avant d'être ensemencées dans un biomatériau permettant le développement d'une matrice extra cellulaire (MEC) similaire au tissu natif. De plus, les biomatériaux utilisés peuvent véhiculer des molécules biologiquement actives ou être soumis à des contraintes mécaniques permettant ainsi le développement d'un néo tissu (George, 2009) (Pelttari et al., 2009).

Cette discipline constitue une stratégie thérapeutique innovante qui peut être appliquée à différentes pathologies telles que les pathologies cardiovasculaires ou ostéo-articulaires (Larochette et al., 2020). De plus, cette stratégie thérapeutique permet de s'affranchir des problèmes d'histocompatibilité dans le cas des greffes d'organes dont la disponibilité reste faible.

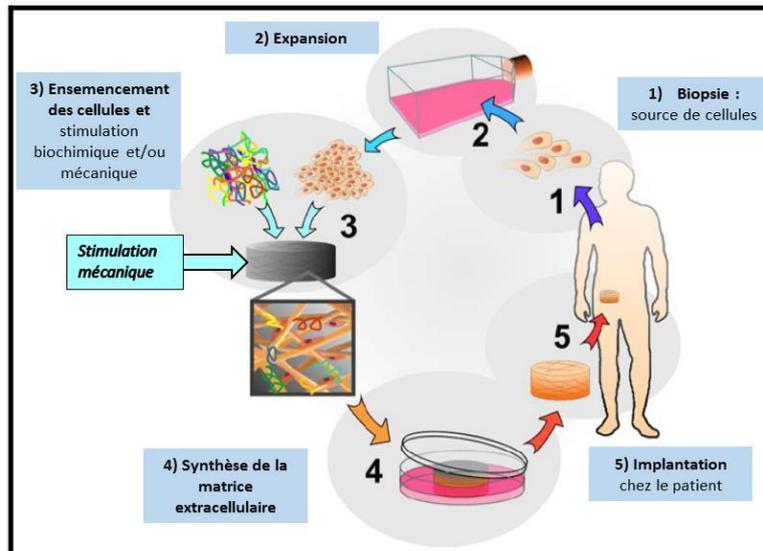


Figure 13 : Schéma du principe de l'ingénierie tissulaire à partir de cellules autologues (George, 2009)

Les cellules d'intérêts sont prélevées chez le patient et isolées (1). Elles sont ensuite sélectionnées en fonction de leur phénotype et amplifiées en monocouche (2). Après expansion, les cellules sont ensemencées dans un biomatériau poreux (3D) en présence ou non de molécules biologiquement actives avec ou sous contrainte mécanique pour permettre le développement d'un néo tissu (3). Les cellules en biomatériaux sont ensuite cultivées pour permettre leur prolifération et la synthèse d'une matrice extracellulaire (4). Enfin, le tissu régénéré est implanté chez le patient au niveau du site de lésion et ainsi permettre son intégration au tissu naturel (5).

1. Thérapie cellulaire à base de CSM

Dans le cadre de la thérapie cellulaire, les CSM sont prélevées chez le donneur ou chez le patient à partir de différentes sources telles que la moelle osseuse, la gelée de Wharton (tissu conjonctif du cordon ombilical), le tissu adipeux, ... Les CSM sont ensuite isolées grâce à leurs propriétés d'adhésion au plastique et amplifiées *in vitro* afin d'avoir un nombre suffisant de cellules. Après expansion, les CSM sont injectées chez le même donneur en cas de situation autologue ou chez un autre patient en cas de situation allogénique (Figure 14).

La thérapie cellulaire constitue également une stratégie thérapeutique innovante qui peut être appliquée à différentes pathologies telles que le syndrome de détresse respiratoire aiguë (SDRA) de la Covid-19 ou de la maladie du greffon contre l'hôte.

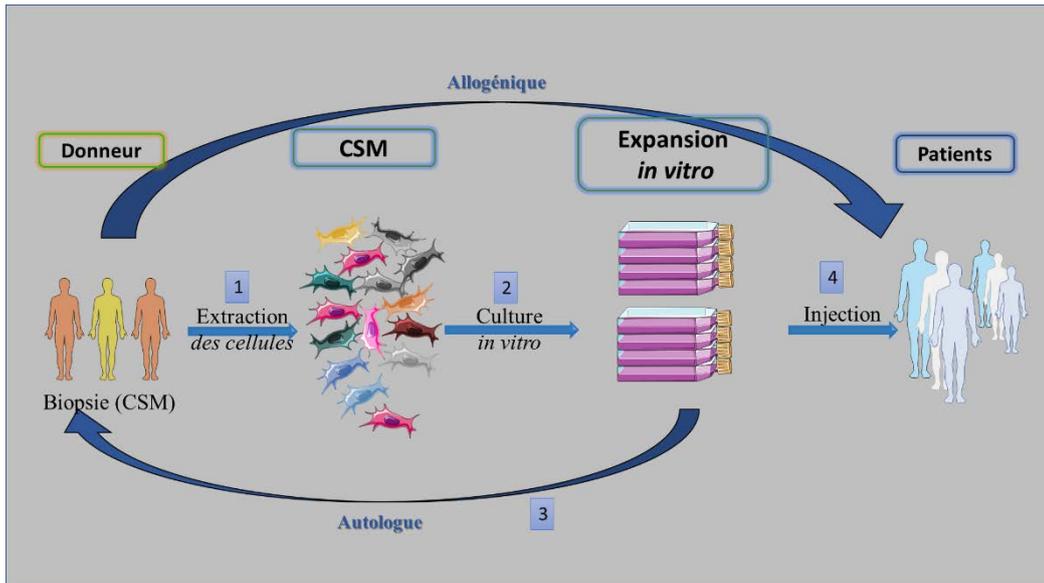


Figure 14 : Schéma du principe de la thérapie cellulaire

Les cellules d'intérêts sont prélevées chez le patient et isolées (1). Elles sont ensuite sélectionnées en fonction de leur phénotype et amplifiées en monocouche (2). Après expansion, afin d'avoir un nombre de cellules suffisant, les cellules sont injectées au même donneur en cas de situation autologue (3) ou chez un autre patient en cas de situation allogénique (4).

C. Utilisation des CSM en thérapie cellulaire

1. CSM et produits de thérapie cellulaire

a) Les CSM en tant que médicament de thérapie innovante (MTI)

Les CSM sont considérées comme des médicaments de thérapie innovante (MTI ou advanced therapy medicinal products, ATMP) au niveau européen (Règlement (CE) n°1394/2007) (Boucher and Cras, 2018). Selon cette directive, les CSM sont considérées comme des produits thérapeutiques qui proviennent de cellules somatiques qui présentent 2 caractéristiques (Sensebé and Bourin, 2011) : des cellules ou tissus non destinés à être utilisés pour la ou les mêmes fonctions essentielles chez le receveur et le donneur (i), et/ou des cellules ou des tissus qui ont fait l'objet d'une manipulation substantielle de façon à modifier leurs caractéristiques biologiques, leurs fonctions physiologiques ou leurs propriétés structurales (ii). L'amplification, ainsi que la congélation, sont, selon la réglementation européenne, considérées comme des modifications substantielles qui nécessitent la réalisation de tests de contrôle de la qualité et la fonctionnalité de ces cellules suite à la production *in vitro*. Cette réglementation se réfère aux règles européennes de bonnes pratiques de fabrication (BPF). En France, ce règlement européen a entraîné des modifications du code de la santé publique suite à la publication de la n°2011-302 du 22 mars 2011 associé au décret 2012-1236 du 06 novembre 2012 relatif aux MTI (Boucher and Cras, 2018). Ce dernier introduit la notion d'exemption hospitalière définie par le terme de MTI préparés ponctuellement (MIT-PP). Cette loi est également associée au décret n°2016-1536 du 15 novembre 2016 relatif à l'utilisation des MTI et des MTI-PP dans le cadre de la recherche biomédicale (Boucher and Cras, 2018). Par ailleurs, les MTI sont fabriqués après l'autorisation de l'Agence nationale de sécurité du médicament et des produits de santé (ANSM) à l'intention d'un malade déterminé, et utilisés dans un hôpital, sous la responsabilité d'un médecin, pour exécuter une prescription médicale déterminée. De plus, la commercialisation des MTI nécessite une autorisation de mise sur le marché délivrée au niveau européen (AMM) (Boucher and Cras, 2018).

De plus, en France, depuis la loi 2011-814 du 7 juillet 2011 relative à la bioéthique, les CSM-GW ne sont plus considérées comme des déchets opératoires et leur prélèvement ne peut se faire qu'à des

fins thérapeutiques ou scientifiques sous forme de don anonyme et gratuit et avec consentement du donneur tout comme les CSM-MO (Reppel et al., 2012).

b) Applications cliniques/essais cliniques

Actuellement, des CSM sont commercialisées aux États-Unis, en Nouvelle Zélande et au Japon dans l'indication du traitement de la maladie du greffon contre l'hôte en post-allogreffe de cellules souches hématopoïétiques allogénique et les CSM de tissu adipeux disposent même d'une AMM pour traiter les fistules péri-anales de la maladie de Crohn (Alofisel®) (Boucher and Cras, 2018). Par ailleurs, de nombreux essais cliniques à base de CSM sont actuellement en cours (www.clinicaltrials.gov) (Figure 15).

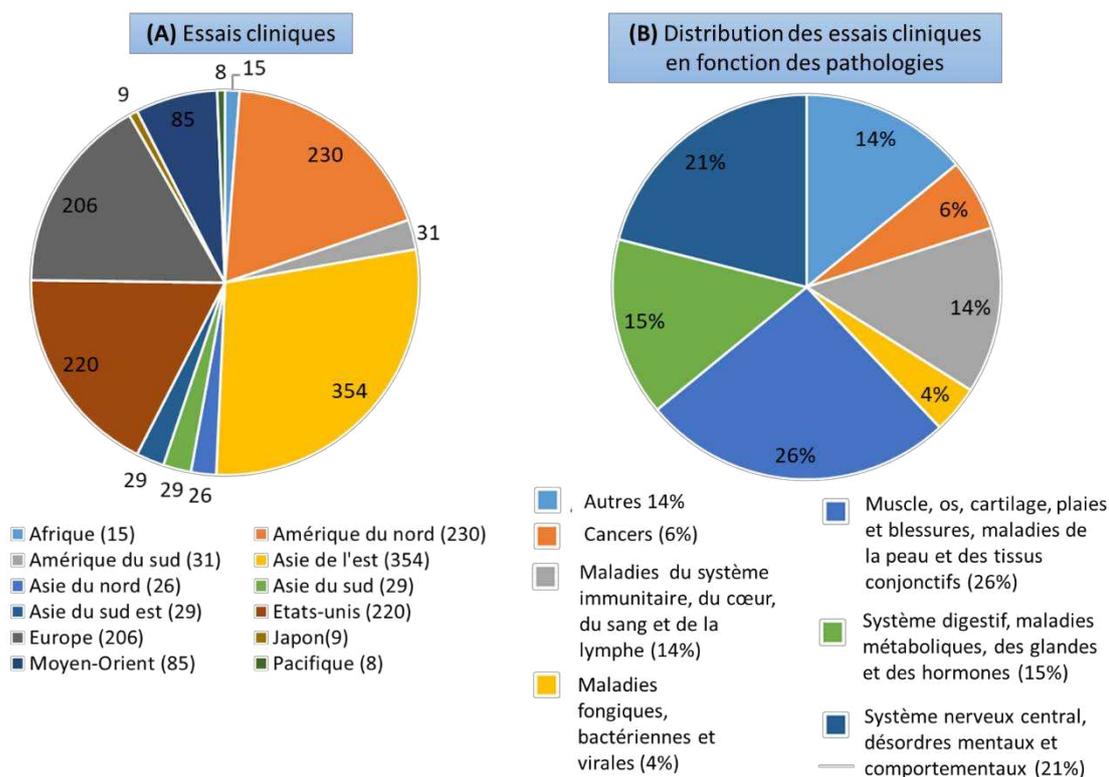


Figure 15 : Essais cliniques à base de CSM en 2020 d'après (Juárez-Navarro et al., 2020)

Répartition des essais cliniques à base de CSM enregistrés en 2020 (A). Distribution des essais cliniques à base des CSM dans le monde en fonction des pathologies en 2020 (B) d'après (Juárez-Navarro et al., 2020)

Une des applications cliniques actuelles des CSM concerne le syndrome de détresse respiratoire aiguë (SDRA) observé dans les cas de complication de la COVID-19 (Laroye et al., 2020). Le SDRA est une cause de détresse respiratoire caractérisé cliniquement par la présence d'infiltrats bilatéraux et d'une hypoxémie. De plus, les patients présentent un orage cytokinique, une inflammation excessive, mais aussi une immunosuppression et une lymphocytopenie. L'une des stratégies de thérapie consiste à utiliser les CSM, parmi lesquelles les CSM-GW présentent un réel intérêt (Laroye et al., 2020). Elles sont d'ailleurs utilisées dans le cadre d'un essai clinique pour traiter les patients atteints de la COVID-19 avec un SDRA au CHRU de Nancy (www.clinicaltrials.gov, NCT04625738) ou à l'hôpital de la Pitié Salpêtrière à Paris (www.clinicaltrials.gov, NCT04333368). En effet, dans le cadre de SDRA les CSM agissent sur différents types cellulaires, notamment les macrophages en induisant le phénotype M2 anti-inflammatoire, les neutrophiles, les cellules épithéliales par transfert des mitochondries et

sécrétion de différents facteurs solubles qui permettent de diminuer la perméabilité membranaire dans les bronches (Walter et al., 2014).

Les CSM sont également utilisées pour leurs propriétés immunosuppressives pour traiter le choc septique dans le cadre d'un essai clinique au CHRU de Nancy (www.clinicaltrials.gov, NCT02883803) ou la maladie du greffon contre l'hôte (GVHD) une des complications des allogreffes de CSH dans le cadre d'hémopathies malignes en Malaisie (cf « OS et GVHD ») (www.clinicaltrials.gov, NCT03847844). Les résultats des essais cliniques à base de CSM, montrent que l'efficacité thérapeutique passe par l'induction de LT régulateurs afin d'inhiber l'effet GVHD (graft versus host disease) sans inhiber l'effet GVL (graft versus leukemia) (Wang et al., 2016a)

2. Conditions de culture des CSM en grade clinique et en grade recherche

a) Conditions de culture en grade recherche

La production des CSM dans les laboratoires de recherche académique, doit respecter les règles de bases de culture cellulaire en conformité avec les règles d'hygiène et de sécurité. La culture se fait en conditions stériles sous un poste de sécurité microbiologique de type 2, afin de protéger le manipulateur d'une part et d'éviter toute contamination bactérienne et/ou fongique de la culture. Le milieu de culture de base α MEM (alpha Minimum Essential Medium Eagle) ou DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) low glucose de base supplémenté avec 10 % de serum de veau foetal (SVF) décomplémenté et avec des antibiotiques. Le SVF contient les facteurs de croissance qui vont permettre la prolifération des CSM. Néanmoins, le SVF est obtenu à partir de veau foetal selon un procédé bien défini (*Figure 17*). L'utilisation du SVF pour des applications thérapeutique chez l'homme est déconseillé par les autorités réglementaires étant donné le risque de transmission de prions et d'autres zoonoses et afin d'éviter les réactions xénogéniques chez l'hôte (Astori et al., 2016). C'est pourquoi des substituts d'origine non animale sont à privilégier pour des applications de thérapie cellulaire chez l'homme (Astori et al., 2016; Doucet et al., 2005). La culture des CSM peut se faire en condition de normoxie (21% d'oxygène), d'hypoxie (2-5% d'oxygène) ou d'anoxie (<1%).

b) Conditions de culture en grade clinique

La production des CSM pour des applications cliniques doit se faire en accord avec les règles de BPF. Elle doit se faire dans un environnement spécifique, sous une hotte à flux laminaire (classe A) placée dans une pièce en surpression et dont le taux d'empoussièrément est très bas (classe B). De même, tous les réactifs et les substances utilisés dans le procédé de production et les contrôles, le stockage, la réception, l'envoi et la distribution doivent respecter cette réglementation (Sensebé and Bourin, 2011). D'ailleurs, les systèmes de culture clos sont à privilégier par rapport aux systèmes classiques en flacons de culture. De plus, pour la culture en 2 dimensions, des containers multi-étages (Nunc, Corning) couplés à des systèmes de connexion, tubulure et poches (Macopharma) sont utilisés (Sensebé and Bourin, 2011). Des projets de culture en grade clinique en 3 dimensions à l'aide de bioréacteurs sont en cours de développement afin d'augmenter le nombre de CSM disponibles pour des applications cliniques. Le projet Improve-STEM, financé par la communauté européenne dans le cadre de l'appel Interreg Va, est un exemple. Le lysat plaquettaire humain (LPH) a été proposé pour l'expansion *ex vivo* des CSM pour des applications cliniques à la place du SVF (Doucet et al., 2005). Celui est obtenu à partir de concentrés plaquettaires selon un procédé bien défini (*Figure 17*). Les conditions de cultures pour les CSM-GW et CSM-MO en grade clinique au sein de l'unité de thérapie cellulaire et banque de tissus (UTCT) de Nancy sont détaillées dans la *Figure 16*. Pour les CSM-GW la

condition d'hypoxie est utilisée pour l'expansion *in vitro*, tandis que les CSM-MO sont amplifiées en condition de normoxie.

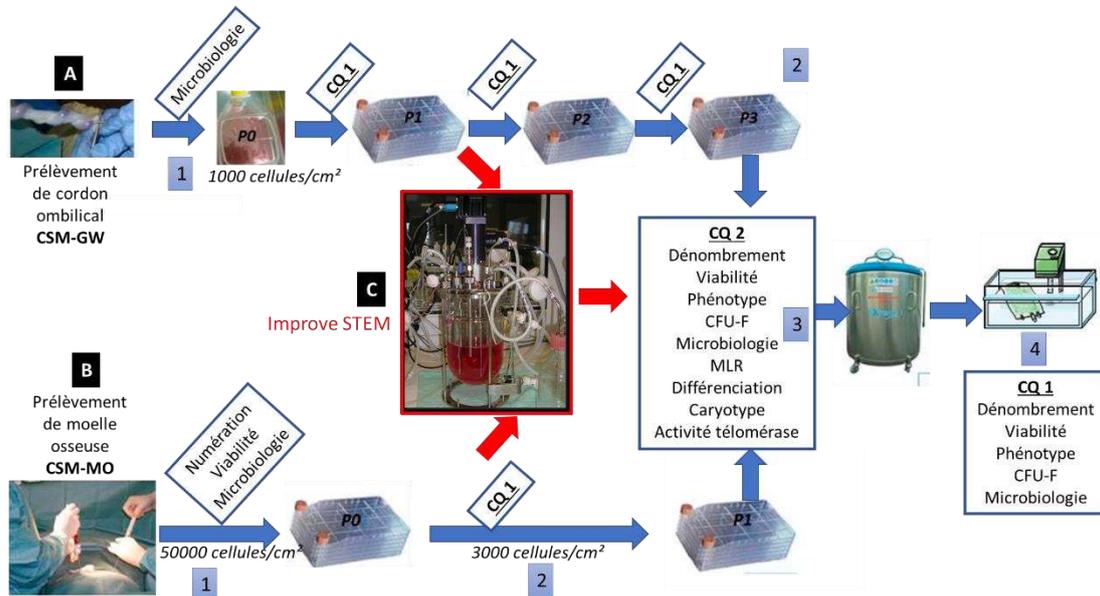


Figure 16 : Les différentes étapes et contrôles qualités à réaliser lors de la production de CSM-GW et CSM-MO en conditions de grade clinique existantes ou en développement (Laroye et al., 2019)

Production de CSM-GW en 2 dimensions en grade clinique (A). Les cellules stromales/souches mésenchymateuses de gelée de Wharton (CSM-GW) sont isolées à partir de cordons ombilicaux selon la méthode de Capelli et al, 2011. Les CSM vont migrer depuis les coupes longitudinales de cordon vers le plastique en P0. Des tests microbiologiques sont réalisés avant ensemencement (1). Les cellules sont ensuite trypsiniées et ensemencées à une densité de 1000 cellules/cm² du passage 1 (P1) à 3 (P3) (2). Lors de chaque trypsination un premier type de contrôle qualité (CQ1) est réalisé (Dénombrement, viabilité, phénotype, clonogénicité (CFU-f : Colony Forming Unit- fibroblast), microbiologie). À la fin du P3, un deuxième type de contrôle qualité (CQ2) est réalisé (CQ1+MLR (Mixte lymphocyte réaction), Différenciation, Caryotype, activité télomérase) avant de congeler les cellules dans de l'azote liquide à 196°C (3). Lorsqu'une thérapie cellulaire est envisagée, les lots sont libérés et sont utilisés chez le patient après avoir réalisé le contrôle qualité (CQ1) (4).

Production de CSM-MO en 2 dimensions en grade clinique (B). Les cellules stromales/souches mésenchymateuses de moelle osseuse (CSM-MO) sont prélevées au niveau de la crête iliaque de donneur sain. Les cellules mononuclées sont dénombrées et des tests de viabilité et microbiologiques sont réalisés avant l'ensemencement en P0 à une densité de 50000 cellules/cm² (1). Les cellules sont ensemencées jusqu'au passage 1 à une densité de 3000 cellules/cm² après avoir réalisé un contrôle qualité (CQ1) (2). À la fin du P1, le deuxième type de contrôle qualité (CQ2) est réalisé avant congélation des CSM-MO dans de l'azote liquide à 196°C (3). Lorsqu'une thérapie cellulaire est envisagée, les lots sont libérés et sont utilisés chez le patient après avoir réalisé le contrôle qualité (CQ1) (4).

Production de CSM en 3 dimensions en bioréacteur (C). Exemple du projet Improve STEM, développé pour récupérer les CSM à la fin du passage précoce et les amplifier en 3 dimensions en bioréacteur, afin d'augmenter le nombre de CSM-GW disponibles pour les applications de thérapie cellulaire.

c) Comparaison de la composition du lysat plaquettaire humain et du sérum de veau fœtal

Le SVF d'origine animale et le LPH d'origine humaine sont obtenus par 2 procédés différents détaillés dans la Figure 17. Le SVF filtré est obtenu à partir sang total coagulé et centrifugé, tandis que le LPH est obtenu après filtration d'unités plaquettaires lysées par des cycles de congélation/décongélation afin de libérer le contenu en facteurs de croissance suivi d'une étape de centrifugation.

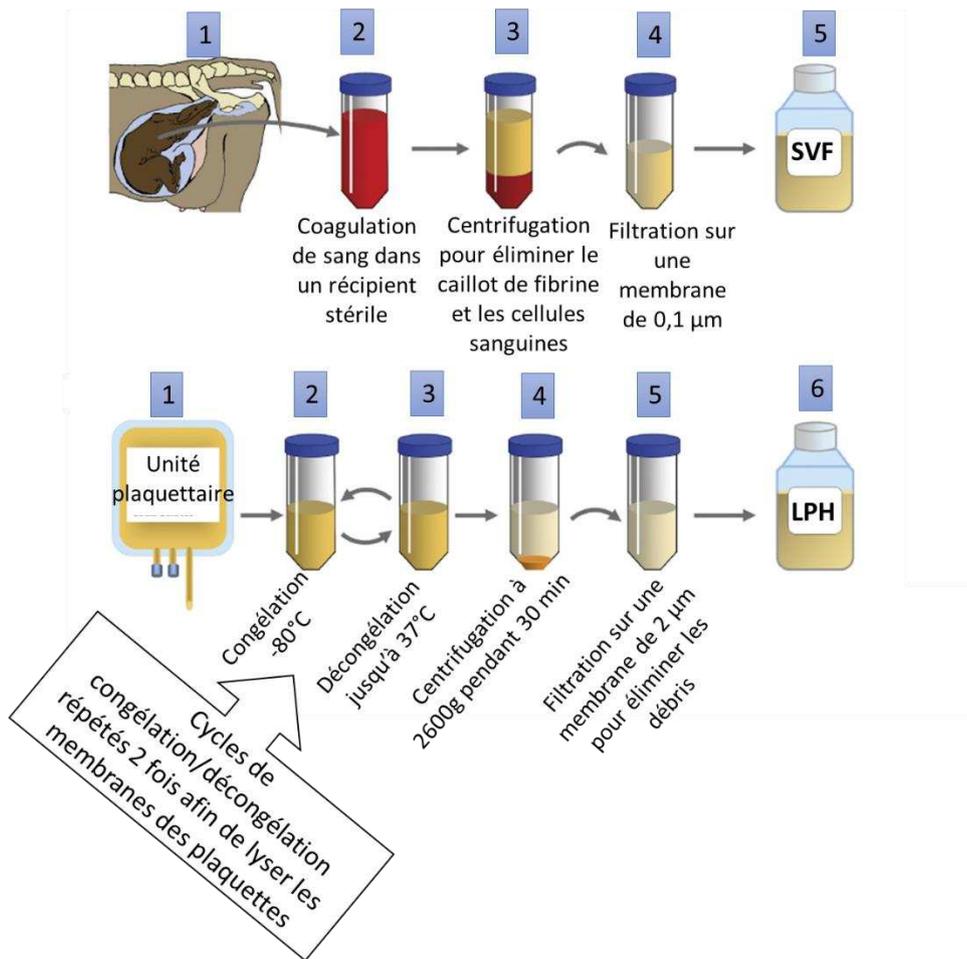


Figure 17 : Comparaison du mode de préparation du SVF et du LPH (Hemeda et al., 2014)

Obtention du sérum de veau fœtal (SVF) (A). Le SVF est obtenu à partir du sang de fœtus de bovins lors de l'abattage des vaches gestantes (1). Le sang coagule après avoir refroidi dans tube stérile (2). Le tube est ensuite centrifugé afin d'éliminer les cellules sanguines et le caillot de fibrine (3). Le sérum récupéré dans le surnageant est ensuite filtré sur une membrane de 0,1 µm (4). Le SVF sera décomplémenté 30 minutes à 56 °C avant supplémentation du milieu de culture des CSM. **Obtention du lysat plaquettaire humain (LPH) (B).** Le LPH est obtenu à partir d'unités plaquettaires (1) qui seront congelées à -80°C (2) et décongelées à 37°C deux fois afin de libérer le contenu des plaquettes riches en facteurs de croissance (3) puis centrifugées afin d'éliminer les fragments cellulaires (4). Le surnageant est ensuite filtré sur une membrane de 2 µm afin d'éliminer les débris (5) et supplémenté avec de l'héparine afin d'éviter la formation de gel (6).

d) Comparaison de la composition biochimique et en facteurs de croissance du SVF et du LPH

L'origine et la méthode de préparation du SVF et du LPH peuvent expliquer les différences dans la composition du SVF et du LPH. Shanskii et al ont comparé la composition biochimique et en facteurs de croissance du SVF et du LPH et ont montré que dans le LPH, les concentrations en phosphatase alcaline, en lactate déshydrogénase, en paramètres du métabolisme minéral étaient plus faibles par rapport au SVF. En revanche, les paramètres du métabolisme des lipides et des protéines étaient plus élevés (Tableau 5) (Shanskii et al., 2013).

Tableau 5 : Comparaison des paramètres biochimiques entre le LPH et le SVF d'après (Shanskii et al., 2013)

Paramètre	Réf normale	SVF (n=4)	LPH (n=20)
Bilirubine totale (µmol/L)	0-20,5	1,18 ± 0,33	3,16 ± 0,32
Cholesterol (mmol/L)	3,12-6,24	0,88 ± 0,08	3,83 ± 0,17*
HDL (mmol/L)	0,91-1,56	0,17 ± 0,02	1,14 ± 0,04
LDL (mmol/L)	0-3,36	0,42 ± 0,07	1,72 ± 0,12
Triglicérides (mmol/L)	0-2,26	0,9 ± 0,15	1,03 ± 0,13
Protéines totales (g/L)	64-83	36,5 ± 1,24	58,64 ± 0,77*
Albumine (g/L)	35-50	20,98 ± 1,36	34,45 ± 0,45*
AST (U/L)	0-40	18,67 ± 8,88	39,2 ± 2,17
ALT (U/L)	0-41	3,75 ± 0,25	17,2 ± 1,5
Phosphatase alcaline (U/L)	0-270	678 ± 37,23	112,85 ± 6,7*
LDH (U/L)	225-450	702,25 ± 70,89	379,55 ± 61*
Urée (mmol/L)	2,5-8,3	6,1 ± 0,17	4,56 ± 0,22
Acide urique (mmol/L)	137-452	68,25 ± 14,33	246,6 ± 15,89*
Glucose (mmol/L)	3,3-6,1	3,53 ± 0,83	15,94 ± 0,23*
Potassium (mmol/L)	3,5-5	11,9 ± 0,55	4,79 ± 0,09
Sodium (mmol/L)	135-152	140,18 ± 0,77	157,13 ± 0,62*
Calcium (mmol/L)	2,15-2,58	3,44 ± 0,1	2,02 ± 0,02*
Phosphate inorganique (mmol/L)	0,81-1,45	3,2 ± 0,28	1,35 ± 0,17*
Chlorures (mmol/L)	96-108	98,5 ± 0,87	85,35 ± 0,5*
Magnésium (mmol/L)	0,70-1,05	1,42 ± 0,06	0,88 ± 0,01*
Fer (µmol/L)	9-31,3	32,68 ± 5,14	14,79 ± 0,98*
Créatinine (µmol/L)	53-115	206,75 ± 14,51	84,35 ± 1,69*

g : gramme ; **HDL** : high-density lipoproteins ; **L** : litre ; **LDL** : low-density lipoproteins ; **LPH** : lysat plaquettaire humain ; **n** : nombre d'échantillons ; **Réf normale** : valeur de référence normale dans le sang total humain ; **SVF** : sérum de veau foetal ; **U** : unité. Les paramètres qui se situent au-delà de la plage normale pour le sang total humain sont affichés en caractères gras. * $p < 0,05$ en comparaison avec le SVF. Valeurs supérieures (rouge) et inférieures (vert) dans le LPH par rapport au SVF.

De même, la concentration en facteurs de croissance tels que platelet derived growth factor AA, AB, BB (PDGF AA, AB, BB), vascular endothelial growth factor (VEGF), insuline-like growth factor (IGF) et transforming growth factor beta (TGF-β) était plus importante dans le LPH que dans le SVF (Tableau 6) (Shanskii et al., 2013). Cette forte concentration en facteurs de croissance dans le LPH a été confirmée par la société Macopharma qui commercialise le LPH utilisé dans cette étude et d'autres études (Doucet et al., 2005; Kinzebach et al., 2013). De façon intéressante, le remplacement du SVF par des concentrations croissantes en LPH a permis d'augmenter les propriétés prolifération des CSM de tissu adipeux (Shanskii et al., 2013).

Tableau 6 : Concentrations en facteurs de croissance dans le LPH et le SVF d'après (Doucet et al., 2005; Shanskii et al., 2013)

Facteur de croissance	SVF (n=4)	LPH (n=46)	Auteur
bFGF (ng/mL)	3 ±0,4	92 ±36	Doucet et al, 2005 (SVF n=10 ; LPH n=10)
IGF-1 (ng/mL)	64,1 ±3,3	108,7 ±4,5*	Shanskii et al, 2013 (SVF n=4 ; LPH n=46)
PDGF (pg/mL)	AA 141,9 ±14,5	6908 ±673*	
	AB 26,8 ±7,7	3984 ±487*	
	BB 0	8196 ±979	
TGF-β (pg/mL)	845 ±66,5	16303 ±1004,8*	
VEGF (pg/mL)	2,5 ±1,5	147,7 ±19,8*	

IGF-1 : insuline like growth factor 1 ; **LPH** : lysat plaquettaire humain ; **PDGF** : plalet derived growth factor ; **SVF** : sérum de veau foetal ; **TGF-β** : transforming growth factor beta ; **VEGF** : vascular endothelial growth factor. Valeurs supérieures (rouge) dans le LPH par rapport au SVF.

Mis à part les facteurs de croissance, les plaquettes contiennent les granules α (i) riches en facteurs de la coagulation, en molécules d'adhésion (fibrinogène, Von Willebrand factor...), des molécules immunologiques (IgG, complément ...), des chimiokines (RANTES,...), mais aussi les granules denses (ii) contenant certaines molécules telles que l'histamine, le calcium, la sérotonine..., et les lysosomes (iii) qui contiennent certaines enzymes telles que l'élastase ou la collagénase (Burnouf et al., 2016). Même si des travaux ont montré une faible variabilité dans le contenu en facteurs de croissance entre les différents lots de LPH (données Macopharma) (Altaie et al., 2016), il existe différentes stratégies d'obtention du LPH à partir de concentré plaquettaire : Buffy coat (i), plasma riche en plaquette (ii) et aphérèse (iii) (Figure 18).

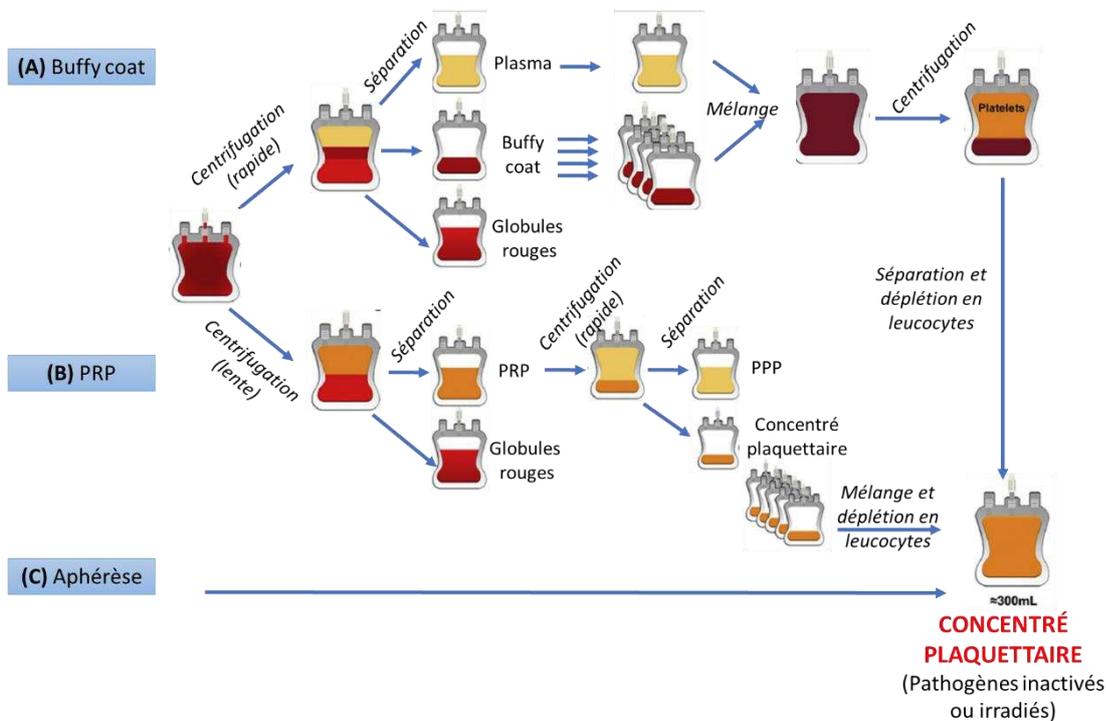


Figure 18 : Les différentes méthodes d'obtention d'unités/concentrés plaquettaires

Le concentré plaquettaire peut être obtenu à partir de 3 méthodes. La méthode du buffy coat (A) : 4 unités de buffy coat et une unité de plasma obtenues à partir de sang total sont mélangées avant de séparer les plaquettes par centrifugation et

d'éliminer les leucocytes par filtration. La méthode du plasma riche en plaquettes (PRP) (B) : Mélange de 6 unités de PRP obtenues à partir de sang total avant d'éliminer les leucocytes par déplétion. L'aphérèse (C) : un seul de donneur de concentré plaquettaire par aphaérèse. Quelle que soit la méthode, les éléments pathogènes éventuels sont inactivés ou irradiés. PPP : plasma pauvre en plaquette.

e) Utilisation de l'héparine

Etant donné que les plaquettes contiennent du fibrinogène et des facteurs de coagulation, il est nécessaire d'utiliser un anticoagulant tel que l'héparine afin d'éviter la formation de gel, néanmoins, sa concentration ne doit pas excéder 0,61 unités/mL (Altaie et al., 2016). En effet, il a été montré que des concentrations trop élevées en héparine altèrent la prolifération de CSM-MO d'une manière dépendante de la dose et inhibent la différenciation adipocytaire et ostéocytaire (Hemeda et al., 2013)

3. Culture des CSM en hypoxie

Il a été montré que l'hypoxie avait un effet bénéfique sur les propriétés de prolifération, de clonogénicité et sur l'expression de HLA-G (impliquée dans l'immunomodulation) des CSM-GW par rapport à celles amplifiées avec du SVF comme supplément de milieu de culture (Reppel et al., 2014). D'ailleurs, à l'UTCT du CHRU de Nancy, les CSM-GW produites en grade clinique sont amplifiées en hypoxie (Laroye et al., 2019). Il existe un facteur de transcription important qui permet à la cellule de s'adapter à ces conditions faibles en oxygène : HIF-1 α (hypoxia inducible factor 1 alpha) (Carrière et al., 2006). En effet, en normoxie HIF-1 α est très instable et est hydroxylé par la prolyl hydroxylase (PHD) en présence d'oxygène et de fer. Il peut ainsi fixer la protéine von Hippel-Lindau (VHL) et être ubiquitiné par E3-ubiquitin ligase (E3 UL) entraînant sa dégradation par le protéasome (Haque et al., 2013). En condition d'hypoxie, HIF-1 α est stabilisé en absence d'oxygène, et peut se lier à HIF-1 β afin d'être transloqué dans le noyau et se fixer à l'hypoxia-response element (HRE) pour induire la transcription de gènes cibles impliqués dans le métabolisme, l'angiogénèse et la migration des CSM (Haque et al., 2013) (Figure 19). De plus, la stabilisation de HIF-1 α pourrait se faire *via* les espèces réactives de l'oxygène (ROS). En effet, il a été suggéré que l'augmentation de la quantité de ROS en hypoxie selon la théorie de la chaîne respiratoire serait responsable de l'inhibition de la PHD, l'enzyme impliquée dans la dégradation de HIF-1 α (Carrière et al., 2006).

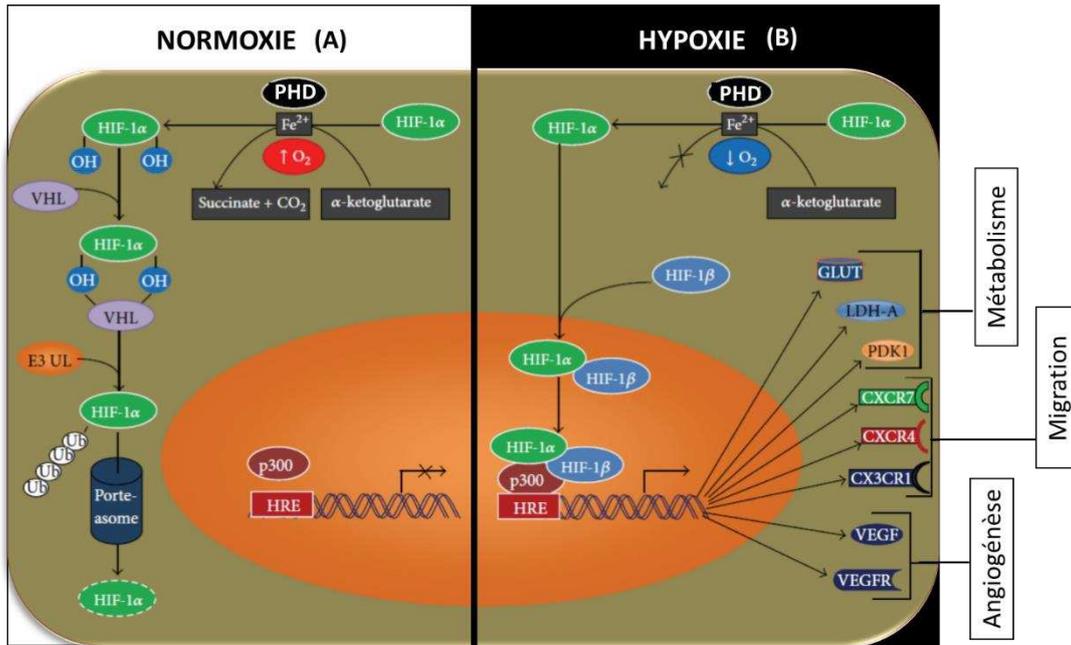


Figure 19 : Régulation de la transcription par HIF-1α en conditions de normoxie et d'hypoxie

En normoxie (A), le facteur de transcription hypoxia inducible factor 1 alpha (**HIF-1α**) localisé dans le cytoplasme est hydroxylé par la prolyl hydroxylase (**PHD**) en présence de fer, qui déclenche son ubiquitination et sa dégradation au niveau du protéasome par le complexe E3-ubiquitin ligase (**E3 UL**)/von Hippel-Lindau (**VHL**). **En hypoxie (B)**, la stabilisation de HIF-1α est transloquée au niveau du noyau et s'associe à HIF-1β pour se lier à l'hypoxia-response element (**HRE**) au niveau des gènes cibles. HRE est associé à des co-activateurs tels que CBP/p300 et va réguler la transcription de gènes cibles impliqués dans le métabolisme, la migration et l'angiogénèse.

Les espèces réactives de l'oxygène (ROS) pourraient avoir un rôle dans la stabilisation de HIF-1α (Carrière et al., 2006). De plus, les meilleures capacités de prolifération des CSM de cordon seraient associées à l'induction de HIF-1α, à une augmentation de l'expression des gènes du métabolisme tels que GLUT-1, LDH et PDK1, ainsi qu'à une augmentation de la consommation en oxygène et de la production de lactate (Lavrentieva et al., 2010). Ces données montrent bien l'importance du métabolisme énergétique dans les propriétés des CSM.

D. Biomarqueurs de qualité des CSM

Actuellement, même si les CSM utilisées en clinique doivent répondre aux principaux critères de l'UTCT (Dominici et al., 2006), des contrôles qualités doivent être développés en fonction des applications. Par ailleurs, différents tests sont réalisés lors de la production de CSM en clinique afin de vérifier certaines de leurs propriétés (Torre et al., 2015). A l'UTCT du CHRU de Nancy, certains contrôles qualités pour l'utilisation des CSM en clinique ont été définies tels que : la prolifération, la viabilité, le phénotype, la clonogénicité, la microbiologie, l'immunomodulation, la différenciation et l'absence de transformation (caryotype et activité télomérase) (Laroye et al., 2019).

Il est évident que les CSM candidates pour des applications de thérapie cellulaire doivent être sûres (non contaminées et ne pas avoir subi de transformations), viables, avoir le bon phénotype, être capables de former des colonies si elles sont souches et avoir de bonnes propriétés fonctionnelles (différenciation, migration, immunomodulation) dépendantes de l'application clinique.

Néanmoins, les CSM utilisées en thérapie cellulaire constituent une population hétérogène avec différentes sous-populations ayant probablement des propriétés fonctionnelles différentes. C'est pourquoi, la mise en place de contrôles complémentaires doit être réalisée afin de mettre en évidence

des biomarqueurs en terme du surfactome (profil de marqueurs de surface), de marqueurs moléculaires, de marqueurs de sénescence et de sécrétome (la sécrétion de facteurs solubles) (Samsonraj et al., 2017). Selon le National Institute of Health (NIH), un biomarqueur est : « une caractéristique qui est objectivement mesurée et évaluée comme un indicateur de processus biologiques normaux ou pathologiques, ou de réponses pharmacologiques en réponse à une intervention thérapeutique ». Les biomarqueurs de la qualité des CSM sont très peu étudiés, bien que le potentiel des biomarqueurs dans la caractérisation cellulaire ait déjà été démontré dans d'autres types cellulaires dont les cellules souches : étude de marqueurs de surface pour le tri, les protéoglycanes de surface (Desantis et al., 2018). Cette partie doit se faire en collaboration entre les équipes de recherche académique grâce à des tests *in vitro* et *in vivo* (i), les équipes de recherche et développement qui doivent adapter les méthodes afin qu'elles soient en accord avec les bonnes pratiques de fabrication (ii) et les équipes cliniques qui se chargent des essais et du suivi clinique chez le patient (iii) (Sensebé and Bourin, 2011).

Ainsi, la **prolifération** des CSM est contrôlée à l'UTCT, car il s'agit d'un paramètre important étant donné la nécessité d'amplifier les cellules *in vitro* afin d'avoir un nombre assez important avant d'être injectées chez le patient (Li et al., 2014). Cette étape d'expansion peut affecter la qualité des CSM et donc l'efficacité thérapeutique. De plus, les capacités de **différenciation** des cellules peuvent être affectées lors de l'expansion (DiGirolamo et al., 1999) (Vono et al., 2018) et les CSM peuvent entrer en **sénescence** pendant l'expansion (DiGirolamo et al., 1999; Vono et al., 2018; Zhai et al., 2019). Le phénotype sécrétoire (*cf "Le phénotype sénescence"*) sénescence pourrait modifier leur propriétés **immunomodulatrices** (Samsonraj et al., 2017; Sensebé and Bourin, 2011; Turinetti et al., 2016; Vono et al., 2018). Le **sécrétome** serait donc un biomarqueur intéressant, de même que le **surfactome**, qui correspond aux antigènes de surface exprimés par les cellules (Vono et al., 2018).

1. Les marqueurs de surface

D'après la littérature et des travaux réalisés dans notre équipe (Thèse (Targa, 2019)) , le **surfactome** présente un réel intérêt. En effet, l'expression de certains clusters de différenciation (CD) à la surface des CSM pourrait être corrélée aux propriétés fonctionnelles des CSM. Au sein d'un même du prélèvement la population de CSM est hétérogène à cause de paramètres liés au donneur tels que l'âge (vieillesse chronologique) ou lors de l'expansion *in vitro* à cause vieillesse répliatif (induction de la sénescence). Ainsi, à partir du travail de thèse de Laurie TARGA et de la littérature, nous avons pu établir une liste de marqueurs potentiels pour sélectionner les CSM candidates pour des applications en thérapie cellulaire (*Tableau 7*). In fine, ces marqueurs de surface pourraient permettre de sélectionner les meilleures CSM candidates en termes de fonctionnalité, grâce à une étape de tri magnétique compatible avec la clinique au début ou pendant l'expansion. L'intérêt des différents marqueurs sélectionnés (**CD71, CD106, CD140b, CD146, CD157, CD166 et CD200**) en fonction de leur potentialité et leur variation d'expression dans les CSM sont regroupées dans le *Tableau 7*.

Parmi, ces marqueurs, le CD146 associé aux meilleures capacités de prolifération des CSM-MO et le CD157 associé à la sénescence des CSM-MO semblent prometteurs.

Tableau 7 : Liste de marqueurs de surface potentiels pour sélectionner les CSM

Maqueur de surface	Autre nom	Fonction	Potentiel des CSM exprimant ce marqueur	Références	Variation d'expression
CD71	Transferrin receptor protein 1 (TfR1)	Récepteur de la transferrine Glycoprotéine transmembranaire exprimée par tous les types cellulaire	Autorenouveaulement, prolifération, multipotence	Siegel et al-2013, Thèse Laurie TARGA-2019	↓ quand l'âge des donneurs de CSM-MO ↑ (Siegel et al-2013) Corrélation avec la prolifération des CSM-MO (Thèse Laurie TARGA-2019)
CD106	Vascular cell adhesion protein 1 (VCAM-1)	Molécule d'adhésion cellulaire qui se lie à l'intégrine- $\alpha 4\beta 1$ (VLA-4). Implication dans l'adhésion des leucocytes, à l'endothélium vasculaire Surexprimé dans un contexte inflammatoire	Immunomodulation, pro-angiogénique, prolifération, clonogénicité, migration/motilité	Siegel et al-2013, Yange et al-2013	↓ quand l'âge des donneurs de CSM-MO ↑ (Siegel et al-2013) Expression varie en fonction du tissu source (faible pour cordon ombilical et modérée pour la moelle (Yang et al-2013)
CD140b	Platelet-derived growth factor receptor beta (PDGFR β)	Récepteur beta au facteur de croissance PDGF Implication de la régulation de la prolifération et la différenciation cellulaire Exprimé pas les cellules de l'endomètre	prolifération	Siegel et al-2013, Thèse Laurie TARGA-2019	↓ quand l'âge des donneurs de CSM-MO ↑ (Siegel et al-2013) Corrélation avec la prolifération des CSM-MO (Thèse Laurie TARGA-2019)
CD146	Melanoma cell adhesion molecule (MCAM), glycoprotéine de surface cellulaire (MUC18)	Glycoprotéine transmembranaire exprimée par les cellules endothéliales, les péricytes, les lymphocytes B et T, les cellules musculaires lisses et les cellules dendritiques impliquée dans l'adhésion et l'extravasation de la matrice inter cellulaire impliquée dans la transduction du signal, la prolifération, la différenciation et la migration	Auto-renouveaulement in vivo, multipotence, migration	Harkness et al-2016, Siegel et al-2013, Thèse Laurie TARGA-2019	↓ quand l'âge des donneurs de CSM-MO ↑ (Siegel et al-2013) Corrélation avec la prolifération des CSM-MO (Thèse Laurie TARGA-2019) ↑ dans CSM avec meilleures capacités de migration (Harkness et al-2016)
CD157	Bone marrow stromal cell antigen 1 (BST1)	Molécules qui contrôle la migration et l'adhésion des leucocytes et impliquée dans la prolifération des CSM	prolifération	Thèse Laurie TARGA-2019	↑ avec sénescence CSM-MO (Thèse Laurie TARGA-2019)
CD166	activated leukocyte cell adhesion molecule (ALCAM)	Glycoprotéine transmembranaire retrouvée dans plusieurs tissus, notamment ceux impliqués dans la croissance et la migration, le LT activés, les monocytes, les cellules épithéliales, les fibroblastes, les neurones	Marqueur classique des CSM, vieillissement chronologique CSM-MO	Siegel et al-2013 Thèse Laurie TARGA-2019	↓ quand l'âge des donneurs de CSM-MO ↑ (Siegel et al-2013) ↓ avec sénescence CSM-MO (Thèse Laurie TARGA-2019)
CD200	OX2	Glycoprotéine transmembranaire impliquée dans la régulation des cellules myéloïdes et l'inhibition des macrophages	Immunomodulation, prolifération	Barcia et al-2015, Delorme et al-2008, Pontikoglou et al-2016	↑ CSM-MO avec meilleure clonogénicité (Delorme et al-2008) ↑ dans CSM de cordon avec meilleures propriétés immunosuppressives (Barcia et al-2015) ↑ dans CSM-MO stimulées par des signaux ostéogéniques et des cytokines pro-inflammatoires (Pontikoglou et al-2016)

CD : cluster de différenciation ; CSM : cellules stromales/souches mésenchymateuses ; MO : moelle osseuse ; ↑ : augmente ; ↓ : diminue.

2. Autres marqueurs protéiques

Nous pourrions envisager de sélectionner d'autres marqueurs protéiques tels que les inhibiteurs du cycle cellulaire P16 et P21 qui permettent de mettre en évidence les cellules sénescentes (Zhai et al., 2019) afin d'exclure ces CSM dont les propriétés fonctionnelles seraient altérées (Sensebé and Bourin, 2011). Cependant, même si l'expression de ces marqueurs dans les cellules sénescentes laissent supposer que le protéome pourrait être un marqueur intéressant (Vono et al., 2018), la mise en évidence de ces protéines intracellulaires nécessite de sacrifier une partie des cellules, contrairement aux marqueurs de surface qui permettent de réaliser un tri magnétique compatible avec la clinique afin de sélectionner les CSM candidates et d'enrichir le prélèvement.

3. Les biomarqueurs moléculaires ARN

D'autres biomarqueurs tels que le **transcriptome** peuvent être pris en considération. Certes, la mise en évidence de ces marqueurs nécessite une étape d'extraction d'ARN et donc de sacrifier une partie des cellules, cependant ces biomarqueurs peuvent être détectés dès le début de la culture afin de réaliser une première sélection des CSM candidates, sans passer par une étape d'expansion *in vitro*, contrairement à la mise en évidence de marqueurs de surface ou à l'évaluation de certains critères tels que la prolifération, qui impliquent d'amplifier les cellules sur plusieurs passages.

a) Définition

Ces dernières années, les progrès technologiques dans le domaine des « microarrays » et du séquençage à haut débit qui permettent des analyses complètes des transcriptomes cellulaires, ont permis le développement d'une nouvelle classe de biomarqueurs : « les biomarqueurs ARN ». L'ARN est un des plus importants composants des organismes vivants. Ainsi chez les vertébrés, les gènes nucléaires de protéines sont initialement transcrits sous forme d'un ARN pré-messager (pré-ARNm) composé de régions codantes ou exons interrompues par des séquences internes ou introniques qui sont éliminées lors d'une étape nucléaire de maturation appelé épissage. L'ARN messenger (**ARNm**) mature ainsi produit est ensuite exporté dans le cytoplasme où il est traduit en protéine. Par élimination alternative des séquences internes, il est possible de produire différents ARNm à partir d'un gène donné. Chez l'homme, ce phénomène d'épissage alternatif concerne près de 95 % des gènes codant des protéines et joue un rôle fondamental dans le développement et la différenciation cellulaire. Il a été mis en évidence que non seulement les ARN pré-messagers, mais aussi les longs ARN non codants (**lncRNA**) et les ARN anti-sens sont épissés de manière alternative (Derrien et al., 2012). Or, ces ARN sont impliqués dans les processus de régulation de l'expression des gènes en particulier, les mécanismes épigénétiques et d'interférence. Par ailleurs, d'autres espèces de petits ARN non codants sont produites dans les cellules et permettent la régulation fine de l'expression des gènes. C'est le cas notamment des **UsnRNA** (U-rich small nuclear RNA) qui sont des composants essentiels de la machinerie d'épissage, des **snoRNA** (small nucleolar RNA) qui interviennent entre autres, dans la biogenèse des ribosomes et des **microARN**, qui régulent l'expression des gènes en s'associant à la région 3'UTR des ARNm, et en perturbant leur traduction ou en induisant leur dégradation. Il est à noter que de nombreux snoRNA et miRNA sont produits à partir d'introns de pré-ARNm ou de longs ARN non codant (Brown et al., 2008). Les profils globaux d'épissage alternatif et d'expression des ARN codants et non codants d'une cellule sont donc très informatifs puisqu'ils reflètent son état de différenciation et son état physiologique.

b) Les microARN

i. Définition

Les microARN ou miR sont des ARN non codants d'une taille allant de 21 à 24 nucléotides. Leur biogenèse est caractérisée par différentes étapes se produisant dans le noyau ou dans le cytoplasme (Weber et al., 2013). La première étape est la transcription du précurseur primaire (pri-miARN) par l'ARN polymérase II au sein du noyau. Ces pri-miARN sont en général de grande taille (plusieurs milliers de nucléotides) et se structurent sous la forme d'une seule ou plusieurs structures en tiges boucle, portant chacune la séquence d'un ou deux miARN. Ces pri-miARN sont maturés dans le noyau par l'enzyme Drosha pour former le pré-miARN (65 à 70 nucléotides) qui sera ensuite exporté, par l'exportine-5, vers le cytoplasme où il sera pris en charge par l'enzyme Dicer pour former le duplex miARN-miARN. Un des deux brins de ce duplex sera ensuite incorporé au complexe RISC (RNA-Induced Silencing Complex). Au sein de ce complexe le miR contrôle l'expression génique au niveau post-transcriptionnel, par appariement à des ARNm cibles par complémentarité de bases. Les ARNm ainsi ciblés sont dégradés et/ou voient leur traduction réprimée. Plus de 80 % des gènes (codants et non codants) sont régulés par des miR. Pour permettre la fixation du miR à l'ARN, il existe une région « seed » (ou région graine), localisée à l'extrémité 5' du miR mature. Cette région, correspondant aux nucléotides en position 2 à 8 va s'apparier avec la région 3'UTR (untranslated region) de l'ARNm cible (Filipowicz et al., 2008) (Figure 20).

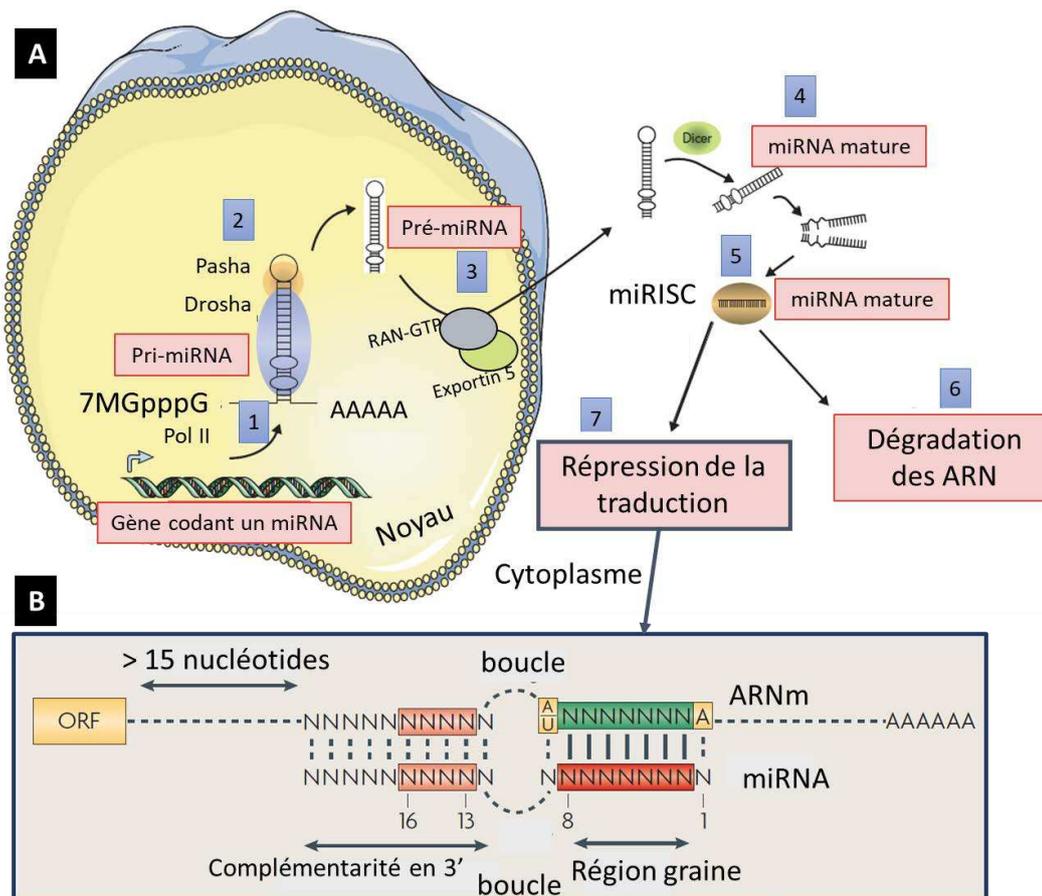


Figure 20 : Biogenèse des microARN d'après (Filipowicz et al., 2008; Jardin et al., 2008; Swarbrick et al., 2019)

Biogenèse des miRNA (A). Les gènes codants les miRNA sont transcrits par l'ARN polymérase II (Pol II) dans le noyau sous forme d'un long transcrit ou *pri-miRNA* (1). Le transcrit est clivé dans le noyau par une RNase III (Drosha) et son cofacteur Pasha pour générer un *pré-miRNA*, précurseur de 70 nucléotides (2). Le *pré-miRNA* est exporté vers le cytoplasme sous l'action de l'exportin 5 et son cofacteur RAN-GTP (3). Dans le cytoplasme, sous l'action de Dicer, une autre RNase III, le *pré-miRNA* va constituer un duplex transitoire miRNA : *miRNA** de 22 nucléotides (4). Le duplex est incorporé dans le complexe protéique

miRISC (5). Le brin mature du complexe est préférentiellement retenu et va réguler négativement ses ARNm cibles. Les ARNm vont soit induire la dégradation des ARNm (6) soit la répression de la traduction (7).

Répression de la traduction par les miRNA (B) D'après (Jardin et al., 2008). Ce schéma représente l'interaction par complémentarités de bases établie entre les séquences d'un miRNA d'une région 3'UTR d'un ARNm cible. Au centre de cet appariement se situe une région « boucle », qui correspond à une suite de mésappariement, formée sans altérer la formation du complexe miRNA/ARNm. Cette interaction va entraîner l'inhibition de la traduction des gènes cibles. D'après (Filipowicz et al., 2008). **miRNA** : microARN ; **ORF** : open reading frame (phase ouverte de lecture) ; **RISC** : RNA-induced silencing complexes ; **RNase** : ribonucléase ; **UTR** : untranslated region (région non traduite).

ii. Les microARN et les CSM

Les miR ont un rôle essentiel dans la différenciation cellulaire, dans l'apoptose et dans le développement de tumeurs (Weber et al., 2013; Zhang and Zhou, 2015). Les miR auraient également un rôle dans la régulation, la différenciation, l'activité sécrétrice et d'autres propriétés relatives aux CSM. De plus, le profil d'expression des miR des CSM varie en fonction du tissu d'origine, des espèces et des méthodes de détection, mêmes si certains miR sont retrouvés dans tous les types de CSM (Clark, 2005). Par ailleurs, certains travaux ont ouvert la possibilité de moduler l'expression des miR dans les CSM afin d'améliorer leur potentiel thérapeutique ((Diederichs et al., 2016). En effet, il est montré que le transfert de miR *via* les vésicules extracellulaires joue un rôle important dans les capacités de modulations de certaines pathologies par les CSM telles que les maladies des reins, du foie, du cœur et du cerveau (Qiu et al., 2018). Ils constitueraient ainsi des biomarqueurs potentiels dans certaines pathologies comme l'arthrite (rhumatisme inflammatoire) ou l'arthrose (altération du cartilage) (Moulin et al., 2017).

Tout d'abord, les miR sont impliqués dans la viabilité et la **prolifération** des CSM. En effet, la sur-expression de miR-195 et miR-497 entraîne une baisse des capacités de prolifération des CSM-MO humaines (Almeida et al., 2016). Dans les CSM humaines de cordon ombilical l'expression de miR-26b-3p est augmentée avec l'expansion *in vitro* et est corrélée avec la sénescence. De plus, la sur-expression de miR-26b-3p inhibe la prolifération *in vitro* de ces CSM (Wang et al., 2016b).

Aussi, il est clairement établi que les miR sont impliqués dans la différenciation des cellules souches hématopoïétiques (Jardin et al., 2008) et des analyses sur puces ont permis de montrer l'implication de plusieurs miR dans la **différenciation** des CSM, et notamment dans la chondrogenèse (Sorrentino et al., 2008). Des travaux récents ont permis de valider l'implication de miR-218 dans la différenciation des CSM-MO humaines vers un phénotype chondrocytaire hypertrophique. Dans cette étude, même si miR-218 cible les gènes codant des marqueurs hypertrophiques tels que le RUNX2 ou le collagène de type 10A1, son action est contrecarrée par la voie de signalisation WNT/ β -caténine (Melnik et al., 2020). Ces résultats montrent bien que les microARN n'agissent pas seuls, mais en association avec d'autres voies de signalisation. D'autres miR sont également impliqués dans la multipotence des CSM. Nous pouvons citer miR-210, dont la sur-expression favorise la différenciation ostéocytaire des CSM humaines de cordon ombilical. MiR-210 est également connu pour être sur-exprimé en condition d'hypoxie (Asgharzadeh et al., 2018). D'autres miR tels que miR-195 et miR-497 sont sous-exprimés pendant la différenciation ostéocytaire de CSM-MO humaines (Almeida et al., 2016).

Par ailleurs, des travaux ont montré que les miR pourraient être impliqués dans les propriétés fonctionnelles, telles que la **migration**. En effet, miR-9-5p favoriserait la migration de CSM de rats *via* la régulation de la voie de signalisation de la β -caténine (Li et al., 2017c). De façon intéressante, les CSM secrètent des vésicules extra-cellulaires contenant des miR ayant un effet sur la migration d'un autre type cellulaire, les cellules tumorales. En effet, miR-124 contenu dans les exosomes des CSM-MO de rats inhibe la prolifération, la migration et l'invasion des cellules cancéreuses pancréatiques (Xu et al., 2020).

Enfin, les miR sont impliqués dans les propriétés fonctionnelles des CSM telle que **l'immunomodulation**. Plusieurs études ont montré l'implication des miR tels que miR-21, miR-23b, miR-27b, miR-30, miR-143, miR-146, miR-155, miR-494 et Let-7a dans les propriétés immunosuppressives des CSM (Pers et al., 2018). En effet, d'anciens travaux ont montré l'implication de miR-146 (sur-exprimé dans les CSM) dans le contrôle des voies de signalisations des TLR et des récepteurs au cytokines dans des monocytes humains (Taganov et al., 2006). Plus récemment, il a été montré que miR-182 contenu dans les exosomes de CSM-MO de souris serait impliqué dans la polarisation des macrophages (Zhao et al., 2019). MiR-126a serait quant à lui, impliqué dans l'induction de LTreg par les CSM-MO d souris (Khosravi et al., 2017)

Toutes ces données de la littérature concernant les miR, laissent supposer qu'ils peuvent être de marqueurs intéressants à prendre en compte pour les stratégies de thérapie cellulaires. Cependant, devant la multitude de miR identifiés, il serait probablement intéressant de sélectionner certains à associer à d'autres marqueurs potentiels.

De plus, il a été montré que la production **d'espèces réactives de l'oxygène (ROS)** par les CSM est associée à l'expression des miR. En effet, des travaux montrent que la stimulation des CSM-MO de rat par du peroxyde d'hydrogène induit la sur-expression de miR-181a (Lee et al., 2015). La même stimulation de CSM-GW entraîne la sous-expression de miR-17 (Tai et al., 2020). Par ailleurs, les miR interfèrent avec l'expression de certains gènes qui codent les enzymes antioxydantes. En effet, miR-10b et miR-23b interfèrent avec l'expression de la glutathion peroxydase dans les CSM de tissu adipeux (Kim et al., 2011). De même, la sur-expression de miR-210 dans les CSM-MO de rat entraîne une diminution de l'apoptose dans un modèle de stress oxydant accompagné d'une augmentation de l'activité de l'enzyme de protection contre le stress oxydant, la superoxyde dismutase 2 (SOD2) (Xu et al., 2014). Ce lien entre les miR et les ROS est important, quand on sait que les ROS sont associés à la sénescence induite par l'expansion *in vitro*.

En effet, l'implication des miR dans la **sénescence** des CSM a été démontrée dans la littérature (Potter et al., 2021). Par exemple, des travaux ont permis de montrer l'implication de certains miR, tels que miR-22, miR-34a, miR-217 miR-200c, dans la sénescence de cellules humaines *via* les voies de signalisation p53/p21. En effet, ces miR sont des cibles du gène suppresseur de tumeur P53, un des marqueurs de sénescence (Abdelmohsen and Gorospe, 2015). D'ailleurs, miR-29c-3p serait impliqué dans la sénescence des CSM-MO *via* les voies de signalisation p53-p21 et p16-pRB (Shang et al., 2016). Des travaux récents ont montré que miR-146a serait sous-exprimé dans les exosomes provenant de CSM de cordon dans un modèle de sénescence induite par le peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) (Xu et al., 2021).

E. Sénescence

La sénescence peut être induite par des composés chimiques tels que H₂O₂ (i), lié à l'âge des donneurs de CSM-MO (Charif et al., 2017, 2019) (ii), mais aussi induite par l'expansion *in vitro* (iii). De plus, la sénescence peut altérer la qualité et les propriétés fonctionnelles des CSM. Il s'agit donc d'un paramètre clé à contrôler pour augmenter l'efficacité thérapeutique.

1. Définition

La sénescence fut formellement décrite pour la première fois par Hayflick en 1965 (Hayflick, 1965) comme le processus qui limite la prolifération de cellules humaines en culture. La sénescence est caractérisée par un arrêt irréversible du cycle cellulaire.

2. Le phénotype sénescence

Toutes les cellules somatiques qui se divisent peuvent subir le phénomène de sénescence (Coppé et al., 2010). Le phénotype des cellules sénescences se caractérise par un arrêt irréversible de la division cellulaire, une augmentation de la taille des cellules (i), des fibres de stress d'actine (ii) et de l'activité de la β -galactosidase (β -gal) (iii) (Heo et al., 2009)(Stenderup et al., 2003). La sénescence cellulaire peut se produire *in vitro* et *in vivo* en réponse à un stress extracellulaire ou intracellulaire excessif entraînant l'arrêt du cycle cellulaire afin d'éviter de transmettre les dommages subis aux autres cellules issues d'une éventuelle division (Coppé et al., 2010). Différents stress peuvent être impliqués tels qu'un dysfonctionnement des télomères, une altération mitochondriale, le stress oxydant, des dommages de l'ADN, des altérations de la chromatine ou des éléments physiques ou chimiques (rayons X ou chimiothérapie) (Coppé et al., 2010)(*Figure 21*).

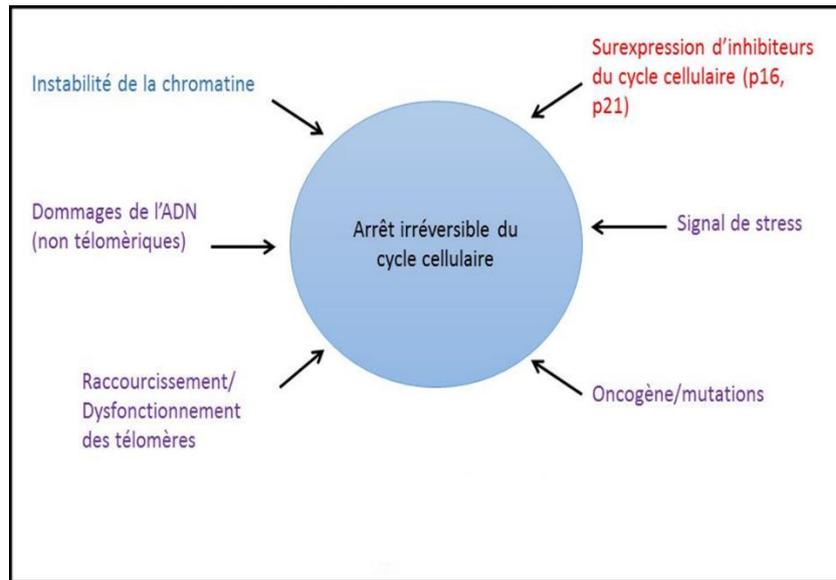


Figure 21 : Les différents stimuli pouvant induire la sénescence (Coppé et al., 2010)

Contrairement aux cellules apoptotiques, les cellules sénescences restent en vie, malgré un changement morphologique (cellules plus larges) et un dérèglement fonctionnel (modifications du cycle cellulaire) généralement constaté pour ces cellules (Campisi, 2005). Elles ont un métabolisme actif entraînant des modifications au niveau de l'expression et de la sécrétion de protéines caractérisant le phénotype sécrétoire des cellules sénescences appelé SASP (senescence associated secretory phenotype) (Coppé et al., 2010). Dans la littérature, le SASP a essentiellement été caractérisé dans les fibroblastes et les cellules épithéliales par la sécrétion de facteurs solubles et insolubles impliqués dans des voies de transduction du signal autocrines et paracrines : facteurs solubles de signalisations (interleukines, chimiokines et facteurs de croissance), protéases sécrétées et des protéines insolubles qui composent la matrice extracellulaire (Coppé et al., 2010). Parmi tous ces facteurs sécrétés, il est important de noter l'oxyde nitrique, une espèce réactive de l'azote impliquée dans le stress oxydant, l'interleukine 1 β impliquée dans l'inflammation ou les métalloprotéinases telles que MMP1 et 3 impliquées dans la dégradation de la matrice extra cellulaire (Coppé et al., 2010). Ce phénotype sécrétoire des cellules est un paramètre important à prendre en compte pour l'utilisation des CSM en thérapie cellulaire, car les CSM sénescences modifieraient leur profil de sécrétion et pourraient perdre une partie de leurs fonctions (Sensebé and Bourin, 2011; Turinetto et al., 2016). En effet, les CSM sénescences sécrètent des cytokines telles que les interleukines (IL-1, IL-3, IL-4, IL-6, IL-8), l'épidermal growth factor (EGF) et des facteurs de croissance tels que l'hépatocyte growth factor (HGF), l'insulin growth factor (IGF), le platelet derived growth factor (PDGF), le

transforming growth factor-beta (TGF- β) et le vascular endothelial growth factor (VEGF) qui peuvent réguler la prolifération et la sénescence des CSM. De plus, le SASP des CSM peut induire la sénescence ou l'apoptose et entraîner une réponse inflammatoire des CSM voisines (Zhai et al., 2019). Le phénotype sénescence des CSM *via* le SASP peut altérer leurs propriétés fonctionnelles telles que l'immunomodulation, la migration et la différenciation (Figure 22).

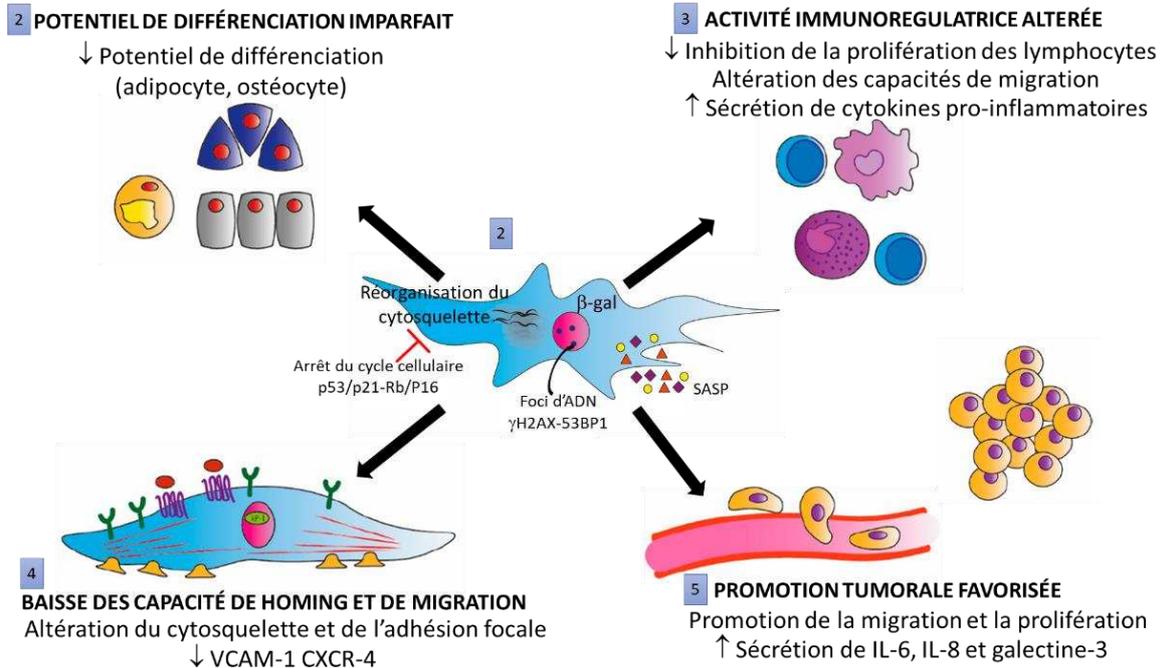


Figure 22 : Effet du phénotype sénescence sur la fonctionnalité des CSM humaines d'après (Turinetto et al., 2016)

Phénotype sénescence des cellules stromales/souches mésenchymateuses (CSM) humaines (1) : les CSM sénescence humaines subissent un arrêt du cycle cellulaire *via* les voies de signalisation P53/p21 et Rb/P16, sont positives pour la β -galactosidase (β -gal), présentent des dommages de l'ADN avec des foci γ H2AX-53BP1 et ont un phénotype sécrétoire spécifique (SASP : senescence-associated secretory phenotype). **Altérations fonctionnelles des CSM sénescence.** La sénescence altère le potentiel de différenciation (1), l'activité immunorégulatrice (2), les propriétés de migration et de homing (3) et favorise la migration et la prolifération tumorale (4).

3. Méthodes de mise en évidence du phénotype sénescence des CSM

- ✓ Il existe plusieurs méthodes pour mettre en évidence la sénescence des cellules (Zhai et al., 2019). Le test classique de base utilisé pour mettre en évidence les cellules sénescence consiste à mettre en évidence l'activité de la β -galactosidase lysosomale à pH 6.0 grâce à 2 méthodes : un test cytochimique/histochimique basé sur l'utilisation du substrat X-gal et un microscope à contraste de phase (i) ou un test basé sur l'alcalinisation des lysosomes à l'aide de la bafylomycine suivie de l'utilisation du substrat 5-dodecanoylamino fluoresceine di- β -D-galactopyranoside (C12FDG) et de la microscopie à fluorescence ou la cytométrie en flux (Debacq-Chainiaux et al., 2009).
 - ✓ La mesure de la longueur des télomères par réaction de polymérisation en chaîne pour mettre en évidence leur raccourcissement est aussi utilisée pour évaluer la sénescence (Baxter et al., 2004).
 - ✓ Certains marqueurs protéiques ou messagers tels que les protéines inhibitrices du cycle cellulaire P16 et p21, la lamine A (dans la progéria, caractérisée par un vieillissement prématuré des patients), les méthylations de l'ADN sont également mis en évidence (Zhai et al., 2019).
 - ✓ Des études sont en cours, notamment au laboratoire, afin de mettre en évidence des marqueurs de surface associé au phénotype sénescence des CSM. Néanmoins, d'après nos données, l'expression de ces marqueurs semble être cellule-dépendante : CSM-MO ou CSM-GW (Targa et al.,

2016, 2017). D'après la littérature, certains marqueurs tels que STRO-1, CD106 et CD146 seraient sous-exprimés dans les cellules sénescentes (Li et al., 2017d).

✓ La mise en évidence de la taille augmentée, ou de spectres de diffusion raman spécifiques des cellules sénescentes, des agrégats de protéines oxydées, des accumulations de métaux et lipides tels que la lipofuscine sont également envisageables (Zhai et al., 2019). Ces agrégats sont à l'origine de l'autofluorescence observée dans les cellules sénescentes (Li et al., 2017d).

✓ Enfin, un autre marqueur, le SA- α -Fuc sur-exprimé en situation de sénescence répliquative a été mis en évidence (Singh and Piekorz, 2013).

L'une des stratégies pour prévenir la sénescence consiste à limiter les facteurs inducteurs tels que le stress oxydant (Li et al., 2017d).

F. Stress oxydant

Le stress oxydant induit par l'expansion *in vitro* ou par des composés chimiques, peut affecter la qualité des CSM. De plus, il est retrouvé dans les contextes inflammatoires des pathologies à traiter. Il s'agit donc d'un paramètre clé à contrôler pour augmenter l'efficacité thérapeutique.

1. Définition

Le stress oxydant (OS) est un type d'agression des constituants de la cellule dû à des radicaux libres ou des molécules, les espèces réactives de l'oxygène (ERO ou ROS pour Reactive Oxygen Species en anglais) et les espèces réactives de l'azote (ERA ou RNS pour Reactive Nitrogen Species) oxydantes. Un radical libre est une espèce chimique, neutre ou chargée, qui a la particularité de porter un électron célibataire (ou non apparié) sur sa couche externe, ce qui le rend généralement instable et capable de réagir plus ou moins rapidement avec d'autres molécules chimiques environnantes. Les réactions de transfert d'électrons qu'il produit (réactions d'oxydoréduction, redox) conduisent souvent à la formation d'un nouveau radical, ce phénomène pouvant se propager par des réactions en chaîne (Carrière et al., 2006). A chaque réaction il peut se produire des « fuites » d'électrons qui formeront les ROS. Les réductions mono-électroniques successives de l'oxygène donnent naissance à différentes ERO : l'anion superoxyde (O_2^-), le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) et le radical hydroxyle ($\cdot OH$) (Carrière et al., 2006) ([Figure 23](#)).

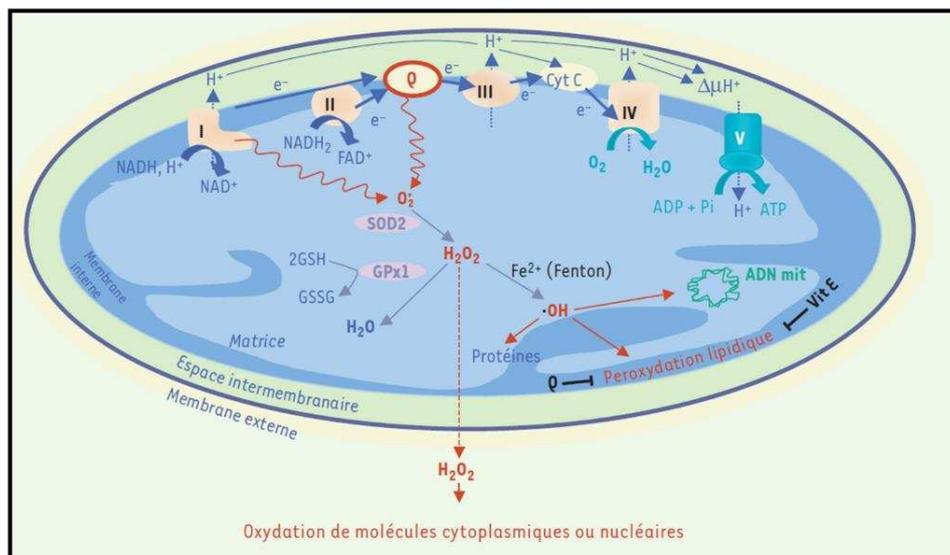


Figure 23 : Production mitochondriale et prise en charge de l'anion superoxyde d'après Carrière et al, 2006

Au cours du transfert des électrons, dans des conditions physiologiques, il peut y avoir des fuites d'électrons et production d'anion superoxyde ($O_2^{\cdot-}$) par le complexe I et le coenzyme Q. $O_2^{\cdot-}$ est métabolisé par la superoxyde dismutase (SOD2, ou MnSOD, étant l'isoforme spécifiquement localisée dans la matrice mitochondriale) en peroxyde d'hydrogène (H_2O_2). Celui-ci peut être décomposé en H_2O par la glutathion peroxydase (GPx1), en présence de glutathion réduit (GSH), se transformer en radical hydroxyle ($\cdot OH$) par la réaction de Fenton, en présence de Fe^{2+} , ou encore diffuser dans le cytoplasme et modifier l'activité de protéines cytoplasmiques ou nucléaires en les oxydant. Le radical hydroxyle peut également oxyder les protéines, ou l'ADN (mitochondrial et nucléaire), et induire la peroxydation lipidique (elle-même limitée par des piègeurs de radicaux libres, de nature lipophile, tels que la vitamine E ou le coenzyme Q). Il est important de souligner ici la dualité d'action du coenzyme Q : piègeur de radicaux libres, sous forme réduite, dans les membranes biologiques, il est la source essentielle d' $O^{\cdot-}$ dans la chaîne respiratoire (Carrière et al., 2006).

La production de ROS physiologiques est indissociable du processus respiratoire et est fortement modulée par les conditions environnementales telles que la pression en oxygène. De plus, les cellules sont équipées de systèmes antioxydants permettant de limiter la concentration en ROS (Carrière et al., 2006).

Lorsque la production de ROS devient chronique car le système de défense cellulaire antioxydant n'arrive pas à maintenir un niveau basal de ROS, on parle alors de stress oxydant. Ce dernier induit des effets délétères et joue un rôle majeur aussi bien en physiopathologie qu'au cours du vieillissement chronologique ou réplcatif (Carrière et al., 2006). En effet au niveau moléculaire, le vieillissement est associé au stress cellulaire dont la théorie la plus connue est le stress oxydant (Simm and Campisi, 2014). Ces ROS qui s'accumulent avec le temps induisent des dysfonctionnements moléculaires, cellulaires et tissulaires (Simm and Campisi, 2014)

2. Les systèmes pro-oxydants

Il existe différentes sources d'agents pro-oxydants telles que les ROS et le RNS. Les ROS sont majoritairement produites dans la mitochondrie (80%), mais aussi au niveau de réticulum endoplasmique (RE), de la membrane plasmique *via* la NADPH oxydase (NOX) et du cytosol, tandis que les RNS sont essentiellement formées au niveau du cytosol et de la mitochondrie (Figure 24) (Curtin et al., 2002; Nathan and Ding, 2010).

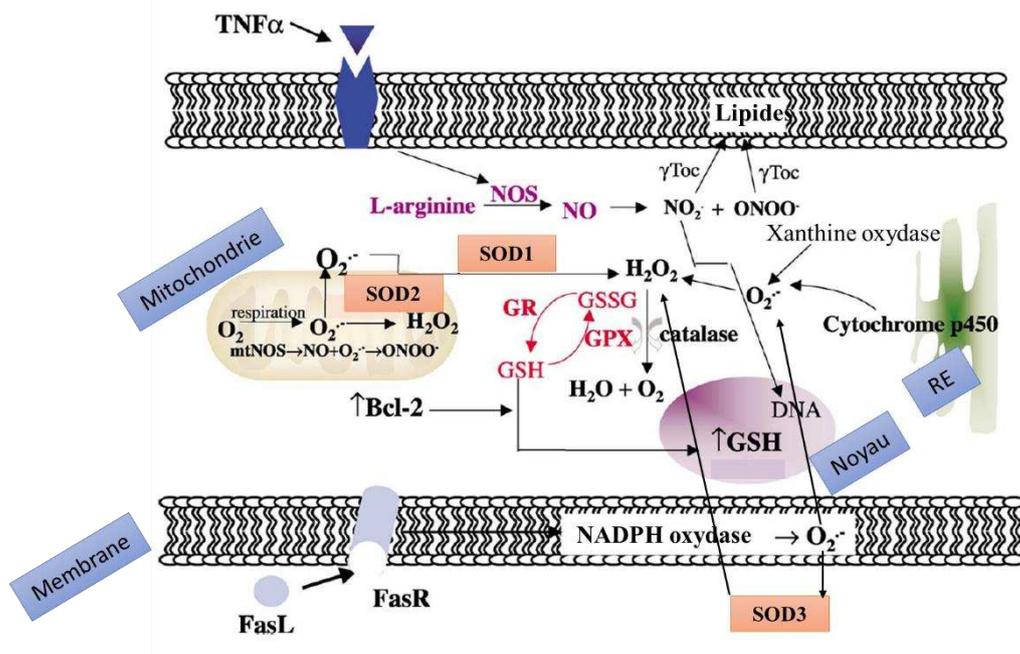


Figure 24 : Les différentes sources de ROS et RNS intracellulaires et mécanismes de défense d'après (Curtin et al., 2002; Wang et al., 2013)

Pendant la respiration, la mitochondrie génère $O_2^{\bullet-}$, converti en H_2O_2 par la SOD2. Dans le cytosol $O_2^{\bullet-}$ est converti en H_2O_2 par la SOD1 et par la SOD3 au niveau extracellulaire. H_2O_2 est pris en charge par le système redox GSH présent dans le cytosol et la mitochondrie et par la catalase présente dans les peroxyssomes. Il existe d'autres sources de $O_2^{\bullet-}$: la xanthine oxydase au niveau du cytosol, la NADPH oxydase au niveau des membranes et le cytochrome p450 au niveau du réticulum endoplasmique (RE). La protéine Bcl2 peut se comporter comme antioxydant dans certains systèmes en induisant la relocalisation de GSH au niveau nucléaire. Le NO peut être produit au niveau du cytosol par la NOS et des mitochondries par la NOS mitochondriale (mtNOS). Le tumor necrosis factor α (TNF- α) peut également la NOS induisant la production d'oxyde nitrique (NO_2) (qui peut interagir avec les membranes et causer des mutations de l'ADN) et de peroxy-nitrite ($ONOO^-$) (qui induit des peroxydations lipidiques). La vitamine E (g-tocopherol) est un antioxydant.

a) Les ROS

iii. Les espèces radicalaires

La source importante d'espèces radicalaires est centrée sur l'oxygène (dioxygène O_2). A l'état fondamental, O_2 possède 2 électrons célibataires, il est dit biradicalaire. La molécule d' O_2 peut donc accepter des électrons célibataires. Lors de réactions redox au niveau de la chaîne des transports des électrons, l' O_2 donne naissance à des espèces radicalaires telles que :

- ✓ l'anion superoxyde ($O_2^{\bullet-}$)
- ✓ le radical hydroxyle ($\cdot OH$) : il est obtenu après décomposition de H_2O_2 en présence de sels métalliques selon la réaction de Fenton.

iv. Les espèces non radicalaires

Le peroxyde d'hydrogène n'est pas un radical libre, mais une molécule ayant tous ses électrons appariés, obtenu par la réaction de dismutation de l'anion superoxyde $O_2^{\bullet-}$ (cf *superoxyde dismutase*) (Carrière et al., 2006; Curtin et al., 2002).

b) Le RNS

La NOS (Nitric Oxide Synthase), située au niveau mitochondrial ou du cytosol, peut également produire l'anion superoxyde ($O_2^{\bullet-}$) ou le NO (monoxyde d'azote ou oxyde nitrique) ((Nathan and Ding, 2010) (Figure 24). Certes le NO est impliqué dans plusieurs fonctions physiologiques comme dans le système vasculaire, immunitaire et nerveux et dans la signalisation cellulaire et l'apoptose, néanmoins

il fait partie des **RNS** et peut être impliqué dans les pathologies liées au stress oxydant. Il est peu réactif et diffusible dans les milieux biologiques et est produit par la NOS qui peut également produire l'anion superoxyde (O_2^-). De plus le NO réagit avec O_2 pour former une espèce extrêmement réactive et toxique, l'anion peroxydrite ($ONOO^-$) connu pour générer des lésions de l'ADN (Halliwell, 2007). Enfin le NO peut être oxydé et former les nitrites (NO_2^-) ou des nitrates (NO_3^-) (Nathan and Ding, 2010) (*Figure 24*).

3. Les conséquences cellulaires induites par les ROS

Si la production de ROS est modérée ou relativement courte dans le temps, un déséquilibre temporaire dans la balance entre production de ROS et défenses anti-oxydantes est observé. Dans ce cas, les ROS activent de manière spécifique et réversible certaines voies de signalisation qui vont déclencher l'adaptation de la cellule tels que les facteurs de transcriptions (NF- κ B (nuclear factor-kappa B)) (i), les protéines kinases (ii) ou les protéines phosphatases (iii). Si la production de ROS est élevée et chronique, les systèmes anti-oxydants sont dépassés aboutissant au stress oxydant et à la survenue de situations pathologiques. Ainsi, les membranes peuvent être altérées par les peroxydations lipidiques (i), l'oxydation de l'ADN peut entraîner des mutations (ii) et l'oxydation massive irréversible des protéines peut entraîner des pertes de fonction (iii) (Carrière et al., 2006).

a) Oxydation des groupements thiol des protéines

Les ROS vont oxyder principalement les groupements thiols (R-SH) des cystéines présentes dans les protéines affectant ainsi leur structure et leur fonction. Ces protéines pouvant être oxydées ont été caractérisées comme des « Redox sensors », il s'agit donc des protéines sensibles aux taux de ROS présents dans les cellules (Wang et al., 2013).

En réponse à l'oxydation par les ROS, les groupements thiols (R-SH) forment de manière réversible des groupements sulféniques (R-SOH), des ponts disulfures intra-moléculaires (R-S-S-R), des ponts disulfures inter-moléculaires (R-S-S-R') ou des ponts disulfures mixtes avec le glutathion (R-S-S-G) connus sous le nom de S-glutathionylation. La présence de RNS entraîne la formation de S-nitrosothiol (R-SNO) ou S-nitrothiol (R-SNO₂). Les groupements sulféniques peuvent être oxydés de manière irréversible en groupements sulfonique (R-SO₃H) ou sulfinique (R-SO₂H) (*Figure 25*) (Ren et al., 2015).

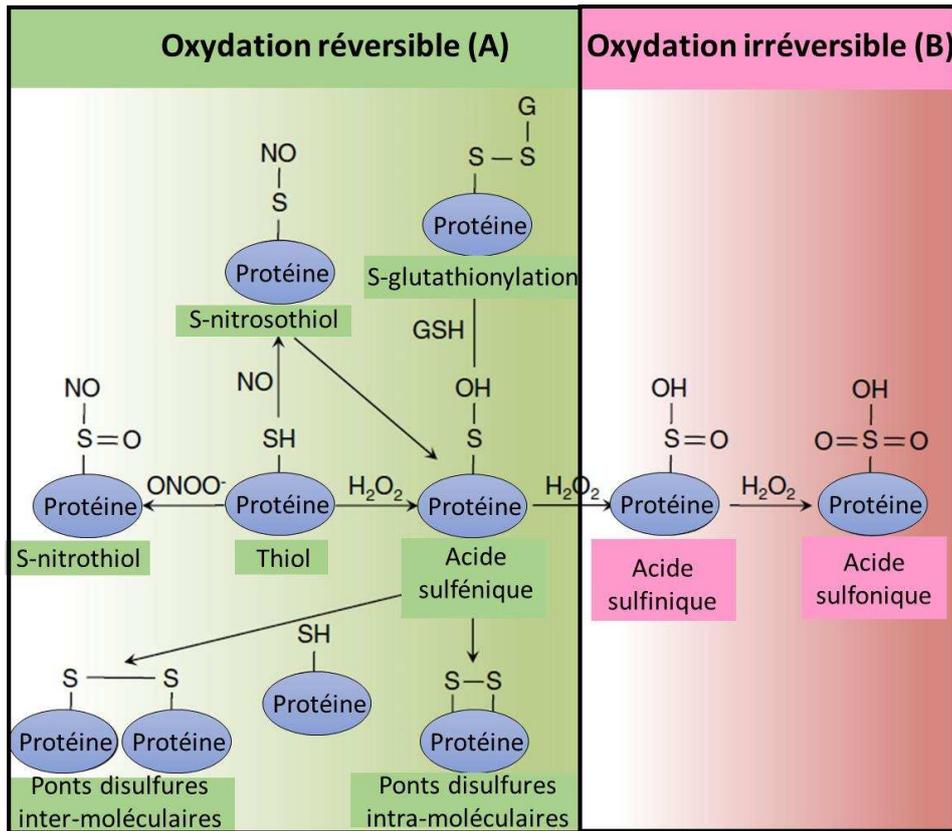


Figure 25 : Oxydation réversible et irréversible des groupements thiols des protéines d'après (Ren et al., 2015)

En présence d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) telle que le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2), les groupements thiols ($R-SH$) des cystéines des protéines sont oxydés et forment de manière réversible des groupements sulféniques ($R-SOH$), des ponts disulfures intra-moléculaires ($R-S-S-R$), des ponts disulfures inter-moléculaires ($R-S-S-R'$) ou des ponts disulfures mixtes avec le glutathion ($R-S-S-G$) connus sous le nom de S-glutathionylation. En présence d'espèces réactives de l'azote (RNS) telle que l'anion peroxydinitrite ($ONOO^-$), les groupements thiols sont oxydés et forment le S-nitrosothiol ($R-SNO$) ou le S-nitrothiol ($R-SNO_2$) (A). En présence de ROS telle que H_2O_2 , les groupements sulféniques peuvent être oxydés de manière irréversible en groupements sulfonique ($R-SO_3H$) ou sulfinique ($R-SO_2H$) (B).

b) Induction de la sénescence

Les ROS peuvent induire des dommages de l'ADN et entraîner de mutations (Carrière et al., 2006), mais aussi induire la sénescence. En effet, de nombreux travaux montrent que des lignées fibroblastiques cultivées *in vitro* et exposées à un stress oxydant ou à des radiations ionisantes subissent un stress induisant leur sénescence (Benameur et al., 2015). De plus, les ROS peuvent induire le phénotype sénescence des CSM. En effet, des travaux réalisés sur les CSM-MO ont montré que le niveau endogène de ROS était corrélé avec celui des marqueurs de sénescence comme la β -galactosidase (Heo et al., 2009) et que les CSM-MO sénescence à passage tardif avaient une production de ROS augmentée (Fernandez-Rebollo et al., 2020). D'autres travaux ont montré qu'il était possible d'induire le phénotype sénescence des CSM-GW avec un pré-traitement à l' H_2O_2 (Ali et al., 2017; Choo et al., 2014). Par ailleurs, les stratégies ciblant les mécanismes associés au stress oxydant constituent des approches prometteuses pour contrecarrer les effets de l'âge et de la sénescence des CSM (Vono et al., 2018). D'autant plus qu'il a été montré que cette induction de la sénescence par les ROS était accompagnée d'une perte des propriétés immunomodulatrices et anti-inflammatoires et d'une baisse des capacités de différenciations ostéocytaires et adipocytaires (Denu and Hematti, 2016).

c) Induction de l'apoptose

Les ROS sont également impliquées dans la régulation de l'apoptose et l'induction de la mort cellulaire (Carrière et al., 2006). En effet, l'oxydation par les ROS des groupements thiols des facteurs de transcription FoxO (Forkhead box protein O), impliqués dans l'auto-renouvellement des cellules souches, entraîne un arrêt du cycle cellulaire et l'apoptose de ces cellules souches (Ren et al., 2015). De même, dans un modèle de souris, le traitement des CSM par de l'H₂O₂ induit leur apoptose, cependant ce processus est contrecarré par l'autophagie *via* la voie de signalisation JNK (c-Jun NH(2)-terminal kinase) (Liu et al., 2015a). Par ailleurs, des travaux suggèrent que les microARN régulent l'apoptose induite par les ROS *via* des modifications redox (Ren et al., 2015). Cette induction de l'apoptose par les ROS est surtout observée en cas de défense immunitaire (Yang and Lian, 2020).

4. Les systèmes anti-oxydants

Il existe des systèmes anti-oxydants au niveau de la cellule qui permettent de la protéger en limitant la production de ROS. Ces systèmes sont de 2 types : les **systèmes enzymatiques (i)** telles que la superoxyde-dismutase (SOD), la catalase et la peroxydase comme les glutathion peroxydase (GPX) et les **systèmes non enzymatiques (ii)** tels que le glutathion (GSH), les vitamines C et E et les oligoéléments (Zinc ou selenium).

a) Les redox sensors

Lors d'un stress oxydant, le taux de ROS augmente et de nombreuses protéines appelées « redox sensors » peuvent changer d'état et se trouver oxydées au niveau des groupements thiol des cystéines. Cette oxydation va modifier plusieurs voies de signalisation dans la cellule et ainsi agir sur les systèmes anti-oxydants. Par exemple, la transcription d'enzymes antioxydantes telles que les SOD ou la catalase est augmentée lorsque les protéines FoxO sont oxydées (Ren et al., 2015). L'oxydation de l'inhibiteur Keap1 du facteur de transcription Nuclear factor erythroid 2-related factor 2 (NRF2), va permettre sa translocation nucléaire et sa liaison à l'élément ARE (antioxydant responsive element) pour activer la transcription d'enzymes antioxydantes (Li et al., 2017d; Wang et al., 2013). In fine, ces redox sensors permettent de maintenir un niveau basal de ROS (Ren et al., 2015; Wang et al., 2013).

b) La superoxyde dismutase (SOD)

La SOD est une métalloprotéine avec une activité enzymatique (oxydoréductase) qui catalyse la dismutation de l'anion superoxyde (O₂^{·-}) en oxygène (O₂) et peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) selon la réaction suivante (Curtin et al., 2002; Valko et al., 2006) (*Figure 23, Figure 24*) :



Il existe 4 types de SOD en fonction de leur localisation cellulaire et du cofacteur dont leur activité dépend (cuivre (Cu), zinc (Zn), manganèse (Mn) et nickel (Ni)) :

- ✓ La **SOD1** ou SOD cuivre et zinc dépendante (**SOD-Cu/Zn**) au niveau du cytoplasmique (Valko et al., 2006),
- ✓ La **SOD2** ou SOD manganèse dépendante (**SOD-Mn**) principalement retrouvée au niveau des mitochondries et qui permet la dismutation quasi instantanée de l'O₂^{·-} (Valko et al., 2006),
- ✓ La **SOD3** ou la forme extracellulaire de SOD cuivre et zinc dépendante (**EC-SOD-Cu/Zn**) : retrouvée sur la face externe de la membrane plasmique et dans les liquides extracellulaires et elle est synthétisée par des cellules comme les fibroblastes et retrouvée notamment dans les tissus des vaisseaux sanguins, le cœur, les poumons, les reins et le placenta (Nozik-Grayck et al., 2005),

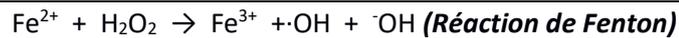
- ✓ La **SOD-Ni** est décrite chez les organismes procaryotes (Curtin et al., 2002).

c) La catalase

La catalase est une enzyme présente dans les peroxysomes, des organelles responsables de la dégradation des acides gras. Elle permet la dismutation du peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) en eau (H₂O) et dioxygène (O₂) selon la réaction suivante :



Ainsi, l'H₂O₂ produit par la SOD peut être métabolisé. Si jamais H₂O₂ s'accumulait, celui peut donner HO· en présence de fer et d'autres métaux de transition selon la réaction de Fenton (*Figure 23*) (Valko et al., 2006).



d) La glutathion peroxydase GPX, le glutathion réduit (GSH) et oxydé (GSSG)

Le système du glutathion est un mécanisme important de défense de la cellule face au stress oxydant. Il est composé de glutathion réduit (GSH), de glutathion peroxydase (GPX) et de glutathion réductase. La GPX prend en charge l'H₂O₂ comme la catalase en le catalysant et convertit le GSH en glutathion oxydé (GSSG) selon la réaction suivante :



Le GSSG est ensuite réduit en GSH par la glutathion réductase, montrant ainsi la capacité de la cellule à gérer le stress oxydant (Curtin et al., 2002) (*Figure 24*).

e) Thiorédoxine, Peroxirédoxine

La thiorédoxine, la glutarédoxine et la peroxyrédoxine sont des enzymes appelées oxydoréductases qui ont une action antioxydante. En effet, ces enzymes réduisent les fonctions thiol des cystéines des protéines oxydées par les ROS (Ren et al., 2015).

f) Les vitamines C et E

La vitamine C ou acide ascorbique est un antioxydant hydrosoluble qui piège les ROS et limite la peroxydation lipidique. Néanmoins, même si la vitamine C est surtout connue pour son activité antioxydante dans des conditions physiologiques, des travaux ont montré son activité pro-oxydante dans des conditions pathologiques (Carrière et al., 2006; Chakraborty et al., 2014).

La Vitamine E est un antioxydant lipophile appartenant à la famille des tocophérols qui protège les membranes plasmiques et nucléaires (Carrière et al., 2006).

5. OS et les CSM

a) OS et homéostasie des cellules souches

Comme pour les autres types cellulaires, un équilibre entre les agents pro- et antioxydants contribue au maintien de l'homéostasie des CS telles que les CSH ou les CSM (Sart et al., 2015). Il a d'ailleurs été rapporté que les ROS, notamment le peroxyde d'hydrogène (H₂O₂), jouaient un rôle important dans la régulation des fonctions des cellules progénitrices ou souches en situation physiologiques et pathologiques dans la moelle osseuse. En effet, des niveaux bas de ROS dans les CSH quiescentes contribuent au maintien de leur caractère souche tandis que des niveaux élevés de ROS favorisent la différenciation, la prolifération, la migration et la survie de ces CSH mais aussi des progéniteurs (Urao and Ushio-Fukai, 2013). De même, des niveaux bas de ROS augmentent la

migration et la prolifération des CSM *via* les voies de signalisation (ERK) 1/2 et Jun 1/2 (Kim et al., 2012). Les effets bénéfiques des ROS sur la prolifération des CSM seraient dus à la NOX (Sart et al., 2015). Aussi, des niveaux modérés de ROS favoriseraient la sécrétion de certaines chimiokines telles que CCL-2 et CCL-4 (chemokine ligand 2 et 4) (Yang et al., 2010) ou de facteurs de croissance tels que le VEGF (De Barros et al., 2013). Enfin, à des niveaux élevés, les ROS induisent l'apoptose des CSM (Sart et al., 2015).

b) OS et différenciation des CSM

Les ROS et les systèmes de défense antioxydants interfèrent avec les voies de signalisation des CSM (Sart et al., 2015), parmi lesquelles certaines sont impliquées dans leur différenciation (Atashi et al., 2015). Par exemple, la production de ROS favorise la différenciation adipocytaire en agissant sur le facteur de différenciation PPAR- γ (Atashi et al., 2015; Kim et al., 2014). En revanche, les ROS seraient associés à une baisse des capacités de différenciation ostéocytaire et chondrocytaire des CSM (Mohammadipour et al., 2020).

c) OS et immunomodulation des CSM

L'effet direct du stress oxydant sur les propriétés immunosuppressives des CSM n'est pas bien décrit dans la littérature (Denu and Hematti, 2021). Des travaux ont montré que l'âge des donneurs affecte négativement les propriétés immunodulatrices des CSM-MO et de tissu adipeux de rat (Wu et al., 2014). Etant donné que le vieillissement est associé au stress oxydant, il est possible d'envisager que celui-ci affecte négativement les propriétés immunosuppressives des CSM. Par ailleurs, des travaux réalisés avec des CSM-MO co-cultivées avec du sérum provenant de patients atteints de sclérose systémique (caractérisée par un taux élevé de protéines oxydées, les AOPP (advanced oxidation protein products)) ont mis en évidence des propriétés immunosuppressives diminuées. Dans ce travail, des co-cultures contrôles réalisées avec du sérum AB de patient sain contenant 150 μ M d' H_2O_2 ont également montré une baisse des propriétés immunosuppressives (Fonteneau et al., 2017).

d) OS lors de l'expansion *in vitro* des CSM

La source majoritaire de ROS provient de la mitochondrie qui permet de produire de l'énergie sous forme d'ATP à partir de la glycolyse ou de la phosphorylation oxydative au niveau de la chaîne respiratoire. Cette production de ROS dépend énormément des conditions environnementales et est modulée par la tension en oxygène lors de l'expansion *in vitro* (Carrière et al., 2006).

i. OS et normoxie

Lors de l'expansion *in vitro* les cellules sont exposées à des taux d' O_2 d'environ 21%. Ces taux sont élevés par rapport à la condition d'hypoxie retrouvée *in vivo* au niveau de la niche pour les CSM-MO ou pour les CSM-GW qui sont nécessaires au maintien de la quiescence et de l'autorenouvellement des CS (Lataillade et al., 2010; Mohyeldin et al., 2010). *In vitro*, ces concentrations élevées d' O_2 peuvent induire une augmentation de la production de ROS induite par l'augmentation d'accepteur d'électrons au niveau de la chaîne de transport des électrons dans la mitochondrie (Halliwell, 2014). De plus, certains agents contenus dans le milieu de culture peuvent provoquer un stress oxydant comme certains polyphénols et groupement thiols qui sont relativement instables et peuvent être rapidement oxydés et former des ROS comme H_2O_2 (Halliwell, 2014).

ii. OS et hypoxie

Deux théories concernant la production de ROS en hypoxie s'affrontent (Carrière et al., 2006; Semenza, 1999). La première, basée sur le rôle de la NADPH oxydase suggère une diminution de la production de ROS en hypoxie. En effet, de faibles pressions en O₂ devraient diminuer la production de ROS, étant donné que la NADPH oxydase produit l'anion superoxyde proportionnellement à la concentration en oxygène. La seconde théorie, basée sur la chaîne respiratoire mitochondriale, décrit au contraire une augmentation de la production de ROS en hypoxie au niveau du complexe III de la chaîne de transport des électrons (ETC) des mitochondries. De plus, cette production de ROS serait nécessaire à la stabilisation de HIF-1 α en hypoxie (Carrière et al., 2006; Chandel et al., 2000; Schroedl et al., 2002). Cette élévation de production de ROS en hypoxie serait en fait responsable de l'adaptation de la cellule dans la réponse à un stress tel que l'hypoxie (Smith et al., 2017). Une des hypothèses qui a été émise, serait que lors de l'hypoxie, la durée de vie des transporteurs d'électrons comme l'ubisemiquinone est augmentée dans l'espace inter-membranaire mitochondrial au niveau du complexe III, favorisant alors transfert d'électrons (e⁻) et donc la génération de ROS même avec une quantité inférieure d'oxygène (Guzy and Schumacker, 2006; Sabharwal and Schumacker, 2014; Smith et al., 2017). La fonction du complexe III est d'accepter les e⁻ de l'ubiquinole afin de les transférer au cytochrome C et de transloquer des protons vers l'espace intermembranaire. Un composant central du complexe III implique le cycle Q (ubiquinone) et notamment l'ubisemiquinone présente au niveau des site Qo et Qi et dont les e⁻ peuvent être capté par l'O₂ électrophile et ainsi générer un radicale libre O₂^{•-}. Par ailleurs, plus la durée de vie de l'ubisemiquinone augmente dans l'espace intermembranaire, plus la probabilité pour que l'O₂ capte un e⁻ augmente (Figure 26). L'ETC au niveau des mitochondries serait sensible aux changements d'oxygénation de la cellule et serait donc essentielle pour l'adaptation de la cellule aux conditions d'hypoxie (Waypa et al., 2016).

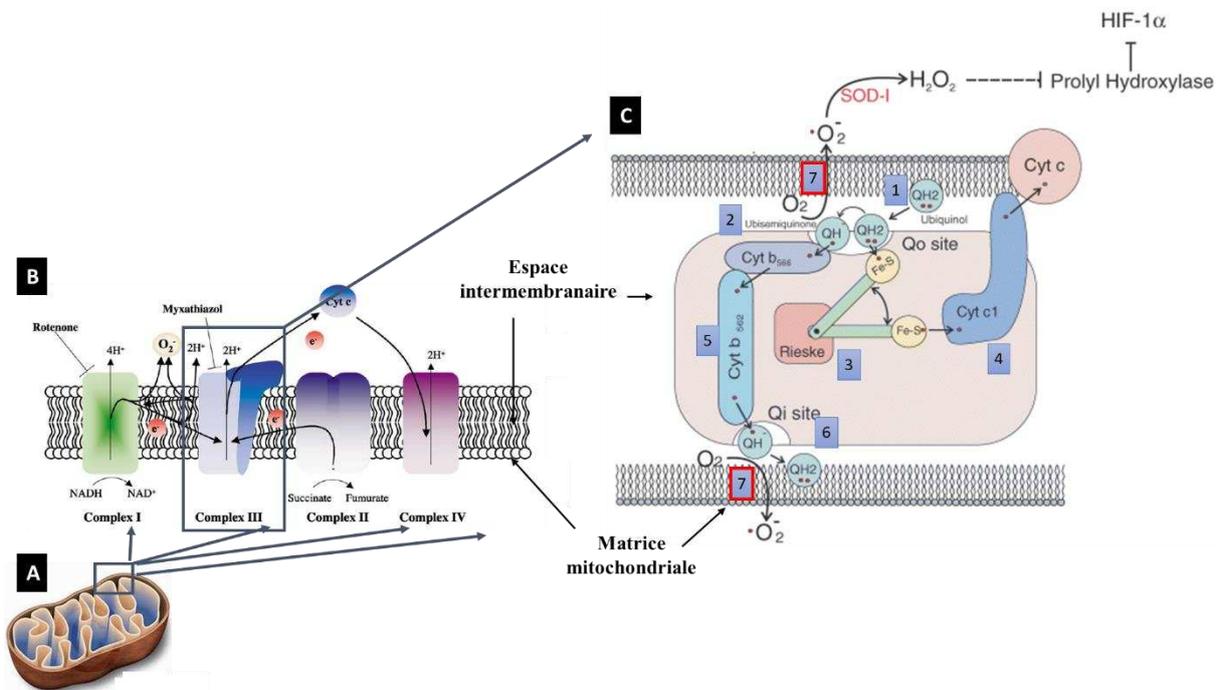


Figure 26 : Représentation schématique de la chaîne de transports des électrons, fonction du complexe III d'après (Curtin et al., 2002; Guzy and Schumacker, 2006)

Mitochondrie (A). Représentation schématique des sous-unités majeures de la chaîne des transports des électrons (ETC) et des sites pour O₂^{•-} (B) : Les électrons (e⁻) entrent dans l'ETC au niveau du complexe I (NADH-ubiquinone oxydoréductase) ou

du complexe II (succinate déshydrogénase) suivi par l'oxydation de NADH et du succinate. L'ubisemiquinone (ou le coenzyme Q) transporte les électrons du complexe I et le complexe II vers le complexe III (ubiquinol-cytochrome c oxydoreductase). L'anion superoxide O_2^- peut être produit par le complexe I et III. Les drogues « Rotenone » et « Myxathiazol » permettent d'inhiber l'ETC au niveau du complexe I et III respectivement. Le cytochrome C (Cyt C) transfère les e^- depuis le complexe III vers le complexe I. **Représentation schématique de la fonction du complexe III au niveau de la mitochondrie : cycle de l'ubiquinone Q (C) :** Une paire d'électron est transférée à l'ubiquinone donnant l'ubiquinol (1). Cependant, le cytochrome C et la cytochrome oxydase n'accepte qu'un seul électron de manière séquentielle. Ainsi, une molécule d'ubiquinone se lie au complexe III au niveau du site Q_o donnant l'ubisemiquinone réduite à ce site (2) et un e^- est transféré à la protéine Rieske (3). La protéine Rieske va ensuite transférer l' e^- au cytochrome C via le cytochrome C1 (4). En parallèle l'ubisemiquinone transfère ses électrons au cytochrome b permettant ainsi la liaison à une nouvelle molécule d'ubiquinone (5). Une seconde réduction de quinone a lieu au niveau du site Q_i à la surface de la membrane permettant le transfert d' e^- afin de régénérer l'ubiquinol (6). Les molécules d' O_2 sont électrophiles et peuvent potentiellement capter les e^- des molécules d'ubisemiquinone présentes au niveau des sites Q_o et Q_i (7).

6. OS et conséquences *in vivo*

Il est important d'identifier les facteurs déclenchant un stress oxydant, car ces stress ont souvent été associés à diverses pathologies dites dégénératives (Alzheimer, Parkinson), des pathologies respiratoires et cardiaques, à certains cancers ou à certaines pathologies liées au métabolisme comme le diabète, ou encore les maladies inflammatoires

ou la défaillance d'organe (Liu et al., 2018; Tan et al., 2018; Umeno et al., 2017; Yang and Lian, 2020).

a) OS et réponse immunitaire

Même s'ils peuvent causer des dommages aux organes et aux tissus, les ROS présentent l'avantage de pouvoir augmenter les défenses immunitaires. En effet, les ROS produits par la NOX des phagocytes sont impliqués dans la réponse innée contre les bactéries intracellulaires. Par ailleurs, les TLR des macrophages phagosomes seraient impliqués dans leur recrutement et l'augmentation de la production de ROS mitochondriaux (West et al., 2011; Yang and Lian, 2020). D'ailleurs, la production de ROS par les mitochondries des cellules stressées serait impliquée dans la polymérisation de l'actine et la formation des nanotubes *via* la voie des voies de signalisation impliquant P53 (Liu et al., 2021). Les ROS peuvent également activer la prolifération et induire la mort des LT (Belikov et al., 2015; Yang and Lian, 2020). Les ROS produites par la mitochondrie sont impliquées dans la production d'IL-2 par les LT *in vivo* et *in vitro* en réponse à une stimulation antigénique et auraient un rôle crucial dans la reprogrammation métabolique suite à l'activation antigénique (Franchina et al., 2018).

b) OS et GVHD

Dans le cadre d'hémopathies malignes, une des stratégies thérapeutiques consiste à réaliser une transplantation de cellules souches hématopoïétiques (CSH) allogéniques après que les patients aient reçu un conditionnement alliant chimiothérapie +/- radiothérapie. L'objectif de ce conditionnement est d'éliminer les cellules résiduelles du patient ainsi que son système immunitaire afin de favoriser la prise de greffe et diminuer les risques de rejet. En effet les lymphocytes T du donneur vont détruire les cellules cancéreuses résiduelles, c'est l'effet GVL (Graft Versus Leukemia). Néanmoins, ce conditionnement va générer un contexte de stress oxydant en favorisant la formation de radicaux libres et déplaçant les tissus en anti-oxydants (Sari et al., 2008). Les CSH du donneur injectées chez le patient vont pouvoir migrer dans la moelle osseuse du receveur, proliférer et se différencier afin de reconstituer une hématopoïèse normale. Malgré l'utilisation de médicaments immunosuppresseurs, certains patients développent des complications : la maladie du greffon contre l'hôte (GVHD : Graft Versus Host Disease). Dans ce cas, les LT du donneur attaquent les cellules saines du receveur appartenant à certains tissus tels que la peau, le foie et le tractus gastrointestinal. On parlera dans ce

cas d'effet GVH (Nassereddine et al., 2017). Il est montré dans la littérature que l'effet GVH peut être diminué par l'utilisation de CSM-MO ou de cordon (Nassereddine et al., 2017) et notamment grâce à aux facteurs solubles qu'elles sécrètent ou à leurs vésicules extracellulaires (Batsali et al., 2020). Des travaux ont montré que le statut redox des plasmas de patients ayant reçu une allogreffe de CSH était modifié, avec une augmentation des agents pro-oxydants tels que l'oxyde nitrique au profit d'une baisse des activité antioxydantes d'enzymes telles que la catalase, la GPX et la SOD (Sari et al., 2008). Même si les auteurs n'ont pas montré de relations significatives entre ces paramètres de stress oxydant et l'existence de GVHD, la perturbation du statut rédox des patients allogreffés est à prendre en compte pour améliorer les stratégies thérapeutiques dans le cadre de la GVHD.

Objectifs

Le programme de recherche proposé dans ce travail de thèse vise à développer des outils permettant l'amélioration de l'utilisation clinique des CSM. En effet, les CSM, du fait de leurs propriétés immunomodulatrices, présentent un réel intérêt thérapeutique pour des applications en thérapie cellulaire. Cependant, la réussite thérapeutique est largement dépendante de la qualité des CSM obtenues et en particulier de leurs propriétés fonctionnelles, qui peuvent être affectées par la nécessité d'amplifier *in vitro* les CSM et par des caractéristiques propres aux donneurs. Le contexte de stress oxydant retrouvé dans les contextes inflammatoires de certaines pathologies pour lesquelles les CSM seront utilisées est également à prendre en compte, car il est important de savoir comment les CSM gèrent le stress oxydant et si ce dernier peut affecter leurs propriétés immunomodulatrices.

L'objectif général de ce travail de thèse est d'étudier l'effet du micro-environnement et de rechercher des marqueurs de qualité afin de pouvoir utiliser des CSM en tant que produit de thérapie cellulaire. Ainsi, le programme de recherche proposé dans ce travail de thèse se subdivise en trois parties, chacune étant en lien avec les étapes de la production des CSM qui sont : l'expansion *in vitro* des cellules (i), le contrôle de leur qualité (ii) et l'étude de leur fonctionnalité (iii).

La première partie de ce travail concerne l'amplification *in vitro* des CSM et porte sur l'effet des conditions de culture sur leur comportement. Jusqu'au début de ma thèse, au laboratoire, les CSM étaient amplifiées dans du milieu de culture supplémenté en sérum de veau foetal (SVF) utilisé en grade recherche. Or, en grade clinique, à l'unité de thérapie cellulaire et banque de tissus (l'UTCT) de Nancy, l'utilisation du lysat plaquettaire humain (LPH) comme supplément au milieu de culture est préférée au SVF, en normoxie pour les CSM-MO et en hypoxie pour les CSM-GW. Pour ce travail, les CSM de la gelée de Wharton (GW) et de la moelle osseuse (MO) ont été amplifiées avec deux suppléments de milieu de culture (SVF/LPH) et 2 tensions en oxygène (O₂) (normoxie (N) 21% O₂/hypoxie (H) 2% O₂).

Dans cette partie, les objectifs spécifiques étaient d'étudier l'effet des conditions de culture des CSM sur :

- l'adhésion au plastique, l'immunophénotypage et la différenciation mésodermique (recommandations de l'ISCT : International Society for Cell and gene Therapy),
- les propriétés clonogéniques des CSM afin de vérifier le caractère souche,
- les propriétés de prolifération des CSM,
- la transformation cellulaire,
- les caractéristiques morphologiques et la sénescence des cellules,
- les propriétés fonctionnelles : migration et immunosuppression.

La deuxième partie de ce travail concerne la recherche de marqueurs associés à la prolifération des CSM en se focalisant sur les marqueurs de surface et les marqueurs ARN.

Dans une thèse précédente de l'équipe (Targa, 2019) nous avons montré que le surfactome, *via* l'expression de certains clusters de différenciation (CD) à la surface des CSM, était corrélé à leurs capacités de prolifération. Il s'agit des marqueurs CD71, CD106, CD140b, CD146, CD157 et CD200. Notre objectif était d'étudier l'effet des 4 conditions de culture sur l'expression de ces marqueurs de surface.

Objectifs

Par ailleurs, l'analyse du **transcriptome** codant et non codant permet une bonne compréhension des changements dynamiques de la cellule et le profil d'expression des ARN est le miroir du statut phénotypique et fonctionnel des cellules étudiées. Notre objectif était donc, *via* l'analyse de l'expression globale des ARN codants (ARN messenger) (ARNm) et non codants (long ARN non codants (lncARN) et micro ARN (miR)), d'identifier des marqueurs ARN potentiels liés à la qualité des cellules, et en particulier à leur capacité de prolifération.

Enfin, la troisième partie de ce travail est en lien avec la fonctionnalité des CSM et vise à caractériser l'effet du stress oxydant et d'un contexte inflammatoire sur leurs propriétés fonctionnelles. Ce volet expérimental a été réalisé uniquement sur les CSM-GW, cellules utilisées actuellement pour les essais cliniques développés à Nancy. Les objectifs spécifiques de cette partie étaient de :

- mettre en place la technique de dosage des espèces réactives de l'oxygène (ROS) intracellulaires par cytométrie en flux.
- analyser la production de ROS intracellulaires et analyser l'expression de systèmes antioxydants par les CSM-GW amplifiées en normoxie et en hypoxie
- étudier l'impact des ROS sur la prolifération, l'apoptose, la sénescence, la migration et l'immunosuppression de CSM-GW stimulées par de l' H_2O_2 afin de mimer un **contexte de stress oxydant** que l'on peut retrouver dans la GVHD.
- étudier l'impact de l'IFN- γ sur la prolifération, l'apoptose, la sénescence, la migration et l'immunosuppression de CSM-GW stimulées à l'IFN- γ afin de mimer le **contexte inflammatoire** que l'on peut retrouver dans la GVHD.

***In fine*, après avoir évalué l'effet des conditions de culture sur les propriétés fonctionnelles des CSM, nous avons recherché des marqueurs en lien avec la qualité des CSM et étudié l'effet du contexte de stress oxydant et inflammatoire sur leurs propriétés fonctionnelles** afin de les utiliser en thérapie cellulaire dans le cadre de la GVHD.

Chapitre II : Matériel et Méthodes

I. Culture cellulaire

A. Isolement des CSM

1. CSM-MO

Les CSM-MO ont été isolées à partir d'échantillons de moelle osseuse prélevés lors de pose de prothèse de hanche chez les patients après avoir obtenu leur consentement au niveau du service de Chirurgie Orthopédique et Traumatologique (COT) ou à l'Unité de Thérapie Cellulaire et banque de Tissu (UTCT) au Centre Hospitalier Universitaire Régional (CHRU) de Nancy ([Tableau 9](#)). 50000 cellules mononuclées/cm² sont ensemencées à P0 afin d'isoler les CSM qui adhéreront au plastique, puis les CSM seront ensemencées à 1000 cellules/cm² aux passages suivants dans du milieu de culture complet α MEM (Lonza, Réf BE12-169F) dit « SVF » (supplémenté en Sérum de Veau Fœtal (SVF)) ou dit « LPH » (supplémenté en Lysat Plaquettaire humain (LPH)). Les cellules seront cultivées jusque 70-80 % de confluence avant d'être trypsinées (Li et al., 2014). La culture est réalisée en normoxie (N) (90% H₂O, 5% CO₂, 21% O₂) ou en hypoxie (H) (90% H₂O, 5% CO₂, 2% O₂).

2. CSM-GW

Les CSM-GW sont isolées selon la méthode de Capelli et al (Capelli et al., 2011) à partir de cordons ombilicaux obtenus lors d'accouchements au sein de la Maternité Régionale Universitaire de Nancy (MRUN) après avoir obtenu le consentement de la mère ([Tableau 9](#)). Brièvement, des coupes longitudinales du cordon sont réalisées et mises en culture dans des boîtes de culture de 150 cm² (ThermoFisher, Réf 157150) afin de permettre la migration et l'adhésion des CSM sur le plastique. Les cellules sont maintenues jusqu'à 3 semaines de culture dans du milieu de culture complet α MEM (Lonza, Réf BE12-169F) dit « SVF » (supplémenté en Sérum de Veau Fœtal (SVF)) ou dit « LPH » (supplémenté en Lysat Plaquettaire Humain (LPH)) jusqu'à l'apparition de colonies avant d'être trypsinées et ensemencées à 1000 cellules/cm² à P1 et aux passages suivants. A partir de P1, les cellules sont trypsinées à 70-80 % de confluence. La culture est réalisée en normoxie (N) (90% H₂O, 5% CO₂, 21% O₂) ou en hypoxie (H) (90% H₂O, 5% CO₂, 2% O₂).

B. Composition des milieux de culture

Les CSM-GW et CSM-MO ont été cultivées avec du milieu alpha MEM avec rouge de phénol pour l'expansion et sans rouge de phénol pour les marquages immunofluorescents et le dosage des espèces réactives de l'oxygène par cytométrie en flux. Ces milieux sont dits « complets » après ajout de facteurs de croissance contenus dans le lysat plaquettaire humain (LPH) ou dans le sérum de veau fœtal (SVF) (i), antibiotiques (ii) et antifongiques (iii) comme indiqué dans le [Tableau 8](#).

Tableau 8 : Composition du milieu de culture des CSM

Composants	Fournisseur	Référence	Milieu "SVF"	Milieu "LPH"
αMEM avec rouge de phénol*	GIBCO	BE12-169F	Oui	Oui
αMEM sans rouge de phénol**	PANBIOTECH	P04-21051	Oui	Oui
SVF	DUTSHER	S132507	10% (V/V)	Non
LPH	Macopharma	BC0190020	Non	5 à 10% (V/V)***
Héparine	SANOFI	5000 UI/mL		2UI/mL
Amphotéricine B	GIBCO	15290-026	2,5 µg/mL	
Penicilline/ Streptomycine	GIBCO	15070-063	10 mU/mL	
Glutamine	SIGMA	G7513	2 mM	

Les cellules stromales/souches mésenchymateuses de gelée de Wharton (CSM-GW) et de moelle osseuse (CSM-MO) sont cultivées soit dans du milieu de culture supplémenté en antibiotiques et glutamine et en facteurs de croissance (soit du sérum de veau fœtal (SVF) soit du lysat plaquettaire (LPH)). *milieu avec rouge de phénol utilisé pour l'expansion des CSM-MO et sans rouge de phénol ; ** utilisé pour les marquages immunofluorescents ou le dosage des espèces réactives de l'oxygène (ROS) par cytométrie en flux ; *** 5% de LPH pour les CSM-GW et 10 % en LPH pour les CSM-MO. UI : mL : mL ; Unités Internationales ; V : Volume.

C. Liste des prélèvements utilisés

Dans la première et la deuxième partie de ce travail de thèse, les expériences ont été réalisées avec des CSM-GW et des CSM-MO cultivées dans les 4 conditions de culture. En revanche, dans la troisième partie, les expériences ont uniquement été réalisées avec les CSM-GW amplifiées en normoxie et en hypoxie avec du milieu supplémenté en LPH (Tableau 9).

Tableau 9 : Liste des prélèvements utilisés dans ce travail

Groupe	Âge (ans)	PD cumulé à P5	Prolifération*	Sexe	Source	Expériences
CSM-MO	9	20	Bonne	F	UTCT	Effet de l'environnement de culture sur les caractéristiques et les propriétés fonctionnelles des CSM (partie 1) Recherche de biomarqueurs moléculaires précoces (partie 2)
	28	14	moyenne	F	COT	
	78	13	Moyenne	F	COT	
CSM-GW	1	16,3	Bonne	F	MRU	Effet de l'environnement de culture sur les caractéristiques et les propriétés fonctionnelles des CSM (partie 1) et effet du stress oxydant sur les propriétés fonctionnelles des CSM (partie 3)
	2	11	moyenne	F		
	3	18,1	Bonne	F		
CSM-MO "jeunes"	24	16,3		F	COT	Recherche de biomarqueurs moléculaires précoces (partie 2)
	30	15,41	Bonne	F		
	36	15,05		F		
CSM-MO "âgés"	75	6,87		F	COT	Recherche de biomarqueurs moléculaires précoces (partie 2)
	82	0,49**	Faible	F		
	85	6,84		F		

CSM-MO : cellules stromales/souches mésenchymateuses de moelle osseuse ; **CSM-GW** : cellules stromales/souches mésenchymateuses de gelée de Wharton, **COT** : centre de chirurgie orthopédique et traumatologique ; **MRU** : maternité régionale universitaire ; **UTCT** : unité de thérapie cellulaire et banque de tissus. * Pour un nombre de population doubling (PD) cumulé à passage 5 (P5) la prolifération est considérée : bonne si PD cumulé >15, moyenne si 10 < PD cumulé < 15 et faible si PD < 10 (En normoxie avec du milieu supplémenté en sérum de veau fœtal). ** pour CSM-MO provenant du donneur âgé de 82 ans, les cellules ne proliféraient pas après le passage 2.

D. Pré-conditionnement des CSM

Après 5 jours de culture, soit 48 heures avant la trypsination, les CSM-GW sont préconditionnées pendant 48 heures avec différentes molécules dans du milieu de culture complet +/- rouge de phénol et avec 10 % LPH : Interféron-γ (MYLTENYI BIOTEC, Réf 130-096-484) à 50 ou 100 ng/mL, Deferoxamine mesylate, Iron chelator (DFO) (ABCAM, Réf ab120727) à 100 µM, CAY10585, HIF-1α inhibitor (ABCAM, Réf ab144422) à 100 nM, Diméthylloxaloylglycine, Prolyl hydroxylase (PHD) inhibitor (DMOG) (ABCAM, Réf ab141586) à 250 µM.

Concernant le peroxyde d'hydrogène (H₂O₂), après 5 jours de culture, les CSM-GW sont incubées pendant 2 heures avec une solution d'H₂O₂ (SIGMA, Réf H1009) à 150 µM dans du milieu de culture

complet +/- rouge de phénol et avec 10 % LPH. Les cellules sont ensuite lavées et maintenues en culture dans du milieu complet jusqu'au 7^{ème} jour.

Un prétraitement par de la N-Acétylcystéine (SIGMA, Réf A916556) à 10 mM dans du milieu sans rouge de phénol et sans LPH pendant 2 heures, avant le pré-conditionnement par du peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) ou de l'interféron- γ a été réalisé pour certaines expériences.

E. Trypsination et amplification

Lorsque les CSM sont à 70 % de confluence à passage n (7 jours environ après la mise en culture pour les CSM-GW et entre 7 et 14 jours pour les CSM-MO), les CSM en flasks de 75 cm² sont rincées 2 fois avec 5 mL de PBS (GIBCO, réf 14190), puis, une solution de trypsine à 0,025% (GIBCO, Réf 25300-054) est ajoutée dans la boîte de culture et laissée au contact des cellules pendant 5 min à 37 °C, 90 % d'humidité et 5 % CO₂. Pour inhiber l'action de l'enzyme, 5 mL de milieu complet α MEM sont ajoutés. La suspension cellulaire est récupérée et centrifugée à 300 g pendant 10 min. Après avoir éliminé le surnageant, le culot cellulaire est repris dans 10 mL de milieu complet α MEM et les cellules sont dénombrées avant d'être remises en culture à une densité de 1000 cellules /cm² (ϕ /cm²) dans des flasks 75 cm² (Corning, Réf 430641U) à passage n+1 afin de les amplifier. Cette étape est renouvelée jusqu'au P5 pour l'étude de la prolifération. Durant l'expansion *in vitro*, différents paramètres sont étudiés (Figure 27).

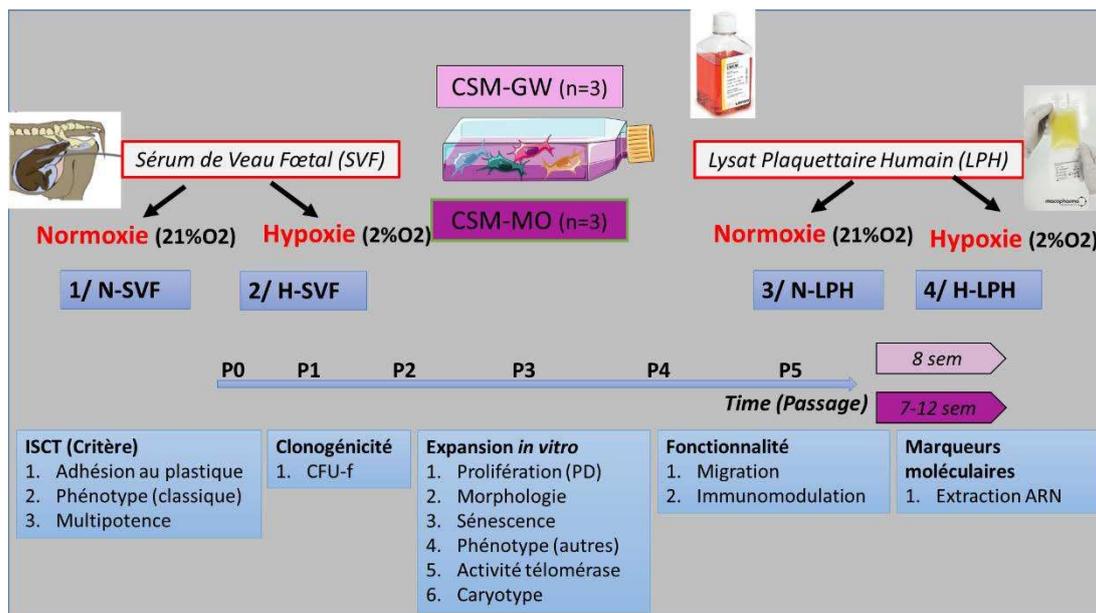


Figure 27 : Schéma récapitulatif des différents paramètres qui sont étudiés durant l'expansion *in vitro* des CSM

Les cellules stromales/souches mésenchymateuses de moelle osseuse (CSM-MO) ou de gelée de Wharton (CSM-GW) ont été amplifiées en normoxie (N) ou en hypoxie (H) avec du milieu supplémenté en sérum de veau fœtal (SVF) ou en lysat plaquettaire humain (LPH) jusqu'au passage 5 (P5). Différentes expériences ont été réalisées afin d'étudier l'effet de l'environnement de culture sur les caractéristiques et les propriétés fonctionnelles des CSM. CFU-f=Colony Forming Unit fibroblast ; PD=Population Doubling ; ISCT : International Society for Cellular Therapy.

F. Dénombrement

a) Bleu trypan

60 μ L de suspension cellulaire sont mélangés à 20 μ L de bleu trypan (SIGMA, Réf T8154). 20 μ L sont déposés dans la cellule de Thoma (VWR, Réf 631-0697). Le nombre de cellules comptées dans tout le quadrillage est multiplié par 10000 (car le volume du quadrillage est de 0,1 μ L) et par le facteur de dilution (F=4/3) afin d'obtenir le nombre de cellules/mL.

b) Leucoplate

10 µL de suspension de moelle osseuse sont mélangés à 190 µL de Leucoplate (SOBIODA, Réf 3101.002) afin de lyser les érythrocytes. 20 µl sont déposés dans la cellule de Thoma (VWR, Réf 631-0697). Le nombre de cellules comptées dans tout le quadrillage est multiplié par 10000 (car le volume du quadrillage est de 0,1 µL) et par le facteur de dilution (F=20) afin d'obtenir le nombre de cellules/mL.

G. Congélation

Après trypsination, une partie du culot cellulaire peut être repris dans du milieu de congélation à 4°C, composé de SVF-DMSO 10 % (V/V) (Dymethyl Sulfoxid, FISHER BioReagents, Réf BP 231-1) ou LPH-DMSO 10 % à une densité d'au moins 1 million par tube. La suspension cellulaire est ensuite déposée dans un cryotube que l'on place dans une boîte de congélation « Coolcell® » (PROTEIGENE, Réf BCS-136) pendant au moins 4 heures à -80°C permettant de descendre la température de 1 °C/minute. Les cryotubes sont ensuite conservés à -196 °C dans de l'azote liquide.

H. Décongélation

Pour remettre en culture les cellules conservées dans l'azote liquide, la suspension cellulaire est ramenée à +37°C en la mélangeant avec du milieu complet αMEM à cette même température. Après centrifugation pendant 10 min à 300 g, le culot cellulaire est remis en suspension dans du milieu complet et les cellules sontensemencées à une densité de 1000 C/cm^2 .

I. Calcul de la prolifération

1. Le « Population Doubling » (PD)

Le « population doubling » ou PD est déterminé pour les passages P1 à P5. Il correspond au nombre de fois où la population a doublé depuis la mise en culture des cellules et est calculé à partir de la formule suivante :

$$PD = \log(N_x/N_i) / \log 2$$

PD : population doubling

N_i : le nombre de cellules initial

N_x : le nombre de cellules après trypsination

2. Le « doubling time » (DT)

Le « doubling time » ou le temps de doublement d'une population correspond au temps moyen dont a besoin cette population pour doubler son effectif et est calculé selon la formule suivante :

$$DT = t \cdot \ln(2) / (\ln(N_x) - \ln(N_i))$$

DT : doubling time

N_i : nombre de cellules initial

N_x : nombre de cellules après trypsination

J. Test de clonogénicité

Les CSM sontensemencées dans différentes conditions (N-SVF, H-SVF, N-LPH, H-LPH) dans des boîtes rondes de culture de 60 cm² (Nunc, Réf 150350) à raison de 100 cellules/boîte (environ 2 cellules/cm²) pour la détermination des CFU (Colony Forming Unit). Après 14 jours de culture, les colonies sont colorées au cristal violet (SIGMA, Réf HT90132-1L) et les boîtes sont numérisées grâce au scanner GS-800 (BIORAD). La taille et le nombre de CFU sont analysés grâce au logiciel ImageJ (National Institutes of Health, USA).

K. Expériences en présence d'anticorps bloquants

Les CSM-GW sontensemencées à 1000 cellules/cm² dans des plaques 12 puits (SARSTEDT, Réf 83-3921) (test de prolifération) ou 2 cellules/cm² (Test de clonogénicité) en condition d'hypoxie après avoir été amplifiées avec du milieu supplémenté en LPH et maintenues pendant 24 heures en culture. Les CSM sont maintenues en culture pendant 7 jours (test de prolifération) et 10 jours (Test de clonogénicité) avec du milieu complet supplémenté en LPH et pré-incubées pendant une heure à 37 °C avec les anticorps neutralisants ([Tableau 10](#)). Le milieu est changé tous les 3 jours. A la fin de la culture, les CSM sont trypsinées et comptées pour le test de prolifération (cf « dénombrement ») et colorées au cristal violet pour le test de clonogénicité (cf « test de clonogénicité »).

Tableau 10 : Liste des anticorps bloquants

Nom	Fournisseur	Référence	Concentration finale dans le milieu complet
Anti-EGF Antibody, neutralizing	Millipore	06-102	43,8 ng/mL
Anti-FGF-2/basic FGF (neutralizing) Antibody, clone bFM-1	Millipore	05-117	3,8 ng/mL
Anti-IGF-I Antibody, clone Sm1.2	Millipore	05-172	4,5 µg/mL
Anti-PDGF Antibody, neutralizing	Millipore	06-127	6 µg/mL

EGF : Epidermal Growth Factor-Facteur de croissance épidermique ; *FGF2/bFGF*: Fibroblast Growth Factor-Facteur de croissance fibroblastique 2 /de base ; *IGF* : insulin-like growth factor- facteur de croissance insuline-like ; *PDGF* : Platelet-derived growth factor-facteur de croissance dérivé des plaquettes.

L. Test de différenciation

1. Culture

Après avoir été amplifiées dans différentes conditions (N-SVF, H-SVF, N-LPH, H-LPH) jusqu'à la fin du passage 3 pour les CSM-GW et du passage 2 pour CSM-MO, les cellules sontensemencées dans des plaques 24 puits (CORNING, Réf 3524) dans des milieux de culture spécifiques pour induire la différenciation ostéocytaire (différenciation O) (3100 cellules/cm²) (LONZA, Réf PT-3924) et adipocytaire (différenciation A) (21000 cellules/cm²) (LONZA, Réf PT-3102A et PT-3102B). Pour la différenciation chondrocytaire (différenciation C), les cellules sontensemencées sous forme de pellets (250000cellules/pellets) dans des tubes de culture de 15 mL (CORNING, Réf 430791) dans un milieu de culture spécifique (LONZA, Réf PT-3925) contenant le facteur de croissance Transforming Growth Factor beta 3 (TGF-B3). La composition des différents milieux ([Tableau 11](#), [Tableau 12](#)) et le détail de la procédure sont décrits dans le protocole fourni par la société Lonza. Les cellules sont cultivées pendant 21 jours pour les différenciations A et O et pendant 28 jours pour la différenciation C avant de procéder à la mise en évidence de la différenciation par la coloration. Toutes les cultures sont réalisées en normoxie. Conformément à la procédure fournie avec les milieux de la société Lonza, les milieux de culture des cellules pour les différenciations O et C sont changés 2 fois par semaine. En revanche, pour la différenciation A, 3 cycles induction (3 jours)/maintenance (1 à 3 jours) sont réalisés dès que les cellules cultivées dans l'αMEM (Lonza, Réf BE12-169F) complet sont arrivées à confluence. Des contrôles négatifs sont réalisés en parallèle pour chaque différenciation : milieu complet αMEM pour les différenciations O et C et milieu de maintenance pour la différenciation A.

Tableau 11 : Composition du milieu de différenciation adipocytaire (A)

Composants	Milieu d'induction (LONZA, réf PT-4135)	Milieu de maintien (LONZA, Réf PT-4122)
h-insuline (recombinante)	ok	ok
L-glutamine	ok	ok
MCGS (mesenchymal cell growth supplement)	ok	
dexaméthasone	ok	
indométhacine	ok	
IBMX (3-isobutyl-1-méthyl-xantine)	ok	
GA-1000	ok	ok

Tableau 12 : Composition du milieu de différenciation ostéocytaire (O)

Composants	Milieu d'induction (LONZA, réf PT-3924)	Milieu complet (LONZA, Réf BE12-169F)
dexaméthasone	ok	
L-glutamine	ok	ok
ascorbate	ok	
pénicilline/streptomycine	ok	ok
MCGS (mesenchymal cell growth supplement)	ok	
SVF (Dutsher, réf S132507)		ok
Amphotéricine B		ok

Tableau 13 : Composition du milieu de différenciation chondrocytaire (C)

Composants	Milieu d'induction (LONZA, réf PT-3925)	Milieu complet (LONZA, Réf BE12-169F)
dexaméthasone	ok	
ascorbate	ok	ok
ITS (Insuline-Transferrine-Sélénium)	ok	
GA1000	ok	ok
Sodium pyruvate	ok	
Proline	ok	
L-glutamine	ok	
TGF-beta3 (Peprotech, réf 100-36E-B)	ok	
SVF (Dutsher, réf S132507)		ok
Amphotéricine B		ok

2. Coloration

a) Coloration rouge alizarine

La coloration rouge alizarine permet de mettre en évidence les sels calciques en rouge, ce qui témoigne de la différenciation des CSM en ostéocytes. Après avoir lavé 3 fois les puits par 1 mL de PBS (GIBCO, réf 14190), les cellules sont fixées pendant une 1 heure à 4 °C par de l'éthanol 70 % froid à raison de 0,5 mL par puits. Les puits sont ensuite lavés 3 fois avec 1 mL d'eau distillée. La coloration s'effectue ensuite pendant 30 min à température ambiante après ajout de rouge alizarine (SIGMA, A5533) 40 mM à raison de 0,5 mL par puits. Après avoir lavé 3 fois les puits avec 1 mL d'eau distillée, la plaque est séchée à TA. Les puits colorés sont ensuite photographiés au microscope inversé (Leica, DMI 3000B) à l'objectif X10 afin d'avoir une appréciation qualitative de la différenciation.

b) Marquage adipored

Le marquage adipored permet de mettre en évidence les vésicules lipidiques par de la fluorescence verte dans les cellules vivantes. Les CSM en plaque 24 puits sont incubées pendant une heure en

normoxie avec 250 μL de solution de DAPI (SIGMA, Réf D9542) dilué au 1/40^{ème} dans du milieu de culture complet sans rouge de phénol. Après avoir lavé 3 fois les puits avec 300 μL de PBS (GIBCO, Réf 14190), les cellules sont incubées pendant 15 minutes en normoxie avec 200 μL de solution d'adipored (LONZA, Réf PT7009) dilué au 1/30^{ème}. Les cellules sont directement observées et des images sont prises au microscope à épifluorescence Leica DMI 3000B grâce à deux filtres spécifiques (filtre DAPI excitation à 372 nm et émission à 456 nm et filtre adipo RED-excitation 488 et émission 509 nm) à l'objectif x10.

c) Coloration Bleu alcian/Kernechtrot

Le Bleu Alcian permet de mettre en évidence les mucopolysaccharides. A un pH acide (pH 1,3), il colore uniquement les polysaccharides sulfatés en bleu comme les GAG (sauf l'acide hyaluronique qui n'est pas sulfaté). Il met ainsi en évidence indirectement les protéoglycannes spécifiques de la matrice extracellulaire des chondrocytes. Pour visualiser plus précisément les cellules, le noyau est coloré en rouge avec une solution de Kernechtrot.

Les pellets sont fixés par de la paraformaldéhyde 4% (PAF 4%) (Sigma, Réf P6148-500G) pendant 24 heures au moins et sont ensuite placés entre deux rectangles de mousse (BIOPSY FOAM PADS, SIMPORT, Canada, réf. M476-1) dans des cassettes en plastique (SIMPORT, Réf M490-6). Les cassettes sont placées dans un appareil de déshydratation ASP 300S (LEICA, Allemagne) pour que les échantillons soient, dans un premier temps, déshydratés progressivement dans des bains croissants d'alcool : un bain d'alcool à 70° pendant une heure minimum, deux bains d'une heure d'alcool à 95°, et trois bains d'alcool absolu d'une heure. L'alcool est ensuite éliminé avec trois bains de toluène de 15 min. Enfin, les échantillons sont laissés dans un bain de paraffine liquide (+58°C) pendant 2-3 heures. Les prélèvements sont ensuite inclus définitivement dans la paraffine, puis les blocs se solidifient avec la diminution de la température.

Les blocs sont alors découpés après avoir été conservés à -20°C pendant au moins 24 heures. Les coupes d'une épaisseur de 5 μm sont réalisées à l'aide d'un microtome (Leica, Réf RM 2135) et déposées sur des lames histologiques (Menzel-Gläser SUPERFROST®, Thermo Scientific, Réf LCSF02). Enfin, les échantillons sont passés successivement dans différents bains d'alcool décroissants pour les réhydrater, puis sont colorés et déshydratés par un appareil de coloration comme décrit succinctement dans le [Tableau 14](#).

Tableau 14 : Protocole de coloration Bleu Alcian

Réactifs	Temps (min)
Tissue Clear	10
Alcool 100°	5
Alcool 95°	5
Alcool 70°	5
Lavage	5
Bleu alcian	60
Bleu alcian	60
Lavage	5
Kernechtrot	5
Lavage	5
Alcool 95°	0,5
Alcool 100°	0,5
Tissue Clear	5
Total	171

Après des déshydratations successives, les échantillons sont plongés dans des bains de colorants spécifiques au protocole de coloration. Enfin les échantillons sont à nouveau déshydratés avant la fin du protocole. **Min**=minutes.

Les échantillons sont colorés avec du Bleu Alcian (SEARLE DIAGNOSTIC, Réf M/N24) dilué à 0,1 % à un pH de 1,3, solution de Kernechtrot (0,5 g de poudre de Kernechtrot (MERCK, 5189), 25 g de sulfate d'aluminium (PROLABO, Réf 21070297) dissout dans 500 mL d'eau distillée. Après la coloration, les lames histologiques sont montées sous lamelles avec une résine synthétique PERTEX (BALER, Réf 02407831) pour permettre l'observation des colorations avec un microscope optique (LEICA, DMD 108).

M. Analyse caryotypique

Les CSM-GW amplifiées dans les 4 conditions de culture (N-SVF, H-SVF, N-LPH, H-LPH) jusqu'au passage 3 ont été transmises au Laboratoire de Génétique du CHRU de Nancy pour la réalisation des analyses caryotypiques selon leurs protocoles standardisés en clinique. Brièvement, après blocage des CSM en mitose à la colchicine 20 mg/mL (Prolabo, Réf C3915), un choc hypotonique est réalisé (Citrates de sodium à Na₃C₆H₅O₇, 2H₂O à 8 g/l (Prolabo, Réf 243.008532.40). Après fixation, les lames sont colorées au Giemsa (Abcam, Réf ab150670) et observées au microscope inversé pour l'analyse des caryotypes.

N. Activité télomérase

Les CSM-GW amplifiées dans les 4 conditions de culture (N-SVF, H-SVF, N-LPH, H-LPH) jusqu'au passage 3 ont été transmises au Laboratoire de cytogénétique du Centre Hospitalier Universitaire (CHU) de Clermont-Ferrand afin de quantifier l'activité télomérase des cellules selon leurs protocoles standardisés en clinique. Brièvement, après extraction des ARN au qiazol et rétrotranscription en ADNc (cf [partie biologie moléculaire](#)), l'expression de l'ARNm hTERT (Human telomerase reverse transcriptase) est quantifiée par qPCR quantitative à l'aide d'amorces spécifiques et normalisée par rapport à l'expression de l'ARNm Abelson ABL, un gène de ménage utilisé dans ce domaine car son expression ne varie pas entre les cellules normales et les cellules leucémiques contrairement aux gènes qui codent pour la β -2-microglobuline (B2M) ou β -glucuronidase (GLUS) (Beillard et al., 2003). Les résultats sont exprimés en expression de hTERT normalisée (ratio entre les transcrits d'hTERT et ABL multiplié par 100). Les échantillons avec absence d'amplification de hTERT et un nombre de copies de

transcrits ABL > 10 000 sont considérés comme négatifs. Le laboratoire se base sur les travaux de (Armstrong et al., 2000) qui montrent que l'expression de l'ARNm de TERT chez la souris est corrélée à l'activité de la télomérase.

O. Sénescence cellulaire

1. Principe

Ce test repose sur le fait que les cellules en sénescence présentent une activité de la β -galactosidase détectable à pH 6. La β -galactosidase est une enzyme lysosomale avec une activité optimale à pH 4-4,5 qui hydrolyse les β galactosides en oses simple dans toutes les cellules y compris les cellules sénescents, pré-sénescents, quiescentes ou immortelles. A pH 6, cette activité n'est essentiellement détectée que dans les cellules sénescents du fait de la quantité importante de l'enzyme présente dans ces cellules par rapport aux cellules non sénescents. Dans ce test la β -galactosidase hydrolyse son substrat chromogénique, le X gal (5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-galactopyranoside), libérant un produit indolique devenant bleu par oxydation et insoluble dans l'eau et précipitant au niveau du site de la réaction enzymatique (Figure 28). Néanmoins, il est nécessaire de ne pas atteindre la confluence car les cellules à confluence sont positives pour ce test biaisant ainsi l'analyse (Debacq-Chainiaux et al., 2009). De plus, seules les cellules qui ne prolifèrent pas sont considérées comme sénescents, c'est pourquoi de l'Edu, un substitut nucléotidique qui s'incorpore dans les cellules en division est rajouté aux cellules 24 heures avant le test.

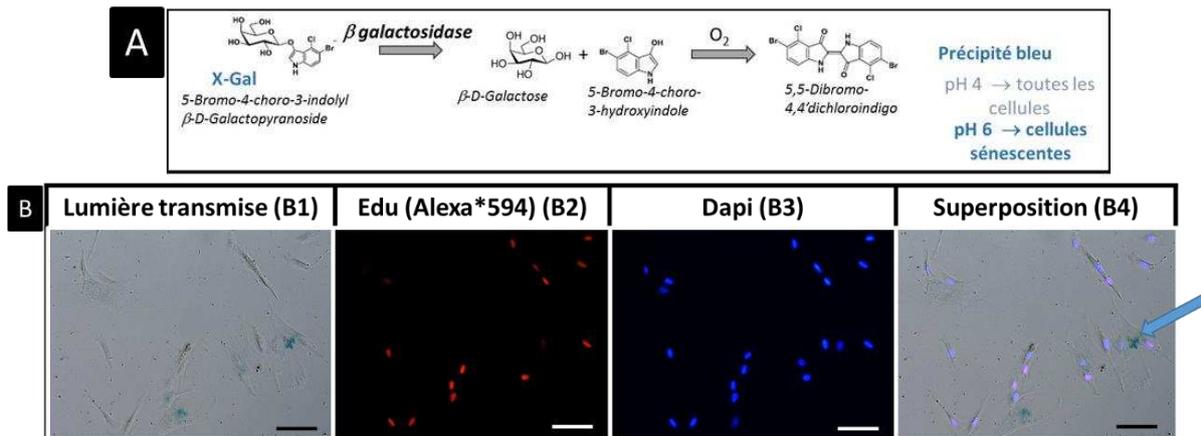


Figure 28 : Schéma de principe du test de sénescence : expression de l'enzyme β -galactosidase (Adapté à partir de Dimri et al., 1995)

La β -galactosidase hydrolyse son substrat chromogénique le X-Gal libérant un précipité bleu à pH 6 dans les cellules sénescents (A). Après avoir réalisé les différents marquages (B), les CSM sont observées au microscope à fluorescence (Leica DMI3000B) et photographiées en lumière transmise (B1) afin d'observer le précipité bleu caractéristique du produit de la β -galactosidase, avec le filtre pour l'Edu afin de voir les noyaux des CSM en prolifération en couleur rouge (B2), les noyaux de toutes les cellules marqués par le DAPI en bleu (B3). La superposition des 3 canaux (B4), permet de compter les cellules sénescents : positive au X-gal (précipité bleu) et qui ne prolifère pas (négative au marquage Edu). Les cellules sénescents (flèche bleue) sont également de plus grande taille. (échelle 100 μ m).

2. Méthode

Les CSM sont ensemencées dans différentes conditions (N-SVF, H-SVF, N-LPH, H-LPH) à 1000 cellules/cm² dans des plaques 24 puits pendant 5 jours. Au quatrième jour, de l'Edu dilué au 1/100^{ème} (5-ethynyl-2'-deoxyuridine) est rajouté au milieu de culture pour mettre en évidence les cellules en prolifération (Click-iT® Plus Edu Imaging Kits, Molecular Probes, Réf C10639). Après 5 jours de culture,

les cellules sont fixées et l'activité enzymatique de la β -galactosidase est mise en évidence dans les cellules sénescentes grâce au kit « Senescence β -Galactosidase Staining kit » (CELL SIGNALING, Réf 9860) selon les recommandations du fournisseur. Après avoir marqué l'Edu avec l'Alexa fluor*594, un marquage des noyaux au DAPI (SIGMA ALDRICH, Réf D9542-5MG) est réalisé afin de déterminer le nombre total de cellules. Des photographies sont réalisées à l'aide du microscope à épifluorescence (Leica, DMI 3000B) à l'objectif X10 et le pourcentage de cellules sénescentes sera déterminé grâce au logiciel ImageJ (National Institutes of Health, USA). Seules les cellules positives pour la β -galactosidase et qui ne se divisent pas (négative au marquage rouge de l'Edu) seront considérées comme sénescentes. Le marquage Edu permet en effet d'éliminer les faux positifs. Le pourcentage des cellules sénescentes est calculé à partir d'au moins 50 cellules par rapport au nombre des cellules totales.

II. Cytométrie en flux

A. Principe de la cytométrie en flux

La **cytométrie en flux** (CMF) (*Figure 29*) est une technique permettant l'étude de particules isolées, cellules ou bactéries entraînées dans un flux liquide ou gazeux devant une source lumineuse. Il s'agit d'une technique de caractérisation individuelle, quantitative et qualitative des particules en suspension dans le flux liquide.

La source lumineuse (laser) excite les cellules, qui vont émettre différents signaux optiques, focalisés, séparés puis acheminés vers des systèmes de détection, photomultiplicateurs. Ils sont pour cela, sélectionnés par différents circuits optiques composés d'une alternance de miroirs dichroïques et de filtres. Il existe trois types de canaux :

1. Le canal « taille » (FSC « Foward Scatter Channel ») : la lumière diffusée dans l'axe du rayon incident qui est mesurée peut être corrélée avec la taille des cellules.
2. Le canal « structure » (SSC « Side Scatter Channel ») : la lumière diffusée dans un angle de 90° correspond à la structure interne des cellules.
3. Le canal fluorescence (FL1, FL2, FL3...) : pour recueillir la fluorescence émise qui peut être spontanée mais qui est le plus souvent apportée par un fluorochrome utilisé pour marquer la cellule. Le fluorochrome est excité par le laser à une longueur d'onde d'excitation et émet ensuite de la fluorescence à une longueur d'onde d'émission plus élevée que la longueur d'onde d'excitation.

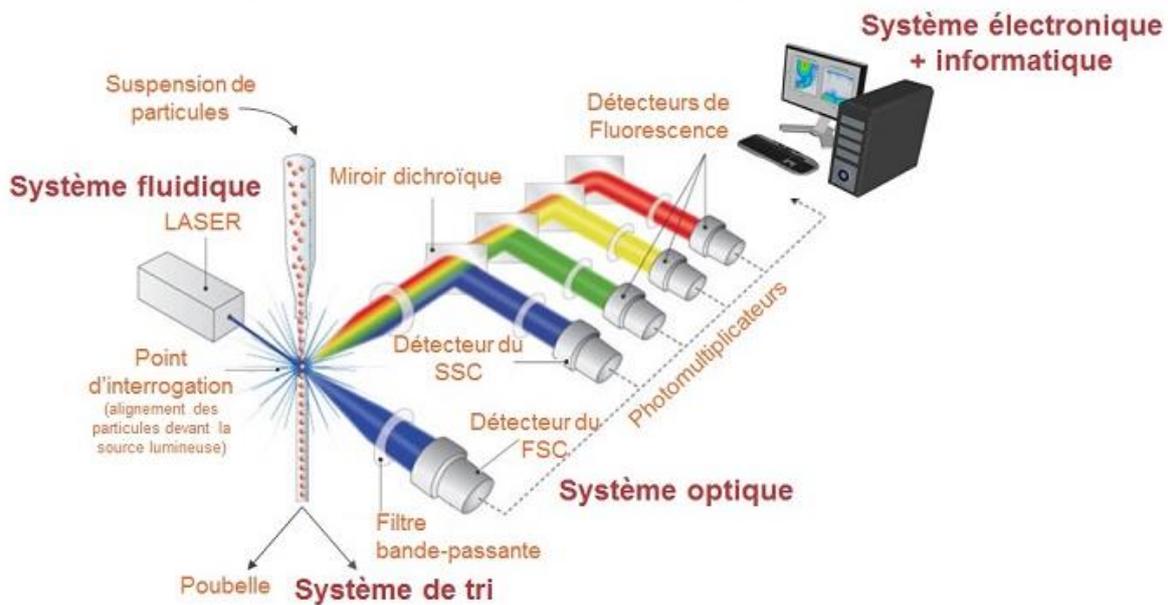


Figure 29 : Schéma du principe de la cytométrie en flux

Les cellules individualisées entraînées par le liquide de gaine sont excitées par un laser et vont diffuser de la lumière dans l'axe du rayon incident (FSC=taille) (Forward Scatter Channel) et dans un angle à 90°C (SSC= structure) (Side Scatter Channel). La fluorescence émise est acheminée aux systèmes de détection après avoir été sélectionnée par des systèmes optiques composés d'une alternance de miroir dichroïques et filtres (FL1, FL2, FL3...). Des photomultiplicateurs permettent d'amplifier le signal et de l'analyser grâce à un système électronique et informatique.

B. Immunophénotypage

1. Principe

Les CSM expriment des marqueurs protéiques à leur surface qui pourront être reconnus par des anticorps monoclonaux couplés à des fluorochromes détectables par cytométrie en flux. L'intensité médiane de fluorescence (IMF) pour chaque marqueur est proportionnelle à son expression par la cellule. Il est également possible de déterminer le pourcentage de cellules positives pour chaque marqueur.

2. Méthode

Après avoir été trypsinées, 200 000 CSM sont déposées dans chaque tube de cytométrie (SARSTEDT, Réf 55526) et lavées dans du PBS (GIBCO, réf 14190) par centrifugation à 300 g pendant 5 minutes. Les CSM sont ensuite bloquées pendant 10 min à température ambiante (TA) dans du PBS (GIBCO, Réf 14190)-BSA 0,5 % (SIGMA-ALDRICH, Réf A9647-50G) et centrifugées à 300 g pendant 5 minutes. Les CSM sont alors incubées avec les marqueurs de viabilité ([Tableau 15](#)) avant d'être lavées avec 500 µL de PBS (GIBCO, réf 14190), puis centrifugées à 300 g pendant 5 minutes.

Les CSM sont ensuite incubées avec des anticorps dirigés contre des antigènes spécifiques couplés aux différents fluorochromes ou avec les anticorps contrôles isotypiques ([Tableau 15](#)) pendant 45 min à TA selon les combinaisons présentées dans le [Tableau 16](#). Les anticorps sont utilisés en excès selon les recommandations des fournisseurs et les contrôles isotypiques à la même concentration que les anticorps. Après un dernier lavage en PBS, 250 µL de PBS (GIBCO, réf 14190) sont ajoutés et les cellules sont passées au cytomètre en flux (CMF) (Gallios, BECKMAN COULTER).

Chapitre II : Matériel et Méthodes

Les données sont ensuite analysées à l'aide du logiciel Kaluza (Kaluza Analysis version 1.3.14026.13330).

Tableau 15 : Liste des anticorps et marqueurs de viabilité utilisés pour le phénotypage

Anticorps/marqueurs de viabilité	Fluorochrome/ Sonde*	Fournisseur	Référence	Clone
CD34	PE	BD Pharmingen	555822	581
CD44	FITC	Beckman Coulter	IM1219U	J.173
CD45	FITC	Dako	F0861	T29/33
CD71	APC	BD Pharmingen	551374	M-A712
CD71	FITC	BD Pharmingen	555536	M-A712
CD73	PE	BD Pharmingen	550257	AD2
CD90	FITC	Beckman Coulter	IM1839U	2G5
CD95L	PE	BD Pharmingen	564261	NOK-1
CD105	PE	Beckman Coulter	B92442	TEA3/17.1.1
CD106	PE	BD Pharmingen	555647	51-10C9
CD140b	PerCP-Cy5.5	BD Pharmingen	562714	28D4
CD146	BV421	BD Horizon,	564325	P1H12
CD157	APC	ThermoFisher	17-1579-42	SY/11B5
CD166	PE	Beckman Coulter	A22361	3A6
CD200	PE	BD Pharmingen	552475	MRC OX-104
HLA-DR	FITC	Beckman Coulter	IM0463U	B8.12.2
PDL-1	APC	Invitrogen	17-5983-42	MIH1
Marqueur de viabilité : LIVE/DEAD	Live dead violet*	ThermoFisher	L34955	
Marqueur de viabilité Zombie Green	Zombie green vert*	Biologend	423111	
Mouse IgG1 κ Isotype Control	PE	Dako	X0928	DAK-GO1
Mouse IgG1 κ Isotype Control	FITC	Dako	X0927	DAK-GO1
Mouse IgG1, κ Isotype Control	BV421	BD Horizon,	562438	X40
Mouse IgG2a, κ Isotype Control	APC	BD Pharmingen	555576	G155-178
Mouse IgG2a, κ Isotype Control	PerCP-Cy5.5	BD Pharmingen	550927	G155-178

L'analyse des résultats a été réalisée sur les cellules vivantes grâce aux marqueurs de viabilité zombie green et livedead. * Les marqueurs viabilité utilisés sont des sondes.

Les anticorps ont été utilisés en excès grâce aux recommandations des fournisseurs et les contrôles isotypiques furent utilisés à la même concentration que les anticorps (données fournisseurs). **APC**=Allophycocyanin ; **BV**=Brillant Violet ; **CD**=cluster de différenciation ; **FITC**=Isothiocyanate de fluorescéine ; **HLA**=Human Leucocyte Antigen ; **IgG**=immunoglobuline G ; **PDL-1**=Programmed cell Death Ligand-1 ; **PE**=R-Phycoerythrine ; **PeCy7**= tandem R-phycoerythrine et Cyanine 7 ; **PercpCy5.5**=tandem de Percp et Cyanine 5.5.

Tableau 16 : Liste des combinaisons d'anticorps pour le phénotypage

Tube	Combinaisons
1	iso*PE-iso*BV421-iso*APC-ZG
2	CD105*PE-CD146*BV421-CD157*APC-ZG
3	iso*PE-iso*PercpCy5.5-iso*APC-LD
4	CD200*PE-CD140b*PercpCy5.5-CD71*APC-LD
5	iso*PE-iso*FITC-LD
6	HLA-DR*FITC-CD166*PE-LD
7	CD45*FITC-CD34*PE-LD
8	CD44*FITC-CD73*PE-LD
9	CD90*FITC-CD106*PE-LD

APC=Allophycocyanine ; **BV**=Brillant Violet ; **CD**=cluster de différenciation ; **FITC**=Isothiocyanate de fluorescéine ; **HLA**=Human Leucocyte Antigen ; **IgG**=immunoglobuline G ; **iso**=contrôle isotypique ; **LD**=Livedead (Violet) ; **PDL-1**=Programmed cell Death Ligand-1 ; **PE**=R-Phycoerythrine ; **PeCy7**=tandem de R-phycoerythrine et Cyanine 7 tandem ; **PercpCy5.5**=tandem de Percp et Cyanine 5.5 ; **ZG**=Zombie Green

C. Viabilité : Apoptose Nécrose

1. Principe

L'annexine V est une protéine de la face interne de la membrane phospholipidique qui interagit avec la phosphatidylsérine (PS) pour réguler l'organisation des microfilaments d'actine. En apoptose, les PS passent de la couche interne à la couche externe de la membrane plasmique des cellules. Ainsi, le couplage de l'annexine V à l'Alexa 488 permet de détecter les cellules apoptotiques. En nécrose (mort cellulaire non programmée) ou en fin d'apoptose (apoptose tardive), la membrane plasmique des cellules se détériore et ne joue plus le rôle de barrière sélective. Ainsi, l'iodure de propidium (IP), agent intercalant de l'ADN, peut entrer dans les cellules et se fixer sur les acides nucléiques contenus dans le noyau (Figure 30).

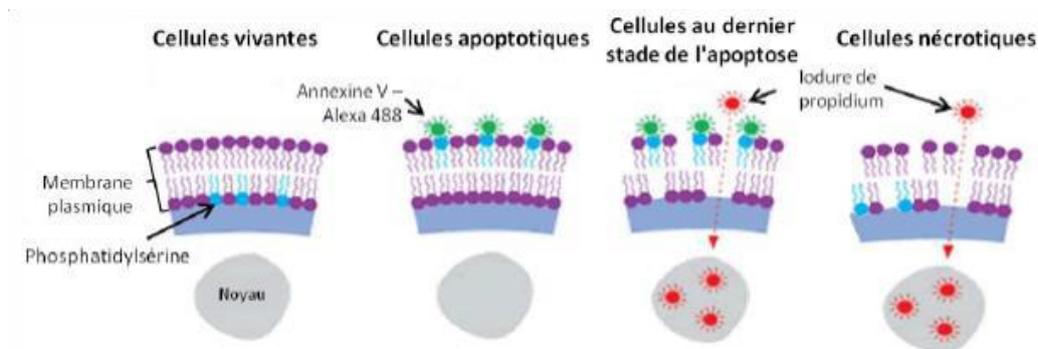


Figure 30 : Schéma de principe du test d'apoptose à l'annexine V (www.biomol.de)

2. Méthode

Après trypsination, les CSM déposées dans des tubes de cytométrie (SARSTEDT, Réf 55526) à une densité comprise entre 200 000 et 800 000 cellules/tube, sont lavées avec du PBS (GIBCO, réf 14190), puis centrifugées pendant 5 min à 300 g afin d'être marquées grâce au kit Vybrant Apoptosis (In Vitrogen, Réf V13241). Les culots cellulaires sont remis en suspension dans 100 µL de tampon annexine V 1X, puis 2,5 µL d'annexine V couplée à l'alexia 488 et 1 µL d'iodure de propidium sont rajoutés avant d'être mélangés au vortex. Après une incubation de 15 minutes à l'obscurité à TA, 200 µL par tube de tampon annexine V sont rajoutés. Les cellules vivantes sont ensuite passées dans l'heure au cytomètre en flux (Gallios, Beckman Coulter) (longueurs d'ondes d'émission 519 et 617 nm) et le pourcentage de CSM vivantes, en apoptose précoce, en nécrose et en apoptose tardive est déterminé grâce au logiciel Kaluza Analysis 2.1 (Beckman Coulter).

D. Dosage des espèces réactives de l'oxygène intracellulaires

1. Principe

La sonde CM-H₂DCFDA (6-Carboxy-2',7'-Dichlorodihydrofluorescein Diacetate) est une sonde non fluorescente comparable à la sonde H₂DCFDA mais plus stable grâce à son groupement carboxy, perméable aux membranes et précurseur du DCF. Après avoir traversé les membranes, la sonde est clivée par les estérases cellulaires. Le DCF est polaire et imperméable aux membranes et va donc s'accumuler dans le compartiment intracellulaire et s'oxyder par l'H₂O₂ ou le peroxinitrite et ainsi devenir fluorescent. En fonction de la quantité de ROS présentes, la fluorescence pourra être mesurée par spectrofluorimétrie ou cytométrie en flux λ_{ex} 492-495 nm/λ_{em} 517-527 nm (Figure 31).

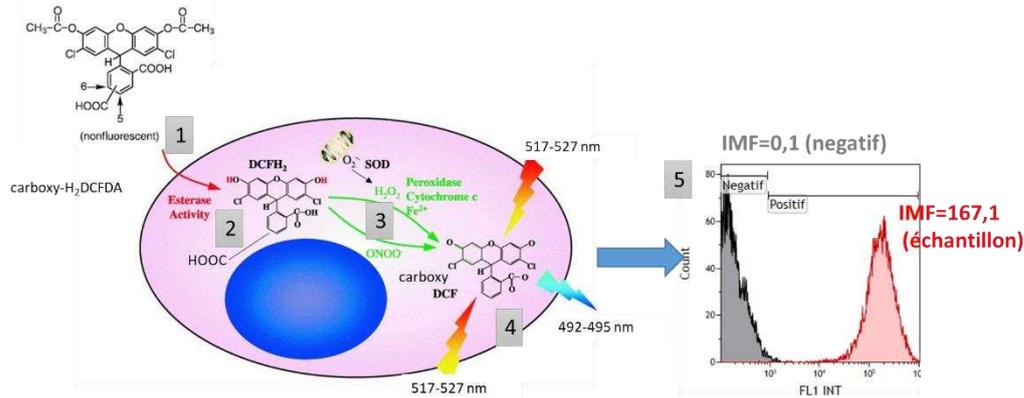


Figure 31 : Principe du dosage des ROS intracellulaires basé sur l'utilisation de la sonde CM-H₂DCFDA par cytométrie en flux d'après (Curtin et al., 2002)

La sonde CM-H₂DCFDA non fluorescente, perméable aux membranes et précurseur du DCF (fluorescent) : traverse la membrane (1), puis est clivée par les estérases intracellulaires (2). Le produit H₂DCFDA polaire et imperméable aux membranes, s'accumule dans l'espace intracellulaire avant d'être oxydé par les espèces réactives de l'oxygène (H₂O₂) (ROS/ERO) ou de l'azote (RNS/ERA) intracellulaires (3). La fluorescence proportionnelle à la quantité de ROS intracellulaire est ensuite détectée par cytométrie en flux (canal FL1 du Gallios, Beckman Coulter) (4) et l'intensité médiane de fluorescence pourra être calculée et représentée sur un histogramme monoparamétrique (5).

La sonde dihydroethidium (DHE), peut également pénétrer dans les cellules et émet une fluorescence bleue (λ_{ex} 518 nm/ λ_{em} 606) dans le cytosol après oxydation par l'anion superoxyde et permet de quantifier les ROS intracellulaires.

2. Méthode

Après trypsination, 200 000 à 500 000 cellules de CSM-GW amplifiées en N-LPH et H-LPH sont déposées dans des tubes de cytométrie (SARSTEDT, Réf 55526) et lavées avec 2 mL de milieu alphaMEM sans rouge de phénol (PAN biotech, réf P04-21051K) et sans LPH avant d'être centrifugées pendant 5 min à 300 g. Les cellules sont ensuite incubées avec 2 mL de sonde CM-H₂DCFDA (INVITROGEN, réf C2938) à 5 μ M ou DHE (INVITROGEN, réf D23107) à 10 μ M diluées dans du milieu alphaMEM sans rouge de phénol (PAN biotech, réf P04-21051K) et sans LPH pendant 30 minutes en normoxie ou en hypoxie. Les CSM-GW sont ensuite centrifugées à 300 g pendant 5 min. Après ajout de 2 mL de PBS (GIBCO, réf 14190), les cellules sont centrifugées et remises en suspension dans 200 μ L de PBS (GIBCO, réf 14190). Après ajout de 200 μ L de PBS (GIBCO, réf 14190) les cellules sont homogénéisées au vortex et passées au cytomètre en flux (Gallios, Beckman Coulter) dans l'heure (CM-H₂DCFDA : λ_{ex} 492–495 nm et λ_{em} 517–527 nm/DHE : λ_{ex} 518 nm et λ_{em} 606 nm). L'intensité médiane de fluorescence (IMF) proportionnelle à la quantité de ROS intracellulaires pour chaque sonde est obtenue grâce au logiciel Kaluza Analysis 2.1 (Beckman Coulter).

III. Tests fonctionnels

A. Migration

1. Principe

Les CSM amplifiées et trypsées sontensemencées avec du milieu sans sérum dans l'insert d'un transwell de chambre de Boyden contenant une membrane qui bloque la fluorescence. Les CSM capables de migrer en présence d'un chimio-attractant vont passer à travers les pores de la membrane

et peuvent être mises en évidence grâce à une molécule fluorescente. La migration pourra ainsi être mesurée par spectrofluorimétrie ou microscopie à fluorescence (Figure 32).

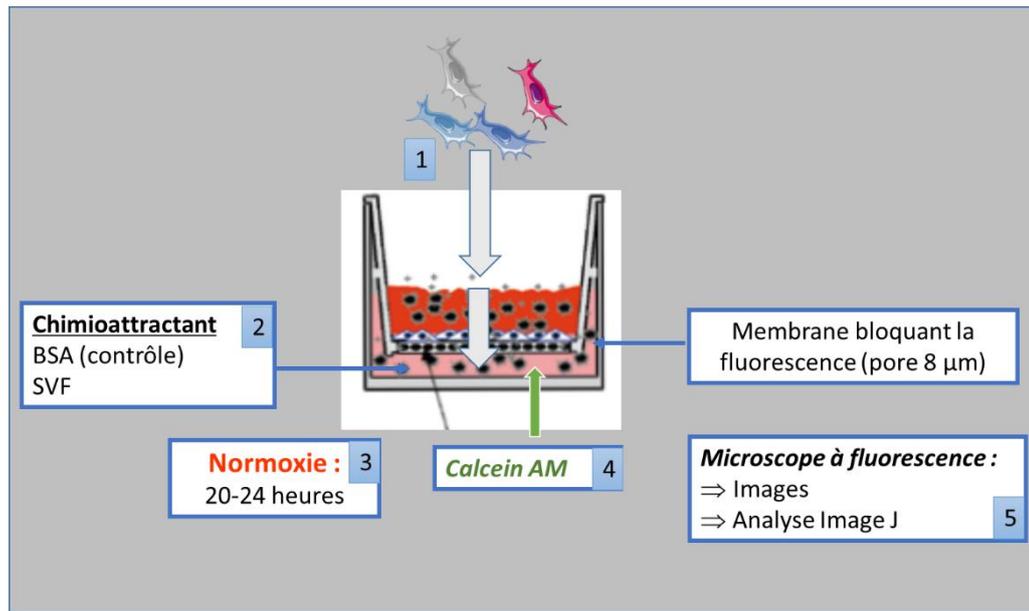


Figure 32 : Principe du test fonctionnel de migration

Les CSM amplifiées dans les différentes conditions de culture sont trypsinées etensemencées avec du milieu sans sérum dans un insert d'un « transwell » de chambre de boyden contenant une membrane qui bloque la fluorescence et qui contient des pores de 8 µm (1). En présence d'un chimio-attractant déposé de l'autre côté du transwell (2), de sérum de veau fœtal (SVF) ou de la sérum albumine bovine (BSA) en contrôle, les CSM vont pouvoir migrer à travers le transwell pendant une incubation de 20-24 heures (3). L'ajout d'une sonde fluorescente, la calcéine AM qui va interagir avec les estérases des cellules, permettra de repérer les cellules ayant migré (4). La prise d'images grâce à un microscope à fluorescence va permettre de quantifier la migration des CSM après mesure de la surface occupée par les CSM ayant migré à l'aide du logiciel Image J (5).

2. Méthode

Après trypsination, les CSM amplifiées dans les différentes conditions de culture sontensemencées avec du milieu alpha MEM sans rouge de phénol (PAN biotech, réf P04-21051K) sans LPH et sans SVF, dans l'insert de la chambre de boyden (DUTSHER, réf 353504-8 µm) à une densité comprise entre 20 000 et 100 000 cellules/transwell dans un volume de 200 µL. De l'autre côté de l'insert, sont déposés 700 µL de milieu alpha MEM sans rouge de phénol (PAN biotech, réf P04-21051K) contenant le chimio-attractant : « serum albumin bovine » (BSA) 0,25 % (p/V) ou SVF 30 % (V/V). Les cellules sont incubées en normoxie pendant 20 à 24 heures. Les milieux de culture contenus des 2 côtés de l'insert sont éliminés et les inserts sont incubés quelques minutes dans 700 µL de milieu alpha MEM sans rouge de phénol (PAN biotech, réf P04-21051K) afin d'éliminer les estérases. Les inserts sont ensuite incubés avec 200 µL de milieu alpha MEM sans rouge de phénol (PAN biotech, réf P04-21051K) contenant la calcéine (OZYME, réf BLE425201) pendant 30 minutes en normoxie. Les CSM ayant migré sont ensuite photographiées au microscope à fluorescence (LEICA, DMI3000B). Ainsi, la surface des cellules ayant migré (fluorescence verte) est analysée grâce au logiciel Image J (National Institute of Health, USA) afin de calculer le ratio de la surface des cellules ayant migré en présence de chimio-attractant SVF versus BSA pour chaque échantillon. Les résultats obtenus pour chaque stimulation sont ensuite normalisés par rapport à ceux obtenus pour la condition contrôle « non stimulée ».

B. Test de prolifération lymphocytaire

1. Principe

Les CSM sont trypsinées et co-cultivées avec des lymphocytes T extraits à partir de sang total de donneurs sains et activés par des anticorps anti CD3 et CD28 et marqués au préalable à l'aide d'un marqueur fluorescent. Grâce à leurs propriétés immunosuppressives, les CSM vont inhiber la prolifération des lymphocyte T et cette inhibition sera quantifiée par cytométrie en flux.

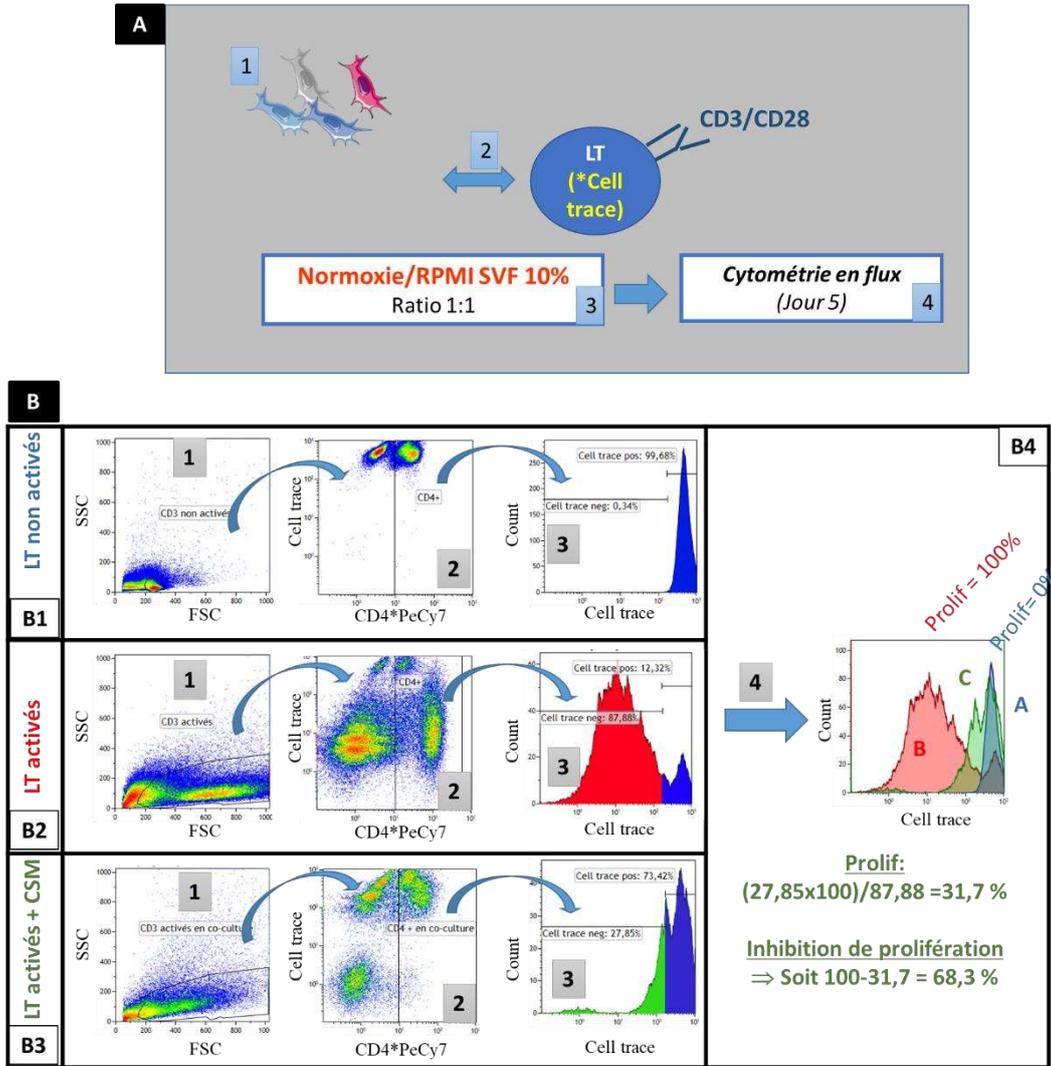


Figure 33 : Test fonctionnel d'activation lymphocytaire : Principe et stratégie de gating pour l'analyse des résultats

Principe du test (A) : Les CSM amplifiées dans les différentes conditions de culture sont trypsinées (1) et ensemencées en co-culture avec des lymphocytes T activés par des anticorps anti CD3 et CD28 comme en situation allogénique et marqués avec du cell trace au préalable (2) en normoxie dans du milieu RPMI supplémenté avec du SVF 10 % (3). Après 5 jours de co-culture, l'inhibition de la prolifération des Lymphocytes T activés marqués avec la sonde « Cell Proliferation Dye eFluor 450 » par les CSM est mesurée par cytométrie en flux (Gallios, Beckman Coulter) (4). **Stratégie de gating pour l'analyse des résultats par cytométrie en flux (B) :** Les lymphocytes T (LT) activés seuls (B1), les LT non activés seuls (B2) et les LT activés en co-culture avec des CSM (B3) sont sélectionnés via leurs paramètres taille (FSC)/structure (SSC) (1) afin d'analyser ces populations dans un histogramme bi-paramétrique CD4/Cell trace fluorescence (2). Un histogramme monoparamétrique du nombre de cellules (Counts) en fonction de la fluorescence (Cell trace) est réalisé à partir des cellules CD4+ (3). La superposition de ces 3 histogrammes (B4) permet d'apprécier l'inhibition de la prolifération par les CSM (4). Le seuil de prolifération des LT CD4+ est défini à partir de la fluorescence obtenue pour les LT CD4+ activés seuls et le pourcentage d'inhibition de la prolifération des LT CD4+ par les CSM est calculé à partir du pourcentage de prolifération des LT CD4+ activés en co-culture et des LT CD4+ seuls. CD=Cluster of Différentiation.

2. Méthode

a) Extraction des cellules mononuclées

Le sang total est déposé dans un tube Leucosep (GREINER, réf 227290) contenant environ 15 mL de milieu de séparation des lymphocytes (MSL) (EUROBIO, réf CMSMSL01-01) en conditions stériles. Après avoir complété le tube avec du PBS (GIBCO, réf 14190) à un volume de 45 mL, celui-ci est centrifugé à 1000 g pendant 10 minutes sans le frein. Le plasma se trouvant dans la partie supérieure est ensuite éliminé afin de récupérer l'anneau contenant les cellules mononuclées à l'aide d'une pipette. L'anneau est ensuite transféré dans un tube de 50 mL (SARSTEDT, réf 62.547.254) avec un volume final de 50 mL de PBS (GIBCO, réf 14190), homogénéisé et centrifugé à 600 g pendant 15 minutes. Le culot est ensuite lavé à 2 reprises avec 50 mL de PBS (GIBCO, réf 14190) (centrifugation à 300 g pendant 10 minutes). Le culot est ensuite repris dans 5 mL de PBS et les cellules mononuclées sont dénombrées avec une solution de Leucoplate (SOBIODA, Réf 3101.002) et repris dans 3,5 mL de PBS-BSA 0,5%-EDTA (2 mM) (BSA : Serum Albumin Bovine (EUROMEDEX, réf 04-100-812-E) (EDTA : SIGMA, Réf101581563).

b) Tri cellulaire des lymphocytes T CD3+

Les cellules mononuclées dénombrées précédemment sont ensuite centrifugées à 300 g pendant 5 minutes et le culot est repris avec 40 µL de PBS-BSA (0,5%-EDTA (2mM) pour 10 millions de cellules mononuclées, afin de réaliser un tri CD3 avec le kit Pan T cell isolation (Myltenyi, Réf 130-096-535) en conditions stériles selon les recommandations du fournisseur. 10 µL de « Pant T cell biotin AB cocktail » sont rajoutés aux 10 millions de cellules et incubées pendant 5 minutes à 4 °C (au réfrigérateur) et à l'obscurité. 30 µL PBS-BSA (0,5%-EDTA (2mM) et de 20 µL de « Pan T cell microbead cocktail » sont ensuite ajoutés aux 10 millions de cellules mononuclées avant d'être incubées 10 minutes à 4 °C (au réfrigérateur) et à l'obscurité. Les cellules sont ensuite déposées sur une colonne « LS » (Myltenyi, Réf 130-042-401) préalablement lavée avec 3,5 mL de PBS-BSA (0,5%-EDTA (2mM) après fixation sur un aimant (Myltenyi, Réf 130-042-302). Il s'agit d'une sélection négative car la colonne retient les cellules CD3 négatives et les Lymphocytes T CD3 positifs (LT CD3+) qui nous intéressent ne sont pas retenus et sont directement récupérés dans un tube de 15 mL (SARSTEDT, Réf 62.554.002) puis dénombrés.

c) Marquage des lymphocytes T CD3+ au cell trace

2 µL de sonde Cell Prolifération Dye eFluor 450 (INVITROGEN, Réf 65-0842-85) sont ajoutés à 998 µL de PBS (GIBCO, réf 14190), avant d'être mélangés avec 1 mL LT CD3+ (entre 1 et 10 millions de cellules) repris au préalable dans 1 mL de PBS (GIBCO, réf 14190). Après avoir bien homogénéisé les cellules par aspiration refoulement, celles-ci sont incubées 10 minutes en normoxie (37 °C). Après ajout de 10 mL de milieu complet RPMI-SVF 10 % (V/V), les cellules sont incubées 5 minutes au réfrigérateur à l'obscurité puis centrifugées pendant 5 minutes à 300 g. Le culot est ensuite repris avec 5 mL de milieu « co-culture » ([Tableau 17](#)) et centrifugé pendant 5 minutes à 300 g.

Tableau 17 : Composition du milieu complet dit de « co-culture »

Composants	Fournisseur	Référence	Milieu "Co-culture"
αMEM	GIBCO	BE12-169F	Oui
SVF	DUTSHER	S132507	10% (V/V)
Penicilline/ Streptomycine	GIBCO	15070-063	10 mU/mL

αMEM=alpha Milieu Essentiel Minimum ; SVF=Sérum de Veau Fœtal

d) Activation des lymphocytes T CD3

Les LT CD3+ sont activés avec des billes d'activation « Dynabeads™ Human T-Activator CD3/CD28 for T Cell Expansion and Activation » (GIBCO, Réf 11131D) selon les recommandations du fournisseur. Les billes (2 µL pour 80 000 LT à activer) sont lavées par aspiration/refoulement avec 1 mL de milieu complet RPMI-SVF 10 % (V/V) dans un tube de 15 mL (SARSTEDT, Réf 62.554.002). Le tube est ensuite fixé sur un aimant (INVITROGEN, Réf 12303D) pendant 1 minute afin de retenir les billes. Le milieu de culture est ensuite éliminé et les billes contenues dans le tube sont détachées de l'aimant afin de les mélanger avec la suspension de LT CD3+ à la concentration voulue (50 000 LT CD3+/100 µL de milieu complet RPMI-SVF 10 % (V/V)).

e) Co-culture

50 000 LT CD3+, contenus dans 100 µL milieu complet sont co-cultivés avec 50 000 CSM (ratio 1 :1), contenus dans 100 µL de milieu complet RPMI-SVF 10 % (V/V) dans un puits de plaques 96 puits à fond rond (THERMO SCIENTIFIC, Réf 163320). Un contrôle de LT CD3 activés (LT CD3A) et non activés (LT CD3NA) sans CSM est également réalisé. Les cellules sont ensuite maintenues en co-culture pendant 5 jours en normoxie.

f) Quantification de la prolifération des lymphocytes T activés

La plaque de co-culture est centrifugée pendant 5 minutes à 300 g afin de récupérer les surnageants de co-culture, qui seront conservés à – 80°C afin de quantifier par la suite certaines protéines par ELISA ou les métabolites par automate. Les puits sont ensuite lavés avec 200 µL de PBS et récupérés dans des tubes de cytométrie (SARSTEDT, réf 55-526) placés sur l'aimant afin de laver les cellules par aspiration refoulement et d'éliminer les billes d'activation. Les LT CD3+ contenus dans 2 puits sont ensuite incubés pendant 30 minutes à 4 °C avec 100 µL de mix d'anticorps dirigés contre les clusters de différenciation suivants : CD3, CD4, CD8 et CD95 ([Tableau 18](#)). Après ajout de 500 µL de PBS (GIBCO, Réf 14190), les cellules sont centrifugées à 300 g pendant 5 minutes et remises en suspension dans 200 µL de PBS (GIBCO, Réf 14190). Les tubes sont ensuite analysés au cytomètre en flux (Gallios, Beckman Coulter). Le seuil de prolifération des LT CD3 est défini à partir de la fluorescence obtenue pour les LT CD3 activés seuls et le pourcentage d'inhibition de la prolifération des LT par les CSM est calculé à partir du pourcentage de prolifération des LT CD3 activés en co-culture et des LT CD3 seuls ([Figure 33](#)).

Tableau 18 : Liste des anticorps utilisés pour révéler la co-culture

Nom	Fluorochrome	Fournisseur	Référence	Clone	Canal sur le Gallios	Volume (µL) pour 500 000 cellules
CD3	APC	BD Biosciences	555335	UCHT1	FL6	1
CD4	PeCy7	Sony	2387050	A151A1	FL4	1
CD8	PercpCy5.5	BD Biosciences	341050	SK1	FL4	1
CD95	FITC	BD Biosciences	555673	DX2	FL1	1
PD-1	BV510	Sony	2249660	EH12.2H7	FL10	1
TIM-3	PEdazzle594	Sony	2325170	F38-2E2	FL2	1

CD=cluster de différenciation ; **PD-1** = Programmed cell Death-1 ; **TIM-3** = Thrombolysis in Myocardial Infarction Grade 3 ; **APC** = Allophycocyanine ; **PeCy7** = tandem de R-phycoerythrine and Cyanine 7 ; **PercpCy5.5** = tandem de Percp and Cyanine 5.5 ; **FITC** = Isothiocyanate de fluorescéine ; **BV** = Brillant Violet ; **PE dazzle** = R-Phycoerythrine dazle

IV. Marquage immunofluorescent

A. Principe

Les protéines à identifier à la surface des CSM sont marquées par un anticorps spécifique après blocage et perméabilisation des cellules. Cet anticorps peut être directement couplé à un fluorochrome (immunofluorescence directe) ou marqué par un anticorps secondaire (immunofluorescence indirecte) lui-même couplé à un fluorochrome afin d'amplifier le signal. Suite à l'excitation du fluorochrome à une longueur d'onde spécifique celui-ci va émettre de la fluorescence à une longueur d'onde d'émission supérieure à celle de l'excitation. Certains marqueurs tels que les protéines intracellulaires, le DAPI (noyau) ou la phalloïdine couplée à l'Alexa 488 (cytosquelette d'actine) sont également utilisés après fixation et perméabilisation. Un microscope à épifluorescence équipé de filtres spécifiques de chaque fluorochrome et d'une caméra est ensuite utilisé pour visualiser les marquages et photographier les cellules.

B. Méthode

Les CSM-MO et CSM-GW sontensemencées à 1000 cellules/cm² et amplifiées jusqu'à atteindre 70 % de confluence sur des lamelles en verre de 14 mm de diamètre (Réf 0111540, Marienfield GmbH Co.KG) dans des plaques 24 puits (CORNING, Réf 3524) avant d'être fixées par de la paraformaldéhyde 2% (Sigma, Réf P6148-500G) dans du PBS (GIBCO, Réf 14190) pendant 10 min à TA. Après avoir été lavées 3 fois par 500 µL/puits de PBS (GIBCO, Réf 14190), les cellules sont perméabilisées pendant 45 min à TA par 500 µL/puits de PBS (GIBCO, Réf 14190)-Triton 0,5% (SIGMA, Réf T9284-100ML), puis bloquées pendant 20 min à TA par 500 µL/puits de PBS (GIBCO, Réf 14190)-BSA (SIGMA, Réf A9647). Les cellules sont ensuite lavées 3 fois par 500 µL/puits de PBS (GIBCO, Réf 14190) avant d'être incubées avec 100 µL d'anticorps primaire (Superoxyde dismutase 2(SOD2), Cytochrome C, H2AX, Human Inducible factor-1 alpha (HIF-1 α , tubuline) ou de marqueurs directement couplés à un fluorochrome (Phalloïdine) ([Tableau 19](#)) pendant 45 min à TA (ou over night (O/N) à 4 °C) à l'obscurité dilué dans du PBS-BSA (0,5%)-Triton (0,1%). Les cellules sont ensuite lavées 3 fois par 500 µL/puits de PBS (GIBCO, Réf 14190). Les cellules nécessitant un marquage par un anticorps secondaire sont ensuite incubées avec 100 µL d'anticorps secondaire couplé à un fluorochrome pendant 45 min à TA à l'obscurité dilué dans du PBS-BSA (0,5%)-Triton (0,1%). Puis, les cellules sont lavées 3 fois avec 500 µL/puits de PBS (GIBCO, Réf 14190) et incubées avec 50 µL de DAPI à 0,1 µg/mL (SIGMA, Réf D9542-5MG). Les cellules subissent 3 derniers lavages à raison de 500 µL/puits de PBS avant que les lamelles soient montées sur des lames de verre (MARENFIELD, Réf 0703010) à l'aide du milieu de montage (DAKO, Réf S3023). Les lames sèches et scellées par du vernis sont ensuite observées au microscope à épifluorescence Leica DMI 3000B grâce à deux filtres spécifiques (Filtre DAPI excitation à 372 nm et émission à 456 nm et Filtre Alexa*488-excitation 488 et émission 509 nm) aux objectifs x10 et x40 (à immersion).

Tableau 19 : Liste des anticorps et marqueurs utilisés pour les marquages immunofluorescents

Type de marqueur	Anticorps/marqueurs de viabilité	Fournisseur	Référence	Espèce hôte	Dilution	Incubation
Anticorps primaires	Anticorps polyclonal anti-SOD2/MnSOD (Superoxydedismutase 2)	Abcam	ab13533	Lapin	1/150	45 min à TA
	Anticorps monoclonal anti-cytochrome C	BD Pharmingen	556432	Souris	1/250	45 min à TA
	Anticorps monoclonal anti-H2AX (pS139)	BD Pharmingen	560443	Souris	1/100	45 min à TA
	Anticorps monoclonal anti-HIF-1 alpha	Abcam	ab16066	Souris	1/10	O/N 4°C
	Anticorps monoclonal Anti-β-Tubuline	Sigma	T5201	Souris	10-20 µg/mL	45 min à TA
Anticorps secondaires	IgG (H+L) Cross-Adsorbed Goat anti-Mouse (chèvre anti souris), Alexa Fluor® 555	Invitrogen	A21422	chèvre	1/100	45 min à TA
	IgG (H+L) Highly Cross-Adsorbed Goat anti-Rabbit (chèvre anti lapin), Alexa Fluor® 568	Invitrogen	A11036	chèvre	1/100	45 min à TA
Autres marqueurs	Dapi	Sigma	D9542	N.C.	1/10000	30 min à TA
	Phalloïdine couplée à l'alexa Fluo 488	Invitrogen	A12379	N.C.	1/50	45 min à TA

min= minute ; N.C.=non concerné ; O/N= over night ; TA=Température ambiante

V. Dosage par spectrophotométrie ou spectrofluorimétrie

A. ELISA

1. Principe

a) Test ELISA en sandwich

Le principe de l'ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) en sandwich consiste à piéger un antigène à doser, entre un « anticorps de capture » et un « anticorps de détection » spécifiques de l'antigène d'intérêt. L'anticorps de détection, souvent biotinylé, peut fixer un complexe enzymatique tel que la streptavidine-HRP (peroxydase de Raifort) et donner une couleur en présence d'un substrat chromogène (TMB : tetramethylbenzidine) détectable par spectrophotométrie. Dans cas, le signal augmente quand la concentration en antigène augmente.

b) Test ELISA en compétition

Le principe de l'ELISA en compétition consiste à lier un antigène de référence au fond du puits. L'échantillon et l'anticorps spécifique couplé à la peroxydase de raifort sont ajoutés au puits. Si l'antigène à doser est présent dans l'échantillon, celui entre en compétition avec l'antigène de référence. En présence d'un substrat chromogène (TMB : tetramethylbenzidine), le puits va changer de couleur et le signal sera détectable par spectrophotométrie. Dans cas, le signal diminue quand la concentration en antigène augmente.

2. Test ELISA pour FAS ligand

a) Méthode

Ce dosage est réalisé à l'aide du kit « Human Fas Ligand/TNFSF6 Immunoassay » (R&D SYSTEM, réf DFLOOB) » selon les recommandations du fournisseur. Après avoir préparé la gamme de FasL humain (de 16 à 10 000 pg/mL) et déposé 100 µL/puits de solution « RD1S », 50 µL/puits d'échantillons (Gamme, Sample et Contrôle) sont déposés. La plaque est mélangée, puis recouverte d'un film adhésif et incubée 2 heures à TA. Après 4 lavages avec 400 µL de « Wash buffer 1X », les puits sont incubés avec 200 µL de conjugué « human Fas ligand conjugate ». Puis, la plaque est agitée, recouverte d'un film adhésif et incubée 2 heures à TA. Après 4 lavages avec 400 µL de « Wash buffer 1X », les puits sont incubés avec 200 µL de solution substrat (Color Reagent A : B (1 :1) V/V) et la plaque est incubée 30 minutes à TA. La plaque est mélangée après ajout de 50 µL/puits de solution stop et l'absorbance est mesurée à 450 nm et à 570 nm (correction) au spectrophotomètre Varioskan Flash (THERMO SCIENTIFIC).

b) Analyse des données

Après avoir tracé la courbe étalon de l'absorbance corrigée (450 nm-570 nm) (logarithmique en ordonnée) en fonction de la concentration en FasL en pg/mL (échelle logarithmique en abscisse), il est possible de calculer la concentration des échantillons à partir de l'équation de la courbe.

3. Test ELISA pour IDO et TGF-β1

a) Méthode

Ce dosage est réalisé à l'aide des kits « Human Indoleamine 2,3-dioxygenase/IDO Duoset ELISA » (R&D SYSTEM, réf DY6030-05) et « Human TGF-β1 Duoset ELISA » (R&D SYSTEM, réf DY240-05) selon les recommandations du fournisseur. Pour le coating, 100 µL/puits de capture « human capture antibody » à 2 µg/mL dans du PBS sont déposés et la plaque recouverte d'un film plastique est incubée O/N à TA. Après 4 lavages avec 400 µL de « Wash buffer », les puits sont bloqués avec 300 µL de « Reagent Diluent » (IDO) ou « Block Buffer » (TGF-β1) pendant 1 heure à TA. Après 4 lavages avec 400 µL de « Wash buffer », les puits sont incubés avec les 100 µL d'échantillons (échantillons, gamme) pendant 2 heures à TA. Les gammes pour IDO (de 0,469 à 30 ng/mL) et pour TGF-β1 (de 31,3 à 2000 pg/mL) sont préparées au préalable avec du reagent diluent. Après 4 lavages avec 400 µL de « Wash buffer », les puits sont incubés avec les 100 µL de « detection antibody » à pendant 2 heures à TA. Après 4 lavages avec 400 µL de « Wash buffer », les puits sont incubés avec les 100 µL de solution de streptavidine-HRP (dilué 40 fois) pendant 20 minutes à TA. La plaque est agitée après ajout de 50 µL/puits de solution stop et l'absorbance est mesurée à 450 nm et à 570 nm (correction) au spectrophotomètre Varioskan Flash (THERMO SCIENTIFIC).

b) Analyse des données

Après avoir tracé la courbe étalon de l'absorbance corrigée (450 nm-570 nm) (échelle logarithmique en ordonnées) en fonction de la concentration des différents points de la gamme (échelle logarithmique en abscisses), il est possible de calculer la concentration des échantillons à partir de l'équation de la courbe.

4. Test ELISA pour la kynurénine

a) Principe

Ce dosage est réalisé par un test ELISA en compétition. La kynurénine, produit de la dégradation du tryptophane impliquant l'enzyme IDO, est quantifiée après acétylation. Des antigènes sont liés à la phase solide de la microplaque « microtiter » dans laquelle sont ajoutés les échantillons (standards, contrôles et samples) après acétylation et un antisérum kynurénine. Les antigènes liés à la phase solide entrent en compétition avec les antigènes des échantillons pour un nombre fixe de sites de liaison aux anticorps contenus dans l'antisérum.

A l'équilibre, les antigènes libres et les complexes antigènes-anticorps libres sont éliminés par lavage. L'anticorps lié à la phase solide est détecté par un anticorps de lapin IgG*HRP en présence de son substrat le TMB. La coloration développée est mesurée par spectrophotométrie à 450 nm et les échantillons sont quantifiés grâce à une gamme réalisée en parallèle.

b) Méthode

Ce dosage est réalisé à l'aide du kit « Kynurenine ELISA KIT » (ImmuSmol, réf BA E-2200) selon les recommandations du fournisseur.

iii. **Acétylation**

Après avoir préparé la gamme de kynurénine (de 0 à 10 000 ng/mL), 10 µL/puits d'échantillons (Gamme, Sample et Contrôle) sont déposés dans la plaque « microtitrer », 250 µL de « acylation buffer », puis 25 µL de « acylation reagent » sont ajoutés. Après avoir agité la plaque rapidement, celle-ci est couverte d'un film plastique et incubée 90 minutes à 37 °C.

iv. **Dosage en plaque**

20 µL d'échantillons après acétylation sont déposés dans chaque puits de plaque « Kynurenine microtiters strips » et 50 µL de « kynurenine antiserum » sont ajoutés. La plaque est agitée puis recouverte d'un film adhésif et incubée 15 à 20 heures O/N à 4°C. Après 4 lavages avec 300 µL de « Wash buffer », les puits sont incubés avec 100 µL de congulé « enzyme conjugate » pendant 30 minutes à TA sous agitation. Les puits sont à nouveau lavés par 300 µL de « Wash buffer » et incubés avec 100 µL de substrat « substrate » pendant 20 à 30 minutes sous agitation à l'abri de la lumière. La réaction est ensuite arrêtée par 100 µL de « stop solution ». Après avoir agité la plaque, l'absorbance est mesurée à 450 nm et à 620 nm (correction) au spectrophotomètre Varioskan Flash (THERMO SCIENTIFIC).

c) **Analyse des données**

Après avoir tracé la courbe étalon de l'absorbance corrigée (450 nm-620 nm) (linéaire en ordonnées) en fonction de la concentration en kynurénine en ng/mL (logarithmique en abscisses), il est possible de calculer la concentration des échantillons à partir de l'équation de la courbe. Le test ELISA étant un test compétitif, l'absorbance des échantillons diminue quand la concentration des échantillons augmente. Après 4 lavages avec 340 µL de « Wash buffer », les puits sont incubés avec 200 µL de solution substrat

5. **Test ELISA pour PGE2**

a) **Méthode**

Ce dosage est réalisé à l'aide du kit « Prostaglandin E2 Assay (R&D SYSTEM, réf KGE004b) » (ImmuSmol, réf BA E-2200) selon les recommandations du fournisseur. Après avoir préparé la gamme de PGE2 (de 39 à 25 000 pg/mL), 150 µL/puits d'échantillons (Gamme, Sample et Contrôle) sont déposés et 50 µL d'anticorps primaire sont rajoutés sauf pour le contrôle NSB. Pour le contrôle de liaison non spécifique « non-specific binding (NSB) 200 µL de « calibrator diluent RD5-56 » sont ajoutés. La plaque est agitée puis recouverte d'un film adhésif et incubée 1 heure à TA sous agitation orbitale. 50 µL/puits de PGE2 conjugué sont ajoutés (sauf pour le contrôle NSB) et la plaque est incubée 2 heures à TA sous agitation. Après 4 lavages avec 400 µL de « Wash buffer 1X », les puits sont incubés avec 200 µL de solution substrat (Color Reagent A : B (1 :1) V/V) et la plaque est incubée 30 minutes à TA. La plaque est mélangée après ajout de 100 µL/puits de solution stop et l'absorbance est mesurée à 450 nm et à 570 nm (correction) au spectrophotomètre Varioskan Flash (THERMO SCIENTIFIC).

b) **Analyse des données**

Après avoir tracé la courbe étalon de l'absorbance corrigée (450 nm-570 nm) (linéaire en ordonnées) en fonction de la concentration en PGE2 en pg/mL (logarithmique en abscisses), il est possible de calculer la concentration des échantillons à partir de l'équation de la courbe. Pour ce test compétitif, l'absorbance des échantillons diminue quand la concentration des échantillons augmente.

C. Dosage du GSH et GSSG

1. Principe

Le kit utilisé permet de doser le glutathion réduit (GSH) et le glutathion oxydé (GSSG). Le rapport de ces 2 molécules permettra de définir le statut redox de la cellule. Le test est réalisé en utilisant un fluorochrome (Thiol Green Indicator) qui devient hautement fluorescent après s'être lié au GSH. Les échantillons lysés sont déprotéinés, car les protéines peuvent réagir avec le Thiol Green Indicator. Le GSSG doit donc être réduit *via* une réaction enzymatique. Le dosage est réalisé en établissant 2 courbes étalons de GSH (panel A) et GSSG (en μM) (panel B) en fonction de la fluorescence (Ex/Em 490nm/520nm). Pour la gamme GSSG, une sonde GSSG est incorporée dans une solution de Thiol Green Indicator et permet de quantifier le glutathion total (oxydé et réduit) présent dans le puits. La concentration en GSSG est ensuite calculée en soustrayant la concentration en GSH obtenue avec la gamme GSH.

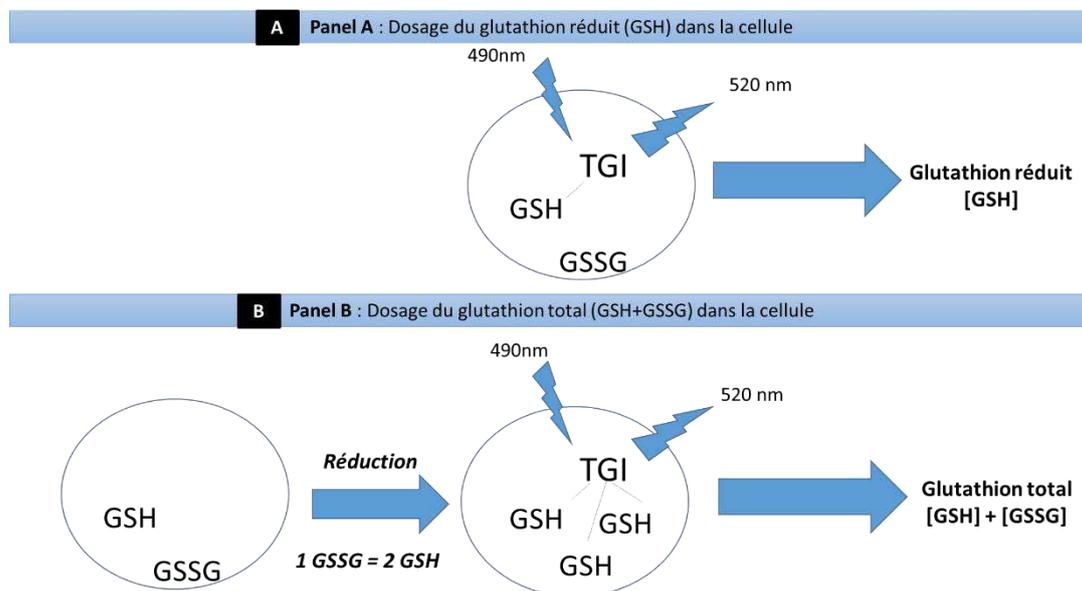


Figure 34 : Schéma de principe du dosage du glutathion réduit (GSH) et du glutathion oxydé (GSSG)

Le fluorochrome TGI (thiol green indicator) (Ex/Em 490nm/520nm) devient hautement fluorescent après liaison au glutathion réduit (GSH) (A). Le glutathion oxydé (GSSG) doit être réduit par réaction enzymatique en GSH après ajout de sonde GSSG et ainsi le glutathion total (GSH+GSSG) peut être quantifié (B). La concentration en GSSG est déduite après soustraction de la concentration en GSH à la concentration en glutathion total (GSH+GSSG).

2. Méthode

a) Lyse cellulaire

Après trypsination et dénombrement, les CSM à passage précoce sont lavées avec du PBS (GIBCO, Réf 14190) à 300 g pendant 5 minutes. Le culot est repris dans 100 μL de PBS (GIBCO, Réf 14190)-0,5% IGEPAL CA-630 (SIGMA, réf I8896) sur glace. Après homogénéisation par aspiration/refoulement, les CSM sont centrifugées 15 minutes à 15 000g à 4 °C. Le surnageant maintenu sur glace est récupéré pour déprotéination.

b) Déprotéination

Les 100 μL de surnageant de lysat cellulaire sont déposés sur une colonne de déprotéination Vivaspin 2 (GE Healthcare, réf 28-9322-47) dans un volume de 1 mL de PBS (GIBCO, Réf 14190) puis

centrifugés à 3000 g pendant 5 minutes à 4°C. L'éluât est récupéré et peut être dosé ou conservé à -80°C pendant 1 mois.

c) Dosage en plaque

Le dosage est réalisé grâce au kit commercial « GSH/GSSG Ratio Detection Assay kit (Fluorimetric-Green) (ABCAM, réf ab138881) selon les recommandations du fournisseur. Après avoir préparé les gammes GSH (de 0 à 10 µM) (panel A) et GSSG (de 0 à 5 µM) (panel B) dans le tampon « Assay buffer » en parallèle, 50 µL d'échantillon (standard et échantillons à doser) sont déposées en duplicat dans 2 plaques 96 puits noires à fond transparent (BD biosciences, réf 353293). Dans la première plaque, afin de doser le glutathion réduit (GSH) 50 µL de solution **GAM** (GSH Assay mixture : 50 µL de Thiol Green Indicator (TGI) stock 100X pour 5 mL d'assay buffer) sont ajoutés. Dans la seconde plaque, afin de doser le glutathion total (GSH+GSSG) 50 µL de **TGAM** (Total glutathione Assay mixture : 100 µL de sonde GSSG 25X dans 2,5 mL de GAM) sont ajoutés par puits. Après 30 minutes d'incubation à TA dans l'obscurité, la fluorescence est mesurée au spectrofluorimètre Varioskan Flash (THERMO SCIENTIFIC) ($\lambda_{ex} = 490 \text{ nm}$ et $\lambda_{em}=520\text{nm}$).

d) Analyse des données

La moyenne des intensités de fluorescence obtenues pour les blancs a été soustraite à celle obtenue pour les différents échantillons ainsi que pour les points de gamme. Une courbe étalon de l'intensité de fluorescence en fonction de la concentration en glutathion réduit (GSH (Panel A) et en GSH+GSSG (Panel B) en fonction a été tracée selon l'équation linéaire suivante :

$$\text{Log } y = A + B \times \text{Log } x$$

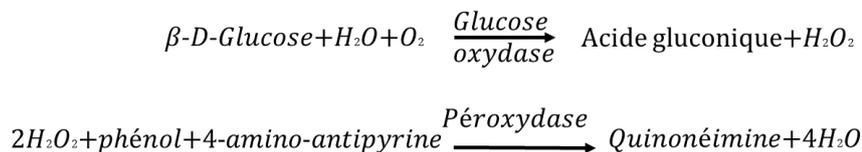
Le panel A permet de déterminer la concentration en GSH (glutathion réduit) de chaque échantillon. Cette concentration sera soustraite à la concentration totale en glutathion (réduit + oxydé) obtenue dans le panel B (GSH+GSSG). Le ratio GSSG/GSH doit permettre de déterminer le statut redox des CSM.

D. Dosage du lactate et du glucose

1. Principe

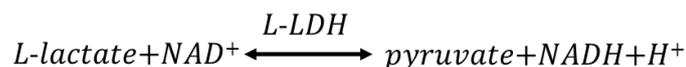
Les dosages du glucose et du lactate ont été réalisés à l'aide d'un analyseur photométrique totalement automatisé pour la clinique et qui utilise des méthodes colorimétriques en point final et en cinétique pour exécuter simultanément différentes analyses de métabolites avec un échantillon unique à partir de réactions enzymatiques.

a) Dosage du glucose

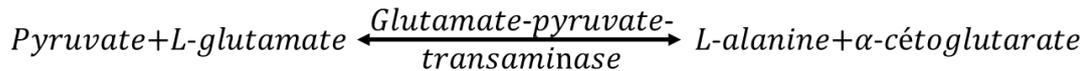


La quinonéimine est détectée par spectrophotométrie à 510 et 620 nm après 10 minutes d'incubation.

b) Dosage du lactate



L'équilibre de la réaction est en faveur du lactate. L'élimination du pyruvate du milieu réactionnel déplace l'équilibre de la réaction dans le sens de la formation de pyruvate.



La formation du NADH est mesurée par spectrophotométrie à 340 nm après 10 min d'incubation.

2. Méthode

Le dosage du glucose et du lactate a été réalisé ultérieurement sur les surnageants de culture récupérés à la fin de chaque expérimentation et conservés à -20°C à l'aide d'un analyseur automatique (Thermo Scientific™ Gallery™, France) au Laboratoire de Réactions et Génie des Procédés (LRGP) à Vandœuvre-Lès-Nancy à l'aide du kit GOP-POD (THERMOFISHER, réf 981780) pour le glucose et du kit L-Lactic Acid (THERMOFISHER, réf 984308) pour le lactate. Pour les 2 dosages, 300 µL de surnageants de culture ont été déposés dans des cupules dosées ensuite par l'automate. Les résultats ont été normalisés par rapport au nombre total de cellules et sont présentés sous forme de quantité de glucose consommé et de lactate produits par cellule.

VI. **Biologie moléculaire**

A. Extraction des ARN totaux

1. Principe

Le principe de cette expérience consiste à extraire les ARN totaux à l'aide du QIAzol une solution monophasique de phénol et d'isothiocyanate de guanidine permettant d'isoler séparément les ARN totaux, l'ADN génomique et les protéines. A partir des ARN extraits des analyses du transcriptome complet et du miRNome ont été réalisées par emploi de puces GeneChip™ Human Exon 1.0 ST Array et GeneChip™ miRNA 3.0 Array (Affymetrix), respectivement. L'étude de l'expression de certains gènes par « Polymerase chain reaction » quantitative (PCRq) en temps réel grâce à la technologie SYBR® Green a été réalisée à partir d'une rétrotranscription. Une rétrotranscription avec un oligonucléotide tige boucle spécifique a été réalisée avant la PCR avec la technologie Taqman pour l'étude de l'expression des miARN.

2. Méthode

a) Récupération des cellules

Les cellules en culture sont lavées deux fois par 5 mL de PBS (GIBCO, Réf 14190). 750 µL de TRIzol (Invitrogen, Réf 15596-018) sont ajoutés et les cellules sont décrochées de la boîte de culture de 75 cm² (CORNING, T75) à l'aide d'un grattoir (CORNING, Réf 3008) pour être récupérées dans des microtubes RNase-DNase free. Les cellules sont ensuite vortexées pendant 30 secondes et incubées 5 min à TA avant d'être congelées à -80 °C jusqu'au jour de l'extraction d'ARN.

b) Extraction des ARN totaux

Les cellules congelées dans le TRIzol sont décongelées à TA et incubées pendant 10 min à TA. 200 µL de chloroforme (VWR, Réf 22711.290) sont ajoutés pour 1000 µL de Trizol (Invitrogen, Réf 15596-018) initial. Le tube est ensuite vortexé 30 secondes, incubé 2 à 15 min à TA et centrifugé à 12000 g pendant 15 min à 4 °C. La phase aqueuse (phase supérieure) contenant l'ARN est transférée dans un microtube RNase-DNase free, tandis que l'interphase et la phase organique, contenant respectivement l'ADN et les protéines, sont éliminées. Un volume égal de chloroforme (VWR, Réf 22711.290) est ajouté

à la phase aqueuse. Le tube est ensuite vortexé 30 secondes puis centrifugé à 12000g pendant 15 min à 4°C. La phase aqueuse (phase supérieure) contenant l'ARN est transférée dans un microtube RNase-DNase free et 1 µL de glycogène (AMBION, Réf AM9515) est ajouté. L'ajout de 500 µL d'isopropanol (Carlo Erba, Réf 415213) pour 1000 µL de TRIzol initial, le vortex et la centrifugation à 12000 g pendant 15 min à 4 °C vont permettre de précipiter l'ARN de la phase aqueuse. Le surnageant est ensuite éliminé et le culot lavé par de l'éthanol 75 % préparé à partir d'éthanol 96° (VWR, Réf 20825.290) (1 mL pour 1 mL de TRIzol initial). Le tube est ensuite vortexé et centrifugé à 7500 g pendant 10 min à 4 °C. Le surnageant est éliminé et le culot est séché au bain à sec (Thermomixer comfort, Eppendorf) pendant 5 min à 30 °C avant d'être remis en solution dans 15 à 30 µL d'eau RNase-DNase free.

B. Quantification et estimation de la pureté des ARN

1 µL de chaque échantillon est déposé sur le spectrophotomètre nanodrop 1000 (LABTECH, France) et un spectre d'absorbance de 220 à 350 nm est réalisé. L'absorbance à 230 nm donne des informations concernant la présence de contaminants (tels que les sels d'isothiocyanate de guanidine). L'absorbance à 260 nm permet d'estimer la quantité d'acides nucléiques. L'absorbance à 270 nm donne des informations concernant les contaminations par les phénols et celle à 280 nm permet d'estimer la contamination protéique. Le ratio 260/280 doit être proche de 2 et le ratio 260/230 doit être compris entre 1,8 et 2,2 pour un échantillon d'ARN pur. En cas de contamination par des phénols, il est nécessaire de recommencer l'extraction à partir de l'étape où le chloroforme est ajouté. En cas de contamination par des sels, une étape de précipitation de l'ARN à l'éthanol est nécessaire.

C. Précipitation de l'ARN par de l'éthanol

Le volume de l'échantillon d'ARN à précipiter est complété à 200 µL avec de l'eau RNase DNase free. 1 µL de GlycoBlue 15mg/ml (AMBION, Réf AM9515), 20 µL d'acétate de sodium 3M pH 4,8-5,2 (Merck, Réf TA803067) et 550 µL d'éthanol 96° (VWR, Réf 20825.290) sont ajoutés à l'échantillon, qui est ensuite vortexé et placé toute la nuit à – 80 °C. Le lendemain, l'échantillon est centrifugé à 16000 g pendant 30 min à 4 °C et le surnageant est éliminé. Après avoir rajouté 500 µL d'éthanol 70-75 % au culot, celui-ci est vortexé 30 secondes puis centrifugé pendant 10 min à 16000 g à 4°C. Le surnageant est éliminé et le culot est repris dans de l'eau RNase-DNase free après avoir été séché. La quantité et la pureté de l'échantillon sont ensuite contrôlées au nanodrop (*cf ci-dessous*) avant d'estimer la qualité des ARN.

D. Estimation de la qualité des ARN

La qualité des ARN est estimée grâce au kit Agilent RNA 6000 Pico Kit (AGILENT TECHNOLOGIES, Réf 5067-1513). 1 µL de sonde fluorescente est ajouté à 65 µL de gel et centrifugé 10 min à 18000 g à TA. Le gel est ensuite chauffé 2 min à 75 °C pour éliminer les structures avant d'être coulé dans la puce (9 µL par point G). L'échantillon (5 µL de RNA 6000 Pico Marker + 1 µL d'ARN à 5 ng/µL) est déposé dans le puits de la puce qui migrera (*électrophorèse capillaire*) et sera ensuite lue par l'appareil Agilent 2100 Bioanalyzer (AGILENT TECHNOLOGIES). Sur la base du profil de migration des ARN ribosomiques 18S et 28S et de la présence ou non de produits de dégradation le logiciel calcule un indicateur de qualité appelé RIN (RNA integrated number) dont les valeurs sont comprises entre 1 et 10. Un échantillon d'ARN dont le RIN sera compris entre 8 et 10 sera considéré comme étant de bonne qualité et pourra être utilisé pour les analyses transcriptomiques (*Figure 35*).

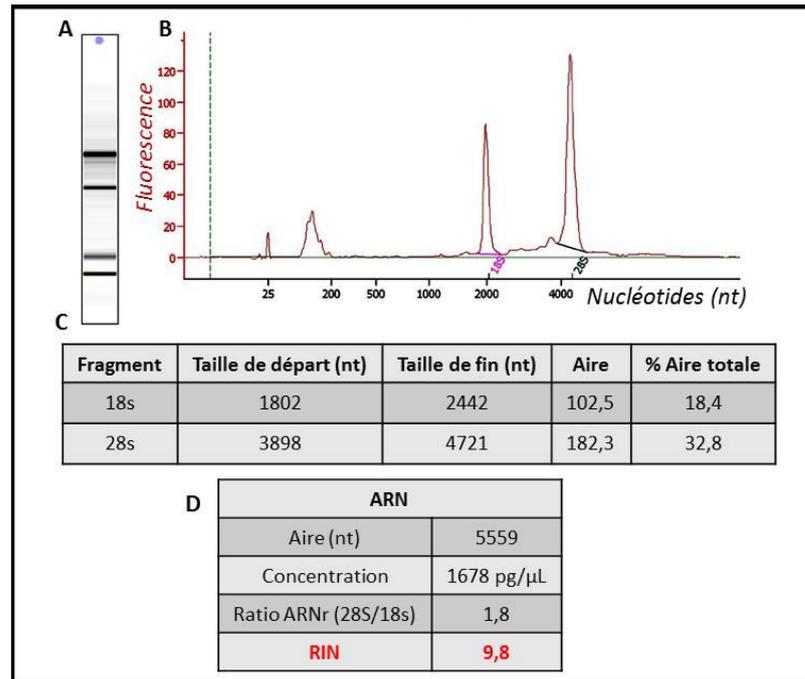


Figure 35 : Résultats d'analyse d'échantillon d'ARN par l'appareil Agilent 2100 Bioanalyzer (AGILENT TECHNOLOGIES)

1 μL d'ARN à 2 ng/μL a été déposé sur une puce « pico » et soumis à électrophorèse capillaire en parallèle d'un marqueur de taille. Les différentes bandes fluorescentes sont détectées par l'appareil (A) qui trace le profil de migration électrophorétique : fluorescence = f (nucléotides) (B) et donne des informations concernant les bandes d'ARN ribosomiaux (ARNr) 28s et 18s (C) ainsi que le RIN (D) représentatif de la qualité des ARN.

E. Traitement des ARN totaux à la DNase

Un traitement à la DNase est réalisé afin d'éliminer les traces d'ADN génomique au sein des ARN extraits selon les recommandations du fournisseur. Pour cela 1 μg d'ARN sont traités par 1 μL de RNase RQ1 à 1 unité/μL (PROMEGA, Réf M6101) et 1 μL de « RQ1 Rnase-Free Dnase1000U » et 1 μL de « 10X Reaction Buffer » contenant les ions Ca²⁺, Mg²⁺ ou Mn²⁺ (PROMEGA, Réf M198A) dans un volume final de 10 μL avant d'être incubés à 37 °C pendant 30 minutes. La réaction est ensuite arrêtée par 1 μL de « Stop solution » (PROMEGA, Réf M199A) et le mélange réactionnel est incubé 10 minutes à 65°C.

F. Analyse sur puces

Les ARN totaux ont été envoyés au « Laboratoire Institute of Health » LIH (Luxembourg) pour analyser l'expression des microARN sur puces GeneChip™ miRNA 3.0 Array (Affimetrix) (500 ng) et l'expression des gènes sur puces GeneChip™ Human Exon 1.0 ST Array (Affimetrix) (100 ng). La préparation des ARN totaux pour l'hybridation sur les puces GeneChip™ miRNA 3.0 Array (Affimetrix) a été réalisée selon le protocole préconisé par le fabricant grâce aux kits « FlashTag™ HSR Biotin RNA Labeling Assay », GeneTitan Hybridation, Wash and Stain kit for miRNA Array Plates (P/N 902276) et GeneChip Hybridization Control kit (P/N900457). La préparation des ARN totaux pour l'hybridation sur les puces GeneChip™ Human Exon 1.0 ST Array (Affimetrix) a été réalisée selon le protocole « Ambion Whole Transcript expression kit for Affymetrix GeneChip protocole ». L'analyse des résultats a été réalisée par l'équipe de bioinformaticiens du LIH.

G. RT-qPCR QUANTITATIVE SYBR GREEN

1. Principe

Dans la RT-PCR quantitative en temps réel (RT-qPCR), l'ARNm est dans une 1^{ère} étape rétrotranscrit en ADNc (Acide désoxyribonucléique complémentaire) qui sert ensuite de matrice pour l'amplification d'un fragment spécifique par réaction de polymérisation en chaîne en présence d'un couple d'amorces spécifique et d'un mélange réactionnel (iTaQ™ Universal SYBR® Green Supermix (BIORAD, Réf 172-5124)) composé de : l'enzyme iTaq™ DNA polymerase, des dNTPs, de la fluorescéine (20 nM), SYBR® Green et une solution tampon (MgCl₂ 6mM, KCl 100 mM, Tris-HCl 40 mM pH 8,4). La particularité de cette PCR repose sur l'utilisation d'un intercalant de l'ADN appelé SYBR green. Ce fluorophore n'émet de la fluorescence que lorsque qu'il est intercalé dans de l'ADN double brin et disparaît quand il se trouve sous forme simple brin. L'appareil de PCR mesure la fluorescence émise par le SYBR green et permet donc de suivre l'évolution de la quantité d'ADNc amplifié en temps réel en effectuant des relevés de fluorescence à la fin de chaque étape d'élongation. Cette évolution de la fluorescence est représentée par une sigmoïde dont la phase exponentielle délimitée par un seuil (threshold) représente la phase pendant laquelle la quantité d'amplicons est directement proportionnelle à la fluorescence.

2. Retro-transcription

L'étape de rétrotranscription est faite avec le kit Iscript Reverse Transcription Supermix (BIORAD, Réf 170-8841) selon les recommandations du fournisseur. Pour obtenir de l'ADNc, 16 µL de la solution d'ARN (pour une quantité allant de 100 fg à 1 µg d'ARN) sont homogénéisés avec 4 µL de la solution de rétrotranscription (5x iscript reverse transcription supermix). Ces étapes se réalisent à +4°C pour ralentir la dégradation des ARN et inhiber l'action de l'enzyme rétrotranscriptase. Les échantillons sont placés dans l'appareil Thermal cycler (BIORAD, MyCycler™) pour faire varier la température selon le déroulement suivant : 5 min à +25°C, 30 min à +42°C, 5 min à +85°C, puis un retour à +4°C. Enfin les ADNc synthétisés sont conservés à -20°C avant de réaliser les q-PCR.

3. qPCR SYBR® green

Pour la qPCR en temps réel, dans chaque puits de la plaque 96 puits (ABI APPLIED BIOSYSTEMS, Réf 4346906), sont ajoutés : 10 µL de la solution de iTaq™ Universal SYBR® Green Supermix (BIORAD, Réf 172-5124) contenant l'enzyme, 1 µL de solution d'amorces sens, 1 µL de solution d'amorces antisens ([Tableau 20](#)) et 6 µL d'eau RNase DNase free. Puis, 2 µL d'échantillon sont ajoutés : eau RNase DNase free (i) pour servir de blanc, c'est-à-dire sans ADN, standard (ii) pour servir de gamme étalon allant de la concentration de 10⁻³ à 10⁻⁶ ng/µL à partir d'une solution mère d'ADN spécifique pour chaque gène, échantillon (iii) pour chaque condition à étudier. Après avoir scellé la plaque à l'aide d'un film adhésif (ABI APPLIED BIOSYSTEMS, Réf 4313663), celle-ci est centrifugée quelques secondes à basse vitesse afin de culoter tout le mix. La plaque est ensuite chargée dans l'appareil à PCR Stepone (APPLIED BIOSYSTEM) et la réaction de PCR est lancée selon le programme décrit dans la [Figure 36](#) Figure 36.

Tableau 20 : Liste des séquences des amorces utilisées lors de la PCR quantitative et synthétisées par la société Eurogentec (Angers, France)

Gène		Séquence (5' – 3')	Tm (°C)	Amplicon (pb)
ATP11B	Sens	ACC-TAC-CAG-TCC-AGT-TAC-CAG-T	60	148
	Antisens	AAG-GCC-ACC-ACT-TCG-AAC-AA		
COX-1	Sens	AAA-CCC-TAC-ACC-TCC-TTC-CAG	60	90
	Antisens	CTC-CAA-CGC-ATC-AAT-GTC-TCC		
COX-2	Sens	GCT-GGA-ACA-TGG-AAT-TAC-CCA	60	98
	Antisens	CTT-TCT-GTA-CTG-CGG-GTG-GAA		
IDO-1	Sens	TCA-CAG-ACC-ACA-AGT-CAC-AGC	60	133
	Antisens	AGT-TGG-CAG-TAA-GGA-ACA-GCA		
PDL-1	Sens	TGC-CTT-GGT-GTA-GCA-CTG-AC	60	123
	Antisens	CGT-CTC-CTC-CAA-ATG-TGT-ATC-A		
RP29	Sens	AGA-TGG-GTC-ACC-AGC-AGC-TCT-ACT-G	65	72
	Antisens	AGA-CGC-GGC-AAG-AGC-GAG-AA		
TGF-β1	Sens	AAC-AAT-TCC-TGG-CGC-TAC-CTC	60	92
	Antisens	TGC-CGC-ACA-ACT-CCA-GTG		

ATP11B (ATPase Phospholipid Transporting 11B), **COX-1** and **COX-2** (Cyclooxygenase 1 and 2), **IDO-1** (Indoleamine 2,3-dioxygenase-1), **PD-L1** (Programmed death-ligand 1), **RP29** (Ribosomal protein), **TGF-β1** (Transforming growth factor beta 1), **Tm** (melting temperature ou température de fusion).

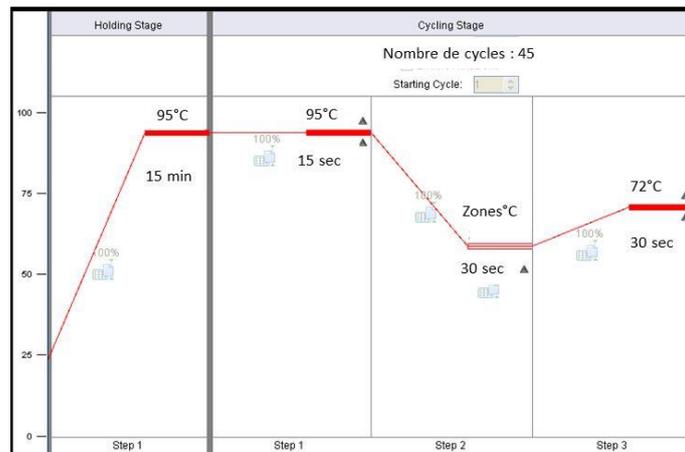


Figure 36 : Etapes de la qPCR en temps réel d'après le logiciel « Stepone Software V2.1 »

La qPCR se déroule avec une succession de cycles (40 à 45) de températures qui permettent : la dissociation des brins d'ADNc à une température de +95°C (**Step 1 : Dénaturation**), la fixation spécifique des amorces sur chaque brin à une température de fusion (Tm) spécifique pour chaque couple d'amorce (**Step 2 : hybridation**), et la duplication des brins d'ADNc par la Taq polymérase à +72°C (**Step 3 : extension d'amorces**). Après un cycle, un double brin d'ADNc est dupliqué en deux doubles brins d'ADN.

De plus à la fin des cycles de PCR, une **courbe de fusion correspondant** à la variation de température en fonction de la fluorescence est réalisée (Figure 37) afin de vérifier la température de fusion des amplicons obtenus. Après dénaturation complète de l'ADN double brin (15 sec à 95°C) la température est abaissée aux alentours de la température d'hybridation (60 °C) et est ensuite remontée par palier de 0,3 °C jusqu'à 95 °C en mesurant l'intensité de fluorescence en continu.

La dérivée de la courbe décroissance de fluorescence = f (température) permet d'obtenir un chromatogramme dont le pic est spécifique à un amplicon. En effet chaque produit d'ADN double brin synthétisé a une température de fusion (T_m) spécifique. Cette température est en lien direct avec la composition de l'amplicon formé à étudier. Pour ce T_m , 50 % de l'ADN est sous forme double brin et 50 % sous forme simple brin.

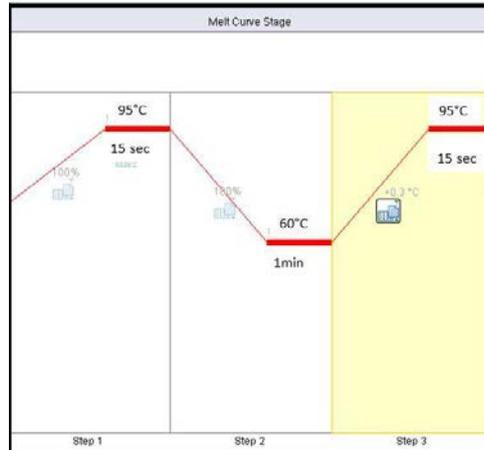


Figure 37 : Programme de la « courbe de fusion » d'après le logiciel « Stepone Software V2.1 ».

A la fin des cycles de PCR, ce programme de courbe de fusion composé d'une étape de **dénaturation (Step 1)** complète à 95°C, puis d'abaissement de Température aux alentours de la température d'hybridation de la PCR (60°C) (**Step 2**) permet d'être sûr que tous les amplicons soient reformés. Ensuite lors de la dernière étape (**Step 3**) la température est augmentée par palier avec une mesure de fluorescence par la machine en continue.

La réaction commence par une activation de l'enzyme de 15 min à 95°C, suivi de 40 cycles de 15 sec à 95 °C (dénaturation), 30 sec à la température d'hybridation des amorces et 30 sec à 72 °C (élongation). A la fin de chaque cycle, la fluorescence émise par le SYBR green est mesurée. Les amorces utilisées sont récapitulées dans le [Tableau 20](#). L'expression des gènes d'intérêt est normalisée par rapport à un gène de ménage (RP29, protéine ribosomale) dont l'expression ne varie pas dans nos conditions expérimentales.

4. Analyse

Le cycle seuil ou Ct (Cycle threshold), c'est-à-dire le nombre de cycle à partir duquel le produit de PCR est détectable, est déterminé automatiquement par le logiciel de l'appareil. Ce Ct est dépendant de la quantité de matrice initialement présente dans l'échantillon amplifié. En effet, le Ct calculé est inversement proportionnel au logarithme décimal du nombre de copies initiales et apparaît toujours au cours de la phase exponentielle de la PCR.

Pour chaque gène étudié une solution mère d'ADNc à 1 ng/ μ L spécifique à chaque gène a été préparée au préalable. Pour cela, une RT-qPCR est réalisée sur des échantillons connus pour exprimer le gène d'intérêt et le produit de PCR obtenu est purifié sur colonne Quiaquick® PCR purification kit (Qiagen, France, réf. 28104).

De plus pour chaque gène étudié, une gamme d'étalonnage (de 10^{-3} à 10^{-6} ng/ μ L) est réalisée à partir de la solution mère spécifique du gène afin d'évaluer la concentration en ADNc de chaque échantillon et l'efficacité de la PCR qui doit être proche de 100 %. L'efficacité est déterminée par la pente de la régression linéaire $Ct = f(\text{Concentration})$. En effet, une pente égale à -3,3 correspond à une efficacité de PCR de 100%.

La quantification relative des résultats est réalisée selon la méthode du $2^{-\Delta\Delta Ct}$.

$RQ = 2^{-\Delta\Delta Ct}$ $\Delta\Delta Ct = \Delta Ct_{\text{échantillon}} (Ct_{\text{échantillon}} - Ct_{\text{contrôle endogène}}) - \Delta Ct_{\text{Calibrateur}} (Ct_{\text{Calibrateur}} - Ct_{\text{contrôle endogène}})$

Le contrôle endogène est le gène RP29, invariant dans les conditions étudiées.

Le calibrateur est :

- ✓ La condition normoxie pour les résultats de l’Axe 1
- ✓ La condition « moyenne des jeunes » dans l’Axe 3.

H. RT-PCR QUANTITATIVE Taqman

1. Principe

Contrairement à la RT-qPCR SG, la RT-qPCR TM dédiée à l’analyse d’un miR comporte une étape de RT spécifique. En effet, la RT d’un miR donné est amorcée par un oligonucléotide qui lui est propre et qui a la particularité de former une structure tige-boucle (*Figure 38*).

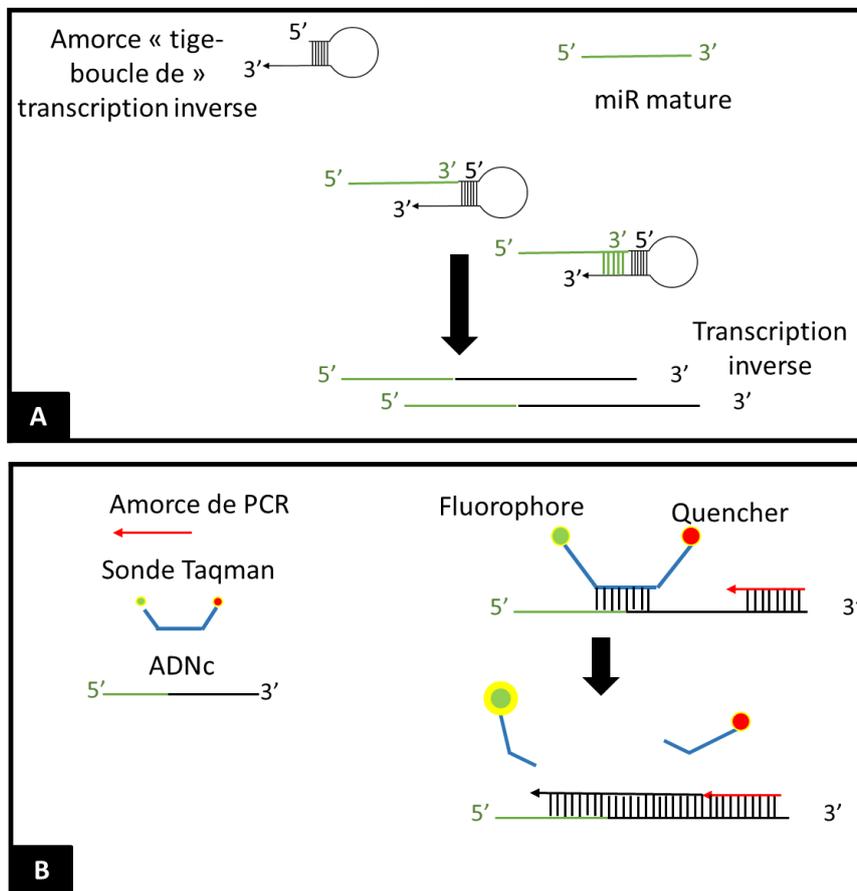


Figure 38 : Principe de la détection des miR par PCR en temps réel par la méthode Taqman

La réaction de transcription inverse permettant la détection des miARN matures (miR matures) est amorcée par un oligonucléotide structuré en tige-boucle dont la séquence est exogène aux génomes humain et murin. Seuls les 6 nucléotides à l’extrémité 3’ de l’amorce sont complémentaires des nucléotides à l’extrémité 5’ du miR étudié. La spécificité de ces amorces est grande et elle permet de discriminer des miRNA matures produits à partir de gènes homologues (A). Au cours de la réaction de PCR en temps réel, la sonde TaqMan spécifique s’apparie par complémentarité à la séquence du miR d’intérêt. Cette sonde comporte à une extrémité un fluorophore et à l’autre un quencher de fluorescence. Lorsque la sonde TaqMan est intègre aucune fluorescence n’est émise. Au cours de l’élargissement, la sonde TaqMan est dégradée et le fluorophore est libéré du quencher : la fluorescence peut alors être détectée. Au cours de la réaction de PCR, la fluorescence est mesurée à la fin de chaque étape d’élargissement : plus l’amplification est importante et plus l’intensité de fluorescence observée est grande. L’intensité de fluorescence est ensuite convertie en CT (Cycle threshold) (B).

2. Retro-transcription avec sonde tige-boucle

La rétrotranscription (RT) est réalisée à l'aide du kit « TM miRNA Reverse Transcription » (Applied Biosystem, Réf 4366597). Les ARN DNAsés (1µg dans 10 µl) sont dilués 25 fois pour obtenir une concentration finale de 4 ng/µL et 20 ng sont mélangés avec le mix réactionnel spécifique du miR étudié et préparé selon les recommandations du fournisseur en présence de l'enzyme Multiscribe Reverse Transcriptase (50 U/µL). Ce mélange réactionnel est incubé 30 min à 16°C, 30 min à 42 °C et 5 min à 85 °C dans le thermocycler (BIORAD, Mycycler™).

3. qPCR en sonde Taqman

Les ADNc sont mélangés à 1 µL de mélange d'amorces (oligodéoxynucléotides forward et reverse et sonde Taqman), 10 µL de tampon Master mix 2x (Applied Biosystem, Réf 4440040) et de l'eau dans un volume final de 20 µL, puis déposés sur plaque 96 puits (ABI APPLIED BIOSYSTEMS, Réf 4346906). La réaction de PCR est réalisée dans l'appareil SteponePlus (APPLIED BIOSYSTEM) et commence par une activation de l'enzyme de 10 min à 95 °C, suivie de 40 cycles de 15 secondes à 95 °C (dénaturation) et 1 min à 60°C (hybridation/élongation). A la fin de chaque cycle, la fluorescence émise par la sonde Taqman est mesurée. La quantification relative des résultats est réalisée selon la méthode du $2^{-\Delta\Delta Ct}$.

$$RQ = 2^{-\Delta\Delta Ct}$$
$$\Delta\Delta Ct = \Delta Ct_{\text{échantillon}} (Ct_{\text{échantillon}} - Ct_{\text{contrôle endogène}}) - \Delta Ct_{\text{Calibrateur}} (Ct_{\text{Calibrateur}} - Ct_{\text{contrôle endogène}})$$

Le contrôle endogène est le snRNA U6, invariant dans les conditions étudiées.

VII. Analyse statistique

Pour la première partie des résultats (phénotypage, clonogénicité, prolifération, sénescence, immunomodulation), la deuxième partie des résultats concernant l'expression de miR et des ARNm par PCR et pour la troisième partie des résultats concernant l'effet du stress oxydant sur les propriétés fonctionnelles des CSM, les données ont été analysées par un test t apparié ou non (suivant les expériences) à l'aide du logiciel GraphPad Prism 6.0 (GraphPad Software, USA). Les résultats sont exprimés en moyenne \pm écart type (*p<0,05).

Pour la seconde partie des résultats concernant la détection des gènes différentiellement exprimés à partir des données des puces, les données ont été analysées par le test statistique ANOVA grâce au logiciel Partek, puis Rank Product grâce à l'environnement logiciel R.

Chapitre III : Résultats-Discussion

Partie 1 : Effet de l'environnement de culture sur les caractéristiques et les propriétés fonctionnelles des CSM

I. Partie 1 : Résultats

Comme décrit précédemment les CSM sont des cellules plastiques sensibles à l'environnement. Ainsi, l'environnement de culture dans lequel elles sont amplifiées aura un impact sur leurs propriétés. Les travaux précédents menés au sein de l'équipe ont été réalisés en cultivant les CSM dans du milieu contenant du SVF d'origine animale. Cependant, le passage à l'utilisation clinique préconise la culture des CSM dans un milieu supplémenté en additifs d'origine humaine comme le lysat plaquettaire. De plus, la culture des CSM dans un environnement hypoxique, se rapprochant des conditions physiologiques dans lesquels ces cellules se trouvent, pourrait être également un paramètre dont il faut tenir compte. En effet, les CSM, étant très plastiques, elles sont sensibles à l'environnement dans lequel elles se trouvent. Celui-ci peut modifier leurs propriétés. Ainsi, nous nous sommes intéressés dans cette partie du travail à l'étude de l'effet de l'environnement de culture sur les caractéristiques et les propriétés fonctionnelles des CSM. Les CSM de la gelée de Wharton (GW) et de la moelle osseuse (MO) ont été amplifiées dans 4 conditions de culture (Normoxie-SVF, Hypoxie-SVF, Normoxie-LPH et Hypoxie-LPH), puis nous avons contrôlé leur qualité (adhésion, phénotype, multipotence), leur clonogénicité et leur capacité d'expansion *in vitro* (Figure 27). Par la suite, les propriétés fonctionnelles (migration et immunosuppression) des CSM amplifiées dans les 4 conditions de culture ont été évaluées.

A. Contrôle qualité des CSM-GW et CSM-MO amplifiées dans les 4 conditions de culture

1. Adhésion au plastique des CSM-GW et CSM-MO amplifiées dans les 4 conditions de culture

Les CSM-GW et CSM-MO cultivées en normoxie et en hypoxie dans du milieu supplémenté en SVF ou LPH ont bien adhéré au plastique après avoir été isolées à partir du cordon ombilical ou de la MO conformément aux recommandations de l'ISCT (Dominici et al., 2006) (Figure 39), permettant ainsi leur amplification *in vitro* jusqu'au passage 5 (Figure 39). Des images au microscope optique ont été réalisées avant chaque trypsination en lumière transmise. Les CSM-GW et CSM-MO cultivées dans les 4 conditions de culture (N-SVF ; H-SVF ; N-LPH ; H-LPH) ont présenté un aspect fusiforme de type fibroblastique caractéristique des CSM. Des images représentatives des CSM-GW et des CSM-MO à la fin du passage 0 sont présentées dans la Figure 39 A1 et B1. Cependant, pour les passages suivants lors

de l'expansion, nous avons pu observer que les CSM-GW et CSM-MO cultivées en SVF semblent plus larges et contiennent plus de granules que les cellules cultivées en LPH.

Ainsi, les résultats montrent que les CSM-GW et CSM-MO adhèrent au plastique quelle que soit la condition de culture.

2. Immunophénotypage des CSM-GW et CSM-MO amplifiées dans les 4 conditions de culture

L'analyse du phénotype a été réalisée à passage 3 pour les CSM-GW et à passage 2 pour les CSM-MO. En effet, en clinique les CSM-GW sont utilisées à la fin du passage 3 et les CSM-MO à la fin du passage 1. Néanmoins, le nombre de CSM-MO disponibles à la fin du passage 1 n'était pas suffisant pour réaliser toutes les expériences souhaitées, c'est pourquoi le passage 2 a été privilégié.

Pour les différents prélèvements étudiés, l'expression des marqueurs de surface est en accord avec les recommandations de l'ISCT (Dominici et al., 2006). En effet, pour tous les échantillons étudiés et quelles que soient les conditions de culture, les cellules exprimaient les marqueurs CD105, CD73 et CD90 (pourcentage d'expression proche de 100%) et n'exprimaient pas les marqueurs CD34, CD45 et HLA-DR (pourcentage d'expression inférieur à 10%) (*Figure 39 A2 et B2*).

Ainsi, le contrôle qualité du phénotype des CSM-GW et CSM-MO montre qu'elles expriment les marqueurs recommandés par l'ISCT lorsqu'elles ont été amplifiées dans les 4 conditions de culture de notre étude.

3. Différenciation des CSM-GW et CSM-MO amplifiées dans les 4 conditions de culture

L'analyse des capacités de différenciation mésodermique adipocytaire (marquage adipored), ostéocytaire (coloration rouge alizarine) et chondrocytaire (coloration bleu alcian) montre que les CSM-MO se différencient en ostéocytes et en adipocytes quelles que soient les conditions de culture (*Figure 39 B3*). En revanche, les CSM-GW se différencient en ostéocytes, mais pas en adipocytes dans les 4 conditions de culture étudiées (*Figure 39 A3*). C'est pourquoi il a été décidé d'induire la différenciation chondrocytaire pour les CSM-GW, ce qui a permis de montrer que les CSM-GW se différencient bien en chondrocytes.

Ainsi, le contrôle de la multipotence des CSM-GW et CSM-MO montre que les cellules conservent leurs capacités de différenciation mésodermique quelle que soit la condition de culture dans laquelle elles ont été amplifiées.

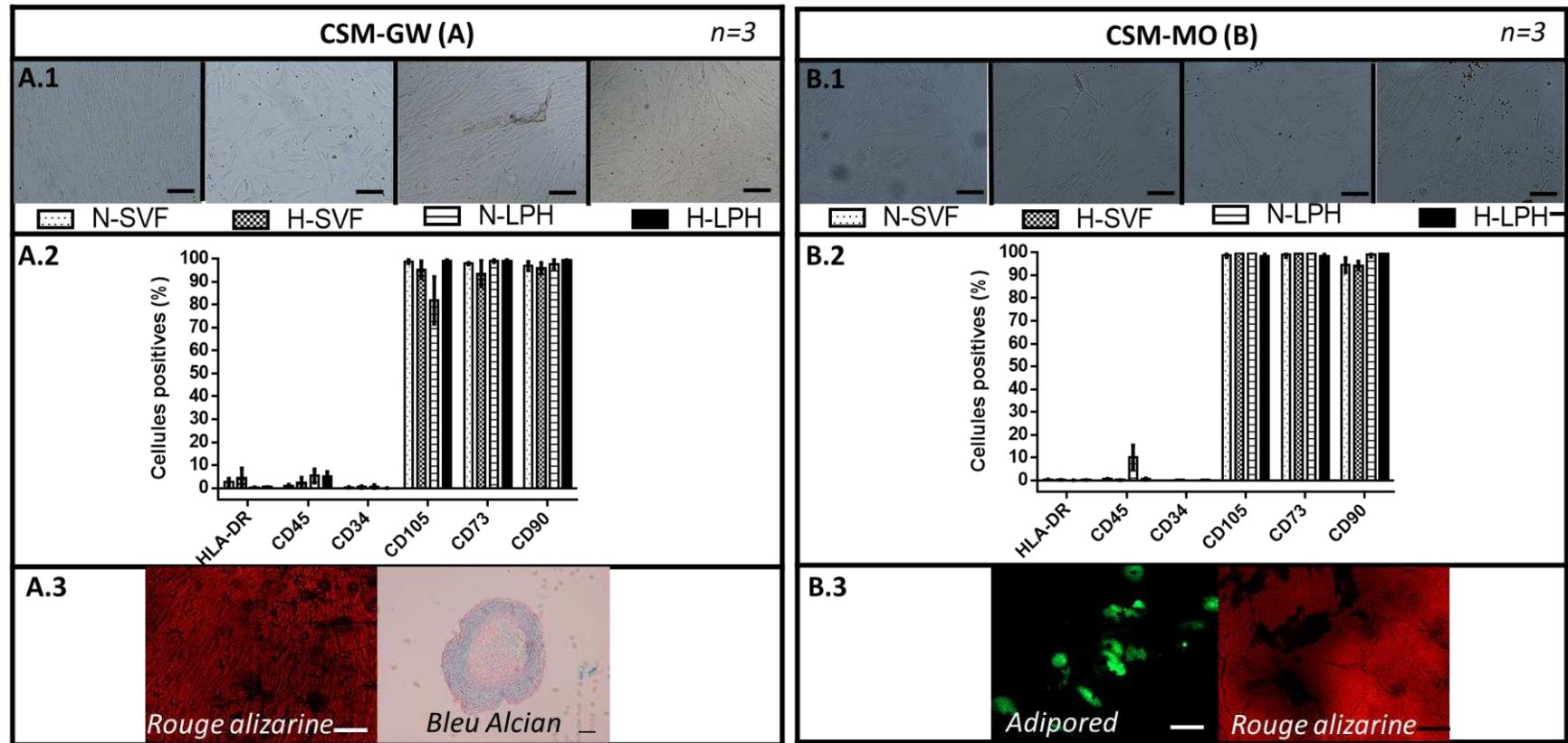


Figure 39 : Critères de l'ISCT des CSM-GW et CSM-MO amplifiées dans les 4 conditions de culture

Les cellules stromales/souches mésenchymateuses de gelée de Wharton (CSM-GW) (A) ou de moelle osseuse (CSM-MO) (B) ont été amplifiées en condition de normoxie (N) ou d'hypoxie (H) avec du milieu supplémenté en sérum de veau fœtal (SVF) ou en lysat plaquettaire humain (LPH). Images représentatives des CSM-GW (A.1) et CSM-MO (B.1) cultivées dans les différentes conditions de culture et ayant adhéré au plastique à passage 0 par microscope DMI3000B (Leica). Le pourcentage d'expression des clusters de différenciation a été déterminé par cytométrie en flux (Beckman, Gallios) pour les CSM-GW à passage 3 (A.2) et les CSM-MO à passage 2 (B.2). Les colorations au rouge alizarine (ostéocytes) et bleu alcian (chondrocytes) ont été réalisées à passage 3 pour les CSM-GW (A.3). Les colorations rouge alizarine (ostéocytes) et adipored (adipocyte) ont été réalisées à passage 2 pour les CSM-MO (B.3). Les images pour les CSM après coloration au rouge alizarine et adipored ont été obtenues avec le microscope MI3000B (Leica) et bleu alcian avec le microscope optique DMD108 (Leica). Echelle = 100 µm. Les résultats sont exprimés en moyenne ± écart-type. ISCT : International Society for Cell and Gene Therapy.

B. Clonogénicité des CSM-GW et CSM-MO

La capacité des CSM à former des colonies lorsqu'elles sont amplifiées à faible densité permet de vérifier le caractère souche de ces cellules. Les résultats du test de CFU des CSM dans la [Figure 40](#) montrent que les CSM-GW arrivent à former plus de colonies lorsqu'elles sont amplifiées dans du milieu supplémenté en LPH par rapport au milieu supplémenté en SVF (normoxie et hypoxie) ([Figure 40 A1 A2](#)). Ce nombre de colonies est quasiment nul pour les CSM-GW cultivées dans du milieu supplémenté en SVF ([Figure 40 A2](#)). De plus, le nombre de colonies ne varie pas entre les conditions normoxie et hypoxie lorsque le supplément de culture est le LPH ([Figure 40 A2](#)). Aucune différence significative n'est observée pour la taille des colonies formées par les CSM-GW selon la condition de culture ([Figure 40 A3](#)).

En revanche, les CSM-MO amplifiées dans les 4 conditions de culture (N-SVF ; H-SVF ; N-LPH et H-LPH) arrivent à former des colonies ([Figure 40 B1](#)). Concernant le nombre de colonies, aucune différence significative n'est observée ([Figure 40 B2](#)), cependant la taille des colonies formées est plus importante lorsque les CSM-MO sont amplifiées dans du milieu de culture supplémenté en LPH (normoxie et hypoxie) (taille supérieure à 20 mm²) ([Figure 40 B3](#)).

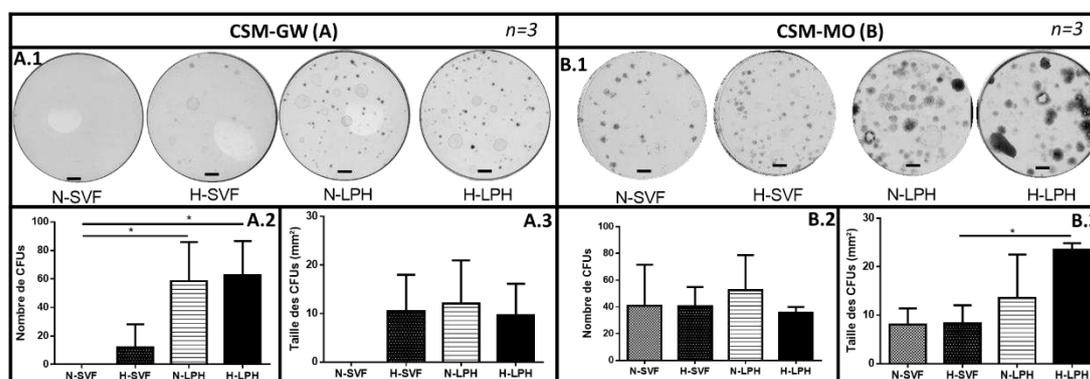


Figure 40 : Clonogénicité des CSM-GW et CSM-MO amplifiées dans les 4 conditions de culture

Les cellules stromales/souches mésenchymateuses de gelée de Wharton (CSM-GW) (A) ou de moelle osseuse (CSM-MO) (B) ont été amplifiées en condition de normoxie (N) ou d'hypoxie (H) avec du milieu supplémenté en sérum de veau fœtal (SVF) ou en lysat plaquettaire humain (LPH). Les CSM ont été ensemencées à une densité de 2 cellules/cm² et cultivées pendant 10 jours à passage 3 pour les CSM-GW et 14 jours pour les CSM-MO à passage 2. Les CSM-GW (n=3) et CSM-MO (n=3) ont été colorées au cristal violet et numérisées avec le chemidoc (Biorad) (échelle = 1 cm). Le nombre (A2, B2) et la taille des CFU (Colony Forming Unit) (A3, B3) ont été analysés avec le logiciel Image J (National Institutes of Health). Paired t test was used for statistical analyses (GraphpadPrism). Les résultats sont exprimés en moyenne ± écart-type. p<0,05 versus contrôle (*) à l'aide d'un test t (GraphpadPrism).

Ces résultats montrent que les CSM-GW ont la capacité à former des colonies après amplification avec du milieu supplémenté en LPH (normoxie et hypoxie) tandis que leur capacité à former des colonies lorsqu'elles sont amplifiées dans du milieu supplémenté en SVF est très faible voire nulle pour certains prélèvements. De plus, les CSM-MO amplifiées dans les 4 conditions de culture conservent leurs capacités à former des colonies, mais la taille des colonies est plus importante lorsqu'elles sont amplifiées dans du milieu supplémenté en LPH.

C. Propriétés de prolifération des CSM-GW et CSM-MO

Les résultats de l'expansion des CSM-GW depuis l'isolement à partir du cordon ombilical et des CSM-MO depuis l'isolement à partir de la moelle osseuse montrent des capacités de prolifération différentes suivant la source (GW ou MO), en fonction du pourcentage d'oxygène (normoxie et hypoxie) et du milieu de culture supplémenté en SVF ou LPH.

Tout d'abord, les résultats de la [Figure 41](#) montrent une augmentation du nombre de PD cumulés en fonction des passages quel que soit le type cellulaire (CSM-GW et CSM-MO) et la condition de culture (N-SVF, HSVF, N-LPH et H-LPH), ce qui signifie que les CSM-GW et MO prolifèrent quand elles sont cultivées dans les 4 conditions de culture. Cependant, l'augmentation est différente suivant la source de CSM (GW ou MO) et les conditions de culture. En effet, la comparaison du nombre de PD cumulés après 5 passages montre que les CSM-GW ont un nombre de PD cumulé compris entre 14 et 20, tandis que les CSM-MO ont un nombre de PD cumulé compris entre 11 et 15. Les CSM-GW ont donc des capacités de prolifération plus importantes que les CSM-MO, quelle que soit la condition de culture.

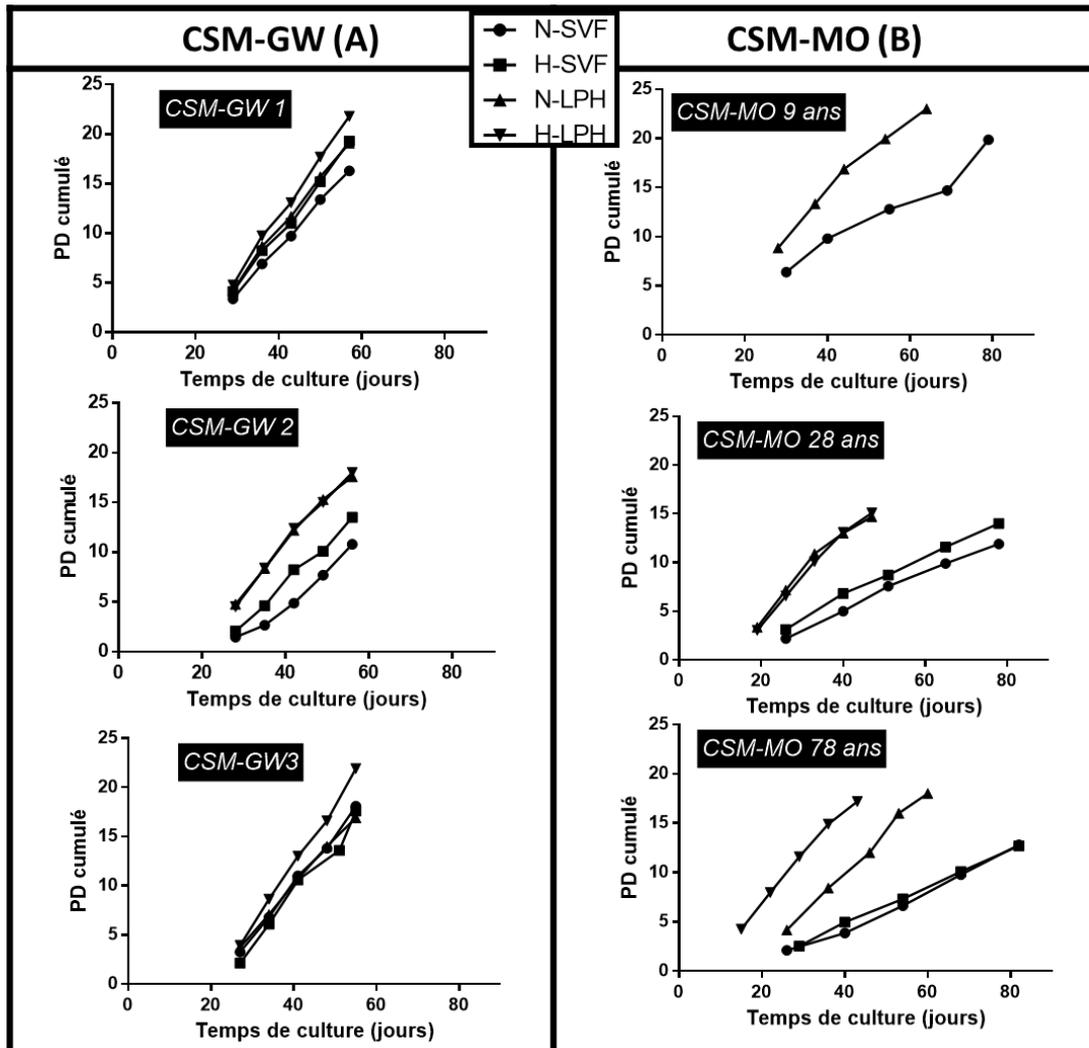


Figure 41 : Prolifération des CSM-GW et des CSM-MO amplifiées dans les 4 conditions de culture

Les cellules stromales/souches mésenchymateuses de gelée de Wharton (CSM-GW) (A) ou de moelle osseuse (CSM-MO) (B) ont été amplifiées en condition de normoxie (N) ou d'hypoxie (H) avec du milieu supplémenté en sérum de veau fœtal (SVF) ou en lysat plaquettaire humain (LPH) jusqu'au passage 5. La prolifération cellulaire a été évaluée à l'aide du nombre de doublement de population (PD) cumulé en fonction du temps en jours pour 3 prélèvements de CSM-GW (No 1-2 et 3) de CSM-MO (9-28 et 78 ans). Le PD est calculé suivant la formule suivante : $PD = \log(N_x/N_i) / \log 2$ avec N_i nombre initial de cellules ensemencées et N_x = Nombre de cellules détachées.

De plus, nos résultats de doublement de population cumulé montrent que les capacités de prolifération après 5 passages sont plus importantes quand les CSM-GW et les CSM-MO sont amplifiées avec du milieu supplémenté en LPH par rapport au SVF aussi bien en normoxie et en

hypoxie. Ces résultats sont confirmés par ceux du temps de doublement. En effet, le temps de doublement diminue pour les CSM-GW et CSM-MO amplifiées avec du LPH (Tableau 21). Les CSM mettent donc moins de temps à doubler leur population, après amplification avec du milieu supplémenté en LPH.

Tableau 21 : Temps de doublement des CSM-GW et CSM-MO amplifiées dans les 4 conditions de culture

A	CSM-GW 1				CSM-GW 2				CSM-GW 3			
	N-SVF	H-SVF	N-LPH	H-LPH	N-SVF	H-SVF	N-LPH	H-LPH	N-SVF	H-SVF	N-LPH	H-LPH
P1	2,07	1,70	1,67	1,46	4,81	3,55	1,46	1,54	2,15	3,41	1,88	1,78
P2	2,00	1,70	1,56	1,42	5,82	2,77	1,95	1,81	1,97	1,77	2,10	1,49
P3	2,50	2,50	2,34	2,11	3,20	1,94	1,82	1,78	1,66	1,56	1,97	1,62
P4	1,89	1,67	1,75	1,50	2,49	3,85	2,28	2,62	2,55	2,33	2,13	1,92
P5	2,41	1,74	2,02	1,72	2,23	2,04	3,10	2,34	1,61	1,76	2,42	1,34
B	CSM-MO 9 ans				CSM-MO 28 ans				CSM-MO 78 ans			
	N-SVF	H-SVF	N-LPH	H-LPH	N-SVF	H-SVF	N-LPH	H-LPH	N-SVF	H-SVF	N-LPH	H-LPH
P1	1,56	N.D	1,02	N.D	6,37	4,47	2,09	2,31	6,46	5,55	2,39	1,64
P2	4,39	N.D	1,55	N.D	4,99	3,79	1,84	1,99	8,06	4,56	2,36	1,90
P3	4,67	N.D	2,86	N.D	6,42	7,06	1,80	1,87	4,87	5,96	2,77	1,93
P4	7,43	N.D	3,25	N.D	6,42	5,19	2,99	2,19	4,45	5,12	1,75	2,14
P5	1,93	N.D	3,27	N.D	7,37	6,05	3,86	3,25	4,61	5,21	3,62	2,96

Les cellules stromales/souches mésenchymateuses de gelée de Wharton (CSM-GW) (A) et de moelle osseuse (CSM-MO) (B) ont été cultivées en conditions de normoxie (N) ou d'hypoxie (H) avec du milieu supplémenté en sérum de veau fœtal (SVF) ou en lysat plaquettaire humain (LPH). La prolifération cellulaire a été évaluée par le temps de doublement (TD) (en jours) pour 3 prélèvements de CSM-GW (No. 1-2 et 3) et 3 de CSM-MO (9, 28 et 78 ans). Le TD a été calculé selon la formule : $TD = (Nj * \ln(2)) / (\ln(Nf) - \ln(Ni))$. Nj = Nombre de jours ; Ni = Nombre initial de cellulesensemencées et Nf = Nombre final de cellules trypsinées. N.D.=non déterminé.

Ces résultats montrent que les capacités de proliférations des CSM-GW sont meilleures que celles des CSM-MO dans les 4 conditions de culture (N-SVF, H-SVF, N-LPH et H-LPH). De plus, comme pour les capacités à former des colonies, les CSM-GW et CSM-MO ont de meilleures propriétés de prolifération après amplification avec du milieu supplémenté en LPH.

Ainsi nous nous sommes intéressés à savoir si les meilleures capacités de prolifération et de clonogénicité avec le LPH étaient liées aux facteurs de croissance contenus dans le LPH.

D. Implication des facteurs de croissance contenus dans le LPH dans les propriétés de prolifération et de clonogénicité des CSM-GW

Afin de vérifier l'implication des facteurs de croissance contenus dans le LPH, des expériences complémentaires avec des anticorps neutralisants certains facteurs de croissance ont été réalisées avec les CSM-GW amplifiées en hypoxie avec du milieu supplémenté en LPH. Les CSM amplifiées en hypoxie avec du LPH ont été mises en culture à passage précoce avec du milieu supplémenté en LPH et pré-incubé avec des anticorps neutralisants dirigés contre certains facteurs de croissance présents en grande quantité dans le LPH tels que : le facteur de croissance épidermique (epidermal growth factor EGF), le facteur de croissance basique des fibroblastes (basic fibroblast growth factor bFGF), le facteur de croissance insuline-like (insulin growth factor IGF) et le facteur de croissance dérivé des plaquettes (platelet-derived growth factor PDGF). Les résultats de la Figure 42 montrent que l'utilisation de ces anticorps neutralisants de manière seule ou combinée ne modifie pas la taille des colonies (Figure 42 C). Cependant, le nombre de colonies diminue en présence d'anticorps neutralisants dirigés contre bFGF (Figure 42 D).

Concernant la prolifération, les résultats de la [Figure 42 A](#) montrent une inhibition de prolifération de 70 % avec l'anticorps anti PDGF et de 80 % avec l'utilisation de l'association des anticorps anti EGF et anti PDGF.

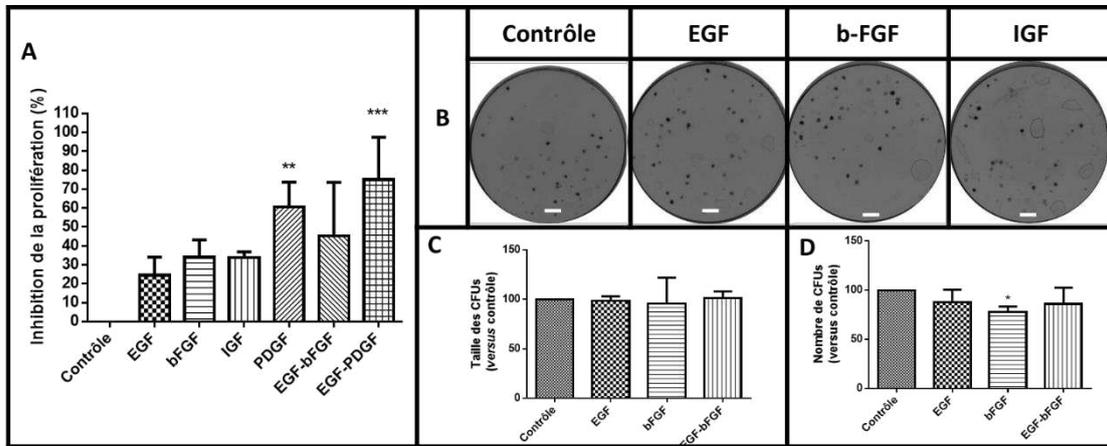


Figure 42 : Prolifération et clonogénicité des CSM-GW amplifiées en LPH en présence d'anticorps neutralisants

Les cellules stromales/souches mésenchymateuses de gelée de Wharton (CSM-GW) ($n=3$) ont été cultivées en condition d'hypoxie (H) avec du milieu supplémenté en lysat plaquettaire humain (LPH) en présence d'anticorps neutralisants dirigés contre : le facteur de croissance épidermique (epidermal growth factor EGF), le facteur de croissance des fibroblastes de base (fibroblast growth factor bFGF), le facteur de croissance insuline like (insulin-like growth factor-1 IGF-1) et le facteur de croissance dérivé des plaquettes (platelet-derived growth factor PDGF) (Millipore, France). Après 7 jours, les CSM-GW ensemencées à 1000 cellules/cm² sont comptées pour la prolifération (A) et les CSM-GW ensemencées à 2 cellules/cm² sont colorées au cristal violet pour le test de clonogénicité (B). Colonies numérisées avec le chemidoc (Biorad) (échelle = 1 cm). La taille en pourcentage (versus contrôle) (C) et le nombre de colonies (D) a été calculée à l'aide du logiciel ImageJ (National Institutes of Health). Les résultats sont exprimés en moyenne \pm écart-type. $p < 0,05$ versus contrôle (*) à l'aide d'un test t apparié (GraphpadPrism).

Ces résultats montrent donc que les meilleures capacités à former des colonies des CSM-GW sont associées à la présence du facteur de croissance bFGF et que les meilleures capacités de prolifération des CSM-GW seraient associées aux facteurs de croissance PDGF et EGF. Par la suite, nous nous sommes intéressés à savoir si l'augmentation des capacités de prolifération des CSM avec le LPH n'entraîne pas de transformation.

E. Transformation des CSM-GW

La transformation cellulaire est le changement d'un état de survie limitée à un état immortel comme les cellules cancéreuses et s'accompagne de l'apparition d'anomalies caryotypiques et d'une forte activité télomérase comme pour les cellules cancéreuses. Les résultats du [Tableau 22](#) montrent que les CSM-GW amplifiées dans les 4 conditions de culture ne présentent pas d'anomalies caryotypiques. De plus, aucune activité télomérase (ou une très faible activité pour CSM-GW1) n'a été détectée dans les CSM-GW amplifiées dans les 4 conditions de culture.

Tableau 22 : Transformation des CSM-GW amplifiées dans les 4 conditions de culture

	Echantillon	N-SVF	H-SVF	N-LPH	H-LPH
A	CSM-GW No.1	ND	ND	ND	ND
	CSM-GW No.2	Normal	Normal	Normal	Normal
	CSM-GW No.3	Normal	Normal		
B (<i>hTERT/ABL</i> ratio)	CSM-GW No.1	0,18 %	0,63 %	0,17 %	0 %
	CSM-GW No.2	N.D.	0 %	0 %	0 %
	CSM-GW No.3	0 %	0 %	0 %	0 %

Les cellules stromales/souches mésenchymateuses de gelée de Wharton (CSM-GW) ont été cultivées en condition de normoxie (N) ou d'hypoxie (H) avec du milieu supplémenté en sérum de veau fœtal (SVF) ou en lysat plaquettaire humain (LPH) jusqu'au passage 3. Les analyses de caryotypes ont été réalisées après blocage des noyaux en métaphase et vingt mitoses ont été analysées (A). Représentation du ratio entre les ARNm de *hTERT* (human telomerase reverse transcriptase) et *ABL* (Abelson protein) multipliés par 100 (B). L'expression de la protéine Abelson ne varie pas entre les cellules normales et les cellules leucémiques.

Le supplément de milieu de culture (le LPH notamment) ou la condition en oxygène n'entraîne donc pas de transformation des CSM-GW. Nous nous sommes par la suite intéressés à l'effet du supplément de milieu de culture sur la morphologie des CSM.

F. Morphologie des CSM-GW et CSM-MO

Afin de caractériser la morphologie des CSM-GW et CSM-MO à passage précoce, nous avons réalisé des marquages immunofluorescents de deux composants du cytosquelette, la tubuline (protéine structurelle des microtubules qui contribuent au transport intracellulaire) (i) et des microfilaments d'actine (qui contribuent au mouvement cellulaire) (ii), et des noyaux au DAPI. Les images des CSM-GW à passage 3 et des CSM-MO à passage 2 ne montrent pas de différences au niveau du marquage de la tubuline ou de la morphologie du noyau quelle que soit la condition de culture (Figure 44). D'après ces images, les conditions de culture n'affectent donc pas la formation de microtubules ou la morphologie des noyaux.

En revanche, le marquage des fibres d'actine (marquées à la phalloïdine) montre que les CSM-GW et CSM-MO amplifiées avec du LPH ont une morphologie fusiforme et plus fine par rapport aux CSM amplifiées avec du SVF indépendamment du taux oxygène. Ces observations ont été confirmées lors de l'amplification *in vitro* (Figure 39 A1 et A2). Le LPH favoriserait donc la morphologie fibroblastique des CSM. Par ailleurs, la fluorescence obtenue par le marquage du cytosquelette d'actine semble moins forte pour les CSM-GW et CSM-MO amplifiées avec du LPH par rapport au SVF que ce soit en normoxie ou en hypoxie (Figure 44). Ces résultats laissent supposer que le LPH pourrait affecter la migration des CSM-GW et CSM-MO.

Ces résultats ont été confirmés lors des analyses du phénotype des CSM par cytométrie en flux. Nous avons montré que la taille (FSC) et la structure relative (SSC) augmentent après amplification avec du SVF comme supplément de milieu de culture comparé au LPH pour les CSM-GW (Figure 43 A2, A3) et pour les CSM-MO (Figure 43 B2, B3). De même, les histogrammes monoparamétriques SSC/FSC montrent que les CSM-GW (Figure 43 A1) ont une taille et une structure relative diminuées par rapport aux CSM-MO (Figure 43 B quelle que soit la condition de culture. De plus, nous observons que la population cellulaire est plus homogène après amplification en normoxie et en hypoxie avec du LPH pour les CSM-GW et en hypoxie et LPH pour les CSM-MO (Figure 43 A1, B1).

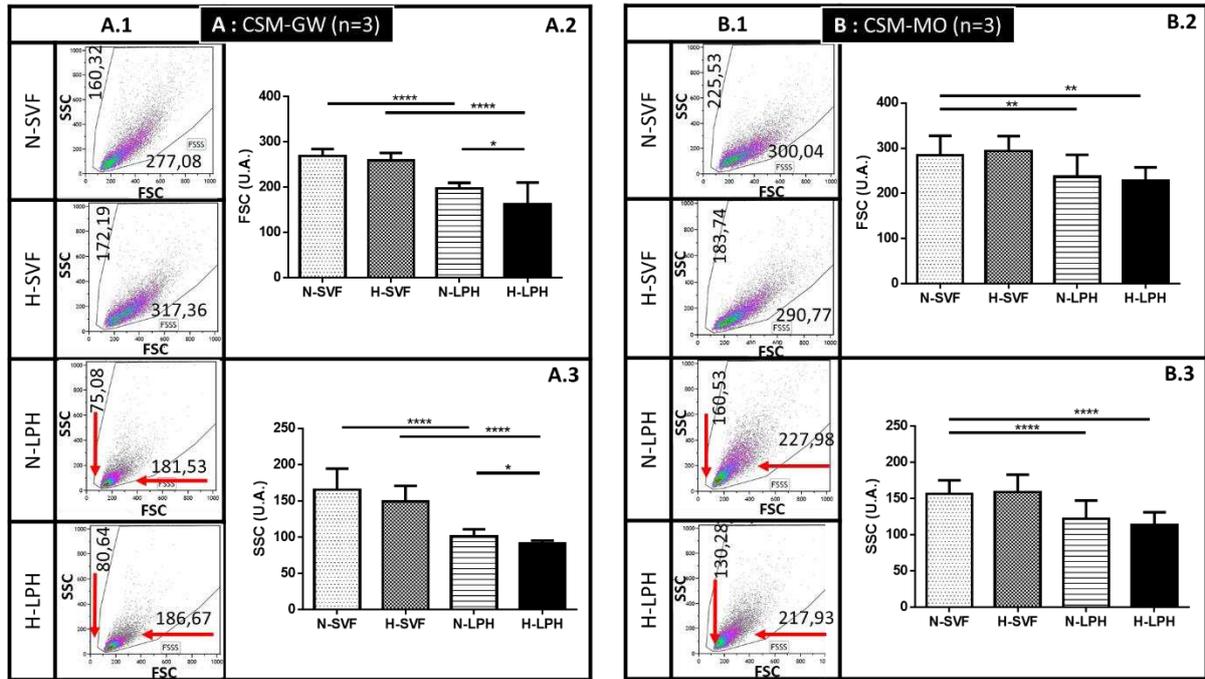


Figure 43 : Morphologie des CSM-GW et CSM-MO amplifiées dans les 4 conditions de culture

Les cellules stromales/souches mésenchymateuses (CSM) ont été amplifiées en condition de normoxie (N) ou d'hypoxie (H) avec du milieu supplémenté en sérum de veau fœtal (SVF) ou en lysat plaquettaire humain (LPH) jusqu'au passage 3 pour la gelée de Wharton (CSM-GW) (n=3) (A) et jusque passage 2 pour la moelle osseuse (CSM-MO) (n=3) (B). Les histogrammes biparamétriques FSC (Forward Scatter, relative size)/SSC (Side Scatter, relative structure) en unités arbitraires (U.A.) ont été obtenus par cytométrie en flux (Gallios, Beckman coulter) pour les CSM-GW (A.1) et les CSM-MO (B.1). Taille relative (FSC) pour les CSM-GW (A.2) et les CSM-MO (B.2) et structure relative (SSC) pour les CSM-GW (A.3) et les CSM-MO (B.3). Les résultats sont exprimés en moyenne \pm écart-type. $p < 0,05$ (*) à l'aide d'un test t apparié (GraphpadPrism).

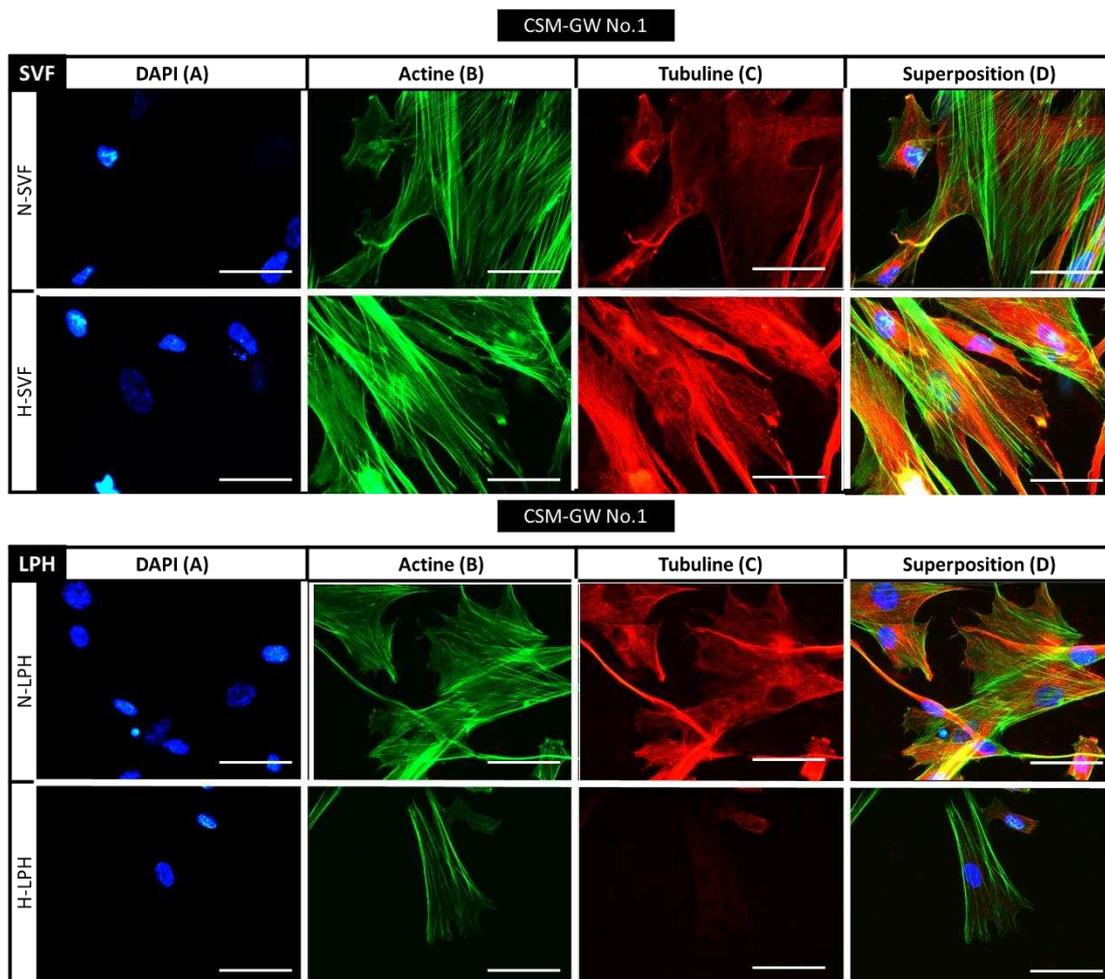


Figure 44 : Marquage immunofluorescent du cytosquelette d'actine, des microtubules et du noyau au DAPI des CSM -GW amplifiées dans les 4 conditions de culture

Les cellules stromales/souches mésenchymateuses de gelée de Wharton (CSM-GW) ($n=3$) ont été cultivées en condition de normoxie (N) ou d'hypoxie (H) avec du milieu supplémenté en sérum de veau fœtal (SVF) ou en lysat plaquettaire humain (LPH) et ensemencées à passage 3 sur des lamelles en verre à une densité de 1000 cellules/cm². A 70% de confluence, les CSM-GW ont été fixées avec de la PAF 2% et différents marquages ont été réalisés. Les images représentent celles obtenues pour un seul prélèvement et ont été prises au microscope à épifluorescence (Leica DMI3000B) (Echelle = 100 μ m) : noyau au DAPI (bleu) (A), cytosquelette d'actine avec la phalloïdine*Alexa 488 (vert) (B), β -tubuline (rouge) (C) superposition(D).

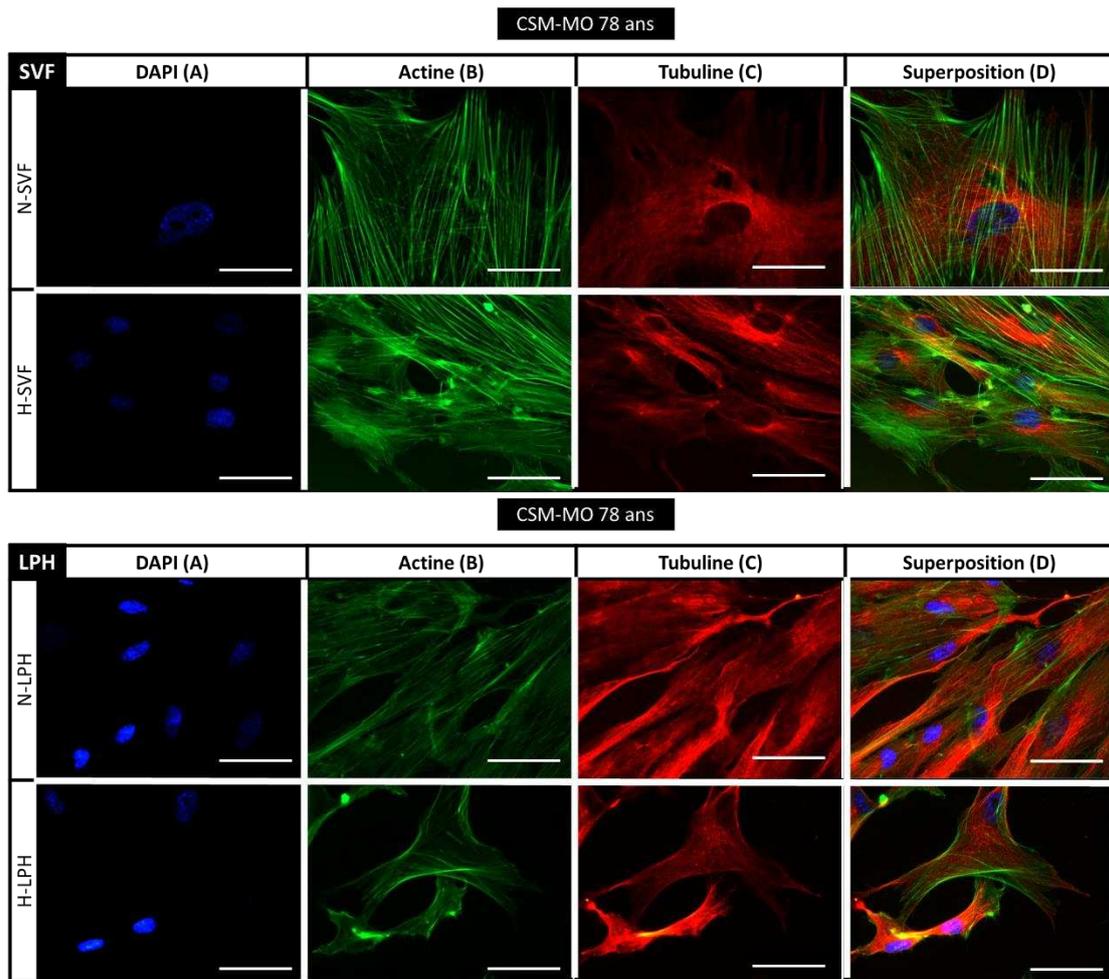


Figure 45 : Marquage immunofluorescent des microtubules, des fibres d'actine à la phalloïdine couplée à l'Alexa 488 et du noyau au DAPI des CSM -GW amplifiées dans les 4 conditions de culture

Les cellules stromales/souches mésenchymateuses de moelle osseuse (CSM-MO) ($n=3$) ont été cultivées en condition de normoxie (N) ou d'hypoxie (H) avec du milieu supplémenté en sérum de veau fœtal (SVF) ou en lysat plaquettaire humain (LPH) et ensemencées à passage 3 sur des lamelles en verre à une densité de 1000 cellules/cm². A 70% de confluence, les CSM-GW ont été fixées avec du PAF 2% et différents marquages ont été réalisés. Les images images représentent celles obtenues pour un seul prélèvement et ont été prises au microscope à épifluorescence (Leica DMI3000B) (Echelle = 100 μ m) : noyau au DAPI (bleu) (A), cytosquelette avec la phalloïdine*Alexa 488 (vert) (B), β -tubuline (rouge) (C) superposition(D).

Les CSM-GW et CSM-MO amplifiées avec du LPH ont donc une morphologie de type fibroblastique, avec une plus petite taille et contenant moins de granules que les cellules amplifiées avec du SVF, qui présentent elles une morphologie plus large. Etant donné que les CSM sénescents sont caractérisés par une taille et une présence de granules augmentées, nous avons par la suite analysé la sénescence des CSM-GW et CSM-MO afin de savoir si les CSM amplifiées avec du LPH seraient moins sénescents.

G. Sénescence des CSM-GW et CSM-MO

La sénescence a été évaluée grâce à la mesure de l'activité de l'enzyme β -galactosidase, fortement exprimée dans les cellules sénescents. Les résultats de la [Figure 46 A](#) montrent que pour les CSM-GW le pourcentage de cellules sénescents est plus faible jusqu'au passage 3 quand les cellules sont amplifiées dans du milieu supplémenté en LPH par rapport à celles amplifiées avec du SVF que ce soit

en normoxie ou en hypoxie. A passage 5, ce pourcentage augmente par rapport au passage 1 avec du milieu supplémenté en LPH et est supérieur à 20 % dans les 4 conditions de culture (N-SVF, H-SVF, N-LPH et H-LPH).

Concernant les CSM-MO, la *Figure 46 B* montre que le pourcentage de cellules sénescents est plus faible jusqu'à passage 2 quand les cellules sont amplifiées dans du milieu supplémenté en LPH par rapport au SVF que ce soit en normoxie ou en hypoxie. A passage 5, ce pourcentage augmente quel que soit la condition de culture.

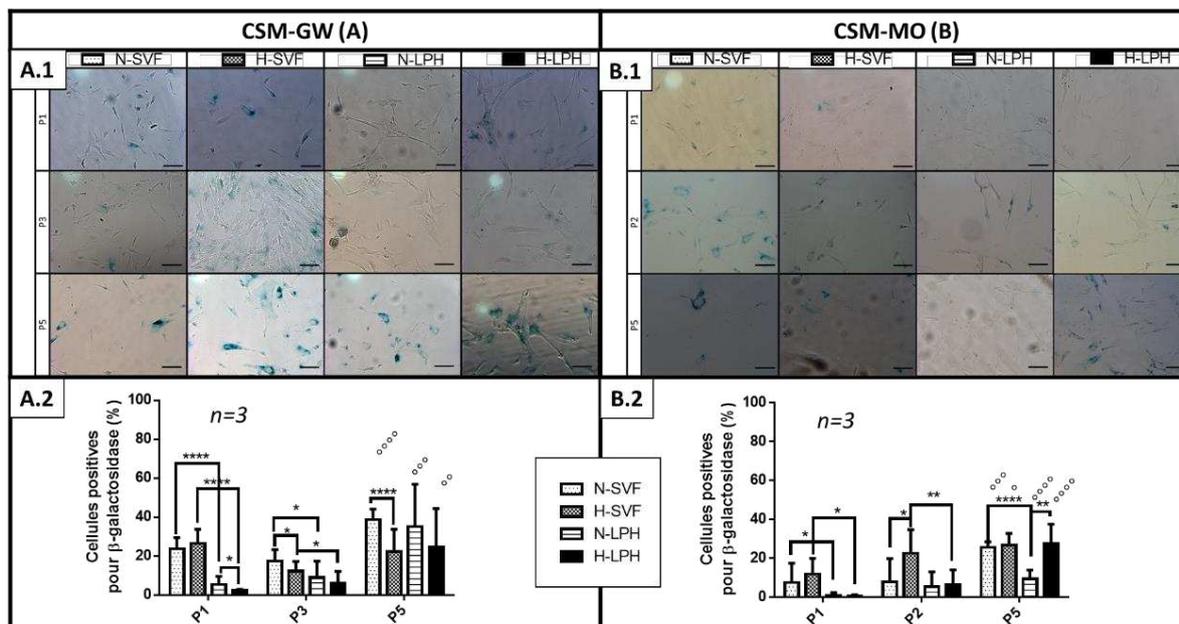


Figure 46 : Sénescence des CSM-GW et CSM-MO amplifiées dans les 4 conditions de culture

Les cellules stromales/souches mésenchymateuses de gelée de Wharton (CSM-GW) ($n=3$) (A) et de moelle osseuse (CSM-MO) ($n=3$) (B) ont été amplifiées en condition de normoxie (N) ou d'hypoxie (H) avec du milieu supplémenté en sérum de veau fœtal (SVF) ou en lysat plaquettaire humain (LPH). Après 4 jours de culture, un test de sénescence (activité β -galactosidase) a été réalisé. Des images des CSM-GW (A.1) et des CSM-MO (B.1) ont été prises au microscope à épifluorescence DMI3000B (Leica) (lumière transmise pour la coloration bleu spécifique des cellules sénescents, marquage du noyau au DAPI) afin de calculer le pourcentage de cellules positives à la β -galactosidase à passage 1 (P1), 3 (P3) et 5 (P5) pour les CSM-GW (A.2) et à passage 1 (P1), 2 (P2) et 5 (P5) pour les CSM-MO (B.2). 15 images par condition ont été prises. Les résultats sont exprimés en moyenne \pm écart-type $p < 0,05$ (*), versus P1 ($^{\circ}$) à l'aide d'un test t apparié (GraphpadPrism).

Ces résultats montrent que le pourcentage de cellules sénescents est inférieur quand les cellules sont amplifiées dans du milieu supplémenté en LPH par rapport au SVF jusqu'au passage 3 pour les CSM-GW et jusqu'au passage 2 pour les CSM-MO. De plus, cette faible sénescence pour les CSM-GW et CSM-MO est associée à de meilleures capacités de prolifération et à former des colonies. Pour la suite de ce travail, nous nous sommes donc intéressés aux propriétés fonctionnelles des CSM afin de savoir si l'amplification des CSM avec du LPH est corrélée avec des meilleures propriétés de migration et d'immunosuppression par rapport aux CSM amplifiées avec du SVF

H. Propriétés de migration des CSM en fonction des conditions de culture

Concernant les propriétés de migration, les résultats de la *Figure 47* montrent que les ratios de surface occupée par les CSM-GW et les CSM-MO ayant migré est plus important après amplification avec du milieu supplémenté en LPH par rapport au SVF que ce soit en condition d'hypoxie ou de normoxie. De plus, pour les CSM-MO et CSM-GW, ces ratios augmentent en condition d'hypoxie par rapport à la normoxie que soit avec du SVF ou du LPH comme supplément de milieu de culture. Les

CSM-GW et CSM-MO ont donc de meilleures propriétés de migration après amplification avec du LPH, mais aussi après amplification en hypoxie par rapport à la normoxie.

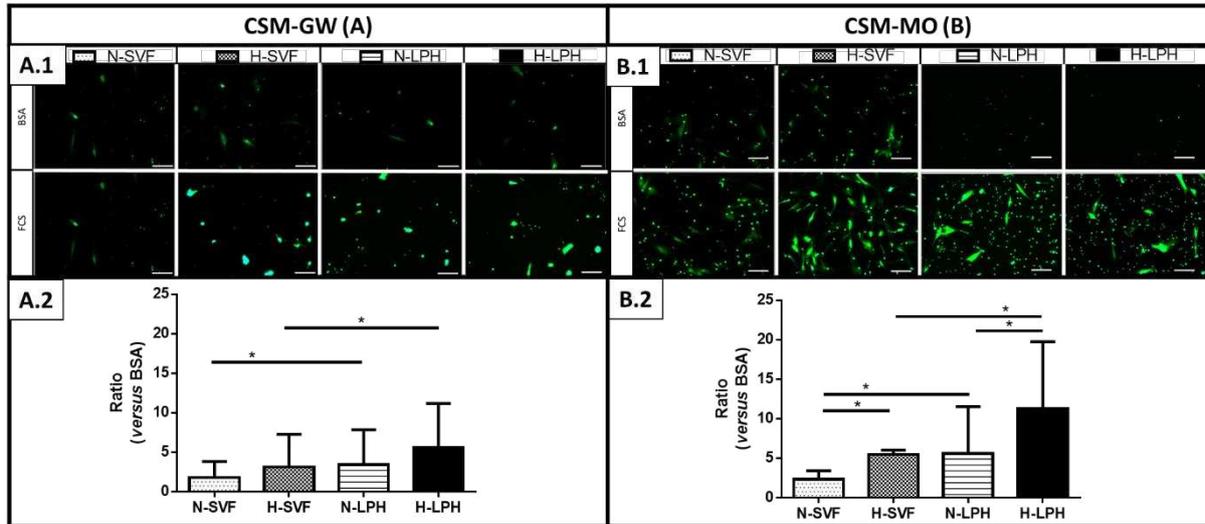


Figure 47 : Migration des CSM-GW et CSM-MO amplifiées dans les 4 conditions de culture

Les cellules stromales/souches mésenchymateuses (CSM) ont été amplifiées en condition de normoxie (N) ou d'hypoxie (H) avec du milieu supplémenté en sérum de veau fœtal (SVF) ou en lysat plaquettaire humain (LPH) jusqu'au passage 3 pour la gelée de Wharton (CSM-GW) (n=3) (A) et jusqu'au passage 2 pour la moelle osseuse (CSM-MO) (n=3) (B). Les CSM ont été ensemencées dans des inserts « Fluoroblok ». La migration des CSM à travers la membrane en présence de sérum de veau fœtal (SVF) à 30 % comme chimio attractant a été comparée à celle en présence de sérum albumine bovine (BSA) 0,25% comme contrôle après 20 heures d'incubation en condition normoxie. Les images ont été prises au microscope à épifluorescence DMI3000B (Leica) afin de visualiser la distribution des CSM-GW (A.1) et des CSM-MO (B.1) ayant migré de l'autre partie de la membrane après marquage à la calcéïne. La surface occupée par les CSM ayant migré pour 10 images par condition a été analysée avec le logiciel Image J (National Institute of Health, USA) afin de calculer le ratio entre la surface occupée pour la condition SVF par rapport au contrôle (BSA) pour les CSM-GW (A.2) et les CSM-MO (B.2). Les résultats sont exprimés en moyenne \pm écart-type $p < 0,05$ (*) à l'aide d'un test t non apparié (GraphpadPrism).

I. Propriétés immunosuppressives des CSM-GW et CSM-MO

1. Immunosuppression : Test d'inhibition de la prolifération lymphocytaire par les CSM-GW et CSM-MO amplifiées dans les 4 conditions de culture

Les propriétés immunosuppressives ont été évaluées en calculant le pourcentage d'inhibition de la prolifération des lymphocytes T CD4 activés (obtenus après un tri CD3) lors de la co-culture avec les CSM-GW et CSM-MO amplifiées dans les 4 conditions de culture (Figure 48).

Trois prélèvements de CSM-GW et CSM-MO amplifiées dans les 4 conditions de culture ont été analysés dans un premier temps. Nous avons observé les mêmes tendances pour les CSM-GW et CSM-MO à savoir : une inhibition de la prolifération des lymphocytes T CD4 activés plus marquée après expansion en hypoxie comparé à la normoxie. De plus, les pourcentages d'inhibition de la prolifération des LT CD4 activés semblent être équivalents entre les 2 sources de CSM (CSM-GW et CSM-MO) quelle que soit la condition de culture (CSM-GW : N-SVF 50% et H-SVF 90% ; N-LPH 40% et H-LPH 60%) (CSM-MO : N-SVF 70% et H-SVF 90% ; N-LPH 60% et H-LPH 80%) (Figure 48 B).

Afin d'expliquer le pourcentage d'inhibition de la prolifération des LT CD4 activés plus élevé pour les CSM amplifiées en hypoxie, nous avons réalisé des expériences complémentaires dont les résultats seront présentés par la suite. Ces expériences ont été réalisées avec une seule source de CSM, les CSM-GW, afin de limiter les conditions. Pour cela, nous avons utilisés 11 prélèvements de CSM-GW supplémentaires amplifiés avec du LPH comme supplément de milieu de culture et contrôlé l'immunosuppression à chaque fois. Nous avons donc inclus ces 11 prélèvements supplémentaires de

CSM-GW amplifiées avec du lysat plaquettaire comme supplément de milieu de culture, ce qui fait 14 échantillons de CSM-GW au total (n=14).

Il faut tout de même noter, que même si la majorité des prélèvements de CSM-GW amplifiées avec du LPH montrent cette tendance (meilleures propriétés immunosuppressives après amplification en hypoxie), certains prélèvements ne montrent pas de différences.

Les CSM-GW et CSM-MO conservent donc des propriétés immunosuppressives quelle que soit la condition de culture (N-SVF-H-SVF, N-LPH et H-LPH) avec un effet bénéfique de l'hypoxie. De plus, cette tendance est observée pour la majorité des prélèvements de CSM-GW amplifiées avec du LPH, même si certains prélèvements ne montrent pas de différences.

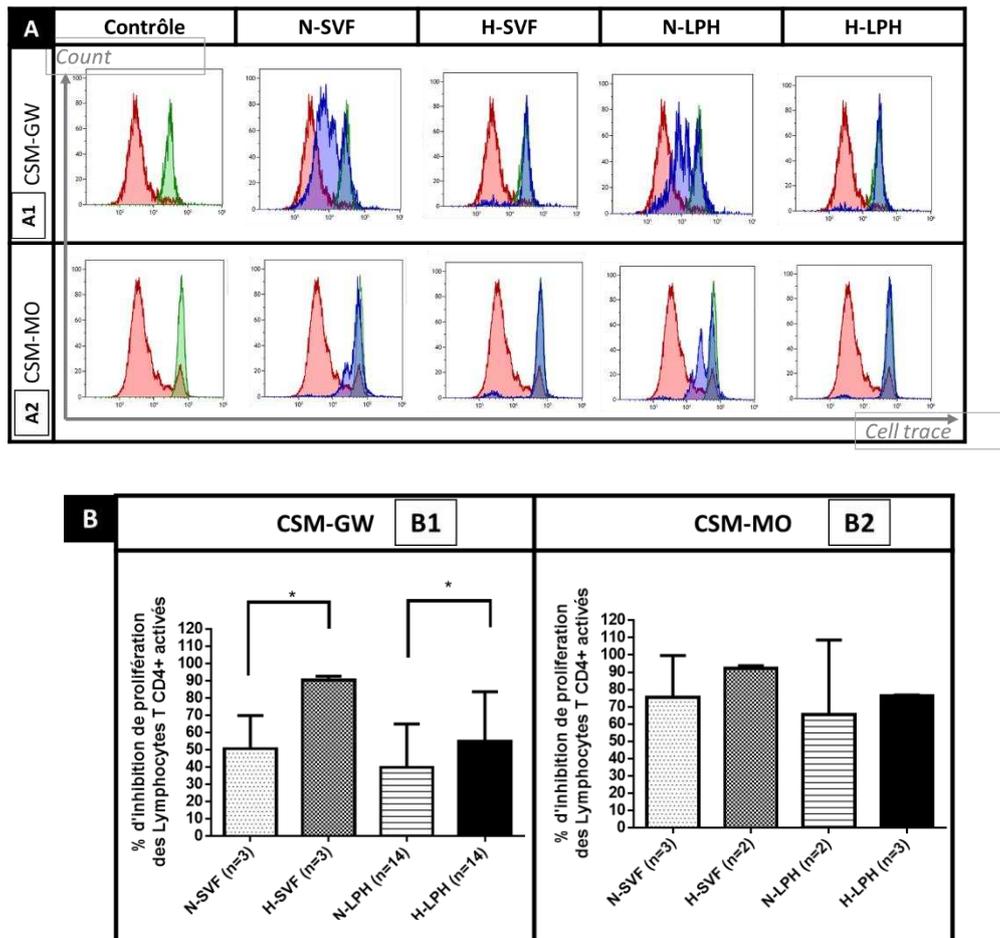


Figure 48 : Immunosuppression des CSM-GW et CSM-MO amplifiées dans les 4 conditions de culture

Les cellules stromales/souches mésenchymateuses (CSM) ont été amplifiées en condition de normoxie (N) ou d'hypoxie (H) avec du milieu supplémenté en sérum de veau fœtal (SVF) ou en lysat plaquettaire humain (LPH). L'amplification s'est faite jusqu'au passage 3 pour la gelée de Wharton (CSM-GW) (n=3) et jusque passage 2 pour la moelle osseuse (CSM-MO) (n=3). 50 000 CSM ont été co-cultivées avec 50 000 lymphocytes T CD3 (ratio 1:1) activés par des anticorps anti CD3 et CD28 comme dans une situation allogénique en condition de normoxie. Pour la co-culture, le milieu RPMI1640 supplémenté avec du sérum de veau fœtal (SVF) a été utilisé. Les lymphocytes T ont été marqués au préalable au cell trace (cell proliferation dye efluor®450) (ThermoFisher). Histogramme monoparamétrique de de la prolifération des lymphocytes T CD4 activés en présence ou non des CSM-GW (A1) ou des CSM-MO (A2) obtenus par cytométrie en flux (Gallios, Beckman Coulter) (Rouge : Lymphocytes T CD4 activés ; Vert : Lymphocytes T CD4 non activés ; Bleu : Lymphocytes T CD4 activés en co-culture avec les CSM). Représentation du pourcentage d'inhibition de prolifération par les CSM-GW (B1) et les CSM-MO (B2) des lymphocytes T CD4 activés. Les résultats sont exprimés en moyenne ± écart-type p < 0,05 (*) à l'aide d'un test t apparié (GraphpadPrism).

2. Mécanismes impliqués dans l'immunosuppression des CSM-GW

Des expériences complémentaires ont été réalisées avec les CSM-GW amplifiées en normoxie et en hypoxie avec du milieu supplémenté en LPH, afin de savoir si les propriétés immunosuppressives des CSM-GW impliquent des mécanismes différents suivant la condition d'oxygène au moment de l'amplification. Devant le coût et la lourdeur des expériences, nous nous sommes uniquement concentrés sur les CSM-GW amplifiées avec du LPH. En effet, pour chaque expérience réalisée, il a été nécessaire de s'assurer que les CSM-GW utilisées étaient immunosuppressives grâce à un test d'inhibition de la prolifération lymphocytaire.

a) Apoptose des lymphocytes T

Les résultats du marquage à l'annexine V (*Figure 49 A1*) montrent une augmentation de l'apoptose des lymphocytes T activés en co-culture avec des CSM-GW amplifiées en condition de normoxie (20 %) et d'hypoxie (30%) avec du milieu supplémenté en LPH. Bien que la différence ne soit pas significative entre la condition N-LPH et H-LPH, nous observons une tendance, avec plus de LT activés apoptotiques après co-culture avec des CSM-GW amplifiées en H-LPH. Ces résultats sont associés à une augmentation de l'expression de Fas ligand (FasL), et à l'augmentation de la sécrétion de FasL soluble par les CSM-GW amplifiées en N-LPH et H-LPH et après co-culture avec les LT activés par rapport à des CSM-GW seules (*Figure 49 A2 et A3*) (tendance non significative). En revanche, l'expression de PD-L1 par les CSM-GW, qui est impliquée dans l'inactivation des lymphocytes T, n'est pas modifiée après co-culture avec les LT activés quelle que soit la condition d'amplification (N-LPH ou H-LPH) (*Figure 49 A4*). **L'inhibition de la prolifération des lymphocytes T activés par CD3 et CD28, par les CSM-GW amplifiés en N-LPH et H-LPH pourrait donc mettre en jeu des mécanismes d'apoptose.**

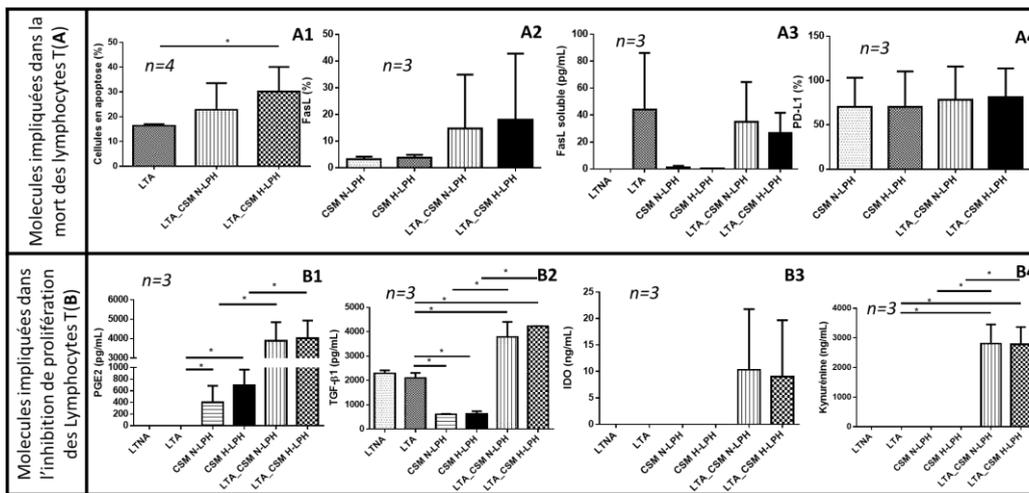


Figure 49 : Molécules impliquées dans la mort et l'inhibition de la prolifération des lymphocytes T activés

Les cellules stromales/souches mésenchymateuses de gelée de Wharton (CSM-GW) ont été cultivées en condition de normoxie (N) ou d'hypoxie (H) avec du milieu supplémenté en lysat plaquettaire humain (LPH) et ensemencées à passage 3 à une densité de 1000 cellules/cm². 50 000 CSM ont été co-cultivées avec 50 000 lymphocytes T CD3 (ratio 1:1) activés par des anticorps anti CD3 et CD28 comme dans une situation allogénique en condition de normoxie avec du milieu RPMI1640 supplémenté avec du sérum de veau fœtal (SVF). L'apoptose des lymphocyte T (**A1**) (n=4), l'expression de CD95 ligand (CD95L ou FasL) membranaire (n=3) (**A2**) et de Programmed death ligand 1 (PD-L1) (n=3) (**A4**) ont été analysées par cytométrie en flux (Gallios, Beckman Coulter). Le FasL soluble (n=3) (**A3**), la prostaglandin E2 (PGE2) (n=3) (**B1**), le transforming growth factor-beta 1 (TGF-β1) (n=3) (**B2**), l'indoleamine 2,3-dioxygénase (IDO) (n=3) (**B3**) et la Kynurénine (n=3) (**B4**) ont été quantifiées dans les surnageants de culture par ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay). Les résultats sont exprimés en moyenne ± écart-type p < 0,05 (*) à l'aide d'un test t apparié (GraphpadPrism). LTA = Lymphocytes T activés ; LTNA = Lymphocytes T non activés.

b) Molécules impliquées dans l'inhibition de la prolifération des lymphocytes T

Afin de mieux comprendre l'effet de la condition d'oxygène au moment de l'amplification des CSM sur leurs propriétés immunosuppressives, nous avons choisi d'analyser l'expression des principaux facteurs décrits dans la littérature pour leur implication dans la régulation des propriétés immunosuppressives des lymphocytes T tels que l'indoléamine 2,3-dioxygénase (IDO) (i), la prostaglandine E2 (PGE2) (ii), le transforming growth factor (TGFβ) ou le programmed death-ligand 1 (PD-L1) (iv). IDO est une enzyme sécrétée par les CSM qui déplete le milieu en tryptophane (un acide aminé nécessaire à la prolifération des lymphocytes T) et produit un métabolite, la kynurénine, toxique pour les lymphocytes T. De plus, les CSM expriment 2 isoformes de la cyclooxygénase (COX-1 et COX-2) qui permettent la synthèse de la PGE2 (qui inhibe la prolifération des lymphocytes T) à partir d'acide arachidonique. Le TGF-β est une cytokine anti-inflammatoire qui agit sur l'ensemble des cellules du système immunitaire tandis que PD-L1 est exprimé à la surface des CSM et inhibe la prolifération des lymphocytes T.

Dans un premier temps, nous nous sommes intéressés à l'expression des ARNm, impliqués dans l'inhibition de la prolifération des LT, par les CSM-GW amplifiées en normoxie et hypoxie avec du milieu supplémenté en LPH. Les résultats de PCR quantitative montrent que les CSM-GW expriment les molécules : COX-1 et COX-2, IDO, TGF-β1 and PD-L1 sans différence significative entre les CSM amplifiées en N-LPH et H-LPH (Figure 50).

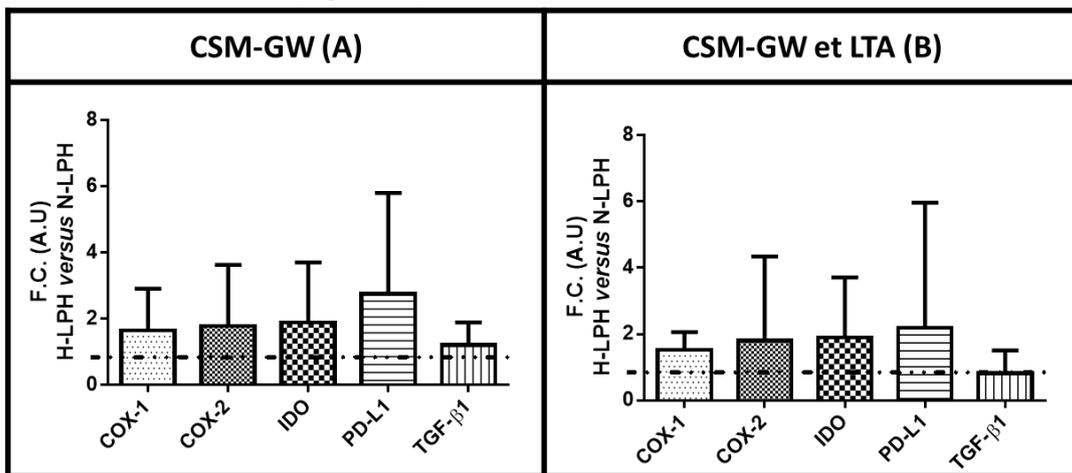


Figure 50 : Expression des ARNm des molécules impliquées dans l'inhibition de la prolifération des lymphocytes T dans les CSM-GW

Les cellules stromales de gelées de Wharthon (CSM-GW) ont été amplifiées en condition de normoxie (N) ou d'hypoxie (H) avec du milieu α MEM complet supplémenté en lysat plaquettaire humain (LPH) à une densité de 1000 cellules/cm². Elles ont ensuite été co-cultivées avec des lymphocytes T (LT) CD3+ (ratio 1 : 1) activés (LTA) par des anticorps de souris anti CD3 et anti-CD28 comme dans un contexte allogénique en normoxie avec du milieu RPMI1640 complet supplémenté avec du sérum de veau fœtal (SVF). Les ARNm ont été extraits au Qiazol (QIAGEN) selon les recommandations du fournisseur et leur expression relative a été analysée par RT-qPCR (quantitative real time polymerase chain reaction) (Stepone, Applied Biosystems) avec du SYBRgreen (Biorad) pour les CSM-GW seules (A) ou co-cultivées avec des LT CD3+ (B) pour différents genes : COX-1 and COX-2 (Cyclooxygenase 1 and 2), PD-L1 (Programmed death-ligand 1), TGF-β1 (Transforming growth factor beta 1) (méthode 2-ΔΔCt). FC = fold change ; U.A. = unités arbitraires.

Dans un second temps, nous nous sommes intéressés aux facteurs solubles sécrétés par les CSM-GW amplifiées en N-LPH et H-LPH et mises en co-culture avec les lymphocytes T activées. La co-culture a été réalisée en condition de normoxie avec du milieu de co-culture supplémenté en SVF. Les CSM seules « contrôles » ont également été cultivées dans les mêmes conditions que la co-culture. Les résultats des tests ELISA montrent qu'après co-culture avec des LT activés, la sécrétion de PGE2 (Figure 49 B1) ou de TGF-β1 (Figure 49 B2) par les CSM-GW est augmentée de manière significative que ce soit

en N-LPH et H-LPH par rapport aux CSM-GW seules. Aussi, la présence d'IDO (*Figure 49 B3*) ou de son produit, la kynurénine dans les surnageants (*Figure 49 B4*) a été uniquement détectée dans les CSM-GW en co-culture avec des LT activés, mais sans différence significative entre les CSM-GW amplifiées en N-LPH et H-LPH. Les données montrent que la sécrétion de molécules telles que PGE2 et TGF- β 1, ainsi que de l'expression d'IDO1 contribuent à l'inhibition de la prolifération par les CSM-GW des LT activés, mais qu'aucune sécrétion ou expression différentielle significative de ces molécules selon la tension en oxygène lors de l'amplification n'a pu être mise en évidence

c) *Implication du facteur de transcription HIF-1 α*

Il est montré que le facteur de transcription HIF-1 α (Hypoxia Inducible Factor 1 alpha) permet aux cellules de s'adapter aux conditions faibles en oxygène et qu'il régule l'expression de gènes cibles impliqués dans l'angiogenèse, la migration et le métabolisme des CSM (Haque et al., 2013). De plus, il a été proposé qu'HIF-1 α puisse gouverner les propriétés immunorégulatrices des CSM de souris en reprogrammant leur métabolisme (Contreras-Lopez et al., 2020).

Afin de vérifier l'implication du facteur de transcription HIF-1 α dans les propriétés immunosuppressives des CSM-GW, des expériences complémentaires à partir des CSM-GW amplifiées en normoxie et en hypoxie avec du milieu supplémenté en LPH et traitées pendant 48 heures avec des molécules qui modulent la localisation et/ou l'action de HIF-1 α ont été réalisées. Nous avons utilisé :

- ✓ La DFO (deferroxamine mesylate) qui chélate le fer un cofacteur nécessaire à l'hydroxylation de HIF-1 α par la prolyl hydroxylase, une étape nécessaire à l'ubiquitination et à la dégradation de HIF-1 α par le protéasome. L'utilisation de la DFO permet la translocation nucléaire de HIF-1 α dans les CSM-GW amplifiées en normoxie et sert de contrôle positif pour prévenir sa dégradation une fois que les CSM-GW amplifiées en hypoxie ont été retirées de l'hypoxie.
- ✓ La DMOG (diméthylaloxaloylglycine) un inhibiteur de la prolyl hydroxylase, qui va hydroxyler HIF-1 α pour permettre son ubiquitination et sa dégradation par le protéasome en normoxie. Son utilisation permet la translocation nucléaire de HIF-1 α .
- ✓ Et le CAY10585, un inhibiteur de HIF-1 α qui supprime la transcription des gènes cibles de HIF-1 α .

Dans un premier temps, après 48 heures de traitement, le marquage de HIF-1 α a été analysé dans les CSM-GW seules amplifiées en normoxie et en hypoxie avec du milieu supplémenté en LPH. Les images obtenues par microscopie à épifluorescence montrent que HIF-1 α est localisé au niveau cytoplasmique dans les CSM-GW après expansion en normoxie (*Figure 51 A1*) et au niveau nucléaire après expansion en hypoxie (*Figure 51 A4*). En normoxie, après traitement des CSM-GW par la DFO (*Figure 51 A2*) ou la DMOG (*Figure 51 A3*), HIF-1 α est transloqué au niveau du noyau. En hypoxie, après traitement des CSM-GW par la DFO ou par CAY10585, HIF-1 α est transloqué au niveau du noyau (*Figure 51 A5 et A6*). La DFO a également été utilisée en hypoxie comme contrôle positif de la translocation nucléaire de HIF-1 α , pour maintenir HIF-1 α dans le noyau.

Dans un second temps, après 48 heures de traitement, les CSM-GW amplifiées en normoxie et en hypoxie ont été co-cultivées avec des lymphocytes T activés.

La translocation nucléaire de HIF-1 α dans les CSM-GW amplifiées en normoxie et pré-traitées par DMOG ou DFO devrait permettre d'augmenter les propriétés immunosuppressives des CSM-GW par rapport à des CSM-GW amplifiées en normoxie et sans traitement. Les résultats montrent, après prétraitement des CSM-GW cultivées en normoxie par de la DFO, une légère augmentation (non

significative) du ratio de pourcentage d'inhibition de la prolifération des lymphocytes T CD4 activés par rapport à des cellules non traitées contrairement au traitement par DMOG, qui ne montre aucun effet. La translocation nucléaire de HIF-1 α dans les CSM-GW amplifiées en normoxie et pré-traitées par DMOG ou DFO, n'a pas induit d'augmentation de leurs propriétés immunosuppressives.

En hypoxie, HIF-1 α est transloqué au niveau nucléaire et son inhibition par CAY10585 devrait entraîner une baisse des propriétés immunosuppressives des CSM-GW par rapport à des CSM-GW amplifiées en hypoxie et sans traitement. Les résultats montrent, après prétraitement des CSM-GW cultivées en hypoxie par de la DFO, une légère augmentation (non significative) du ratio de pourcentage d'inhibition de la prolifération des lymphocytes T CD4 activés par rapport à rapport à des cellules non traitées contrairement au traitement par CAY10585, qui ne montre aucun effet. L'utilisation de l'inhibiteur HIF-1 α dans les CSM-GW amplifiées en hypoxie et pré-traitées par CAY10585, n'a pas induit d'augmentation de leurs propriétés immunosuppressives.

Même si une tendance est observée en normoxie avec le prétraitement par DFO, les conditions expérimentales n'ont pas permis de montrer une implication directe du facteur de transcription HIF-1 α dans les propriétés immunosuppressives des CSM-GW amplifiées en N-LPH et H-LPH.

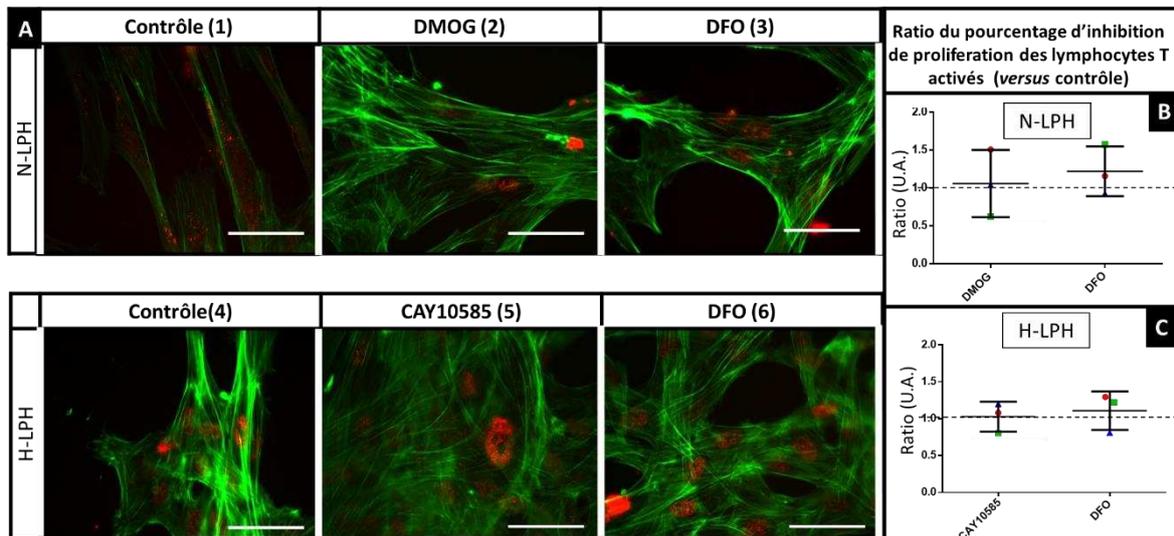


Figure 51 : Marquage immunofluorescent de HIF-1 α et à la phalloïdine couplée à l'Alexa 488 des fibres d'actine et immunosuppression après des traitements modulant l'action et/ou la localisation de HIF-1 α

Marquages immunofluorescents (A). Les cellules stromales/souches mésenchymateuses de gelée de Wharton (CSM-GW) ont été cultivées en condition de normoxie (N) ou d'hypoxie (H) avec du milieu supplémenté en lysat plaquettaire humain (LPH) et ensemencées à passage 3 sur des lamelles en verre ou dans des boîtes de culture T75 à une densité de 1000 cellules/cm². A 60 % de confluence, les CSM-GW ont été incubées avec différentes molécules pendant 48 heures : (DMOG) Diméthylloxaloylglycine (Abcam) un inhibiteur de la prolyl hydroxylase qui empêche la dégradation de HIF-1 α , (2), CAY10585 (Abcam) un inhibiteur de HIF1- α qui bloque la transcription des gènes cibles de HIF-1 (5) ou Deferoxamine mesylate (DFO) (Abcam) (chélate le fer un cofacteur nécessaire à l'hydroxylation de HIF) (3-6) ; ou sans molécules pour le contrôle (1-4). Les CSM-GW sur lamelles ont été fixées par de la paraformaldéhyde 2% et marquées avec un anticorps anti HIF-1 α (Abcam) et un anticorps secondaire*Alexa fluor 555 (rouge) (ThermoFisher). Le cytosquelette d'actine a été marqué avec la phalloïdine*Alexa 488 (vert) (ThermoFisher). Des images ont été prises au microscope à fluorescence (Leica DMI3000B) (Echelle = 100 μ m). Les CSM en boîte de culture ont été trypsinées après traitement et co-cultivées avec des lymphocytes T CD3 (ratio 1:1) activés par des anticorps anti CD3 et CD28 comme dans une situation allogénique en condition de normoxie avec du milieu RPMI1640 supplémenté avec du sérum de veau fœtal (SVF) pendant 5 jours. **L'inhibition de la prolifération des lymphocytes T CD4 (marqués au cell trace) par les CSM-GW amplifiées en normoxie (B) ou en hypoxie (C) et stimulées par les molécules (DMOG, CAY10585 and DFO) a été analysée par cytométrie en flux (Gallios, Beckman Coulter). Ce pourcentage a été normalisé par rapport à celui obtenu pour les CSM-GW contrôle non stimulées pour 3 échantillons. Les résultats sont exprimés en moyenne \pm écart-type $p < 0,05$ (*) à l'aide d'un test t apparié (GraphpadPrism).**

d) Implication du métabolisme des CSM-GW

Le facteur de transcription HIF-1 α régule des gènes cibles impliqués dans le métabolisme des CSM (Haque et al., 2013) et pourrait gouverner les propriétés immunorégulatrices des CSM de souris en reprogrammant leur métabolisme (Contreras-Lopez et al., 2020). Le métabolisme énergétique de la cellule permet la production d'énergie sous forme d'ATP *via* la glycolyse (entraînant la production de lactate) au niveau cytosolique ne nécessitant pas d'oxygène (i), le cycle de krebs au niveau mitochondrial (ii) et la phosphorylation oxydative (iii) au niveau mitochondrial. De plus, lors de la production d'énergie au niveau mitochondrial, des espèces réactives de l'oxygène (ROS) et de l'azote (RNS) sont produites. Bien que la mitochondrie constitue la source majoritaire de ROS et de RNS, une autre partie est produite au niveau cytosolique *via* la NOX (NADPH oxydase).

Nous avons donc quantifié les ROS et les RNS grâce à la sonde CM-H₂DCFDA par cytométrie en flux. Les résultats montrent que la production de ROS est augmentée de manière significative par les CSM-GW amplifiées en hypoxie par rapport à la normoxie (Figure 52 A1). De plus, les résultats de dosage de glucose et lactate montrent une tendance à l'augmentation de la consommation de glucose (Figure 52 A2) et la production de lactate (Figure 52 A3) par les CSM-GW amplifiées en hypoxie comparées à celles amplifiées en normoxie avant la co-culture avec les lymphocytes T. **Les résultats montrent donc que, dans notre étude, les CSM-GW amplifiées en hypoxie et en normoxie n'ont pas le même métabolisme avant la co-culture avec les lymphocytes T.**

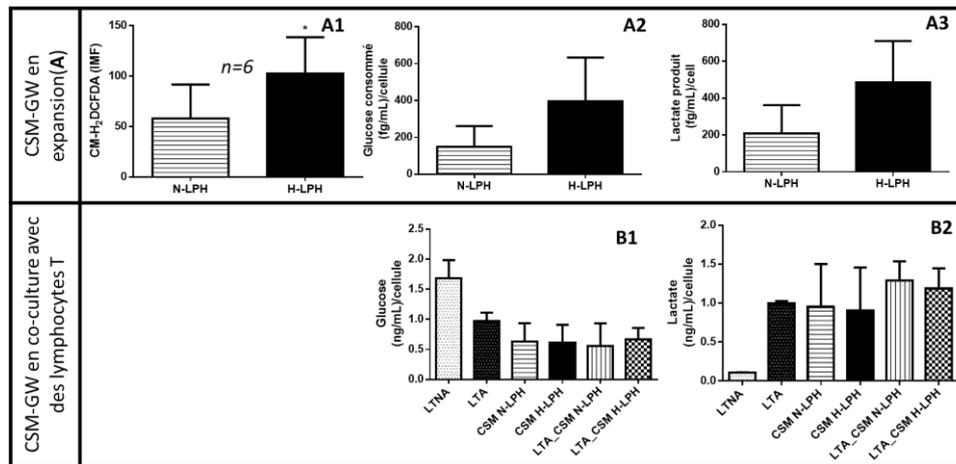


Figure 52 : Métabolisme et immunosuppression des CSM-GW

Les cellules stromales/souches mésenchymateuses de gelée de Wharton (CSM-GW) ont été cultivées en condition de normoxie (N) ou d'hypoxie (H) avec du milieu α MEM supplémenté en lysat plaquettaire humain (LPH) et ensemencées à une densité de 1000 cellules/cm² (A). La production d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) intracellulaires a été quantifiée par cytométrie en flux avec la sonde CM-H₂DCFDA (ThermoFisher) (IMF = intensité médiane de fluorescence) (A1). La consommation de glucose (A2) et la production de lactate (A3) dans le surnageant a été quantifiée par un automate (Thermo Scientific™ Gallery™). Les CSM-GW furent ensuite co-cultivées avec des lymphocytes T CD3 (ratio 1:1) activés par des anticorps anti CD3 et CD28 comme dans une situation allogénique en condition de normoxie avec du milieu RPMI1640 supplémenté avec du sérum de veau fœtal (SVF) pendant 5 jours (B). Les lymphocytes T ont été marqués au préalable par du cell trace (cell proliferation dye efluor®450 proliferation). Après 5 jours, la consommation de glucose (B1) et la production de lactate (B2) ont été quantifiées par un automate (Thermo Scientific™ Gallery™) afin de calculer le ratio lactate/glucose (B3). Les résultats sont exprimés en moyenne \pm écart-type $p < 0,05$ (*) à l'aide d'un test t apparié (GraphpadPrism). LTA = Lymphocytes T activés ; LTNA = Lymphocytes T non activés.

Les résultats obtenus dans cette partie, sont récapitulés dans le [Tableau 23](#).

Tableau 23 : Tableau récapitulatif des résultats obtenus dans la partie 1 concernant l'effet des conditions de culture sur le comportement des CSM-GW et CSM-MO

	N-SVF	H-SVF	N-LPH	H-LPH
Critères de l'ISCT	Validé	Validé	Validé	Validé
CFU	-	+*	↑***	↑***
Prolifération	oui	oui	↑	↑
Morphologie	large	large	fibroblastique	fibroblastique
Sénescence	↑	↑	↓	↓
Migration	oui	↑	↑↑	↑↑↑
Immunosuppression	oui	↑**	oui	↑**

* pour CSM-MO

** versus normoxie

*** versus SVF

CFU : colony forming unit ; **CSM** : cellules stromales mésenchymateuses ; **GW** : gelée de Wharton ; **H** : hypoxie ; **ISCT** : international society for cell and gene therapy ; **LPH** : lysat plaquettaire ; **MO** : moelle osseuse ; **N** : normoxie ; **SVF** : serum de veau foetal : ↑ : augmente ; ↓ : diminue ; - : négatif pour les CSM-GW

II. Partie 1 : Discussion

Dans cette partie du travail, nous nous sommes intéressés au microenvironnement de culture et à son impact sur les CSM. En effet, comme précédemment décrit, les CSM sont des cellules très sensibles à leur environnement. Nous avons ainsi étudié l'effet des suppléments dans le milieu de culture (LPH ou SVF) et du taux d'oxygène sur les caractéristiques et la fonctionnalité des CSM.

Conformément aux recommandations de l'ISCT (Dominici et al., 2006), les CSM-GW et CSM-MO ont montré des propriétés d'adhésion au plastique quel que soit le supplément du milieu de culture (LPH/SVF) et quelle que soit la condition d'oxygène (hypoxie/normoxie). D'autres travaux sur des CSM cultivées en normoxie rapportent des changements morphologiques en présence de LPH ou SVF (Becherucci et al., 2018; Bernardo and Fibbe, 2013; Fernandez-Rebollo et al., 2017; Griffiths et al., 2013; Skific et al., 2018). Cependant, la majorité de ces travaux concerne les CSM-MO cultivées en normoxie. En effet, peu de d'études concernent les CSM-GW et aucune ne compare la morphologie des CSM-MO et CSM-GW amplifiées dans les quatre conditions de culture testées dans notre étude. Il était également important de vérifier que les conditions de culture n'affectent pas le phénotype de surface des CSM.

En clinique, les CSM-GW étant utilisées à la fin du passage 3 et les CSM-MO à la fin du passage 1, l'analyse du phénotype par cytométrie en flux a été réalisée à passage 3 pour les CSM-GW mais à passage 2 pour les CSM-MO, car le nombre de CSM-MO disponibles à la fin du passage 1 n'était pas suffisant pour réaliser toutes les expériences souhaitées. Nos résultats montrent que les CSM-GW et CSM-MO expriment les marqueurs recommandés par l'ISCT lorsqu'elles ont été amplifiées dans les 4 conditions de culture (N-SVF, H-SVF, N-LPH et H-LPH). Ces données sont en accord avec celles de la littérature, où il est décrit que l'expression des principaux marqueurs phénotypiques des CSM cultivées dans du milieu supplémenté en LPH ou SVF en conditions de normoxie n'est pas modifiée (Becherucci et al., 2018; Bernardo et al., 2011; Doucet et al., 2005; Fazzina et al., 2016; Fernandez-Rebollo et al., 2017; Griffiths et al., 2013; Juhl et al., 2016; Kandoi et al., 2018; Naskou et al., 2018). On note cependant que peu de travaux concernent les CSM-GW et que jusqu'alors, aucune étude ne reportait la comparaison de l'expression des marqueurs de surface des CSM-MO et CSM-GW amplifiées dans les quatre conditions de culture utilisées dans ce travail.

De plus, ces CSM conservent leurs principales capacités de différenciation. En effet, nous avons montré que quelles que soient les conditions de culture, les CSM-MO se différencient en ostéocytes et adipocytes tandis que les CSM-GW se différencient en ostéocytes et chondrocytes, mais pas en adipocytes. Ces résultats sont en accord avec ceux de la littérature qui montrent que les CSM-MO se différencient en ostéocytes et adipocytes après amplification avec du milieu supplémenté en LPH et en SVF (Becherucci et al., 2018; Bernardo et al., 2011; Doucet et al., 2005; Fazzina et al., 2016; Juhl et al., 2016; Kandoi et al., 2018; Naskou et al., 2018; Skific et al., 2018). De plus, des travaux de notre équipe ont montré que les CSM-GW cultivées dans du milieu de culture supplémenté en SVF avaient du mal à se différencier en adipocytes, contrairement aux CSM-MO (Reppel et al., 2014). Cela pourrait être dû l'hormone 17β -œstradiol qui interfère avec le facteur de transcription PPAR- γ (peroxisome proliferator-activated receptor- γ) qui induit la différenciation adipocytaire (Jeong and Cho, 2015; Reppel et al., 2014). Là encore, peu de travaux publiés concernent les CSM-GW et aucuns ne comparent les capacités de différenciation des CSM-MO et CSM-GW amplifiées dans les quatre conditions de culture utilisées dans notre travail.

Cette capacité de différenciation a été décrite en 1999 à partir des colonies formées par les cellules souches (Pittenger et al., 1999). Il a donc été important de contrôler si les CSM amplifiées dans les 4

conditions de culture étaient capables de former des colonies après ensemencement à faible densité afin de vérifier leur caractère souche. Nos résultats ont montré que les CSM-GW forment des colonies après amplification avec du milieu supplémenté en LPH en normoxie et en hypoxie, tandis que les CSM-MO forment des colonies dans les 4 conditions de culture avec une taille augmentée avec le LPH comme supplément de culture. Certains travaux de la littérature ont montré que l'amplification en normoxie des CSM-MO entraînait la formation de colonies plus grandes pour les CSM-MO amplifiées dans du milieu supplémenté en LPH par rapport à celui supplémenté en SVF (Doucet et al., 2005; Savelli et al., 2018). Concernant les CSM-GW, il existe peu de travaux comparant la formation de colonies lorsque les cellules ont été amplifiées dans du milieu supplémenté en LPH ou SVF, que ce soit en normoxie ou en hypoxie. Il est important de noter que les CSM ont été ensemencées à une faible densité (moins de 2 cellules/cm²) pour la réalisation du test dans des conditions clonogéniques (Baker et al., 2015) permettant d'obtenir un compromis afin d'avoir un meilleur rendement d'expansion, mais aussi d'avoir des cellules progénitrices précoces (Sekiya et al., 2002). Contrairement à notre étude, certains travaux rapportent que le nombre de colonies formées par les CSM-GW amplifiées avec du LPH est plus important par rapport aux CSM-MO. Or, dans ces études les cellules ont été ensemencées entre 10 et 20 cellules/cm² (Laroye et al., 2019), concentration éloignée de la culture clonogénique. Les différences observées dans la formation de colonies entre les CSM-MO et les CSM-GW laissent penser que ces cellules sont différentes, d'un point de vue du caractère souche et permettent de poser une question : « Faut-il considérer les CSM-GW comme des cellules souches, des cellules stromales ou plutôt des progéniteurs ? ». De même, nos résultats montrent que les CSM-GW et CSM-MO ont de meilleures capacités de prolifération lorsqu'elles sont amplifiées avec du milieu supplémenté en LPH par rapport au SVF.

Le LPH permettrait, en effet, d'améliorer le rendement en culture des CSM-MO et des CSM-GW si l'on tient compte de la diminution du temps de doublement et de l'augmentation du doublement de la population obtenues avec le LPH tout en conservant le caractère souche des CSM d'après leurs capacités à former des colonies. D'après des données de la société Macopharma qui commercialise le LPH utilisé dans ce travail et d'après la littérature (Crespo-Diaz et al., 2011; Doucet et al., 2005; Fekete et al., 2012a; Hemeda et al., 2014; Laner-Plamberger et al., 2015), le LPH est riche en facteurs de croissance tels que le bFGF, le PDGF, l'IGF, l'EGF et le VEGF. De plus, la concentration en facteurs de croissance tels que PDGF (AA, AB, BB), VEGF, IGF-1 et TGF- β 1 serait entre 1,7 et 148,7 fois plus importante dans le LPH que dans le SVF (Shanskii et al., 2013). Certains travaux avec le LPH de Macopharma ont montré qu'une faible variabilité des concentrations en facteurs de croissance entre plusieurs lots n'avait aucune incidence sur la formation des CFUs (Fekete et al., 2012a), et d'autres ont montré que l'âge des donneurs de LPH n'influait pas la teneur en facteurs de croissance (Lohmann et al., 2012). Il est donc envisageable que la forte concentration en facteurs de croissance du LPH puisse expliquer l'augmentation du nombre de colonies des CSM-GW (i), l'augmentation de la taille des colonies des CSM-MO (ii) et les meilleures capacités de prolifération (iii). Certains travaux, utilisant des anticorps neutralisant ces facteurs de croissance (bFGF, PDGF-BB et TGF- β 1 notamment), ont permis de confirmer que ces facteurs de croissance étaient impliqués dans l'augmentation des capacités de prolifération des CSM-MO cultivées en normoxie avec du milieu supplémenté en SVF (Wu et al., 2012) sans s'intéresser à la clonogénicité (Fekete et al., 2012a). Cependant, les auteurs ont montré que d'autres constituants du LPH seraient également impliqués. D'autres auteurs ont montré que le bFGF était impliqué dans la formation des colonies de cellules souches de papille apicale (SCAP). A ce jour, aucun article n'a reporté cette approche pour les CSM-GW. Nos expériences avec des anticorps neutralisants ont montré que le facteur de croissance bFGF est impliqué dans les capacités des CSM-

GW à former des colonies après expansion avec du LPH. Ces mêmes expériences avec anticorps neutralisants ont également permis de montrer l'implication des facteurs de croissances EGF et PDGF dans les meilleures capacités de prolifération des CSM-GW amplifiées avec du LPH. Dans la littérature, même si une étude ne rapporte aucune différence dans les capacités de prolifération des CSM de cheval amplifiées avec du LPH et du SVF (Naskou et al., 2018), la plupart montre que les capacités de prolifération des CSM sont augmentées lors de la culture avec du milieu supplémenté en LPH par rapport au SVF, bien que la majorité concerne les CSM-MO amplifiées en normoxie (Becherucci et al., 2018; Bernardo et al., 2011; Doucet et al., 2005; Fernandez-Rebollo et al., 2017; Griffiths et al., 2013; Juhl et al., 2016; Skific et al., 2018), et que ces propriétés seraient améliorées quand le LPH provient de donneurs jeunes (Lohmann et al., 2012). D'ailleurs, il a été montré que les CSM-MO cultivées avec du milieu « xeno-free » mais supplémenté en bFGF et PDGF-BB avaient de meilleures propriétés de motilité et de prolifération entraînant un changement morphologique de type fibroblastique (Blázquez-Prunera et al., 2019) et que le bFGF augmentait les propriétés de prolifération des cellules souches SCAP (Wu et al., 2012).

Nos résultats montrent également que les CSM-GW et CSM-MO amplifiées avec du LPH ont une morphologie fusiforme (de type fibroblastique), mais aussi une taille (FSC) et une structure relative (SSC) diminuées par rapport à celles amplifiées avec du SVF. Or, d'après la littérature et des données au laboratoire (Thèse (Targa, 2019)), nous savons que le phénotype des cellules sénescents est notamment caractérisé par une taille augmentée et par la présence de granules. Ces résultats nous ont conduits à émettre l'hypothèse que les CSM amplifiées avec LPH seraient moins sénescents, ce qui a pu être confirmé par la diminution de l'expression de l'enzyme β -galactosidase à passage précoce dans les CSM-GW et CSM-MO amplifiées avec du LPH. Cependant, le pourcentage de cellules sénescents augmente avec l'expansion *in vitro* des CSM-GW et des CSM-MO amplifiées avec du LPH. Ces résultats confirment nos précédents résultats montrant une augmentation de la sénescence des CSM-GW et des CSM-MO amplifiées en normoxie avec du SVF (Charif et al., 2019). Cependant, dans ce travail de thèse, la sénescence observée pour les CSM-GW et CSM-MO donne la même tendance alors que dans nos précédents travaux, nous avons montré que les CSM-GW à « forte » capacités de prolifération étaient moins sénescents que les CSM-MO à capacités de prolifération « moyenne » (Charif et al., 2019). Cela peut être expliqué par le fait que dans cette étude, les CSM-MO proviennent de donneurs âgés de 9 et 28 ans donc « dits jeunes » qui sont moins sénescents que des CSM-MO provenant de donneurs âgés (Charif et al., 2019; Li et al., 2014). Concernant les CSM-MO provenant du donneur âgé de 78 ans, même si elles proviennent d'un donneur âgé, la sénescence est plutôt faible, probablement car les capacités de prolifération de ces CSM-MO sont proches de celles provenant du donneur âgé de 28 ans. D'autres travaux ont montré que cette sénescence des CSM-MO amplifiées avec du milieu supplémenté avec du LPH serait plus importante avec l'augmentation de l'âge des donneurs (Lohmann et al., 2012). Même s'il a été montré dans la littérature que l'expression de gènes associés à la sénescence était identique dans les CSM-MO amplifiées avec du SVF et du LPH (Schallmoser et al., 2010), il est aussi rapporté que le LPH permet une rapide expansion des CSM-MO et un rajeunissement des CSM-MO âgées et sénescents en diminuant le temps de doublement et la taille des CSM-MO (Griffiths et al., 2013), probablement à cause de la forte concentration en facteurs de croissance tel que le bFGF dans le LPH par rapport au SVF (Altaie et al., 2016; Doucet et al., 2005; Shanskii et al., 2013). En effet, la voie de signalisation du récepteur 1/2 au FGF (FGFR1/2) *via* PI3K/AKT-MTM2 favorise la prolifération des CSM-MO en inhibant essentiellement la sénescence cellulaire (Coutu et al., 2011). De plus, les facteurs de croissance bFGF, PDGF et EGF augmentent les capacités de prolifération de lignées de CSM en retardant la sénescence sans affecter la différenciation

ostéocytaire et adipocytaire (Gharibi and Hughes, 2012). Ces résultats nous ont conduits à émettre l'hypothèse que les CSM-GW et CSM-MO amplifiées avec du milieu supplémenté en LPH sont moins sénescentes et auraient par conséquent de meilleures propriétés fonctionnelles telles que la migration ou l'immunosuppression.

En effet, il a été montré que les CSM-MO sénescentes avaient de moins bonnes capacités de migration (Sepúlveda et al., 2014; Turinetti et al., 2016). Nos résultats montrent que les CSM-GW et CSM-MO cultivées avec du milieu supplémenté en LPH ont de meilleures propriétés de migration par rapport à celles cultivées avec du milieu supplémenté en SVF. Le processus de migration est guidé par des cytokines, des chimiokines et des facteurs de croissance tels que le stem cell factor ou le Stromal Derived Factor-1 (SDF-1) (Nitzsche et al., 2017) ou l'« hepatocyte growth factor » (HGF) (Li et al., 2017c). L'amplification des CSM-MO avec du milieu supplémenté en LPH améliore les propriétés de migration par rapport au SVF (Moisley et al., 2019) probablement car le LPH contient un nombre conséquent de chimiokines et de molécules d'adhésion solubles qui sont importantes pour l'adhésion au plastique ou la migration (Shih and Burnouf, 2015). En effet, la supplémentation de milieu *xeno free* avec du bFGF améliore la motilité des CSM-MO *via* l'intégrine $\alpha\beta3$ par la voie de signalisation P38 MAPK (Blázquez-Prunera et al., 2019).

De plus, nous avons montré que les CSM-GW et CSM-MO ont de meilleures propriétés de migration après expansion *in vitro* en hypoxie par rapport à la normoxie indépendamment du supplément du milieu de culture. En effet, les cellules pré-conditionnées par l'hypoxie expriment plus de chimiokines CXCR1 et CXCR4 et ont de meilleures propriétés de migration en réponse à SDF-1 de manière dose dépendante (Hung et al., 2007). De plus, l'expression des récepteurs aux chimiokines à la surface des CSM augmente en présence de l'« hypoxia inducible factor -1 α » (HIF-1 α) (Haque et al., 2013; Hung et al., 2007) et l'hypoxie induit la transcription de gènes impliqués dans l'angiogénèse, le métabolisme et la migration *via* HIF-1 α (Haque et al., 2013). Dans notre modèle de migration, les CSM-GW migrent moins que les CSM-MO. Des travaux ont montré que le microARN miR-9-5p favorisait la migration des CSM-MO de rats en activant la voie de signalisation β -caténine et affecte la réorganisation du cytosquelette d'actine (Balasubramanian et al., 2012). Ces résultats sont intéressants, car dans la partie 2 de ce travail, nous avons constaté que les CSM-GW qui ont de fortes capacités de prolifération, n'expriment pas ou faiblement miR-9 par rapport aux CSM-MO. De plus, il a été montré une sur-expression de 20 gènes impliqués dans l'expression de cytokines, chimiokines et facteurs de croissances dans les CSM-MO *versus* CSM-GW, alors que 11 seulement sont sur-exprimés dans les CSM-GW *versus* CSM-MO (Balasubramanian et al., 2012).

Comme pour les propriétés de migration, nous avons émis l'hypothèse que les CSM-GW et CSM-MO amplifiées avec le LPH qui sont moins sénescentes auraient de meilleures propriétés fonctionnelles. Cependant, nos résultats ont montré que les CSM-GW et CSM-MO sont immunosuppressives dans les 4 conditions de culture de manière équivalente, mais qu'elles présentent des meilleures propriétés immunosuppressives après expansion en hypoxie quel que soit le supplément de milieu de culture (SVF/LPH). Certains travaux ont tout de même montré que la source de CSM pouvait affecter leurs propriétés immunosuppressives. En effet, les CSM-MO amplifiées avec du LPH ont de meilleures propriétés immunosuppressives que les cellules du cordon ombilical ou dérivés du tissu adipeux (CSM-TA)(Fazzina et al., 2016). Cependant, la majorité des travaux sur l'impact du LPH sur les propriétés immunosuppressives des CSM concerne les CSM-MO. Dans ce travail, le LPH n'affecte pas les propriétés immunosuppressives des CSM-GW et CSM-MO, ce qui est confirmé dans la littérature pour les CSM-MO (Baker et al., 2015; Becherucci et al., 2018; Bernardo et al., 2011; Doucet et al., 2005; Naskou et al., 2018; Savelli et al., 2018; Skific et al., 2018) et les CSM-GW

(Kandoi et al., 2018) cultivées avec des réactifs de grade recherche. En condition de culture de grade clinique, l'expansion avec le LPH des CSM-GW en hypoxie et des CSM-MO en normoxie n'affecte pas leurs propriétés immunosuppressives (Laroye et al., 2019).

Notre étude, montre que les CSM-GW et CSM-MO ont de meilleures propriétés immunosuppressives après avoir été amplifiées en hypoxie par rapport à la normoxie que ce soit avec du LPH ou du SVF. Ces résultats sont intéressants car il est connu que les CSM-MO sont dans un environnement hypoxique dans leur niche (Calvo-Asensio et al., 2018) dans laquelle HIF-1 α pourrait avoir un rôle clé (Haque et al., 2013). En effet, en normoxie, HIF-1 α est hydroxylé par la prolyl-hydroxylases (PHD) entraînant son ubiquitination et sa dégradation par le protéasome. En hypoxie, HIF-1 α est transloqué dans le noyau entraînant la transcription des gènes cibles impliqués dans l'angiogénèse, le métabolisme et la migration (Haque et al., 2013), mais il n'est pas montré si les gènes impliqués dans l'immunosuppression des CSM sont des cibles de HIF-1 α . Le pré-conditionnement des CSM-TA par la DFO (molécule qui favorise la translocation nucléaire de HIF-1 α) augmente l'abondance de HIF-1 α et la sécrétion des facteurs anti-inflammatoires tels que l'IL-4 et l'IL5 (Oses et al., 2017), et augmente la sur-expression de HIF-1 α dans les CSM de pulpe dentaire (Martinez et al., 2017). C'est pourquoi nous avons supposé que HIF-1 α serait impliqué dans les propriétés immunosuppressives des CSM. Cependant, nos résultats avec les CSM-GW amplifiées en normoxie traitées par DMOG (un inhibiteur de PHD) et les CSM-GW amplifiées en hypoxie et traitées par CAY10585 (un inhibiteur de HIF-1 α) ne montrent pas d'implication directe avec les propriétés immunosuppressives des CSM. Nous aurions pu supposer que l'utilisation des inhibiteurs DMOG et CAY10585 a un effet transitoire sur la translocation nucléaire de HIF-1 α pendant les 5 jours de co-culture avec les LT activés en normoxie étant donné que HIF-1 α est instable en condition de normoxie. En effet, un modèle de sur-expression stable de HIF-1 α serait préférable pour étudier l'effet de HIF-1 α sur les propriétés fonctionnelles. Cependant, les effets bénéfiques sur les propriétés immunosuppressives des CSM-GW amplifiées en hypoxie ont bien été montrés après 5 jours de co-culture avec les LT. Par ailleurs, Martinez et al ont réalisé une sur-expression de HIF-1 α à l'aide d'une transduction stable *via* un lentivirus dans les CSM humaines de pulpe dentaire et ont montré un effet inhibiteur sur la différenciation des cellules dendritiques sans affecter le potentiel inhibiteur sur les LT activés après 4 jours de co-culture entre les CSM modifiées et des LT. Les CSM en question avaient un métabolisme glycolytique avant la co-culture (Martinez et al., 2017). En revanche, Contreras-Lopez et al ont montré que l'inhibition de HIF-1 α dans les CSM de souris à l'aide des siRNA (short interfering RNA) entraînait une baisse du potentiel inhibiteur sur la génération de LTh1 et LTh17 et limitait leurs capacités à générer des LTreg après 3 jours de co-culture avec des LT CD4. Ces CSM présentaient également un métabolisme oxydatif et produisaient plus de ROS au niveau mitochondrial (Contreras-Lopez et al., 2020). La capacité des CSM à inhiber la prolifération des cellules immunitaires peut être mise en évidence quel que soit le type de co-culture. Cependant, les mécanismes d'immunosuppression des CSM dépendent de certains paramètres : populations cellulaires, mode d'activation, et la présence ou non de contacts entre cellulaires (Castro-Manrreza and Montesinos, 2015). Par ailleurs, il est probable que la source de CSM (humaine/murine), le temps de co-culture (5 jours pour nos expériences, 4 jours pour celles de Martinez et al et 3 jours pour celles de Contreras-Lopez et al) puissent influencer les résultats. En effet, Contreras-Lopez et al montrent que les propriétés immunosuppressives des CSM de souris se font *via* la sécrétion de molécules telles que l'IL6 ou l'oxyde nitrique (NO) (Contreras-Lopez et al., 2020). Or, il est connu que les CSM humaines ne sécrètent pas de NO, mais que ce serait plutôt l'IDO qui serait impliquée quelle que soit la source : MO, GW, sang de cordon, tissu adipeux (Kim et al., 2018).

Après expansion en normoxie et en hypoxie avec du LPH, les CSM-GW inhibent la prolifération des lymphocytes T en entraînant leur apoptose et en sécrétant des facteurs solubles tels que PGE2 et TGF- β 1 et en produisant de la kynurénine, un métabolite obtenu à partir du tryptophane du milieu par l'enzyme IDO. Le tryptophane est un acide aminé essentiel à la prolifération des lymphocytes T. L'hypoxie entraîne probablement la sur-expression d'autres protéines immunomodulatrices dans les CSM-GW que nous n'avons pas analysées. Certains travaux ont montré que l'exposition des CSM-MO à des taux variables en oxygène (0,1%, 5%) ne modifie pas la sécrétion de molécules impliquées dans l'immunomodulation telles que l'IL-2, l'IL4, l'IL-7 et l'IL10, mais augmente la sécrétion de l'IL-6 ou l'IL-15 (Paquet et al., 2015). Il a également été confirmé par spectrométrie de masse que le pré-conditionnement de CSM-TA par l'hypoxie n'entraîne pas de sur-expression de protéines immunosuppressives, mais de protéines influençant le métabolisme (Wobma et al., 2018). En effet, le métabolisme des CSM est très sensible aux signaux cellulaires et environnementaux et reste un paramètre important à prendre en compte pour les applications de médecine régénérative (Salazar-Noratto et al., 2020). Même si, d'après nos expériences, HIF-1 α n'est pas directement lié aux meilleures propriétés immunosuppressives des CSM-GW, son rôle reste néanmoins important pour les applications cliniques, car il pourrait être un régulateur contrôlant le statut métabolique et la multipotence des CSM (Calvo-Asensio et al., 2018). De plus, il a été montré une stabilisation surprenante de HIF-1 α dans les CSM-MO d'enfants et les CSM de cordons ombilicaux cultivées en normoxie qui serait due à un fort niveau d'expression de l'ARNm de HIF-1 α accompagnée d'une augmentation de l'expression des gènes cibles de HIF-1 α favorisant une augmentation de la glycolyse (Palomäki et al., 2013). De plus, le pré-conditionnement de CSM-MO de rats par l'hypoxie entraîne leur autophagie par une expression élevée de HIF-1 α et l'activation des voies de signalisation AMPK/mTOR (Liu et al., 2015b). L'autophagie est un type de mort cellulaire qui permet la digestion des organites propres à la cellule par fusion avec la machinerie du lysosome et peut être activée en réponse à des stress tels que la famine, l'hypoxie, le dysfonctionnement mitochondrial et l'infection (Liu et al., 2015b). De plus, il a été montré que le pré-conditionnement par l'hypoxie de CSM-TA entraîne un *switch* métabolique vers la glycolyse, entraînant une consommation rapide de glucose et une production de lactate après 1 jour de co-culture avec des Lymphocytes T (Wobma et al., 2018). Nos résultats montrent que l'expansion en hypoxie entraîne un *switch* métabolique des CSM-GW vers la glycolyse, caractérisé par une consommation en glucose et une production de lactate. Cependant, après 5 jours de co-culture avec des lymphocyte T en normoxie nous n'avons pas observé de différences pour la consommation de glucose entre les CSM-GW amplifiées en normoxie et en hypoxie. Il est cependant difficile de conclure sur ces résultats étant donné que les lymphocytes T consomment du glucose et produisent également du lactate pendant la co-culture (Franchina et al., 2018). Nous supposons que le métabolisme glycolytique des CSM-GW au début de la co-culture est associé aux meilleures propriétés immunosuppressives. En effet, la privation en glucose limite la prolifération des lymphocytes T qui utilisent également la glycolyse aérobie et ont donc besoin de glucose (Dimeloe et al., 2017; Jacobs et al., 2008). De plus, des doses croissantes d'acide lactique externe sont proportionnelles à la baisse du pH intracellulaire des lymphocytes T entraînant leur apoptose (Wobma et al., 2018). Nos résultats montrent également que ces CSM-GW pré-conditionnées par l'hypoxie produisent plus de ROS intracellulaires, tandis que la production diminue dans les CSM-MO de rats (Liu et al., 2015b). Ces résultats peuvent être expliqués par le fait qu'en hypoxie même si la concentration en oxygène est diminuée, la durée de vie des transporteurs d'électrons comme l'ubisemiquinone est augmentée dans l'espace inter-membranaire mitochondrial, favorisant ainsi la fuite d'électrons et donc la génération de ROS (Guzy and Schumacker, 2006). D'ailleurs, de plus en plus de travaux

suggèrent que les ROS ont un rôle important dans l'activation des lymphocytes T et notamment dans la production d'IL-2 (Franchina et al., 2018). En revanche, les ROS exogènes pourraient inhiber l'activation de facteurs de transcription dans les lymphocytes T (Franchina et al., 2018). Certains travaux montrent notamment que la viabilité des lymphocytes T CD4 diminue après co-culture avec des granulocytes de manière dépendante de la concentration en ROS (Mougiakakos et al., 2009). Ces résultats laissent supposer un lien entre le métabolisme des CSM et leur production de ROS avec leurs propriétés immunosuppressives sur les lymphocytes T.

Les principaux résultats obtenus dans la partie 1 sont représentés dans la *Figure 53*.

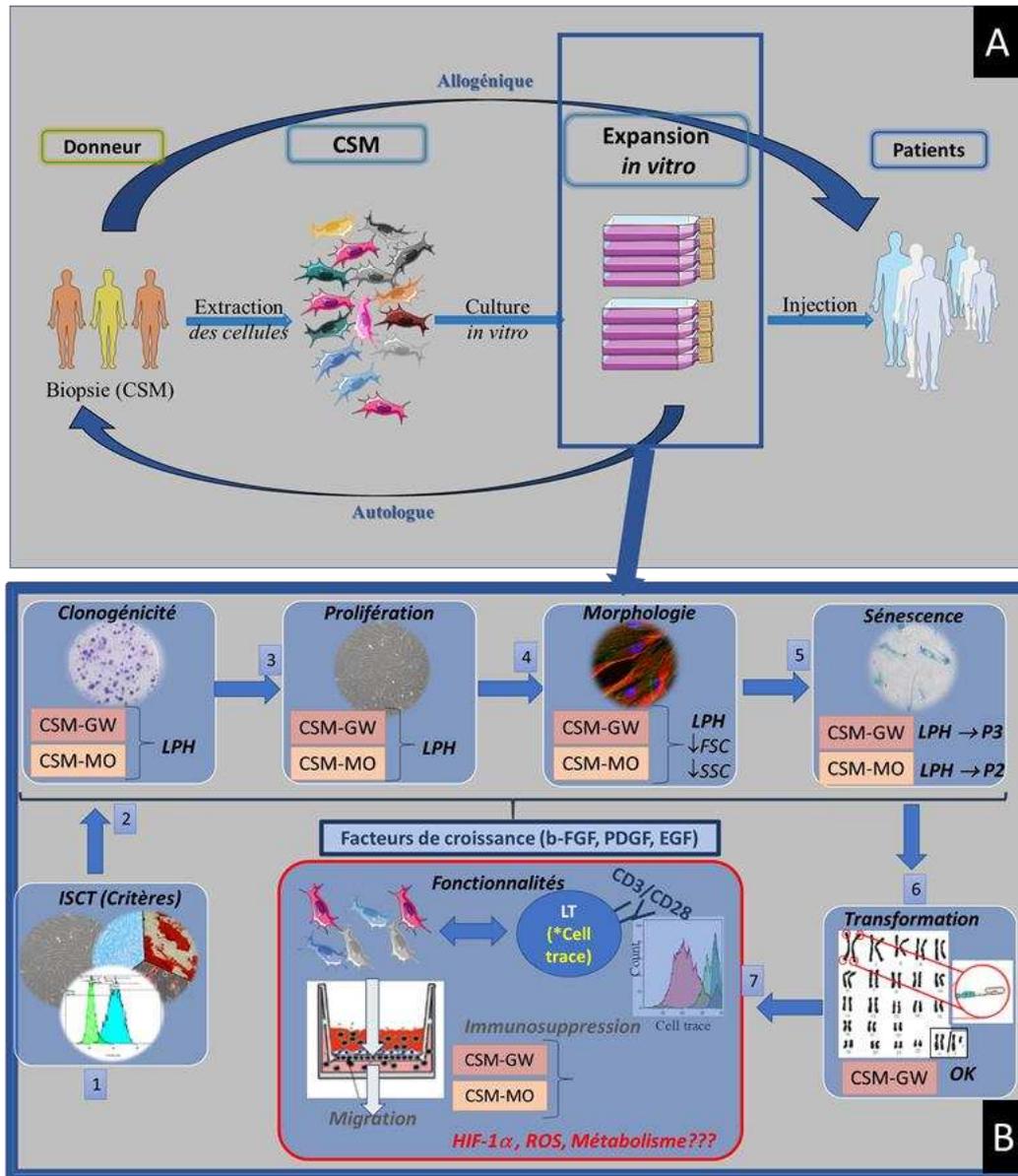


Figure 53 : Schéma récapitulatif des résultats obtenus dans la partie 1

A) Dans cette première partie, nous nous sommes intéressés à l'effet des conditions de culture sur le comportement des CSM *in vitro*. **(B).** Nous avons montré que les CSM-GW et CSM-MO amplifiées en normoxie (N) ou en hypoxie (H) avec du milieu supplémenté en lysat plaquettaire humain (LPH) ou sérum de veau fœtal (SVF) répondaient aux principaux critères recommandés par l'ISCT (1). Avec le LPH, les CSM ont de meilleures propriétés de clonogénicité (2), de prolifération (3), présentent une morphologie de type fibroblastique fine et allongée (4) et sont moins sénescentes (5). La composition en facteurs de croissance est impliquée dans ces meilleures propriétés. De plus, les CSM-GW amplifiées dans les 4 conditions de culture n'ont pas d'anomalies caryotypiques et ont une très faible voire pas d'activité télomérase (6). Enfin, les propriétés fonctionnelles des CSM-GW et CSM-MO sont améliorées en hypoxie, suggérant un lien entre le métabolisme et les propriétés fonctionnelles des CSM (7).

Partie 2 : Recherche de biomarqueurs en lien avec la prolifération des CSM

I. Partie 2 : Résultats

Dans la partie précédente, les résultats ont montré que les CSM-GW et CSM-MO amplifiées avec du LPH comme supplément de milieu de culture avaient de meilleures capacités de prolifération. Cependant, les propriétés fonctionnelles des CSM-GW et CSM-MO sont meilleures après expansion en hypoxie avec du LPH pour la migration et indépendamment du supplément de culture pour les propriétés immunosuppressives. Il a également été montré une hétérogénéité, prélèvement-dépendante, dans les propriétés prolifératives et fonctionnelles des CSM. Par ailleurs, plusieurs équipes, dont la nôtre, ont montré une forte hétérogénéité intra-prélèvement avec des sous-populations cellulaires. Ainsi, afin de sélectionner les meilleurs prélèvements candidats dès le début de la culture il serait intéressant de mettre en évidence des marqueurs moléculaires précoces de la qualité des prélèvements. Par ailleurs, la mise en évidence de marqueurs de surface liés aux capacités de prolifération des CSM permettrait de sélectionner/trier lors de l'expansion les meilleures CSM candidates pour des applications de thérapie cellulaire.

Dans cet objectif, nous avons entrepris d'étudier d'une part l'expression des certains marqueurs de surface des CSM en fonction des conditions de culture et d'autre part de réaliser des études transcriptomiques afin d'identifier des marqueurs ARN liés aux capacités prolifératives des cellules.

A. Les marqueurs de surface

Les CSM expriment des clusters de différenciation dits « classiques » à leur surface qui permettent de les identifier (Dominici et al., 2006). Il existe d'autres marqueurs de sous-populations qui permettent d'isoler les CSM en fonction de certains critères et de les enrichir (Sensebé and Bourin, 2011). Les marqueurs analysés ici, ont été choisis en fonction des travaux précédents de l'équipe (Thèses Li YY et Targa L - Targa, 2019).

1. Expression des marqueurs de surface dans les 4 conditions de culture

Les analyses par cytométrie en flux de l'expression des marqueurs de sous-populations tels que CD71, CD106, CD140b, CD146, CD157, CD166 et CD200 en termes de pourcentage (%) ne montrent pas de grosses différences entre les conditions de culture (N-SVF, H-SVF, N-LPH et H-LPH) que ce soit pour les CSM-GW et les CSM-MO trypsinées à la fin du passage 3 et 2, respectivement (*Figure 54*). L'expression de CD106, qui est très faible pour les CSM-MO et CSM-GW, n'a pas été représentée. De plus, pour certains marqueurs tels que CD146 (entre 60 et 80% de cellules positives), CD157 (entre 80 et 90%) et CD166 (environ 100%), nous observons les mêmes tendances pour les pourcentages d'expression entre les CSM-MO et CSM-GW.

Cependant, le pourcentage d'expression de certains marqueurs varie en fonction de la source de CSM. En effet, le pourcentage de cellules positives pour CD71 et CD200 est plus élevé à la surface des CSM-GW (100% pour CD71 et 80% pour CD200) qu'à la surface des CSM-MO (entre 40 et 80% pour CD71 et entre 10 et 40 % pour CD200). En revanche, le récepteur CD140b est beaucoup moins exprimé dans les CSM-GW (environ 5 %) par rapport aux CSM-MO (entre 40 et 70 %). De façon intéressante, nous observons que contrairement aux CSM-GW, les CSM-MO présentent de grosses variations dans les pourcentages d'expression des marqueurs de sous-population CD71, CD140b, CD146, CD157, CD166 et CD200, mais pas pour CD166 ou même CD106 qui est très faiblement, voir pas exprimé dans

les CSM-MO et CSM-GW. Un autre résultat intéressant concerne CD71 et CD146, dont l'expression est plus faible pour les CSM-MO provenant d'un donneur âgé de 78 ans par rapport aux donneurs âgés de 9 et 28 ans (*Figure 54 B*).

Concernant, les marqueurs faiblement exprimés tels que CD140b pour les CSM-GW ou CD200 pour les CSM-MO, les ratios d'intensités moyenne de fluorescence (IMF) normalisés par rapport au contrôle isotypique, ne montrent pas de différences selon les conditions de culture d'expansion (*Figure 54*). Cependant, des tendances sont observables pour les ratios d'IMF des marqueurs CD71, CD146 et CD157 pour les CSM-MO amplifiées avec du LPH par rapport au SVF quelle que soit le taux d'oxygène. L'expression de CD71 et CD146 semble augmenter, tandis que celles de CD157 diminue avec le LPH comme supplément de milieu de culture par rapport au SVF (*Figure 54 B*).

Nous montrons donc :

- ✓ **Que quelle que soit la source (CSM-GW ou CSM-MO), les CSM n'expriment pas CD106 et expriment les marqueurs CD71, CD140b, CD146, CD157 et CD200.**
- ✓ **Que l'expression des marqueurs est plus homogène à la surface des CSM-GW contrairement aux CSM-MO.**
- ✓ **Que l'expression de certains marqueurs varie en fonction de la source de CSM. En effet, les marqueurs CD71 et CD200 sont plus exprimés par les CSM-GW tandis que CD140b est plus exprimé par les CSM-MO.**
- ✓ **Que l'expression des marqueurs à la surface des CSM-GW est homogène.**
- ✓ **Que l'expression des marqueurs CD71, CD146 augmente et que celle de CD157 diminue avec le LPH pour les CSM-MO.**

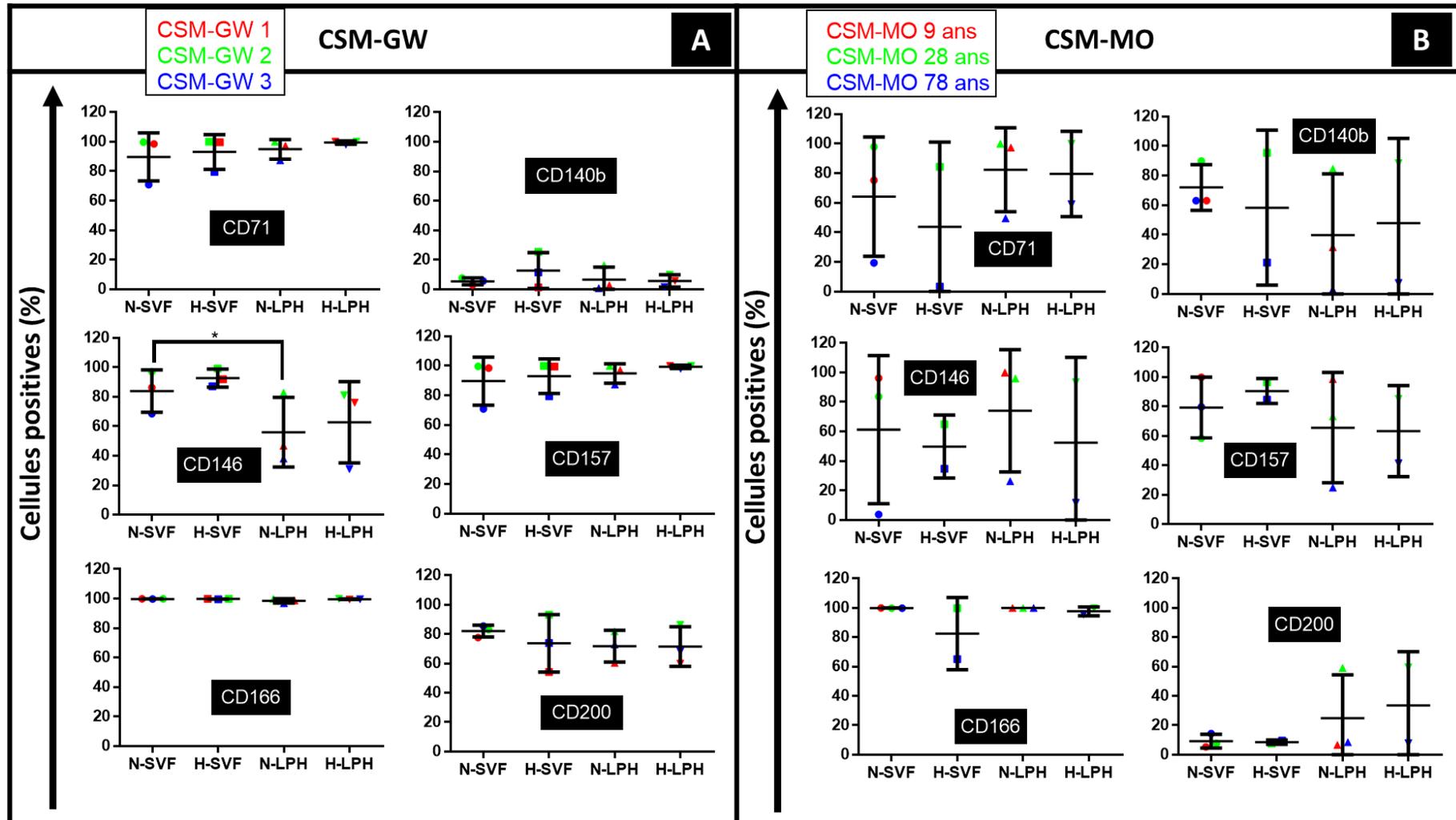


Figure 54 : Expression des marqueurs de surface (en % de cellules positives) dans les CSM-GW et CSM-MO amplifiées dans les 4 conditions de culture

Les cellules stromales/souches mésenchymateuses de gelée de Wharton (CSM-GW) ou de moelle osseuse (CSM-MO) ont été amplifiées en condition de normoxie (N) ou d'hypoxie (H) avec du milieu supplémenté en sérum de veau fœtal (SVF) ou en lysat plaquettaire humain (LPH). Le pourcentage d'expression des marqueurs de surface a été déterminé par cytométrie en flux (Beckman, Gallios) pour les CSM-GW à passage 3 (A) et les CSM-MO à passage 2 (B). Les résultats sont exprimés en moyenne \pm écart-type. $p < 0,05$ (*) à l'aide d'un test t (GraphpadPrism).

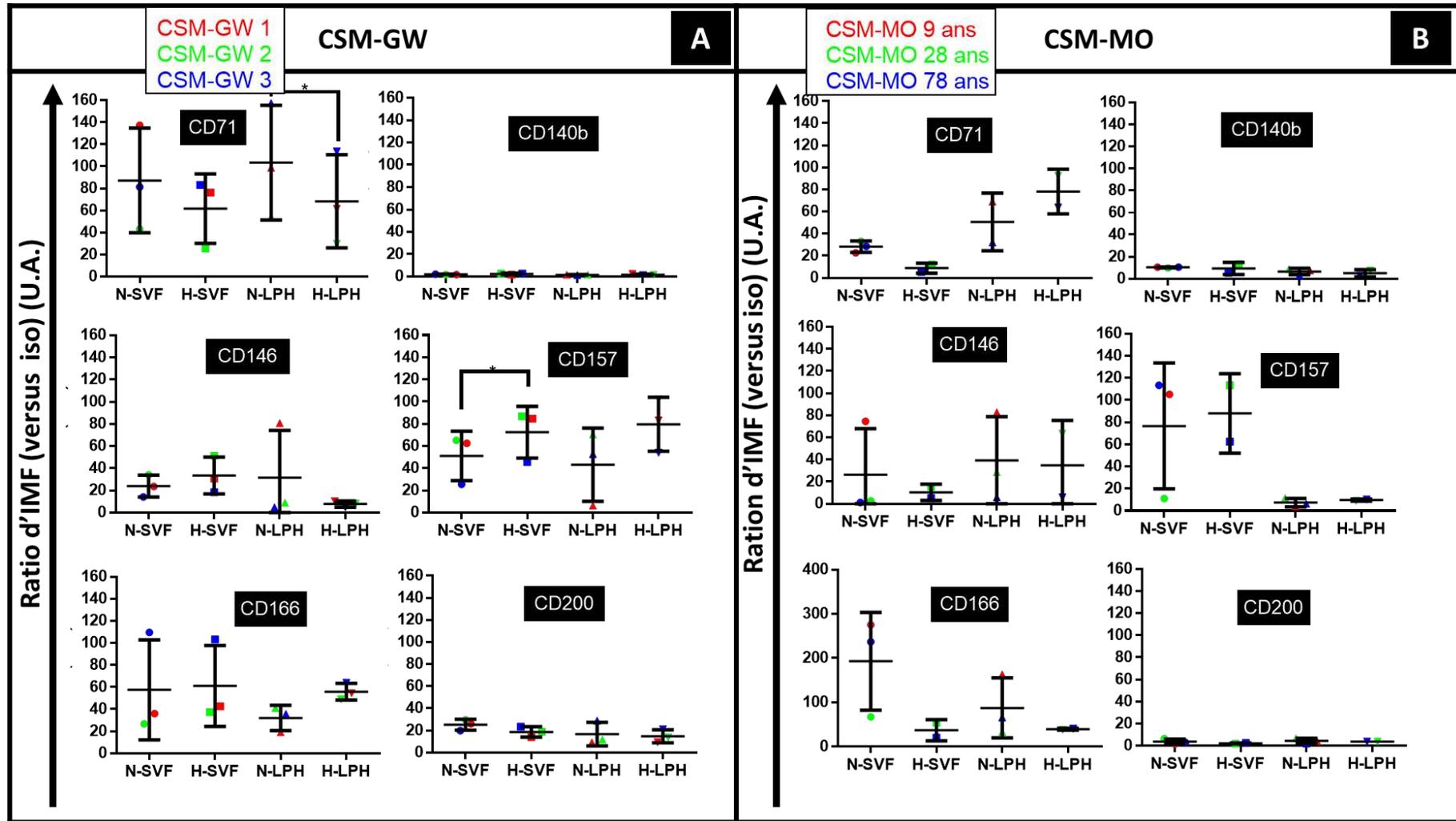


Figure 55 : Expression des marqueurs de surface (en ratio d'Intensité Médiane de Fluorescence ou IMF) dans les CSM-GW et CSM-MO amplifiées dans les 4 conditions de culture
 Les cellules stromales/souches mésenchymateuses de gelée de Wharton (CSM-GW) ou de moelle osseuse (CSM-MO) ont été amplifiées en condition de normoxie (N) ou d'hypoxie (H) avec du milieu supplémenté en sérum de veau fœtal (SVF) ou en lysat plaquettaire humain (LPH). Les ratios d'intensité médiane de fluorescence (IMF) de chaque marqueur de surface normalisés par rapport au contrôle isotypique ont été déterminés par cytométrie en flux (Beckman, Gallios) pour les CSM-GW à passage 3 (A) et les CSM-MO à passage 2 (B). Les résultats sont exprimés en moyenne \pm écart-type. $p < 0,05$ (*) à l'aide d'un test t (GraphpadPrism).

2. **Lien entre l'expansion en LPH et l'expression des marqueurs de surface**

Nous remarquons que les tendances pour les ratios d'IMF *versus* le contrôle isotypique des marqueurs CD71 et CD146 (qui augmentent) et CD157 (qui diminue) pour les CSM-MO amplifiées avec du LPH par rapport au SVF quelle que soit le taux d'oxygène (*Figure 55 B*) sont confirmées par les graphiques qui représentent ces mêmes ratios d'IMF *normalisés par rapport à la condition SVF* (CD71 et CD146 : ratios >1 ; CD157 : ratio <1) (*Figure 56 B*). Concernant le CD200, les ratios d'IMF (*versus* le contrôle isotypique) sont faibles, entre 0 et 10 % (*Figure 55 B*), mais si l'on compare les ratios d'IMF normalisés par rapport à la condition SVF, nous observons une légère augmentation en N-LPH (1,5) et en H-LPH (1,9) (*Figure 56 B*).

Concernant les CSM-GW, les ratios d'IMF *versus* le contrôle isotypique normalisés par rapport à la condition SVF sont proches de 1 quel que soit le marqueur analysé pour les CSM-GW (*Figure 56*).

Grâce au calcul des ratios d'IMF normalisés par rapport à la condition SVF, nous avons donc confirmé qu'avec le LPH qui est associé aux meilleures propriétés de prolifération :

- ✓ l'expression des marqueurs CD71, CD146 augmente et que celle de CD157 diminue pour les CSM-MO,
- ✓ et montré que l'expression de CD200 augmente dans les CSM-MO.

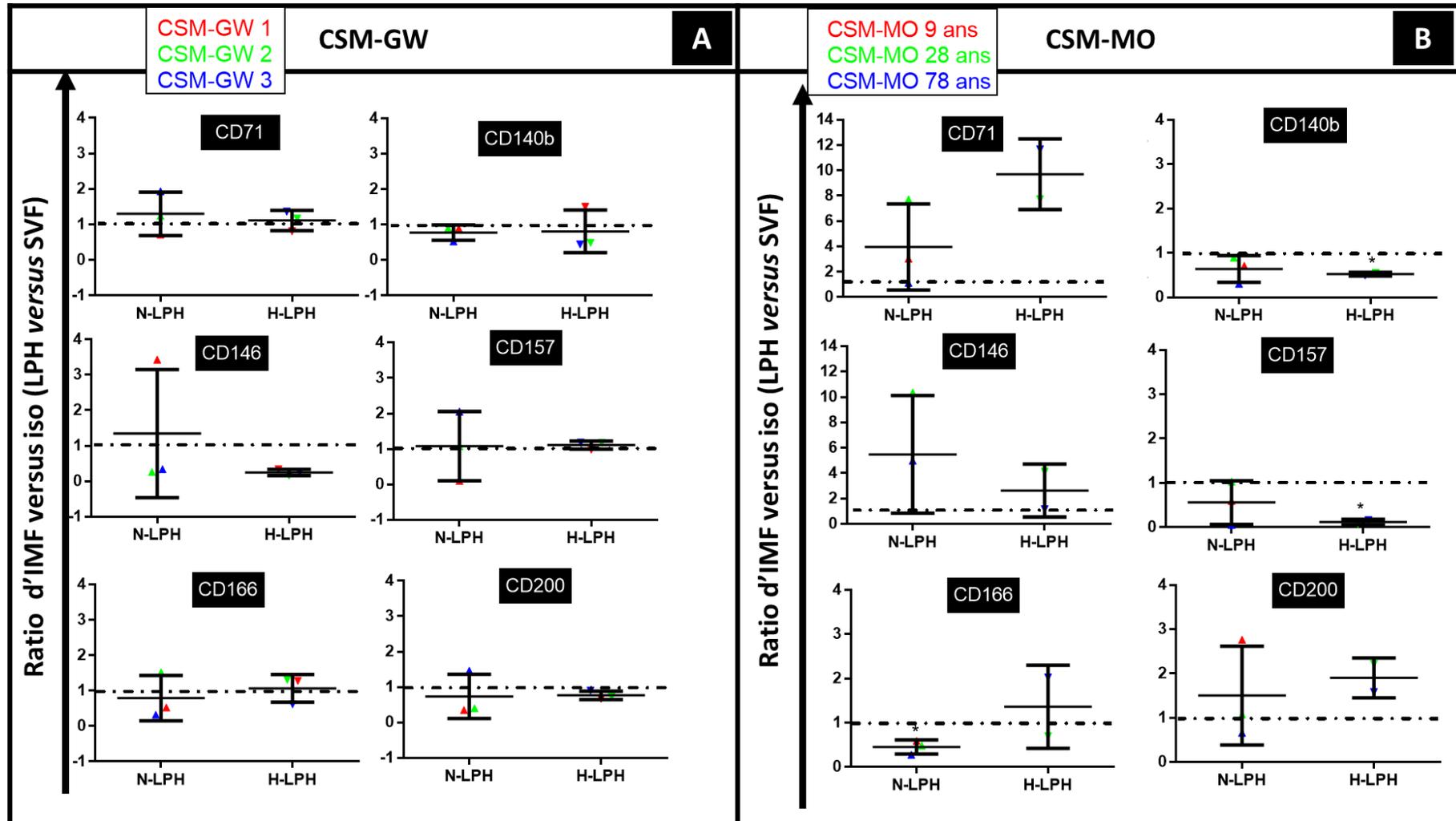


Figure 56 : Comparaison des ratios d'IMF des marqueurs de surface dans les CSM-GW et CSM-MO amplifiées avec du LPH versus SVF

Les cellules stromales/souches mésenchymateuses de gelée de Wharton (CSM-GW) ou de moelle osseuse (CSM-MO) ont été amplifiées en condition de normoxie (N) ou d'hypoxie (H) avec du milieu supplémenté en sérum de veau fœtal (SVF) ou en lysat plaquettaire humain (LPH). Les ratios d'intensité médiane de fluorescence (IMF) de chaque marqueur de surface normalisés par rapport au contrôle isotypique pour les CSM-GW à passage 3 (A) et les CSM-MO à passage 2 (B) amplifiées en normoxie (N) ou en hypoxie (H) avec du lysat plaquettaire humain (LPH) comme supplément de milieu de culture ont été normalisés par rapport aux ratios d'IMF des CSM-GW et CSM-MO amplifiées avec du sérum de veau fœtal (SVF) après analyse par cytométrie en flux (Beckman, Gallios). Les résultats sont exprimés en moyenne \pm écart-type. $p < 0,05$ (*) à l'aide d'un test t (GraphpadPrism).

B. Les marqueurs moléculaires

En complément des marqueurs de surface, les marqueurs moléculaires pourraient permettre de sélectionner les meilleurs prélèvements candidats à amplifier *in vitro* pour des applications de thérapie cellulaire. Ce travail avait déjà commencé dans le cadre d'une autre thèse (Li, 2015) et de mon diplôme EPHE (Ecole Pratique de Hautes Etudes). Les prélèvements de CSM-MO analysés avaient été amplifiés en normoxie avec du milieu supplémenté en SVF et avaient des capacités de prolifération bonnes pour des donneurs « jeunes » et faibles pour les donneurs « âgés » ([Tableau 9](#)). En effet, jusqu'au début de la thèse, nous travaillions dans l'équipe essentiellement en condition de grade recherche pour l'amplification des CSM-MO, à savoir N-SVF. De plus, nous avons déjà caractérisé un certain nombre de prélèvements en termes de prolifération, de différenciation, de sénescence. Cependant, nous n'avons aucun recul sur la culture de ces cellules dans les 3 autres conditions de culture. Devant le coût de l'analyse sur puce, nous avons décidé de nous focaliser sur 2 types de prélèvements de CSM-MO amplifiés N-SVF provenant de donneurs jeunes à bonnes capacités de prolifération et de donneurs âgés à fortes capacités de prolifération pour les analyses sur puce afin de mettre en évidence des marqueurs moléculaires dans les CSM-MO ayant des faibles et bonnes capacités de prolifération. Les ARN des échantillons extraits ont été envoyés au Luxembourg Institute of Health (LIH) pour l'analyse du transcriptome au moyen de microarrays avec un traitement des données générées par des bioinformaticiens. L'expression des marqueurs a ensuite été validée par qPCR sur un plus grand nombre d'échantillons et vérifiée dans les CSM-GW amplifiées en N-LPH.

1. Contrôle qualité des ARN extraits

Nous avons, dans un premier temps, vérifié la qualité des ARN extraits grâce à l'appareil Agilent 2100 Bioanalyzer (AGILENT TECHNOLOGIES). Les ARN de tous les échantillons ont un RIN (Rna Integrity Number) compris entre 9 et 10. Les échantillons ont donc été considérés comme étant de bonne qualité et ont pu être analysés dans la suite des expériences.

2. Les microARN

a) Analyse de l'expression différentielle des miARN sur puces dans les CSM-MO

L'analyse sur puce du miRome de CSM-MO provenant de 3 donneurs « jeunes » (bonne prolifération) et de 3 donneurs « âgés » (faible prolifération) **cultivées en conditions de normoxie avec du milieu supplémenté en SVF** à l'aide des puces Affymetrix Gene Chip miRNA v3.0 a mis en évidence des variations significatives de l'expression de 80 miARN entre les donneurs « jeunes » et « âgés ». Ainsi, dans les CSM-MO « âgés », 20 miARN sont sur-exprimés et 60 miARN sont sous-exprimés avec une p -value $< 0,05$ et un fold change $\geq |2|$. Les 20 miARN les plus significativement sur-exprimés et les 60 miARN les plus significativement sous-exprimés dans les prélèvements de CSM-MO de donneurs « âgés » *versus* « jeunes » sont représentés dans la [Figure 57](#).

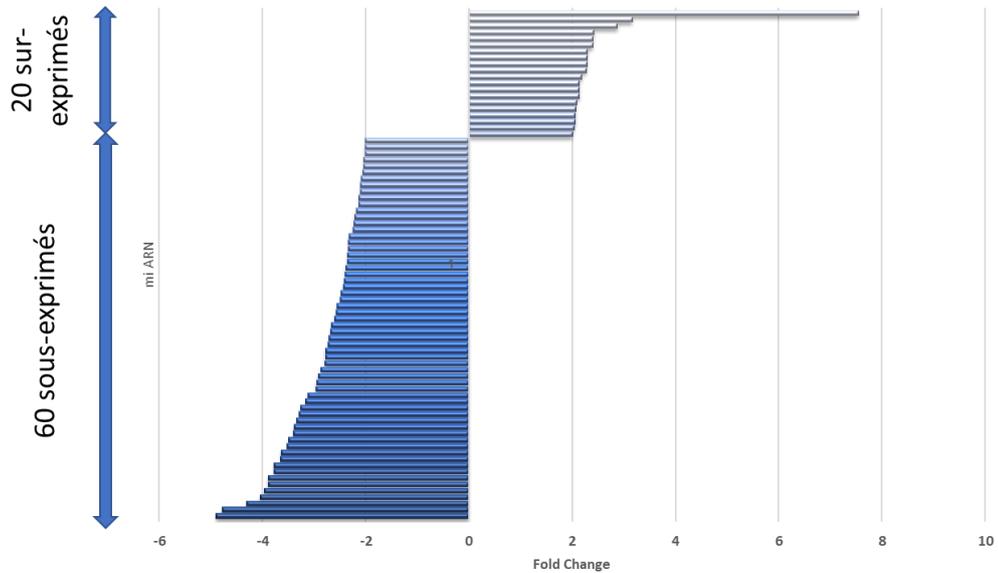


Figure 57 : Expression différentielle de miARN dans les Cellules Stromales Souches Mésoenchymateuses de moelle osseuse (CSM-MO) provenant de donneurs âgés (n=3) versus jeunes (n=3) à passage 1

Les ARN totaux des CSM-MO provenant de donneurs âgés (n=3) versus jeunes (n=3) et amplifiées en normoxie avec du milieu complet supplémenté en sérum de veau fœtal (SVF) ont été extraits, puis ont été analysés sur puces GeneChip™ miRNA 3.0 Array (Affimetrix) (500 ng) et le niveau d'expression global des miRNA des CSM-MO âgés a été normalisé par rapport à celui des CSM-MO jeunes. L'analyse a été réalisée par un test statistique ANOVA grâce au logiciel Partek, puis Rank Product grâce à l'environnement logiciel R.

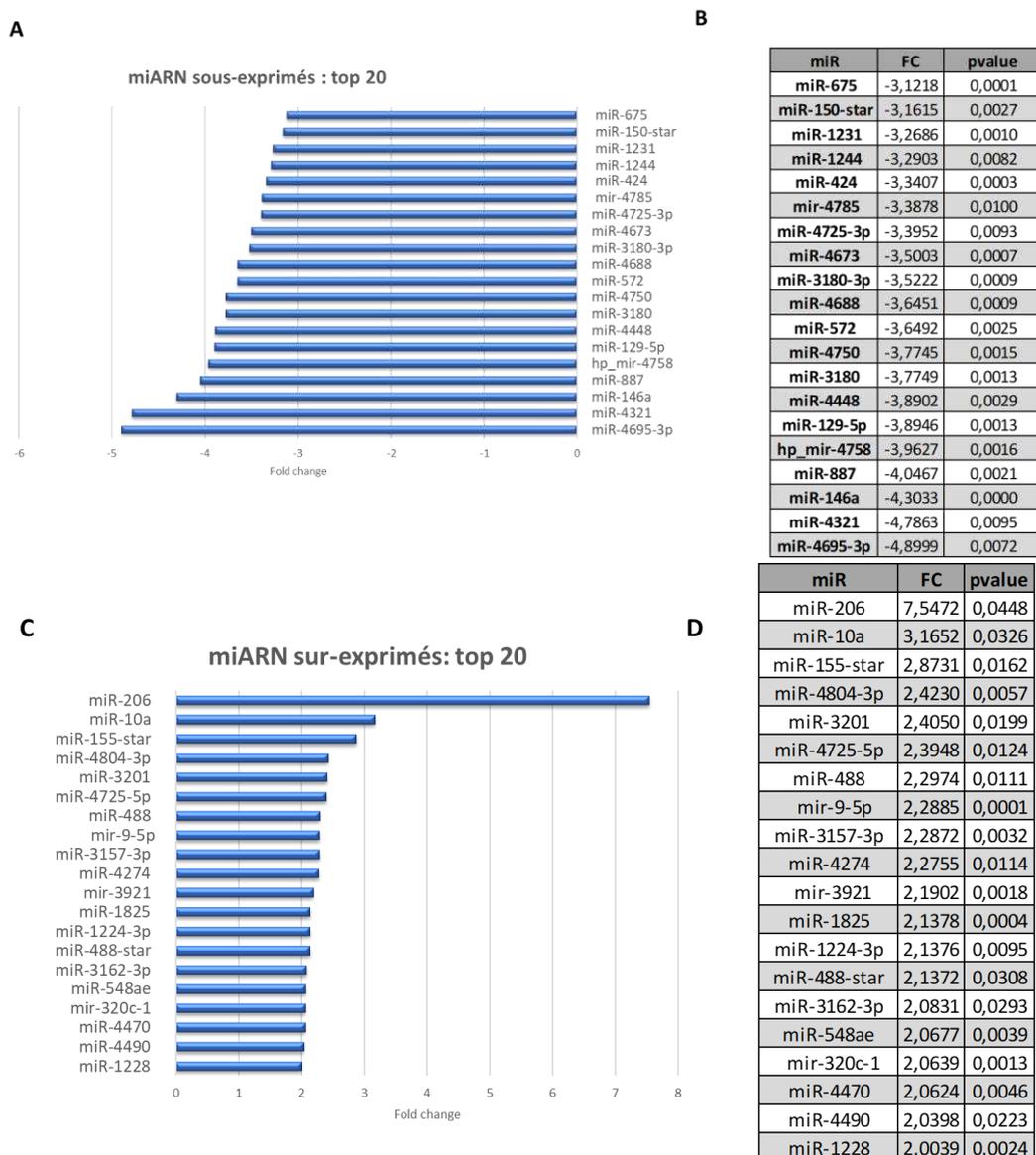


Figure 58 : Top 20 des miARNs sur- et sous -exprimés dans les Cellules Stromales Souches Mésenchymateuses de moelle osseuse (CSM-MO) provenant de donneurs âgés (n=3) versus jeunes (n=3) à passage 1

Les ARN totaux des CSM-MO provenant de donneurs âgés (n=3) versus jeunes (n=3) et amplifiées en normoxie avec du milieu complet supplémenté en sérum de veau fœtal (SVF) ont été extraits avant d'être analysés sur puces GeneChip™ miRNA 3.0 Array (Affimetrix) (500 ng). Le niveau d'expression global des miRNA des CSM-MO âgés a été normalisé par rapport à celui des CSM-MO jeunes. L'analyse a été réalisée par un test statistique ANOVA grâce au logiciel Partek, puis Rank Product grâce à l'environnement logiciel R. Les 20 miARN sous-exprimés chez les CSM-MO « âgées » avec le fold change (FC) le plus élevé et une pvalue < 0,05 sont représentés en A. Les valeurs de FC et de pvalue sont données dans le tableau en B. Les 20 miARN sur-exprimés chez les CSM-MO « âgées » avec le fold change (FC) le plus élevé et une pvalue < 0,05 sont représentés en C. Les valeurs de FC et de pvalue sont données dans le tableau en D.

b) Validation des variations de miARN par PCR quantitative Taqman dans les CSM-MO

La validation des données de puces a été réalisée par PCR quantitative TaqMan sur un nombre plus important d'échantillons de CSM-MO provenant de donneurs jeunes (n>10) et âgés (n>13). Dans un premier temps, nous avons sélectionné un panel de miARN présentant les p-values les plus faibles et des niveaux d'expression suffisamment élevés pour être détectables par PCR quantitative : **miR-9 et miR-1825 pour les miARN sur-exprimés** chez les CSM-MO provenant de donneurs « âgés » et **mir-**

4695-3p, miR-146a, miR-4750, miR-572, miR-4688, miR-3180-3p, miR-675, miR-4783-3p, miR-146b-5p et miR-4655-5p pour les miARN sous-exprimés chez les CSM-MO provenant de donneurs « âgés ». Ces expériences ont confirmé la sur-expression de miR-9 et la sous-expression de miR-675 dans les CSM-MO « âgés » à faibles capacités de prolifération utilisées pour l'analyse sur puces, ainsi que dans des prélèvements additionnels pour lesquels l'ARN a pu être extrait ($n \geq 13$ pour les CSM-MO « âgés » et $n \geq 10$ pour les CSM-MO « jeunes ») (*Figure 59* *Erreur ! Source du renvoi introuvable.*).

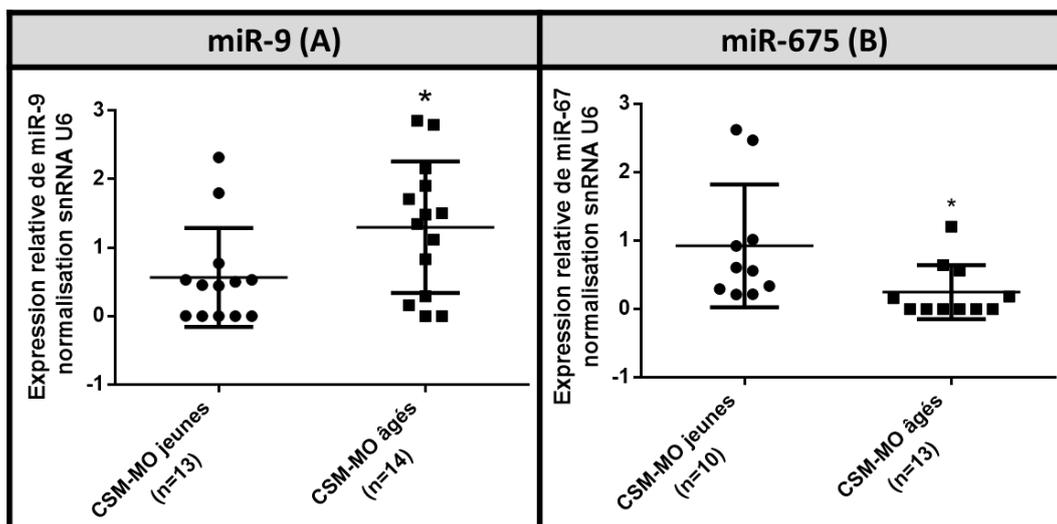


Figure 59 : Expression de miR-9 et miR-675 par RT-PCR Taqman dans les Cellules Stromales Souches Mésenchymateuses de moelle osseuse (CSM-MO) provenant de donneurs âgés versus jeunes à passage 1

Les ARN totaux des CSM-MO amplifiés en normoxie avec du milieu complet supplémenté en sérum de veau foetal (SVF) ont été extraits à passage 1, puis rétro-transcrits à l'aide d'une amorce tige boucle spécifique du miR étudié. Puis une qPCR a été réalisée en présence d'une sonde Taqman spécifique de miR-9 (A) ou miR-675 (B). La quantification relative des résultats est réalisée selon la méthode du $2^{-\Delta\Delta Ct}$ avec comme contrôle endogène le snRNA U6 et comme calibrateur les CSM-MO jeunes. L'analyse statistique a été réalisée à l'aide du logiciel graphpad, grâce au test statistique t non apparié. Les résultats sont exprimés en moyennes \pm l'écart type (ET), $p < 0,05$ (*).

c) Expression de miR-9 et miR-675 dans les CSM-GW

Des analyses par qPCR Taqman ont également été réalisées sur des prélèvements de CSM-GW ayant de « bonnes et moyennes capacités de prolifération » (*Tableau 9*) et ont montré que les CSM-GW n'expriment pas miR-9 (*Figure 60*). De plus, l'expression de miR-9 est significativement augmentée dans les CSM-MO provenant de donneurs âgés à « faibles capacités de prolifération » par rapport aux CSM-GW à « bonnes et moyennes capacités de prolifération ». Concernant miR-675 qui est sous-exprimé dans les CSM-MO provenant de donneurs âgés à « faibles capacités de prolifération », son expression est quasi nulle dans les CSM-GW à « bonnes et moyennes capacités de prolifération » (*Figure 60*).

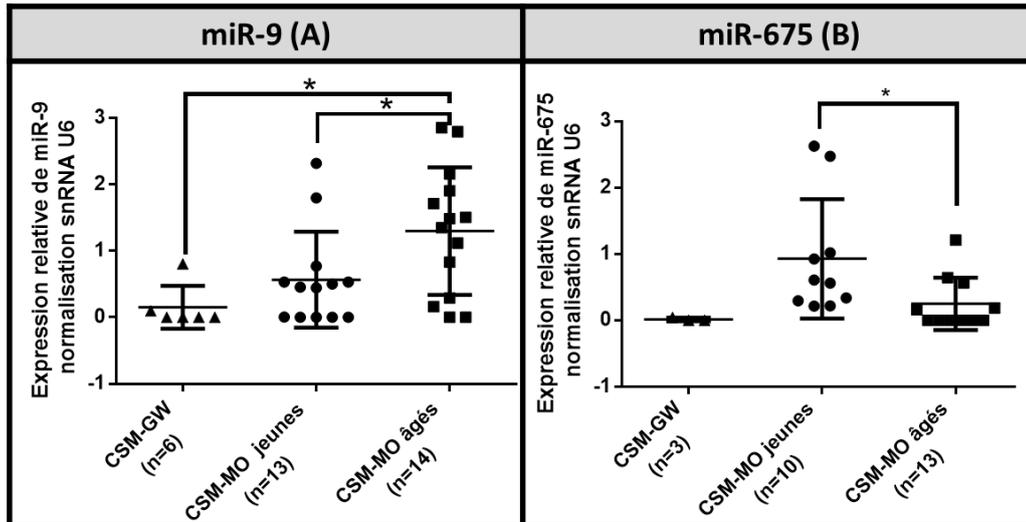


Figure 60 : Expression de miR-9 et miR-675 par RT-PCR Taqman dans les Cellules Stromales Souches Mésoenchymateuses de gelée de Wharton (CSM-GW) comparée aux CSM de moelle osseuse (CSM-MO) provenant de donneurs âgés versus jeunes à passage 1

Les ARN totaux des CSM-MO et CSM-GW amplifiées en normoxie avec du milieu complet supplémenté en sérum de veau fœtal (SVF) ont été extraits, puis rétro-transcrits à l'aide d'une amorce tige boucle spécifique du miR étudié. Puis une qPCR est réalisée en présence d'une sonde Taqman spécifique de miR-9 (A) ou miR-675 (B). La quantification relative des résultats est réalisée selon la méthode du $2^{-\Delta\Delta Ct}$ avec comme contrôle endogène le snRNA U6 et comme calibrateur les CSM-MO jeunes. L'analyse statistique a été réalisée à l'aide du logiciel graphpad, grâce au test statistique t non apparié. Les résultats sont exprimés en moyennes \pm l'écart type (ET), $p < 0,05$ (*).

Nous montrons donc que :

- ✓ l'expression de miR-9 est augmentée dans les CSM-MO provenant de donneurs « âgés » par rapport aux CSM-MO provenant de donneurs « jeunes » ou de CSM-GW à bonnes ou moyennes capacités de prolifération.
- ✓ l'expression de miR-675 est diminuée dans les CSM-MO provenant de donneurs « âgés » par rapport à celles provenant de donneurs jeunes.

3. Analyse de l'expression des ARN messagers et longs ARN non codants

a) Analyse de l'expression différentielle des gènes sur puces Affymetrix

L'analyse sur puce du transcriptome de CSM-MO provenant de 3 donneurs « jeunes » et de 3 donneurs « âgés » à l'aide des puces Affymetrix Human Exon ST 1.0 arrays a révélé une variation significative de l'expression de 30 ARN messagers (ARNm) et de 3 longs ARN non codants (lncARN) (Tableau 24). Parmi ces variations, 18 événements (16 ARNm et 2 lncARN) correspondent à une sous-expression, tandis que 11 événements (10 ARNm et 1 lncARN) correspondent à une sur-expression dans les CSM-MO « âgés » avec une FDR $< 0,1$ et un fold change $\geq |2|$. Une analyse des termes de gene ontology (GO) associés à ces gènes a été réalisée par emploi des programmes DAVID (<https://david.ncifcrf.gov>) et Panther (www.pantherdb.org), mais aucun enrichissement significatif d'une fonction biologique ou d'une voie de signalisation particulière n'a pu être mis en évidence. On notera cependant, qu'en accord avec notre sélection sur les capacités de prolifération, on observe dans les prélèvements CSM-MO « âgés » (et donc à faible prolifération) une diminution de l'expression de certains gènes intervenant dans le contrôle positif de la prolifération tel que le gène CBX7 et l'ARN non codant DLEU2.

Tableau 24 : Tableau de l'analyse de l'expression différentielle sur puces Affymetrix des gènes de Cellules Stromales Souches Mésoenchymateuses de moelle osseuse (CSM-MO) provenant de donneurs âgés (n=3) versus jeunes (n=3) à passage 1

Gène	FC	pval	FDR
CBX7	-3,4423	8,39E-07	0,0085
ZNF552	-2,9462	5,19E-06	0,0206
RSRP1	-2,8955	7,21E-06	0,0230
COL6A3	-2,8243	1,14E-05	0,0299
DLEU2*	-2,7281	1,47E-05	0,0350
CFHR4	-2,6793	2,11E-05	0,0409
IPO7	-2,5677	5,01E-05	0,0650
MIA3	-2,5610	4,56E-05	0,0613
FDX1	-2,5148	6,13E-05	0,0704
KIAA2022	-2,4938	7,56E-05	0,0796
DCAF17	-2,4699	7,27E-05	0,0778
GNAS	-2,4358	9,60E-05	0,0874
LINC00890*	-2,4344	7,89E-05	0,0814
ATP11B	-2,4180	1,20E-04	0,0965
ANKRD20A12P	-2,4107	8,80E-05	0,0848
EFCAB13	-2,3892	1,13E-04	0,0923
GPM6B	-2,3741	1,00E-04	0,0893
DDHD1	-2,3490	1,08E-04	0,0904
NMD3	-2,3475	1,25E-04	0,0979
ATP9B	2,3361	8,31E-05	0,0995
PRR9	2,3696	6,81E-05	0,0925
LINC00664*	2,4161	5,43E-05	0,0847
ENOPH1	2,4669	4,12E-05	0,0726
PPP2R5E	2,4718	3,81E-05	0,0694
CDCA7	2,5153	3,31E-05	0,0633
KCNQ5	2,5367	2,18E-05	0,0502
PSG9	2,6452	1,43E-05	0,0409
SERPINB2	2,7114	9,73E-06	0,0319
SERPINB2	3,0766	1,53E-06	0,0111
KCNQ5	3,8219	7,63E-08	0,0029

Les ARN totaux des CSM-MO provenant de donneurs âgés (n=3) versus jeunes (n=3) et amplifiées en normoxie avec du milieu complet supplémenté en sérum de veau fœtal (SVF) ont été extraits à passage 1 afin de permettre l'analyse de l'expression des gènes sur puces GeneChip™ Human Exon 1.0 ST Array (Affymetrix). Sont représentés les gènes sur- (rose) et sous-exprimés (bleu) avec une FDR inférieure à 0,1 et un FC supérieur ou égal à 2. Les données ont été analysées par le test statistique ANOVA grâce au logiciel Partek, puis Rank Product grâce à l'environnement logiciel R.

Dans cette liste, parmi les gènes exprimés de manière différentielle dans les CSM-MO provenant de donneurs jeunes et âgés (Tableau 24), les ARNm de CBX7 et ATP11B étaient présents dans la liste des ARNm cibles potentielles (>1000 cibles) de miR-9 qui a pu être établie, par emploi des logiciels de prédiction Target Scan (http://www.targetscan.org/vert_72/) et Mirwalk (<http://mirwalk.umm.uni-heidelberg.de/>), afin de pouvoir identifier par la suite d'éventuels couplages miARN/ARNm au sein des données. Concernant miR-675, aucun ARNm retrouvé dans le (Tableau 24) ne figure dans la liste des ARNm cibles potentielles de miR675.

b) Validation des variations d'expression des ARNm par PCR quantitative

Dans un premier temps, nous avons sélectionné un panel d'ARNm présentant des niveaux d'expression suffisamment élevés pour être détectables par PCR quantitative. Nous avons uniquement validé la diminution de l'expression de l'ARNm codant ATP11B dans les CSM-MO provenant de donneurs âgés à faible prolifération (Figure 61). De façon intéressante, la région 3'-UTR

des ARNm ATP11B présente une complémentarité de base avec miR9, dont l'expression est augmentée dans les CSM-MO provenant de donneurs âgés à faible prolifération. Le couplage miR9/ATP11B n'ayant pas encore été décrit dans la littérature, il serait intéressant d'établir un gène rapporteur luciférase dans lequel la phase codante du gène de la luciférase *Firefly* sera fusionnée à la région 3'-UTR du gène ATP11B et de le co-transfecter dans des cellules avec un vecteur recombinant exprimant le pré-miR9. Si le couplage fonctionnel miR9/ATP11B est avéré, l'appariement de base au sein de la région 3'-UTR fusionnée devrait moduler l'activité luciférase.

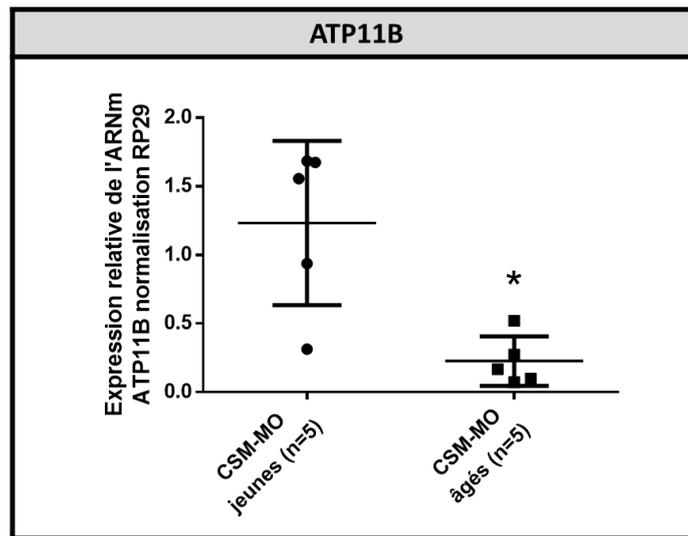


Figure 61 : Expression de l'ARNm ATP11B par RT-PCR SYBR-green dans les Cellules Stromales Souches Mésoenchymateuses de moelle osseuse (CSM-MO) provenant de donneurs âgés versus jeunes à passage 1

Les ARN totaux des CSM-MO provenant de donneurs âgés (n=5) versus jeunes (n=5) et amplifiées en normoxie avec du milieu complet supplémenté en sérum de veau fœtal (SVF) ont été extraits à passage 1 puis ont été rétro-transcrits en ADN complémentaire afin d'étudier l'expression du gène ATP11B dans les CSM-MO provenant de donneurs âgés versus jeunes à passage 1 par qPCR « Sybr Green™ ». La quantification relative des résultats est réalisée selon la méthode du $2^{-\Delta\Delta Ct}$ avec comme contrôle endogène le gène codant pour la protéine ribosomale RP29 et comme calibrateur les CSM-MO jeunes. L'analyse statistique a été réalisée à l'aide du logiciel graphpad, grâce au test statistique t non apparié. Les résultats sont exprimés en moyennes \pm l'écart type (ET), $p < 0,05$ (*).

c) Expression d'ATP11B dans les CSM-GW

L'analyse de l'expression de l'ARNm ATP11B dans les CSM-GW, montre qu'il est également exprimé dans les CSM-GW à passage précoce. De plus, son expression est beaucoup plus importante dans les CSM-GW par rapport aux CSM-MO provenant de donneurs jeunes et âgés (Figure 62).

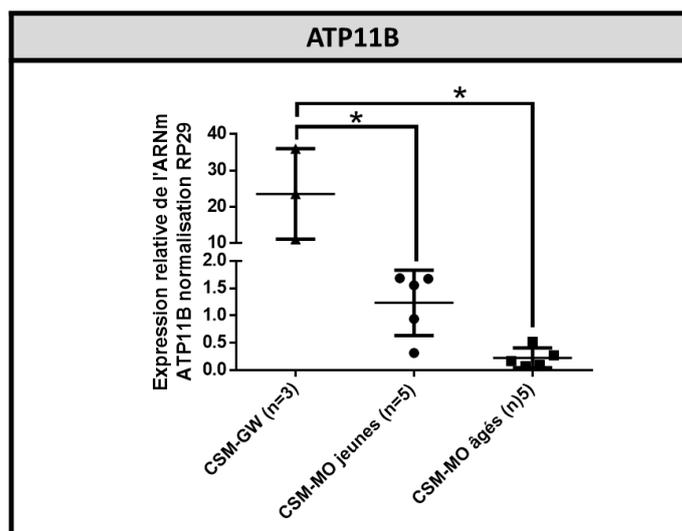


Figure 62 : Expression de l'ARNm ATP11B par RT-PCR SYBR-green dans les Cellules Stromales Souches Mésoenchymateuses de gelée de Wharton (CSM-GW) et de moelle osseuse (CSM-MO) provenant de donneurs âgés versus jeunes à passage 1

Les ARN totaux des cellules stromales souches mésoenchymateuses de gelée de Wharton (CSM-GW) (n=3) et de moelle osseuse (CSM-MO) provenant de donneurs âgés (n=5) versus jeunes (n=5) et amplifiées en normoxie avec du milieu complet supplémenté en sérum de veau foetal (SVF) ont été extraits à passage 1 puis ont été rétro-transcrits en ADN complémentaire afin d'étudier l'expression du gène ATP11B dans les CSM-GW et les CSM-MO provenant de donneurs âgés versus jeunes à passage 1 par qPCR « SYBR Green™ ». La quantification relative des résultats est réalisée selon la méthode du $2^{-\Delta\Delta Ct}$ avec comme contrôle endogène le gène codant pour la protéine ribosomale RP29 et comme calibrateur les CSM-MO jeunes. L'analyse statistique a été réalisée à l'aide du logiciel graphpad, grâce au test statistique t non apparié. Les résultats sont exprimés en moyennes \pm l'écart type (ET), $p < 0,05$ (*).

Nous montrons donc que l'expression d'ATP11B :

- ✓ est diminuée dans les CSM-MO provenant de donneurs « âgés » à « faibles capacités de prolifération » par rapport aux CSM-MO provenant de donneurs « jeunes » à « bonnes ou moyennes » capacités de prolifération.
- ✓ est augmentée dans les CSM-GW par rapport aux CSM-MO provenant de donneurs « jeunes ».

Les principaux résultats obtenus dans cette partie sont repris dans le [Tableau 25](#).

Tableau 25 : Tableau récapitulatif des principaux résultats de la partie 2 concernant l'expression de marqueurs de surface et moléculaires dans les CSM-GW et CSM-MO

	CSM-GW	CSM-MO
Expression homogène des CD entre donneurs	oui	non
CD non exprimés	CD106	CD106
CD exprimés	CD71, CD40b, CD146, CD157 et CD200	CD71, CD40b, CD146, CD157 et CD200
CD dont l'expression \uparrow avec le LPH	aucun	CD71, CD146 et CD200
CD dont l'expression \downarrow avec le LPH	aucun	CD157
Expression de miR-9	non	\uparrow *
Expression de miR-675	non	\downarrow *
Expression d'ATP11B	\uparrow *	\downarrow *

* versus CSM-MO « jeunes »,

CD : cluster de différenciation ; CSM : cellules stromales mésoenchymateuses ; GW : gelée de Wharton ; MO : moelle osseuse ; \downarrow : diminuée ; \uparrow : augmentée.

II. Partie 2 : Discussion

Les CSM présentent une certaine **hétérogénéité** liée à leur source (niche biologique) et aux paramètres propres aux donneurs (âge, sexe, contexte inflammatoire...). Dans les travaux antérieurs à la thèse (Thèse (Li, 2015)) et mon diplôme EPHE nous avons montré que les meilleures capacités de prolifération des CSM-GW par rapport aux CSM-MO en conditions N-SVF étaient liées à la sénescence. En effet, les CSM-GW ainsi que les CSM-MO provenant de donneurs jeunes ont de meilleures capacités de prolifération et expriment moins la SOD2 que les CSM-MO provenant de donneurs âgés (Charif et al., 2019).

Cette hétérogénéité dépend également des conditions d'expansion telles que le taux d'oxygène, les stimulés (inflammation), les suppléments de milieu de culture ou le milieu lui-même (Costa et al., 2020). La recherche de marqueurs de surface ou moléculaires pourrait permettre de palier à ce problème d'hétérogénéité. Certes, les CSM expriment de manière plus ou moins homogène des clusters de différenciation dits « classiques » à leur surface qui permettent de les identifier (Dominici et al., 2006). Cependant, il existe d'autres marqueurs de sous-populations qui permettent d'isoler les CSM en fonction de certains critères et de les enrichir (Sensebé and Bourin, 2011). Les marqueurs analysés ici, ont été choisis en fonction des travaux précédents du laboratoire réalisés essentiellement avec les CSM-MO (Thèse (Targa, 2019)). Il a notamment été montré que l'expression de certains marqueurs de surface pouvaient varier en fonction des donneurs. Cependant, un groupe de marqueurs de surface tels que CD146, CD71, CD105, CD44 ainsi que les paramètres de structure relative (SSC) sont associés au vieillissement répliatif, autrement dit à l'âge des donneurs de CSM-MO. Par ailleurs, l'expression de CD146, CD140b et CD71 était corrélée à la prolifération des CSM-MO. Même si l'expression de CD146 était plutôt stable dans les prélèvements, celle-ci reste hétérogène en fonction des donneurs. CD146 a d'ailleurs été proposé comme marqueur de tri cellulaire afin de sélectionner les CSM-MO ayant les meilleures capacités de prolifération (Thèse (Targa, 2019)).

Tout d'abord, nos résultats ont montré des similitudes dans l'expression des marqueurs de surface entre les CSM-GW et CSM-MO. En effet, parmi les marqueurs étudiés, certains sont très faiblement exprimés (voire pas du tout) par les CSM-GW à P3 et les CSM-MO à P2, tels que CD106. D'ailleurs, d'après la littérature, l'expression de CD106 tend à diminuer après le passage 1 en normoxie avec du LPH ou du SVF (Juhl et al., 2016). Cependant, les mêmes auteurs ont montré que l'expression de CD106 est dépendante de la source de CSM (CSM-MO ou de tissu adipeux).

En effet, parmi les autres marqueurs étudiés, l'expression était différente entre les CSM-GW et CSM-MO. Tout d'abord, l'expression des marqueurs de sous-population CD71, CD140b, CD146 et CD157 est homogène à la surface des CSM-GW, tandis qu'elle est plus hétérogène à la surface des CSM-MO (*Données non publiées, Thèse (Targa, 2019)*). Par ailleurs, les donneurs utilisés dans cette étude sont âgés de 9, 28 et 78 ans. L'expression de CD71, CD140b et CD146 est diminuée dans les CSM-MO provenant du donneur âgé de 78 ans, ce qui est confirmé par nos résultats antérieurs (Thèse (Li, 2015)) et la littérature (Charif et al., 2017; Siegel et al., 2013). D'autres résultats intéressants obtenus par une chercheuse de l'équipe (Dima Ghannoum) ont montré que l'expression de CD146 diminue, tandis que celle de CD200 augmente dans les CSM-GW en sénescence répliatif. Une différence importante concerne l'effet de la condition de culture sur l'expression de ces marqueurs à la surface des CSM-GW et CSM-MO. Même le taux d'oxygène (normoxie/hypoxie) n'affecte pas l'expression de ces marqueurs, la nature du supplément du milieu de culture (LPH/SVF) semble avoir un impact sur les CSM-MO, mais pas sur les CSM-GW. En effet, dans notre étude, l'expression de CD71, CD146 et CD200 à la surface des CSM-MO augmente avec le LPH comme supplément de milieu de culture, tandis que celle de CD157 semble diminuer. D'après la littérature, les CSM-MO expriment les récepteurs aux facteurs de

croissance tels que CD140a et CD140b, les récepteurs au PDGF-A et B, ainsi que les récepteurs au bFGF et à l'IGF-1 après amplification en normoxie avec du milieu supplémenté en LPH ou SVF (Doucet et al., 2005). Cependant, l'expression de CD140b n'est pas augmentée en LPH à la surface des CSM-MO utilisées dans cette thèse. Néanmoins, l'expression de CD140b et CD71 dans les CSM-MO amplifiées avec du LPH serait dépendante du mode de préparation du LPH tout comme celle de CD146 (Fekete et al., 2012b). Par ailleurs, nos résultats montrent que l'expression de CD146 est diminuée dans les CSM-MO en LPH qui sont moins sénescents. En effet, l'expression de CD146 diminue avec la sénescence des CSM (Li et al., 2017d) et serait stimulée dans les CSM de pulpe dentaire par le facteur de croissance PDGF-BB (Mihaylova et al., 2018), ce dernier étant présent en très forte concentration dans le LPH (Doucet et al., 2005; Shanskii et al., 2013). De plus, les résultats antérieurs du laboratoire ([actuellement soumis pour publication](#)) de l'analyse protéomique des marqueurs à la surface des CSM-MO ont montré une augmentation de l'expression de CD157 avec la sénescence répliquative (Thèse (Targa, 2019)). D'après notre étude, l'expression de CD157 semble diminuer avec les CSM-MO amplifiées avec du LPH, qui ont de meilleures capacités de prolifération et de migration et qui sont moins sénescents. CD157 et son ligand SCRG1 sont impliqués dans l'auto-renouvellement, la migration et la différenciation ostéocytaire en maintenant notamment ces fonctions à passage élevé (Aomatsu et al., 2014). Il reste cependant à démontrer pourquoi les CSM-MO amplifiées avec du LPH ont de meilleures capacités de migration *in vitro* dans nos résultats, sachant que SCRG1/CD157 favorise l'activité de migration des CSM-MO *ex vivo* (Aomatsu et al., 2014). L'expression de CD166 dans les CSM-MO avec du LPH par rapport au SVF ne varie pas, ce qui est confirmé par la littérature (Griffiths et al., 2013). Concernant CD200, son expression est faible pour les CSM-MO par rapport aux CSM-GW. Il semblerait que son expression soit dépendante de la source de CSM. D'après la littérature, CD200 est un peu exprimé dans les CSM de cordon, exprimé par une petite partie des CSM-MO et pas du tout exprimé par les CSM de tissus adipeux après expansion en normoxie avec du LPH (Fazzina et al., 2016).

Il est envisageable que l'expression des gènes codant ces marqueurs de surface soit régulée par d'autres marqueurs moléculaires tels que les miR. L'expression de ces miR pourrait être impliquée dans la régulation de la prolifération et de la fonctionnalité des CSM. En effet, miR-146a, miR-146b-5p, miR-488, miR-675, miR-320c, miR-9, miR-10a et miR-206, préalablement décrits par d'autres équipes comme intervenant dans le contrôle de la prolifération cellulaire des CSM ou d'autres types cellulaires, sont retrouvés dans notre liste de candidats avec des sens de variation en accord avec leur rôle proposé (Delaloy et al., 2010; Hsieh et al., 2013; Keniry et al., 2012; Roese-Koerner et al., 2017). Concernant les autres miR sur- et sous-exprimés de manière significative dans les CSM-MO « âgées », aucune donnée de la littérature n'a mis en évidence leur implication dans les capacités de prolifération et/ou le vieillissement des CSM ou d'autres types cellulaires.

De façon intéressante, l'expression de certains des miARN retrouvés différemment exprimés dans les CSM-MO « âgées », les miARN miR-146a et miR-181, a également été associée à la modulation des propriétés immunomodulatrices des CSM (Taganov et al., 2006). Il est par conséquent envisageable que ces miARN régulent à la fois la prolifération des CSM et leur propriétés immunomodulatrices (Pers et al., 2018). En effet, des travaux ont montré que la sur-expression de miR-146a-5p dans les CSM-GW par rapport aux CSM-MO était associée à de meilleures capacités de prolifération et de migration (Hsieh et al., 2013).

Nous pouvons remarquer d'après l'analyse sur puces que la majorité des variations détectées dans les CSM-MO « âgées » à faibles capacités de prolifération, correspondent à des sous-expressions, suggérant que la sur-expression des miARN pourrait avoir un rôle dans la prolifération des CSM.

Cette étude a permis de mettre en évidence deux miRNA potentiellement intéressants, miR-675 et miR-9. Nos données de qPCR Taqman ont permis de confirmer que **miR-675** était sur-exprimé dans les CSM-MO provenant de donneurs jeunes à fortes capacités de prolifération par rapport aux donneurs âgés, après expansion en normoxie avec du SVF comme supplément de milieu culture. Il n'est pas improbable que la fonction de certains miR soit différente suivant la source de CSM adulte ou fœtale. En effet, d'après la littérature la sur-expression de miR-675 serait associée à la prolifération tumorale dans certains cancers colorectaux (Tsang et al., 2010) et inhiberait la prolifération de cellules souches embryonnaires (Keniry et al., 2012).

Par ailleurs, nos données de qPCR Taqman ont permis de confirmer que **miR-9** est sur-exprimé dans les CSM-MO à faibles capacités de prolifération après expansion en normoxie avec du SVF comme supplément de milieu culture. Ces résultats sont intéressants, car l'implication de miR-9 dans la prolifération des CSM-MO n'a pas été démontrée mis à part quelque travaux montrant le rôle de miR-9 dans le différenciation ostéo cartilagineuse (Liu et al., 2016; Luo et al., 2017) des CSM-MO ou dans la régulation de la prolifération de fibroblastes dans un modèle de sénescence réplivative (O'Loghlen et al., 2015). D'ailleurs, dans les CSM-MO de rats, miR-9 serait impliqué dans la migration *via* la voie de signalisation de la β -caténine (Li et al., 2017c) et le homing *via* la voie de signalisation PI3K/AKT (Bing et al., 2016). De plus, la libération de miR-9 par les CSM-MO *via* les exosomes supprime le développement de cancer de la vessie (Cai et al., 2019). De façon intéressante, les résultats sur puces montrent que le gène CBX7 est sur-exprimé dans les CSM-MO provenant de donneurs âgés à faibles capacités de prolifération par rapport aux donneurs jeunes à fortes capacités de prolifération. Le gène CBX7 code un composant du complexe polycomb PRC1-like (polycomb repressive complexe 1) qui régule différents processus tels que la pluripotence, la différenciation, le cancer et la sénescence réplivative. Par ailleurs, miR-9 entraîne la sous-expression de CBX7 dans un modèle de sénescence réplivative dans les fibroblastes (O'Loghlen et al., 2015). Cependant, nous n'avons pas pu valider par qPCR SYBR-Green la sous-expression de CBX7 dans les CSM-MO provenant de donneurs âgés, alors que nous avons validé la sous-expression de ATP11B dans ces mêmes CSM-MO. L'expression d'**ATP11B** est augmentée dans les CSM-MO provenant de donneurs jeunes ou dans les CSM-GW après expansion en normoxie avec du SVF comme supplément de milieu culture. Le gène ATP11B est exprimé dans différents tissus (moelle osseuse, cerveau...) et code une ATPase qui participe au transport des ions métalliques lourds (Cu(2+)), non lourds (H(+), Na(+), K(+) ou Ca(+)) ou les phosphatidylsérines à travers la membrane cellulaire (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/23200>). Il a déjà été montré que le gène ATP11B était exprimé à passage précoce dans les CSM-MO provenant de 9 donneurs âgés entre 30 et 59 ans, mais son expression était augmentée de manière significative *in vitro*, après 8 passages (Binato et al., 2012).

Il serait également intéressant de savoir si les conditions de culture affectent l'expression des marqueurs moléculaires miR-9, miR-675 et ATP11B. En effet, des travaux ont montré dans des lignées de CSM que miR-675 serait impliqué dans la stabilisation de HIF-1 α et que l'hypoxie induisait l'expression de miR-675 qui pouvait avoir un rôle sur l'ossification *via* la voie de signalisation Wnt/ β caténine dans des lignées de CSM (Costa et al., 2017; Noronha et al., 2019). De plus, dans la littérature, même si les capacités de prolifération des CSM-MO amplifiées en normoxie sont améliorées avec le LPH, des analyses du transcriptome par puce « Affymetrix Human Transcriptome Arrays 2.0 » ont montré des changements modérés par rapport au SVF (Fernandez-Rebollo et al., 2017). En revanche, d'autres études ont comparé la culture de CSM-MO en normoxie en SVF à celle avec du milieu supplémenté en facteurs de croissance contenus dans le LPH et ont montré une sur-expression

de miR impliqués dans la différenciation ostéocytaire tels que miR-135b, miR-146a, miR-210, et miR-335-5p, miR-378 (Ren et al., 2018).

Il serait également intéressant de savoir si les conditions de culture affectent l'expression d'ATP11B. En effet, dans la littérature, des analyses sur puces « Human Genome SurveyMicroarray version 2.0 » de l'ARN de CSM-MO amplifiées jusqu'à P2 (versus P0) ont montré un nombre plus important de gènes sur- et sous-exprimés avec le LPH comme supplément de milieu de culture par rapport au SVF. Parmi ces gènes, un bon nombre était associé à la sénescence cellulaire (Schallmoser et al., 2010).

Ces résultats encourageants, montrent l'importance de miR-9 dans les capacités de prolifération et laissent supposer un rôle dans les propriétés fonctionnelles des CSM telles que la migration et l'immunosuppression. Afin de confirmer l'implication de miR-9 dans les propriétés fonctionnelles des CSM, il serait intéressant de réaliser des expériences complémentaires avec des antagonismes (inhibant les miR) ou des miR-mimics et de vérifier le couplage de miR9/ATP11B qui n'a pas été démontré dans la littérature. Les principaux résultats qui ont été obtenus sont représentés dans la [Figure 63](#).

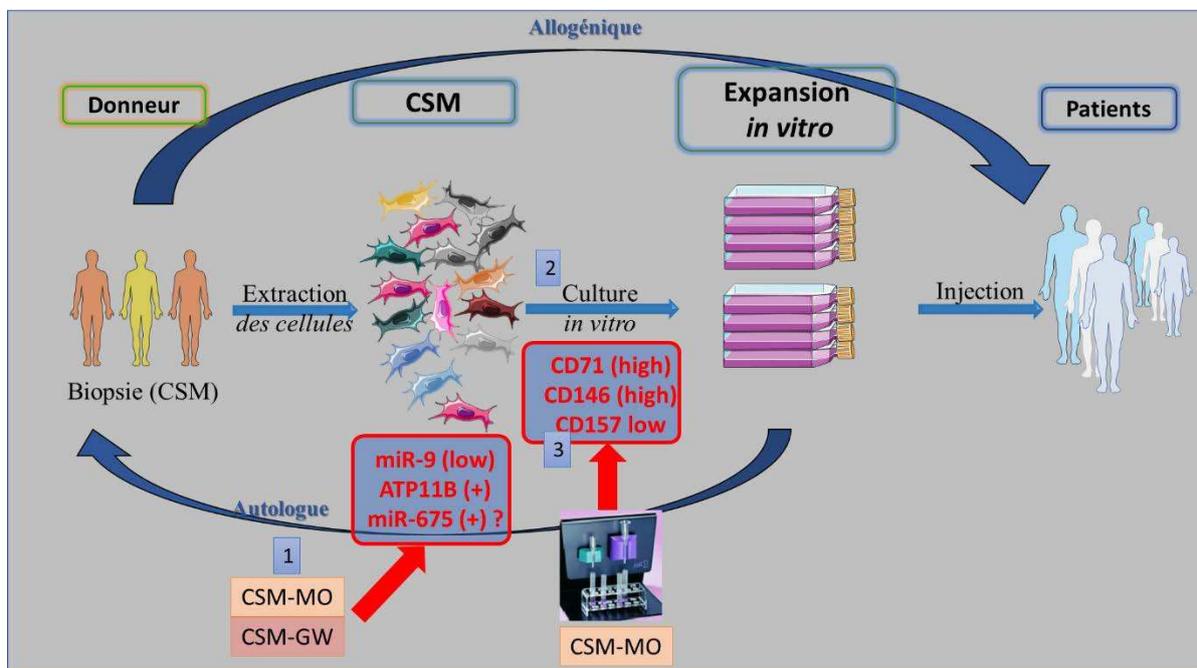


Figure 63 : Schéma récapitulatif des principaux résultats obtenus dans la partie 2

Dans cette deuxième partie, nous nous sommes intéressés aux biomarqueurs de surface et moléculaires en lien avec la prolifération des CSM. Nous avons montré qu'il serait possible d'utiliser des marqueurs moléculaires précoces dès le début de la culture. L'ARN d'une partie des cellules à la fin du passage 0 pourrait être utilisée afin de vérifier que les CSM n'expriment pas miR-9 mais expriment l'ARN messager d'ATP11B et miR-675 (1). Cette étape permettrait de savoir si le prélèvement a potentiellement de bonnes capacités de prolifération et si son amplification in vitro mérite d'être poursuivie (2). A la fin de cette étape d'amplification, un tri magnétique compatible avec la clinique pourrait également être réalisé afin de sélectionner les CSM CD71 (high) et CD146 (high) et CD157 (low) qui ont de meilleures capacités de prolifération (3).

Partie 3 : Effet du contexte de stress oxydant et inflammatoire sur les propriétés fonctionnelles des CSM

I. Partie 3 : Résultats

Le stress oxydant est un type d'agression de la cellule dû à des radicaux libres, les espèces réactives de l'oxygène (ROS) ou de l'azote (RNS). Il peut être induit par l'expansion *in vitro* des CSM ou retrouvé chez le donneur ou le patient présentant un contexte inflammatoire. Ce stress oxydant peut affecter la qualité des CSM et reste un paramètre clé à contrôler afin d'augmenter l'efficacité thérapeutique. A l'UTCT du CHRU de Nancy, les CSM-GW sont privilégiées par rapport aux CSM-MO en thérapie cellulaire pour traiter les pathologies telles que la GVHD. Il est donc intéressant de connaître l'impact du stress oxydant sur les propriétés fonctionnelles des CSM-GW. Dans la GVHD, une complication de la greffe de CSH, les lymphocytes T du donneur vont attaquer les cellules du receveur. Un **contexte de stress oxydant** est retrouvé dans cette pathologie (Sari et al., 2008) en plus **du contexte inflammatoire** et notamment la présence de cytokines pro-inflammatoires telles que l'IFN- γ (Toubai et al., 2012). Cette cytokine est utilisée dans la littérature dans des modèles de GVH murins (Kim et al., 2018), mais aussi dans l'équipe pour préconditionner les CSM-GW avant une application thérapeutique. Afin de connaître l'effet individuel du stress oxydant et des cytokines pro-inflammatoires sur les CSM-GW, nous avons mis en place la quantification des ROS dans les CSM-GW, pour mesurer la production de ROS intracellulaires après stimulation par du peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) et de l'interféron gamma (IFN- γ). Ensuite, nous avons évalué, l'effet de ces 2 stimulations sur la prolifération, l'apoptose et la sénescence des CSM-GW, avant d'étudier l'effet sur leurs propriétés fonctionnelles (migration et immunosuppression).

A. Agents pro- et antioxydants dans les CSM-GW

Les ROS ou les RNS sont prises en charge par des systèmes antioxydants de la cellule qui lui permettent de maintenir un niveau basal d'espèces réactives. Cependant, quand il y a trop d'espèces réactives ou quand les systèmes antioxydants sont défaillants, un déséquilibre est observé aboutissant au stress oxydant. Il est donc important d'évaluer la production de ROS intracellulaires par les CSM-GW amplifiées en N-LPH et H-LPH ainsi que leur potentiel antioxydant avant d'étudier l'effet d'un stress oxydant sur leurs propriétés fonctionnelles.

1. Production d'espèces de réactives de l'oxygène (ROS) intracellulaires par les CSM-GW cultivées en hypoxie et en normoxie

Les résultats présentés dans ce travail ont été obtenus avec la sonde CM- H_2 DCFDA utilisée à 5 μ M pour la quantification des ROS intracellulaires. La concentration de la sonde a été choisie à partir des mises au point réalisées au préalable (*Annexe 1*). Cette sonde permet de quantifier les ROS et les RNS intracellulaires. Sur certains échantillons, nous avons également confirmé les tendances obtenues avec la sonde DHE, considérée dans la littérature comme étant plus spécifique de l'anion superoxyde (*Annexe 2*). La DHE a été utilisée à la concentration de 10 μ M, suivant les recommandations du fournisseur et les tests réalisés préalablement sur les CSM-GW au laboratoire. Nous avons également utilisé la sonde mitosox, qui correspond à une sonde DHE spécifique des mitochondries. Les tendances observées étaient les mêmes que celles observées avec la sonde CM- H_2 DCFDA (*résultats non montrés*).

Nous avons comparé la production de ROS des CSM-GW cultivées en normoxie et en hypoxie. Les résultats montrent que la production de ROS est plus importante pour les cellules amplifiées en

condition d'hypoxie (IMF=92,4) par rapport à la normoxie (IMF=68,8) (Figure 64). Nous pouvons également noter que les CSM-GW amplifiées en normoxie et en hypoxie (Figure 64A) ont une morphologie allongée de type fibroblastique et prolifèrent sous forme de colonies.

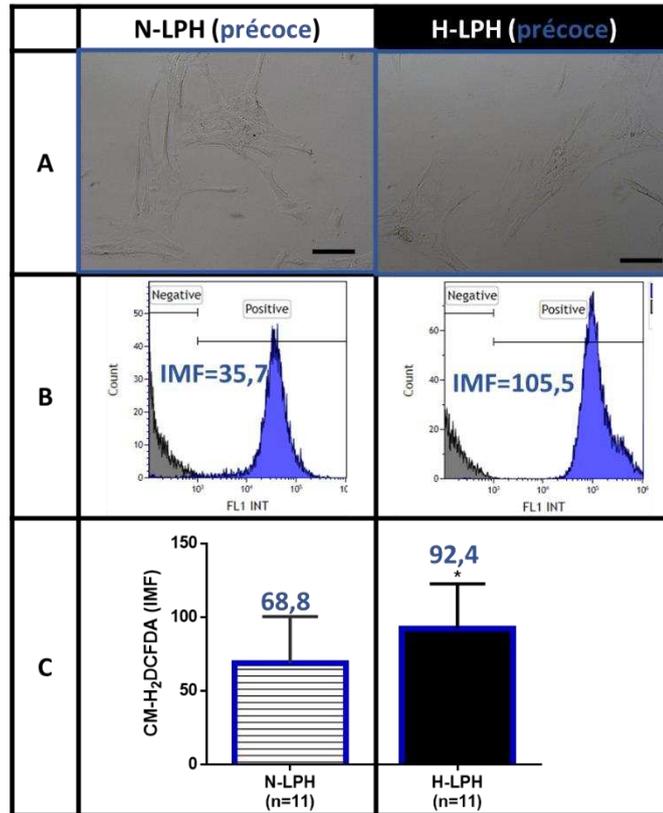


Figure 64 : Production d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) intracellulaires dans les CSM-GW amplifiées à passage précoce en hypoxie et en normoxie

Les CSM de gelée de Wharton cultivées à passage précoce (P3) en normoxie (N) ou hypoxie (H) avec du milieu supplémenté en lysat plaquettaire humain (LPH) ensemencées à 1000 cellules/cm² ont été cultivées pendant 7 jours. Images des cellules obtenues par microscopie inversé (Leica DMI3000B, échelle=100 µm) avant la quantification de ROS intracellulaires (A). Histogrammes monoparamétriques de la distribution de fluorescence verte (FL1) émise en fonction du nombre d'évènements (Count) obtenus par cytométrie en flux (Gallios, Beckman Coulter) avec la sonde CM-H₂DCFDA. Gris = contrôle négatif, bleu = cellules incubées avec la sonde (B). La moyenne des valeurs d'IMF (intensité médiane de fluorescence) obtenues à partir des histogrammes est représentée sous forme de graphique de barres pour les 11 échantillons. (C). L'analyse statistique a été réalisée à l'aide du logiciel graphpad, grâce à un test t apparié. Les résultats sont exprimés en moyennes ± l'écart type (ET), p < 0,05 (*).

Nous montrons donc que les CSM-GW amplifiées en hypoxie produisent plus de ROS que celles amplifiées en normoxie.

2. Production de ROS intracellulaires par les CSM-GW en sénescence réplivative

Nous avons par la suite étudié la production de ROS intracellulaires par les CSM en sénescence réplivative, phénomène qui peut survenir lors de l'expansion *in vitro* des CSM.

Les images présentées dans la Figure 65 montrent que les CSM-GW à passage précoce amplifiées en normoxie et en hypoxie prolifèrent bien et ont une faible expression de la β-galactosidase (Figure 65 A1 et A3), contrairement aux CSM-GW à passage tardif qui prolifèrent peu et expriment fortement la β-galactosidase (Figure 65 A2 et A4), ce qui témoigne de leur état de sénescence. Les résultats du dosage des ROS montrent que les CSM sénéscentes produisent plus de ROS que les CSM non sénéscentes, que ce soit en condition d'amplification en normoxie (IMF : 182,1 à passage tardif contre

43,2 à passage précoce) ou en hypoxie (IMF : 159,2 à passage tardif contre 86,2 à passage précoce) (*Figure 65 C*). De façon intéressante, les résultats montrent que les CSM-GW à passage précoce, produisent plus de ROS après amplification en hypoxie, alors que la tendance semble s'inverser à passage tardif.

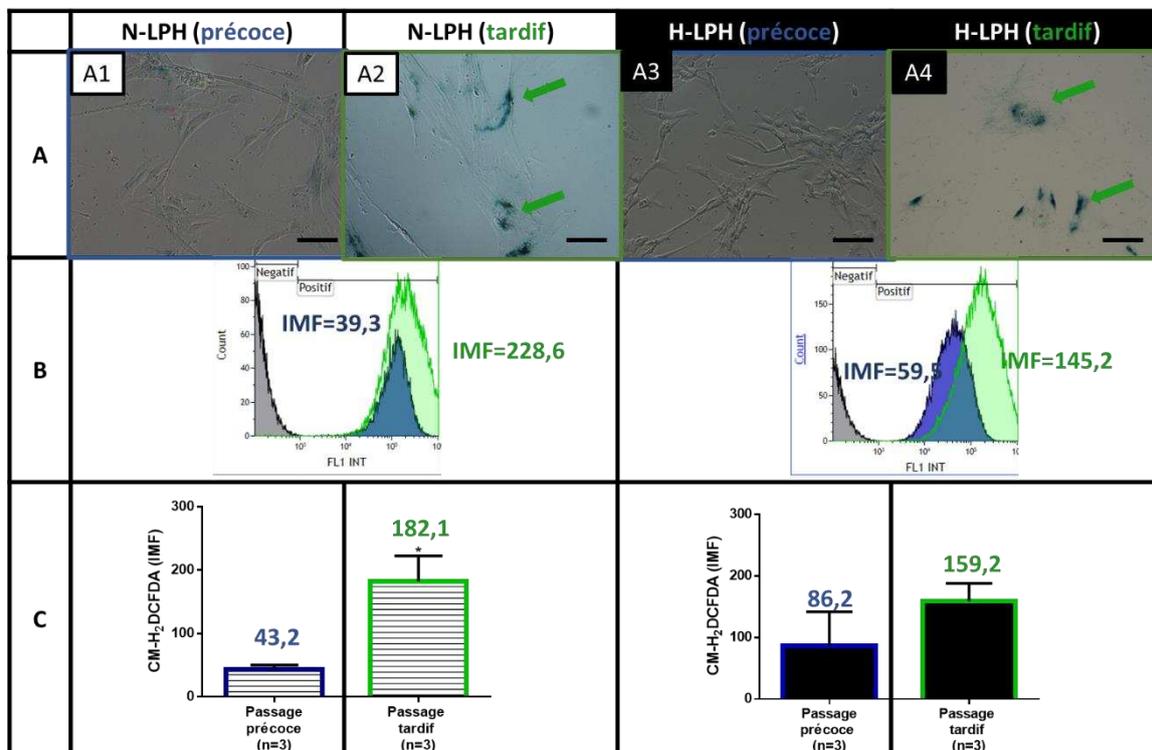


Figure 65 : Production d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) intracellulaires dans les CSM-GW amplifiées en hypoxie et normoxie à passage tardif (sénescence réplivative) versus précoce

Les CSM de gelée de Wharton amplifiées jusqu'à passage précoce (P3-P4) ou tardif (entre P15 et P20) (sénescence réplivative) en normoxie (N) ou hypoxie (H) avec du milieu supplémenté en lysat plaquettaire humain (LPH) ont été ensemencées à 1000 cellules/cm² avant d'être trypsées. Une partie des cellules a été remise en culture pour réaliser le test de sénescence, tandis que l'autre partie des cellules en suspension a été incubée 45 minutes avec la sonde CM-H₂DCFDA à 5 µM avant d'être lavée et analysée par cytométrie en flux (Gallios, Beckman Coulter). Photographie des cellules au microscope inversé (Leica DMI3000B, échelle 100 µm) après le test de sénescence (*bleu* : passage précoce, cellules non sénescentes ; *vert* : passage tardif cellules en sénescence réplivative) (A), représentation des histogrammes monoparamétriques de la distribution de la fluorescence verte émise (FL1) en fonction du nombre d'évènements (Count) obtenus avec la sonde CM-H₂DCFDA pour un échantillon (B) et représentation sous forme de graphique de barres de la moyenne des valeurs d'IMF (intensité médiane de fluorescence) obtenues à partir des histogrammes de distribution (C). L'analyse statistique a été réalisée à l'aide du logiciel graphpad, grâce au test t apparié. Les résultats sont exprimés en moyennes ± l'écart type (ET), p < 0,05 (*).

Nous montrons donc que les CSM-GW en « sénescence réplivative » produisent plus de ROS que les CSM-GW non sénescentes ou à passage précoce.

3. Les systèmes antioxydants

Les cellules disposent de systèmes antioxydants pour leur permettre de maintenir un niveau basal de ROS, des systèmes enzymatiques et non enzymatiques. Nous avons donc étudié la présence de quelques-uns de ces agents chez les CSM-GW amplifiées en normoxie et en hypoxie afin d'évaluer leur réponse à la production de ROS intracellulaires.

a) Dosage du glutathion réduit (GSH)

Dans un contexte de stress oxydant dans la cellule, le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) peut être décomposé en H_2O par la glutathion peroxydase (GPX) en présence de glutathion réduit (GSH) et donner le glutathion oxydé (GSSG). Le ratio **GSH/GSSG** et le potentiel redox calculé grâce à l'équation de Nernst à partir des concentrations en GSH et GSSG, renseignent sur le statut redox des CSM-GW. C'est un bon indicateur du stress oxydant subit par les CSM-GW. Cependant, nos expériences n'ont pas permis de quantifier le GSSG. Les résultats de la *Figure 66* présentent uniquement les quantifications du glutathion réduit (GSH) (*Figure 66*).

Les résultats montrent que pour les 3 échantillons testés de CSM-GW amplifiées avec du milieu supplémenté en LPH, lorsque la production de ROS intracellulaires augmente de manière significative en hypoxie par rapport à la normoxie, la concentration en GSH diminue de manière significative (*Figure 66*). Le GSH est considéré comme un agent antioxydant important de la cellule, il est le cofacteur essentiel de la GPX pour éliminer les espèces réactives de l'oxygène tels que l' H_2O_2 . Ces résultats sont intéressants, car le GSH est utilisé par la GPX pour exercer son action antioxydante.

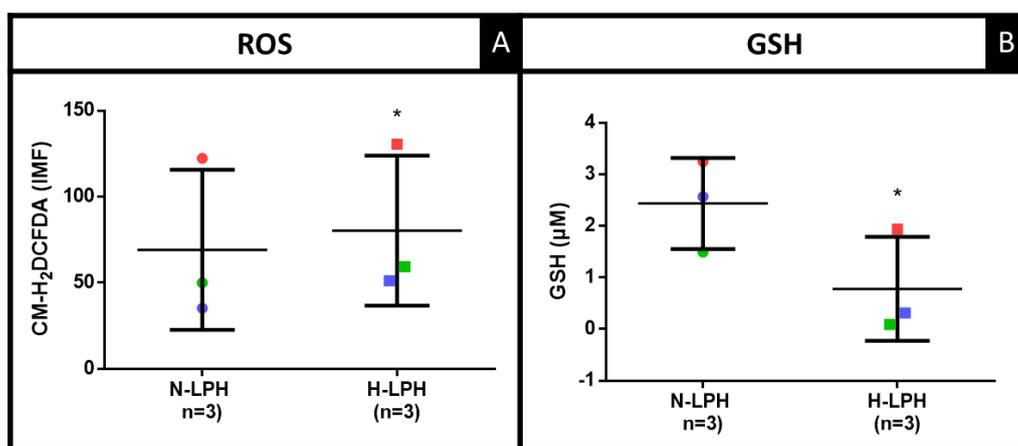


Figure 66 : Dosage du glutathion réduit (GSH) dans les CSM-GW amplifiées avec du lysat plaquettaire humain (LPH) à passage précoce en hypoxie et normoxie

Les cellules stromales mésenchymateuses de gelée de Wharton (CSM-GW) cultivées en normoxie et en hypoxie ont étéensemencées à 1000 cellules/cm² pendant au moins 7 jours avant d'être trypsinées pour le dosage de ROS intracellulaires à l'aide de la sonde Di(Acetoxyethyl Ester) 6-Carboxy-2',7'-Dichlorodihydrofluorescein Diacetate (Invitrogen, Réf C2938, CM-H2DCFDA) et analysées par cytométrie en flux (Gallios, Beckman Coulter (A)). Le surnageant des lysats cellulaires est également récupéré pour quantifier le glutathion réduit (GSH) par spectrofluorimétrie (Variaskan flash, Thermofisher) (B). L'analyse statistique a été réalisée à l'aide du logiciel graphpad, grâce à un test t apparié (*p<0.05).

b) **Expression de l'enzyme de protection contre le stress oxydant SOD2**

Des marquages immunofluorescents de la SOD2 ont été réalisés sur les CSM-GW amplifiées en normoxie et en hypoxie à passage précoce. Les images obtenues ne montrent pas de différences d'expression de la SOD2 par les CSM-GW amplifiées en normoxie (32%) et en hypoxie (28%) (*Figure 67*). Même si le marquage immunofluorescent de la SOD2 ne donne pas d'informations sur l'activité de l'enzyme, ces résultats laissent supposer que quelle que soit la tension en oxygène, les CSM-GW expriment la SOD2.

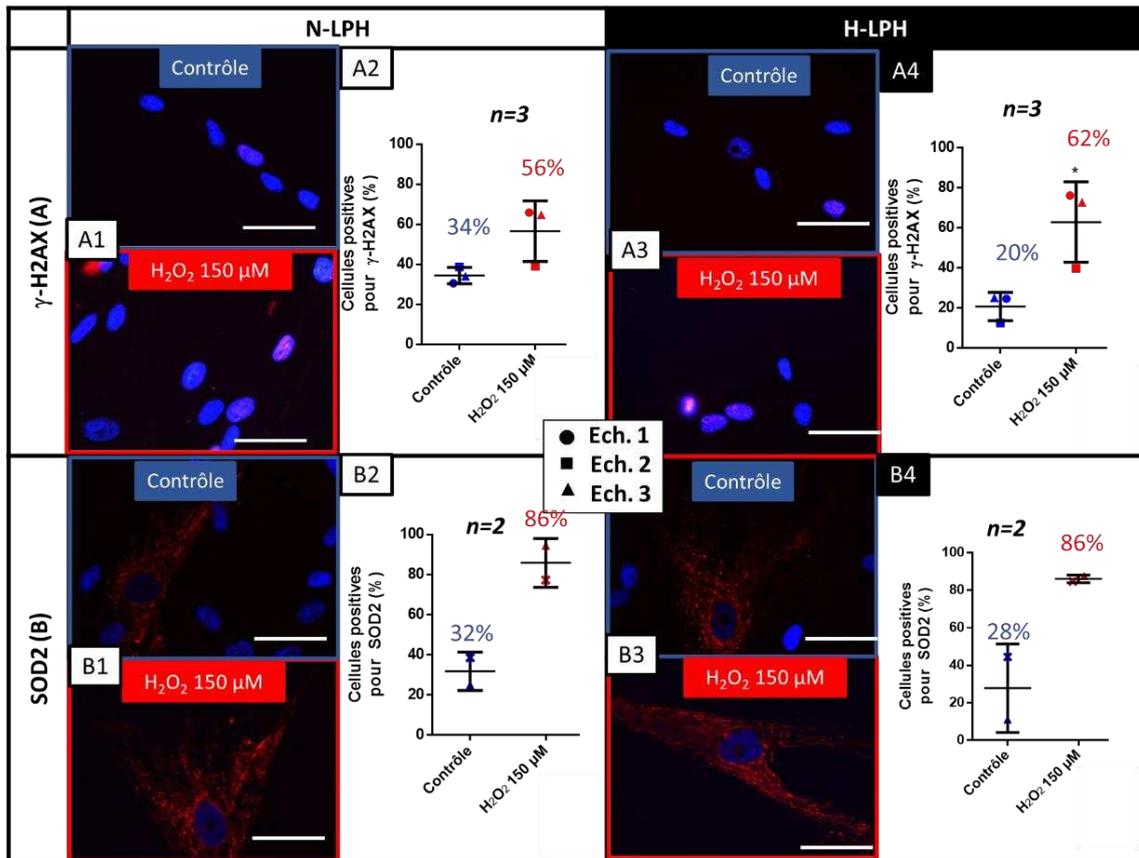


Figure 67 : Expression de la superoxyde dismutase 2 (SOD2) dans les CSM-GW amplifiées avec du lysat plaquettaire humain (LPH) à passage précoce en normoxie et hypoxie

Les cellules stromales mésenchymateuses de gelée de Wharton (CSM-GW) cultivées jusqu'au passage 3 en normoxie et en hypoxie ont été trypsinées avant d'être ensemencées à 1000 cellules/cm² sur des lamelles en verre pour réaliser le marquage immunofluorescent de la superoxyde dismutase 2 (SOD2). Photographie des cellules au microscope à épifluorescence (Leica DMI3000B, échelle 100 μm) (A) en normoxie et en hypoxie (n=1) : Noyau en bleu (dapi), cytosquelette en vert (Alexa 488) et SOD2 en rouge (Alexa 555) ; Représentation du pourcentage de cellules positives pour le marquage de la SOD2 en normoxie (B1) et en hypoxie (B2) à partir de 5 images (environ 10 cellules/images) (n=2 échantillons). Cellules contrôles : **bleu** ; Cellules stimulées : **rouge**.

Au final, ces résultats montrent que les systèmes antioxydant tels que la SOD2 ou la GSH sont exprimés et sont détectables dans les CSM-GW. Cependant, d'autres systèmes antioxydants sont probablement impliqués et mériteraient d'être étudiés.

B. Stimulation par H₂O₂ 150 μM

Afin d'étudier l'effet du stress oxydant sur les propriétés fonctionnelles des CSM-GW, il était important de pouvoir mimer un contexte de stress oxydant dans les CSM-GW. Dans ce travail nous avons décidé de stimuler les CSM-GW avec du peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) à 150 μM, la stimulation la plus utilisée dans la littérature.

1. Production de ROS intracellulaires

Pour utiliser l'H₂O₂ en tant qu'agent de stimulation des CSM-GW, des expériences préliminaires avaient été réalisées dans le but d'optimiser la concentration en H₂O₂ (i), mais aussi le temps de contact avec les CSM-GW (ii) afin de ne pas induire de la mort cellulaire par apoptose ou nécrose. Ainsi, les CSM-GW ont été incubées avec du peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) à 150 μM pendant 2 heures, puis maintenues en culture pendant 48 heures avec du milieu complet avant l'analyse par cytométrie en

flux. Nous remarquons que les CSM-GW stimulées par l' H_2O_2 produisent plus de ROS que ce soit en normoxie (IMF=135,5) ou en hypoxie (IMF=162,7) par rapport aux CSM-GW contrôle (*Figure 68*). De plus, la pré-incubation des CSM-GW stimulées par H_2O_2 avec un agent antioxydant, la N-acétylcystéine (NAC) à 10 mM pendant 2 heures, permet de limiter cette production de ROS en normoxie (IMF=103,4) et en hypoxie (IMF=92,1) (*Figure 68*). La NAC est un précurseur du glutathion réduit (GSH), cofacteur de la glutathion peroxydase (GPX) qui permet d'éliminer les ROS produites par la cellule.

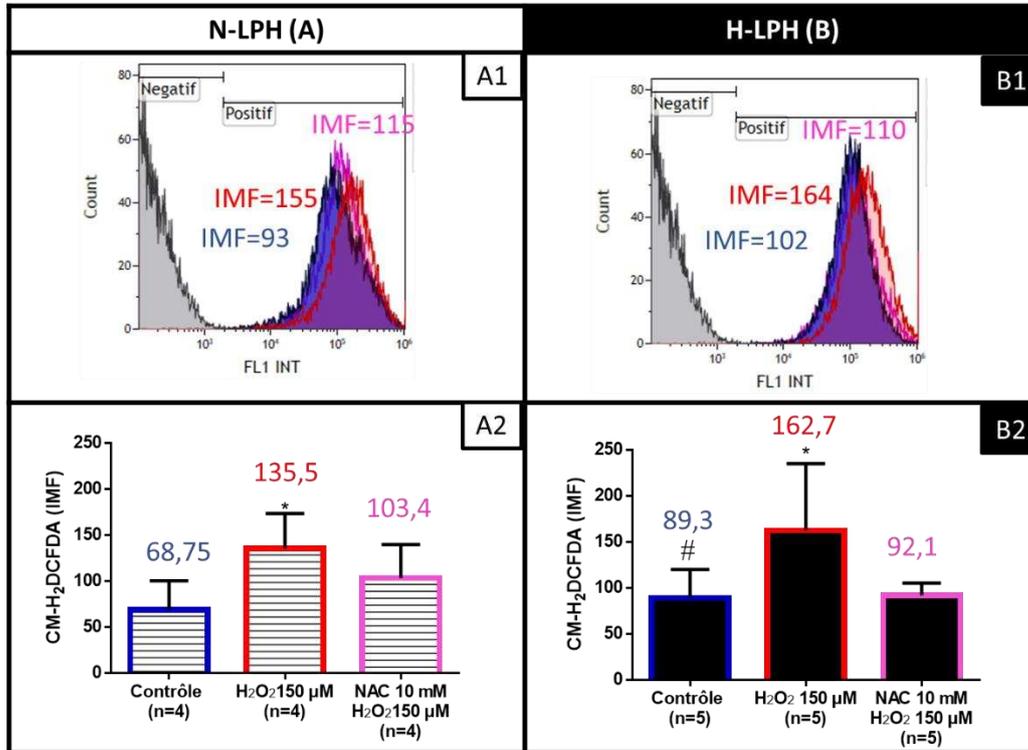


Figure 68 : Production d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) intracellulaires dans les CSM-GW amplifiées en normoxie et hypoxie : sonde CM-H₂DCFDA

Les cellules stromales mésenchymateuses de gelée de Wharton (CSM-GW) cultivées à passage précoce (P3) en normoxie (N) (A) ou hypoxie (H) (B) avec du milieu supplémenté en lysat plaquettaire humain (LPH) ont été ensemencées à 1000 cellules/cm². Après 5 jours de culture, les CSM-GW ont été soumises à différentes stimulations : l' H_2O_2 150 μ M (peroxyde d'hydrogène) (rouge) ; N-acétylcystéine (NAC) 10 mM (rose) ; cellules contrôles (bleu). À J7, les CSM-GW sont trypsinées. Les cellules sont trypsinées et marquées avec la sonde Di(Acetoxyethyl Ester) 6-Carboxy-2',7'-Dichlorodihydrofluorescein Diacetate (CM-H₂DCFDA) et analysées par cytométrie en flux (Gallios, Beckman Coulter). Représentation des histogrammes de distribution de la fluorescence verte obtenue (FL1) avec la sonde CM-H₂DCFDA en fonction du nombre d'événements (Count) (n=1) (A1 (N-LPH), B1 (H-LPH)) et représentation sous forme de graphique de barres de la moyenne des valeurs d'IMF (intensité médiane de fluorescence) obtenues à partir des histogrammes de distribution en N-LPH (A2) (n=4), et en H-LPH (B2) (n=5). L'analyse statistique a été réalisée à l'aide du logiciel graphpad, grâce au test t. Les résultats sont exprimés en moyennes \pm l'écart type (ET), $p < 0,05$ (* versus contrôle).

Ces expériences ont permis de valider le fait que la stimulation par de l' H_2O_2 à 150 μ M induit la production de ROS intracellulaires dans les CSM-GW amplifiées en N-LPH ou H-LPH, mais que cette production de ROS peut être limitée avec un prétraitement à la NAC.

2. Prolifération

Ensuite, nous avons vérifié si la production de ROS par les CSM-GW stimulées par l' H_2O_2 150 μ M affecte leur prolifération. Les images des CSM-GW à passage précoce amplifiées en normoxie et en hypoxie avec du milieu supplémenté en LPH montrent que les CSM-GW « contrôle » (*Figure 69 A1 et B1*) et les CSM-GW traitées par H_2O_2 après pré-traitement par la NAC (*Figure 69 A3 et B3*) ont une

morphologie allongée de type fibroblastique et prolifèrent sous forme de colonies après amplification en normoxie et hypoxie. En revanche, les CSM-GW traitées par H₂O₂ ont une morphologie modifiée par rapport aux cellules contrôles. En effet, elles sont moins denses, un peu plus large et certaines se décrochent en normoxie et en hypoxie. Nous observons même quelques cellules rondes ayant du mal à adhérer ou qui pourraient avoir tendance à se décrocher. En effet, après le traitement de 2 heures par H₂O₂ 150 µM un certain nombre de cellules se sont décollées après traitement (*Figure 69 A2 et B2*). Les graphiques du pourcentage de prolifération des CSM-GW stimulées par l'H₂O₂ 150 µM avec ou sans traitement par la NAC 10 mM montrent une baisse de la prolifération en normoxie (56%) (*Figure 69 A4*) ou en hypoxie (50%) par rapport aux CSM-GW non traitées (*Figure 69 B4*). Nous observons également qu'avec le prétraitement par la NAC 10 mM la prolifération est légèrement supérieure à celle obtenue pour les CSM-GW stimulées par l'H₂O₂ 150 µM seul, mais cette différence n'est pas significative. Ces résultats laissent supposer que le prétraitement par la NAC limite la baisse de la prolifération induite par l'H₂O₂ 150 µM.

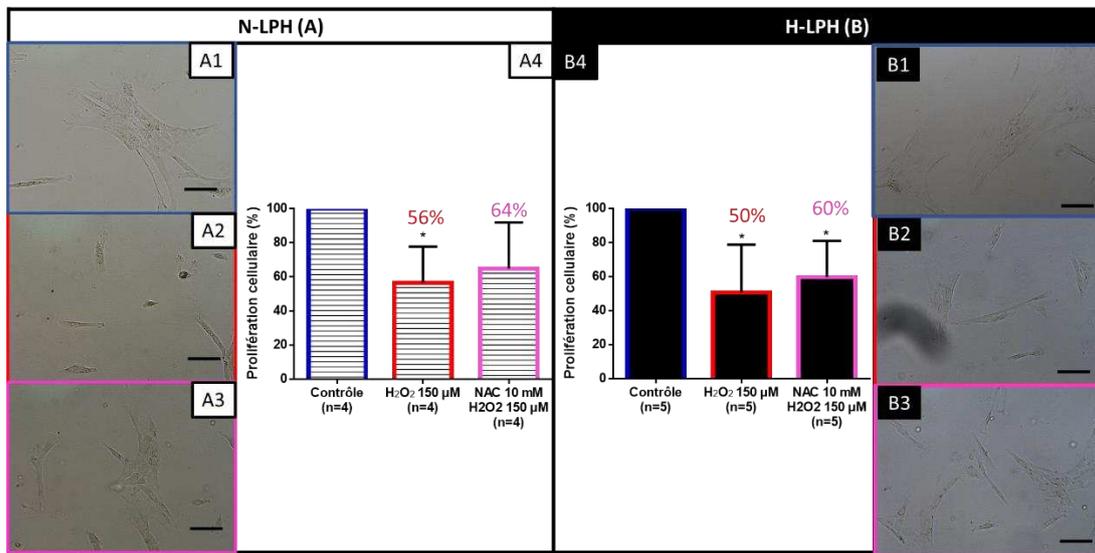


Figure 69 : Effet de la stimulation par du peroxyde d'hydrogène sur la prolifération des CSM-GW amplifiées en normoxie et en hypoxie avec du lysat plaquettaire humain (LPH) à passage précoce

Les cellules stromales mésenchymateuses de gelée de Wharton (CSM-GW) cultivées jusqu'au passage 3 en normoxie et en hypoxie ont été trypsinées avant d'êtreensemencées à 1000 cellules/cm² au passage suivant. Après 5 jours de culture, les CSM-GW ont été soumises à différentes stimulations : l'H₂O₂ 150 µM (peroxyde d'hydrogène) (rouge) ; N-acétylcystéine (NAC) 10 mM (rose) ; cellules contrôles (bleu). Au jour 7, les CSM-GW sont trypsinées et dénombrées. Photographie des cellules au microscope inversé (Leica DMI3000B, échelle 100 µm) juste après le traitement (A1, A2 et A3 en N-LPH) (B1, B2 et B3 en H-LPH) et représentation du pourcentage de prolifération (vs CSM-GW non traitées « contrôle ») après trypsination et dénombrement (A4 en N-LPH et B4 en H-LPH). L'analyse statistique a été réalisée à l'aide du logiciel graphpad, grâce à un test t apparié (*p<0.05 versus contrôle).

Nous montrons donc que la stimulation par de l'H₂O₂ à 150 µM des CSM-GW amplifiées en normoxie et en hypoxie entraîne une modification de la morphologie des CSM-GW accompagnée d'une baisse de leurs capacités de prolifération. Cependant, cette baisse de la prolifération peut être limitée par la NAC 10 mM. Nous avons ensuite vérifié si cette baisse de la prolifération était associée l'induction de cellules apoptotiques ou en sénescence.

3. Apoptose

La représentation graphique du pourcentage de cellules en apoptose évalué par cytométrie en flux, montre une augmentation significative pour les CSM-GW stimulées à l'H₂O₂ 150 µM amplifiées en

normoxie (25,5%) (Figure 70 A) et en hypoxie (24,5%) (Figure 70 B) par rapport aux CSM-GW non traitées. Nous observons également qu'avec le prétraitement par de la NAC 10 mM le pourcentage de cellules apoptotiques est légèrement inférieur à celui obtenu pour les CSM-GW stimulées par l'H₂O₂ 150 µM seul, mais cette différence n'est pas significative. Ces résultats laissent supposer que le prétraitement par la NAC limite l'induction de l'apoptose par l'H₂O₂ 150 µM.

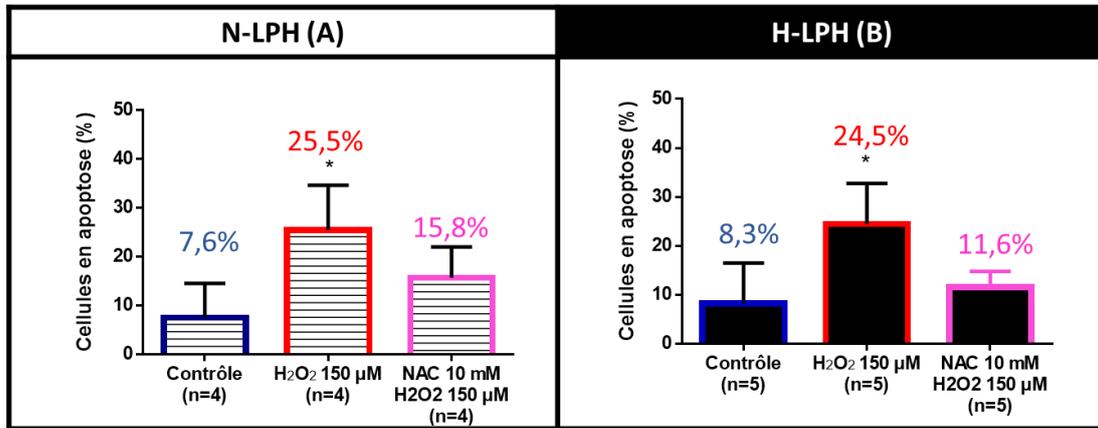


Figure 70 : Effet de la stimulation par du peroxyde d'hydrogène sur l'apoptose des CSM-GW amplifiées en normoxie et en hypoxie avec du lysat plaquettaire humain (LPH) à passage précoce

Les cellules stromales mésenchymateuses de gelée de Wharton (CSM-GW) cultivées jusqu'au passage 3 en normoxie (N) ou en hypoxie (H) avec du milieu supplémenté en lysat plaquettaire humain (LPH) ont été trypsinées avant d'être ensemencées à 1000 cellules/cm² au passage suivant. Après 5 jours de culture, les CSM-GW ont été soumises à différentes stimulations : l'H₂O₂ 150 µM (peroxyde d'hydrogène) (rouge) ; N-acétylcystéine (NAC) 10 mM (rose) ; cellules contrôles (bleu). Au jour 7, les CSM-GW sont trypsinées et marquées à l'annexine V couplée à l'Alexa*488 pour le test d'apoptose par cytométrie en flux (Gallios, Beckman Coulter). Représentation du pourcentage de cellules en apoptose en N-LPH (n=4) (A) et en H-LPH (n=5) (B). L'analyse statistique a été réalisée à l'aide du logiciel graphpad, grâce à un test t apparié (*p<0.05 versus contrôle).

Nous montrons donc que la baisse de la prolifération des CSM-GW induite par la stimulation par l'H₂O₂ à 150 µM est associée à l'induction de l'apoptose, qui est limitée par un prétraitement par la NAC 10 mM. De plus, cette condition peut servir de contrôle positif d'induction de l'apoptose dans les CSM-GW.

4. Sénescence

Les images des CSM-GW réensemencées pour le test de sénescence après avoir été soumises aux différentes stimulations (H₂O₂ 150 µM et NAC 10 mM+H₂O₂ 150 µM) montrent un marquage EdU (en rouge) des noyaux des CSM-GW pour les CSM-GW contrôles que ce soit en normoxie (Figure 71 A1) ou en hypoxie (Figure 71 B1), ce qui signifie qu'elles prolifèrent. On note que pour certaines de ces CSM-GW, nous observons un marquage bleu des cellules positives à la β-galactosidase au niveau du cytoplasme, cependant le pourcentage de cellules positives à la β-galactosidase est moins important que le celui à l'EdU, signifiant qu'il y a plus de cellules en prolifération. En revanche, pour les CSM-GW traitées par H₂O₂ seul (Figure 71 A2 et B2) ou NAC+ H₂O₂ (Figure 71 A3 et B3), le marquage EdU rouge des noyaux est faible alors que le marquage bleu des cellules positives à la β-galactosidase est plus important indiquant qu'il y aurait plus de cellules sénescents. En effet, à partir de ces images, nous avons pu calculer le pourcentage de cellules sénescents. Une cellule est considérée sénescents si elle est positive à la β-galactosidase (marquage bleu) et qu'elle ne prolifère pas (absence de marquage rouge Edu). Le graphique montre que pour les CSM-GW stimulées par H₂O₂ 150 µM, le pourcentage

de cellules sénescentes augmente de manière significative par rapport aux CSM-GW « contrôle » après amplification en normoxie (73%) (Figure 71 A4) et en hypoxie (78%) (Figure 71 B4).

Concernant les CSM-GW traitées par la NAC et l'H₂O₂ en N-LPH et H-LPH le pourcentage de cellules positives à la β-galactosidase par rapport au CSM-GW non traitées « contrôles » augmente dans les 2 cas (93% versus 28% en N-LPH et 43% versus 9% en H-LPH) (Figure 71 A4 et B4). En revanche, si l'on compare ce pourcentage de cellules positives à la β-galactosidase par rapport au CSM-GW traitées par H₂O₂ après prétraitement par de la NAC, la réponse est différente. En effet, celui-ci augmente en N-LPH (93% versus 73%) (Figure 71 A4) mais diminue en H-LPH (43% versus 78%) (Figure 71 B4). Le prétraitement par la NAC permettrait de limiter l'induction de sénescence pour le CSM-GW amplifiées en hypoxie.

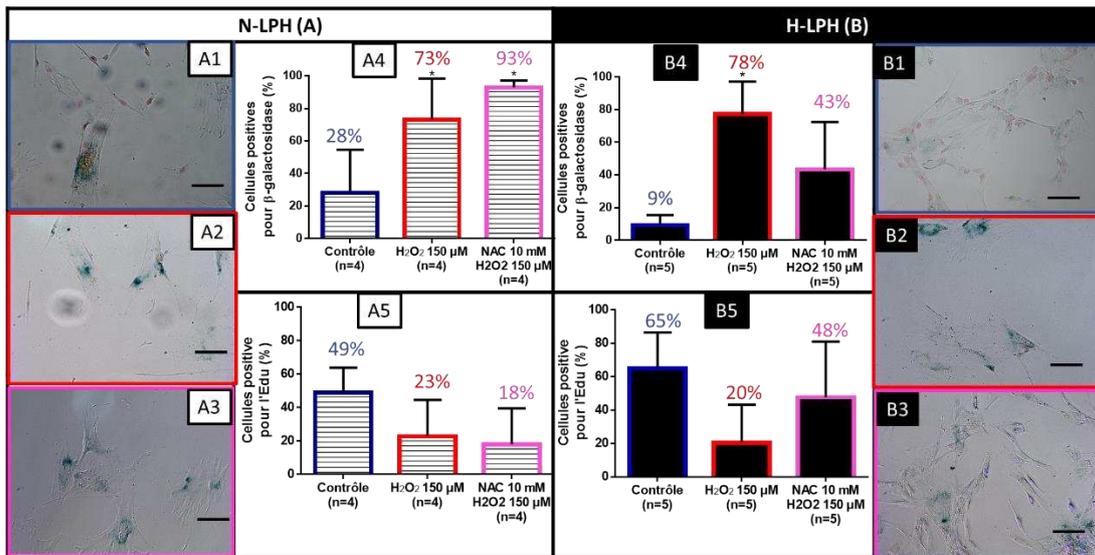


Figure 71 : Effet de la stimulation par du peroxyde d'hydrogène sur la sénescence des CSM-GW amplifiées en normoxie et en hypoxie avec du lysat plaquettaire humain (LPH) à passage précoce

Les CSM de gelée de Wharton (CSM-GW) cultivées jusqu'à un passage précoce (P3-P4) en normoxie (N) et en hypoxie (H) avec du milieu supplémenté en lysat plaquettaire humain (LPH) ont été trypsinées avant d'être ensemencées à 1000 cellules/cm² au passage suivant. Après 5 jours de culture, les CSM-GW ont été soumises à différentes stimulations : l'H₂O₂ 150 μM (peroxyde d'hydrogène) (rouge) ; N-acétylcystéine (NAC) 10 mM (rose) ; cellules contrôles (bleu). Au jour 7, les CSM-GW sont trypsinées puis ensemencées pour le test de sénescence. Photographie des cellules au microscope inversé après le test de sénescence (Leica DMI3000B, échelle 100 μm) (A1, A2 et A3 en N-LPH) (B1, B2 et B3 en H-LPH), représentation du pourcentage de de cellules sénescentes/positives à la β-galactosidase (positives au marquage X-Gal et négatives à l'Edu) (A4 en N-LPH et B4 en H-LPH) et en prolifération (positives à l'Edu) (A5 en N-LPH et B5 en H-LPH). Le nombre de cellules total a été déterminé grâce à un marquage au dapi non représenté dans la figure. L'analyse statistique a été réalisée à l'aide du logiciel graphpad, grâce à un test t apparié (*p<0.05 versus contrôle).

Nous montrons donc que la baisse de la prolifération des CSM-GW induite par la stimulation par l'H₂O₂ 150 μM est associée à l'induction de la sénescence. Ces expériences montrent que la stimulation par l'H₂O₂ 150 μM des CSM-GW peut servir de contrôle positif pour le test de sénescence et laissent supposer que l'H₂O₂ 150 μM pourrait servir de modèle de stress oxydant.

5. Mise en évidence des cassures de l'ADN et de l'expression de la SOD2 après stimulation par l'H₂O₂ 150 μM

Afin de savoir, si la stimulation par l'H₂O₂ 150 μM, entraînait des cassures de l'ADN, nous avons réalisé un marquage immunofluorescent de H2AX phosphorylé au niveau de la sérine 139 (H2AX pS139 ou γ-H2AX (gamma-H2AX)). Cette protéine nucléaire appartenant à la famille des histones impliquée

dans la réparation de l'ADN est localisée au niveau des cassures double-brin de l'ADN et se présente, après marquage immunofluorescent, sous forme de spots nucléaires (foci nucléaires) en cas de dommage de l'ADN. Pour les CSM-GW stimulées par l' H_2O_2 150 μ M et dont la production de ROS est augmentée, nous observons une augmentation du nombre de cellules présentant des foci nucléaires pour les CSM-GW amplifiées en N-LPH (56%) (Figure 72 A2) et en H-LPH (62%) (Figure 72 A4) par rapport aux CSM-GW contrôle non stimulées. De façon intéressante, cette augmentation est également associée à une augmentation de l'expression de l'enzyme de protection contre le stress oxydant la SOD2 après amplification en N-LPH (Figure 72 B2) ou en H-LPH (Figure 72 B4). Ces résultats montrent que les CSM-GW amplifiées en normoxie et en hypoxie et stimulées par H_2O_2 subissent des cassures de l'ADN, une des conséquences du stress oxydant, mais aussi qu'elles expriment la SOD2, probablement pour se défendre contre le stress induit par l' H_2O_2 .

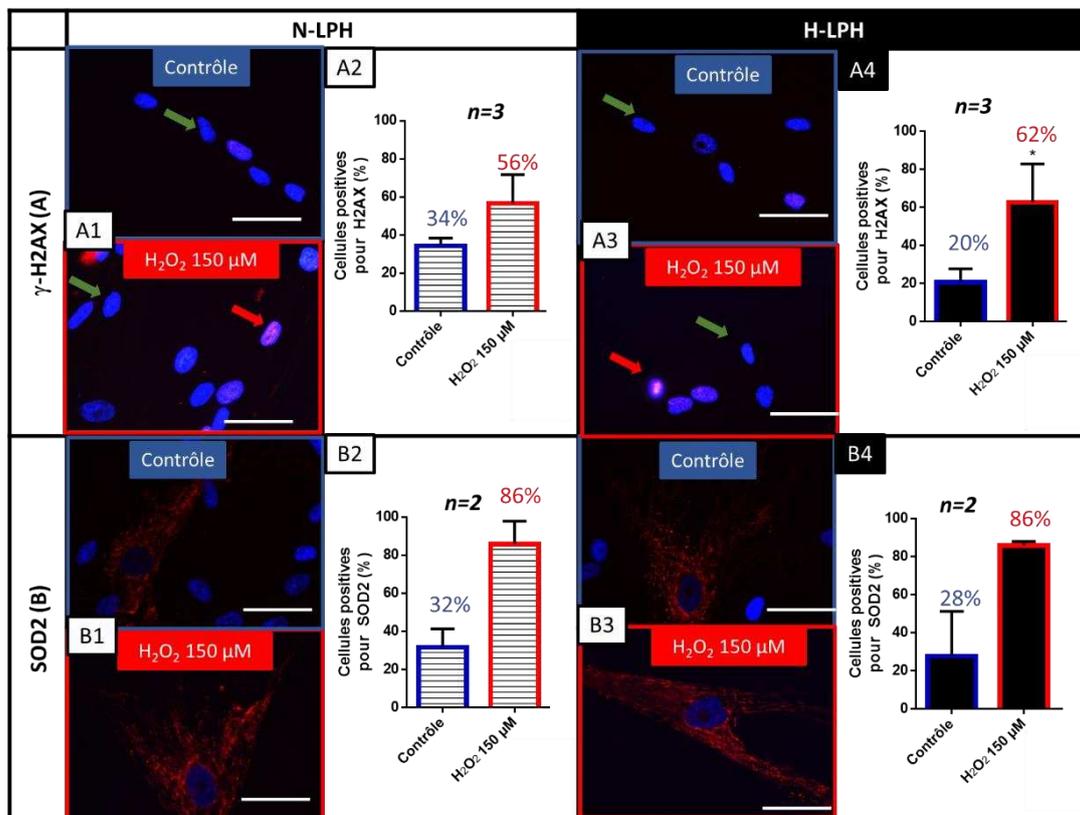


Figure 72 : Mise en évidence de cassures de l'ADN (γ -H2AX : gamma H2A histone family member X) et de l'expression de la superoxyde dismutase 2 (SOD2) dans les CSM-GW amplifiées avec du lysat plaquettaire humain (LPH) à passage précoce en normoxie et hypoxie après stimulation par H_2O_2 à 150 μ M

Les CSM de gelée de Wharton (CSM-GW) cultivées jusqu'au passage 3 en normoxie (N) et en hypoxie (H) ont été trypsinées avant d'être ensemencées à 1000 cellules/cm² au passage suivant. Après 5 jours de culture, les CSM-GW ont été stimulées par l' H_2O_2 150 μ M (peroxyde d'hydrogène) (rouge) ; cellules contrôles (bleu). Au jour 7, les CSM-GW sont trypsinées et remises en culture sur des lamelles en verre pour réaliser le marquage immunofluorescent de γ -H2AX et de la SOD2 (B). Photographie des cellules au microscope à épifluorescence (Leica DMI3000B, échelle 100 μ m) en normoxie et en hypoxie (n=1). (A) γ -H2AX noyau en bleu (DAPI), γ -H2AX en rouge (Alexa 555) (noyaux avec (flèche rouge) et sans foci (flèche verte)) en N-LPH (A1) et H-LPH (A3) ; (B) SOD2 noyau en bleu (DAPI), SOD2 en rouge (Alexa 555) en N-LPH (B1) et H-LPH (B3). Représentation du pourcentage de cellules positives pour le marquage de H2AX en N-LPH (A2) et en H-LPH (A4) et pour la SOD2 en N-LPH (B2) et en H-LPH (B4). L'analyse statistique a été réalisée à l'aide du logiciel graphpad, grâce à un test t (*p<0.05 versus contrôle).

Nous avons donc montré que la stimulation par l' H_2O_2 150 μ M qui induit la production de ROS dans les CSM-GW est responsable de la présence de cassures de l'ADN associées à l'expression de l'enzyme de protection contre le stress oxydant, la SOD2.

C. Stimulation par l'IFN- γ à 50 et 100 ng/mL

Afin de mimer le contexte inflammatoire retrouvé dans les pathologies comme la GVHD, nous avons stimulé nos CSM-GW par de l'IFN- γ . Dans notre équipe, l'IFN- γ est utilisé seul à forte dose (50-100 ng/mL) en préconditionnement des CSM-GW pour mimer le contexte inflammatoire retrouvé dans les pathologies et ainsi augmenter leurs propriétés immunosuppressives (Noronha et al., 2019). Ces concentrations ont été choisies en fonction de celles déjà utilisées dans l'équipe. En effet, d'après la littérature une stimulation des CSM par de l'IFN- γ à faible dose augmente l'expression des molécules CMH-II (complexe majeur d'histocompatibilité) accompagnée d'une présentation antigénique, alors qu'une stimulation à forte dose d'IFN- γ entraîne la diminution des molécules du CMH de classe II accompagnée d'une augmentation des propriétés immunosuppressives (Chan et al., 2006; Yagi et al., 2010). D'après la littérature, la stimulation par l'IFN- γ peut également induire la production de ROS dans les hépatocytes (Watanabe et al., 2003), les CSM de tissu adipeux (Andreeva et al., 2018) et les CSM-MO de souris (Yang et al., 2017), comme que le TNF- α dans les cellules cancéreuses (Halliwell, 2007; Mantovani and Madeddu, 2006). Le TNF- α est aussi utilisé en association avec l'IFN- γ à faible dose en préconditionnement des CSM afin d'augmenter leurs propriétés immunosuppressives (Contreras-Lopez et al., 2020). Il était donc important de vérifier si cette stimulation par l'IFN- γ a un effet sur la production de ROS intracellulaires (i), la prolifération (ii), l'apoptose (iii) et la sénescence cellulaire (iv) comme la stimulation par l'H₂O₂ à 150 μ M.

Nous avons quantifié les ROS dans les CSM-GW stimulées par des doses croissantes (de 10 à 100 ng/mL) en IFN- γ afin de savoir si la réponse des CSM-GW était dose dépendante. Les expériences ont uniquement été réalisées en **hypoxie** afin de limiter les conditions. Les résultats présentés en ([Annexe 3](#)) montrent que la production de ROS intracellulaires par les CSM-GW stimulées par des concentrations croissantes en IFN- γ tend à augmenter (i), que le taux de cellules apoptotique reste faible (ii), et que le pourcentage de cellules sénescence augmente légèrement (iii). De plus, la prolifération n'est pas affectée par de faibles concentrations en IFN- γ mais tend à augmenter avec l'augmentation des concentrations. De plus, quelle que soit la concentration en IFN- γ les CSM-GW ont une morphologie fibroblastique.

Afin d'étudier, l'effet de la stimulation IFN- γ à 50 et 100 ng/mL sur les CSM-GW amplifiées en **normoxie et en hypoxie**, nous avons contrôlé certains paramètres (prolifération, production de ROS, apoptose, sénescence) en parallèle des expériences de migration et d'immunosuppression sur les mêmes échantillons qui ont été utilisés pour les études de fonctionnalité. Les résultats ont été comparés à la condition H₂O₂ 150 μ M qui mime le contexte de stress oxydant.

Malheureusement, étant donné le contexte sanitaire lié à la crise de la covid-19, les quantifications des ROS intracellulaires, de l'apoptose ainsi que les résultats d'immunosuppression présentés ne concernent que 2 prélèvements vu que ces expériences dépendent de l'ouverture de la plateforme de cytométrie en flux. Il s'agit donc de **résultats préliminaires**, qui doivent être répétés.

1. Production de ROS intracellulaires

Pour 2 prélèvements, la production de ROS intracellulaires a pu être analysée par cytométrie en flux à l'aide de la sonde CM-H₂DCFDA. Les résultats ont montré que les CSM-GW amplifiées en normoxie et en hypoxie stimulées par l'H₂O₂ produisent plus de ROS par rapport aux CSM-GW contrôles non traitées (pour un seul prélèvement « n°3 »). En revanche, pour les CSM-GW stimulées par IFN- γ à 50 et 100 ng/mL la production de ROS est diminuée pour les CSM-GW amplifiées en normoxie (échantillon 3 et 4), tandis qu'elle est quasi identique pour les CSM-GW amplifiées en hypoxie par rapport aux CSM-GW contrôles ([Figure 73](#)).

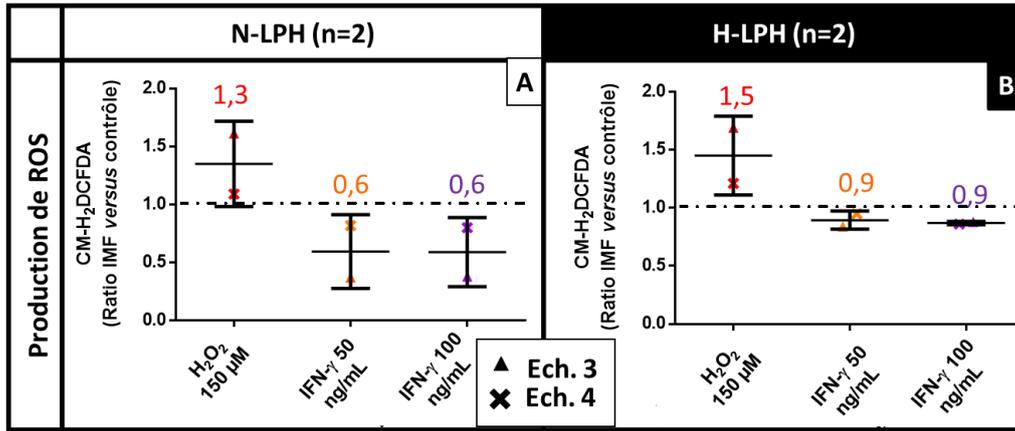


Figure 73 : Contrôle de l'effet de la stimulation par de l'interféron-γ sur la production de ROS intracellulaires par les CSM-GW à passage précoce

Les CSM de gelée de Wharton (CSM-GW) cultivées jusqu'au passage 3 avec du milieu supplémenté en lysat plaquettaire humain (LPH) en normoxie (N) (A) et en hypoxie (H) (B) ont été trypsinées avant d'être ensemencées à 1000 cellules/cm² au passage suivant. Après 5 jours de culture, les CSM-GW ont été soumises à différentes stimulations : H₂O₂ 150 µM (peroxyde d'hydrogène) (rouge) ; IFN-γ (interféron) à 50 ng/mL (orange) et à 100 ng/mL (violet) ; cellules contrôles (bleu). Au jour 7, les CSM-GW sont trypsinées. Les cellules en suspension sont incubées 45 minutes avec la sonde CM-H₂DCFDA à 5 µM avant d'être lavées et analysées par cytométrie en flux (Gallios, Beckman Coulter). Représentation des ratios d'intensité moyenne de fluorescence d'IMF versus contrôle (n=2). Ech : échantillon

Nous pouvons retenir qu'après stimulation des CSM-GW par l'IFN-γ, la production de ROS intracellulaires est équivalente en N-LPH et diminue en H-LPH.

2. Prolifération

La stimulation des CSM-GW par de l'IFN-γ à 50 et 100 ng/mL entraîne une baisse des capacités de prolifération que ce soit en normoxie ou en hypoxie. De plus, hormis la condition N-LPH (IFN-γ 100 ng/mL), ces pourcentages restent plus élevés par rapport aux CSM-GW traitées par l'H₂O₂ à 150 µM (Figure 74). La stimulation des CSM-GW par l'IFN-γ entraîne donc une baisse des capacités de prolifération moins importante qu'après stimulation par l'H₂O₂ à 150 µM.

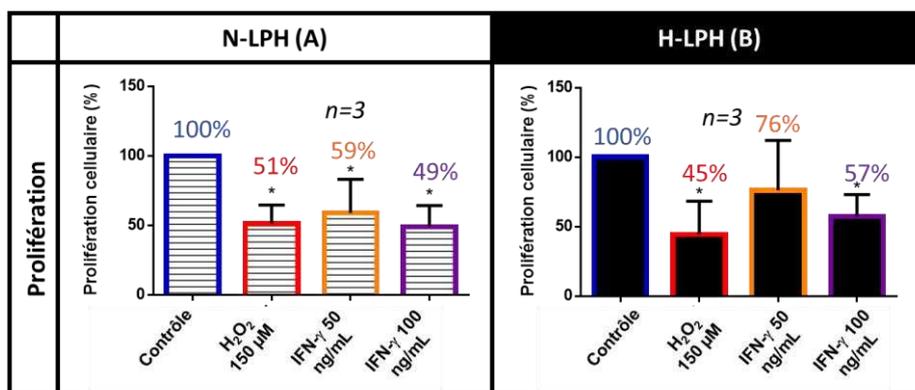


Figure 74 : Contrôle de l'effet de la stimulation des CSM-GW par de l'interféron-γ sur la prolifération à passage précoce

Les CSM de gelée de Wharton (CSM-GW) (n=3) cultivées jusqu'au passage 3 (à passage précoce) en normoxie (N) (A) et en hypoxie (H) (B) avec du milieu supplémenté en LPH ont été trypsinées avant d'être ensemencées à 1000 cellules/cm² au passage suivant. Après 5 jours de culture, les CSM-GW ont été soumises à différentes stimulations : H₂O₂ 150 µM (peroxyde d'hydrogène) (rouge) ; IFN-γ (interféron) à 50 ng/mL (orange) et à 100 ng/mL (violet) ; cellules contrôles (bleu). Au jour 7, les CSM-GW sont trypsinées et dénombrées. Représentation du pourcentage de prolifération des CSM-GW après dénombrement (versus contrôle) (n=3). L'analyse statistique a été réalisée à l'aide du logiciel graphpad, grâce à un test t apparié (*p<0,05, versus contrôle).

Les résultats montrent donc, que la stimulation des CSM-GW par de l'IFN- γ à 50 et 100 ng/mL entraîne une baisse de leur capacité de prolifération, mais qui reste moins importante que celle induite par l'H₂O₂ à 150 μ M (sauf pour la condition N-LPH (IFN- γ 100 ng/mL)). Nous avons ensuite vérifié l'effet de la stimulation par l'IFN- γ sur l'apoptose des CSM-GW.

3. Apoptose

Pour 2 prélèvements de CSM-GW, l'apoptose a pu être contrôlée par cytométrie en flux. Les résultats ont montré des tendances (Figure 75). Le pourcentage de cellules apoptotiques est augmenté pour les CSM-GW amplifiées en normoxie (24%) et en hypoxie (22%) après stimulation par l'H₂O₂ à 150 μ M. Concernant les CSM-GW stimulées par l'IFN- γ à 50 et 100 ng/mL, le pourcentage de cellules en apoptose est de 11% et 4% en hypoxie respectivement et de 18 et 15% en normoxie respectivement. Les pourcentages d'apoptose obtenus après stimulation par l'IFN- γ à 50 et 100 ng/mL restent donc inférieures à 20 %.

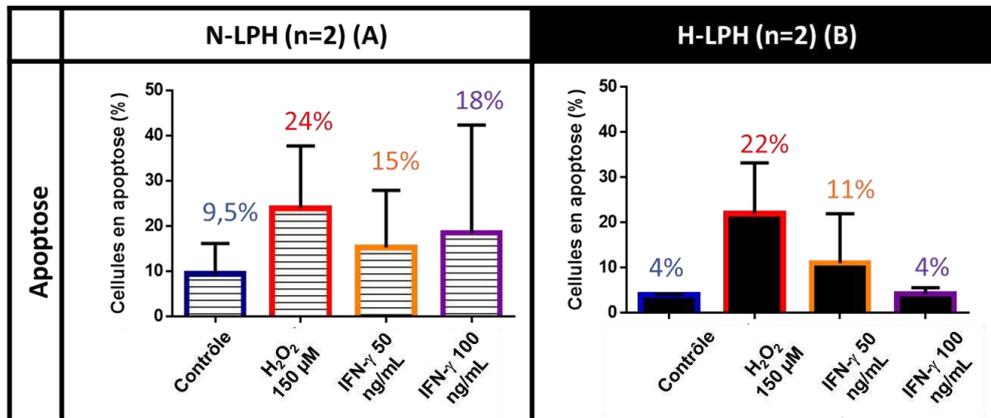


Figure 75 : Contrôle de l'effet de la stimulation par de l'interféron- γ l'apoptose des CSM-GW à passage précoce

Les CSM de gelée de Wharton (CSM-GW) cultivées jusqu'au passage 3 en normoxie (N) (A) et en hypoxie (H) (B) avec du milieu supplémenté en LPH, ont été trypsinées avant d'êtreensemencées à 1000 cellules/cm² au passage suivant. Après 5 jours de culture, les CSM-GW ont été soumises à différentes stimulations : H₂O₂ 150 μ M (peroxyde d'hydrogène) (rouge) ; IFN- γ (interféron) à 50 ng/mL (orange) et à 100 ng/mL (violet) ; cellules contrôles (bleu). Au jour 7, les CSM-GW sont trypsinées et marquées à l'Annexine V pour le test d'apoptose par cytométrie en flux (Gallios, Beckman Coulter). Représentation du pourcentage de cellules en apoptose (n=2).

Nous montrons donc que la stimulation des CSM-GW par l'IFN- γ à 50 et 100 ng/mL induit peu d'apoptose après amplification en normoxie et hypoxie. Nous avons ensuite vérifié si cette stimulation induisait de la sénescence.

4. Sénescence

Les résultats du test de sénescence sur les 3 prélèvements utilisés pour les tests fonctionnels sont présentés en *Figure 76*. Pour les CSM-GW stimulées par l' H_2O_2 à 150 μM , le pourcentage de cellules positives à la β -galactosidase augmente (*Figure 76 A*) significativement et le pourcentage de cellules positives à l'Edu diminue (*Figure 76 B*) en N-LPH et H-LPH. Ces résultats confirment l'induction de la sénescence démontrée précédemment (*Figure 72*). En revanche, la stimulation par l'IFN- γ à 50 et 100 ng/mL entraîne une légère augmentation non significative du pourcentage de cellules positives à la β -galactosidase (*Figure 76 A*). Par ailleurs, le pourcentage de cellules positives à l'Edu diminue et est proche de celui des CSM-GW non traitées (*Figure 76 B*). Ces résultats montrent que la stimulation par l'IFN- γ à 50 et 100 ng/mL induit un peu de sénescence.

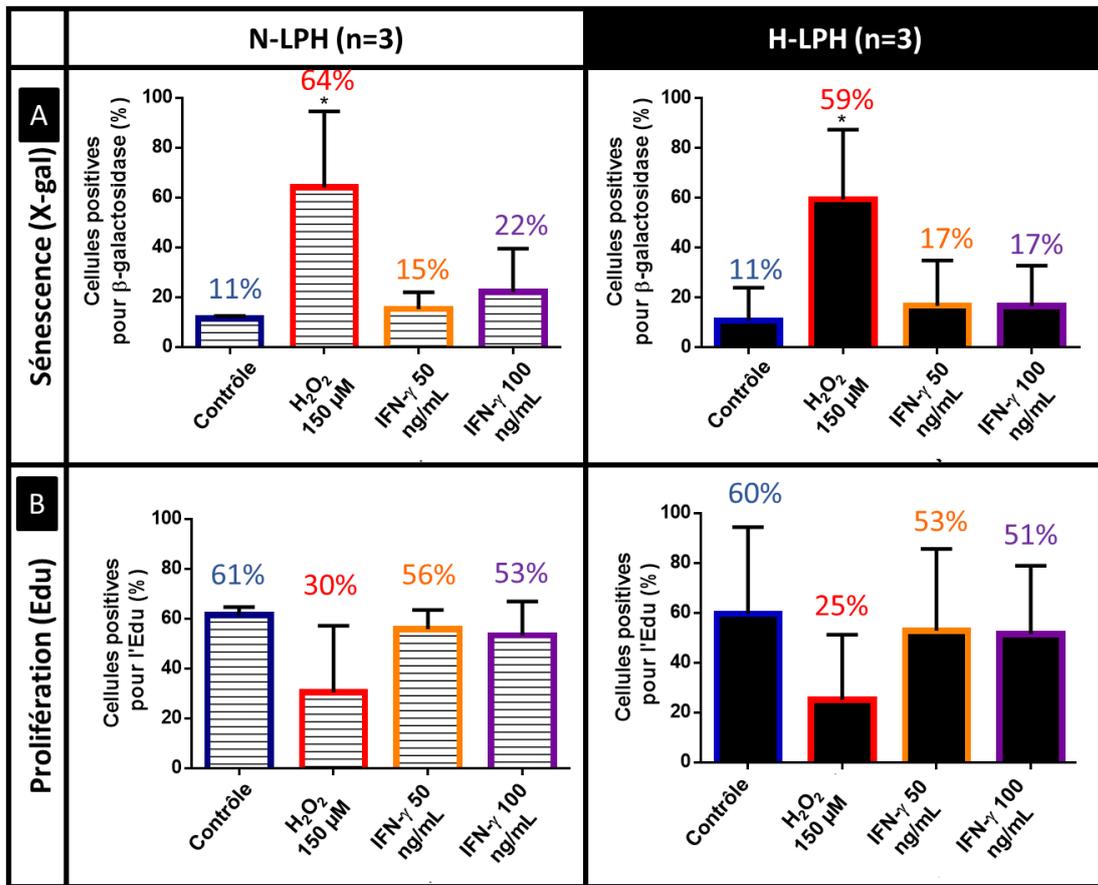


Figure 76 : Contrôle de l'effet de la stimulation par de l'interféron- γ sur la sénescence des CSM-GW à passage précoce

Les CSM de gelée de Wharton (CSM-GW) cultivées jusqu'au passage 3 (passage précoce) en normoxie (N) et en hypoxie (H) avec du milieu supplémenté en lysat plaquettaire humain (LPH) ont été trypsinées avant d'êtreensemencées à 1000 cellules/cm² au passage suivant. Après 5 jours de culture, les CSM-GW ont été soumises à différentes stimulations : H_2O_2 150 μM (peroxyde d'hydrogène) (rouge) ; IFN- γ (interféron) à 50 ng/mL (orange) et à 100 ng/mL (violet) ; cellules contrôles (bleu). Au jour 7, les CSM-GW sont trypsinées et remises en culture pour le test de sénescence. (A) : Représentation du pourcentage de cellules sénescents (positives au marquage X-Gal et négatives à l'Edu) et en prolifération (positives à l'Edu). (B) : L'analyse statistique a été réalisée à l'aide du logiciel graphpad, grâce à un test t apparié (*p<0.05, versus contrôle).

Nous montrons donc que la stimulation par l'IFN- γ à 50 et 100 ng/mL induit peu de sénescence.

D. Comparaison de la réponse des CSM-GW à la stimulation par l'H₂O₂ et par l'IFN-γ

Dans un premier temps, nous avons montré que la stimulation par l'H₂O₂ à 150 μM des CSM-GW amplifiées en **normoxie et en hypoxie** entraîne :

- ✓ une augmentation importante de la production de ROS intracellulaires associée à une augmentation de l'expression de la SOD2,
- ✓ une modification de la morphologie des CSM-GW accompagnée d'une baisse de leurs capacités de leur prolifération,
- ✓ l'induction de l'apoptose,
- ✓ l'induction de la sénescence,
- ✓ et l'induction de cassures de l'ADN.

Par conséquent, cette stimulation (H₂O₂ à 150 μM) permet de mimer un contexte de stress oxydant pour étudier l'effet du stress oxydant sur les propriétés fonctionnelles des CSM-GW.

Dans un second temps, nous avons montré que pour la stimulation par l'IFN-γ 50 et 100 ng/mL des CSM-GW amplifiées en **normoxie et en hypoxie** ont une réponse est différente. En effet, cette stimulation entraîne :

- ✓ une production de ROS intracellulaires équivalente au contrôle ou qui diminue légèrement ,
- ✓ un maintien de la morphologie fibroblastique avec une baisse légère de la prolifération.
- ✓ une faible apoptose quelle que soit la concentration en IFN-γ,
- ✓ une faible sénescence, qui peut être limitée *via* un prétraitement par de la NAC 10 mM,

Par conséquent, la stimulation par l'IFN-γ à 50 et 100 ng/mL des CSM-GW entraîne une réponse différente par rapport avec notamment une production de ROS intracellulaires stable voir diminuée.

Cependant, les résultats présentés en [annexe 3](#) montrent une réponse différente en termes de production de ROS par les CSM-GW amplifiées en **hypoxie** stimulées par de l'IFN-γ. En effet, celle-ci tend à augmenter pour des concentrations de 50 et 100 ng/mL. Nous avons donc regroupé les différents résultats de production de ROS intracellulaires par les CSM-GW stimulées par de l'IFN-γ à 50 et 100 ng/mL obtenus lors des différentes expériences pendant cette thèse. Les données ont été comparées à celles obtenues après stimulation par l'H₂O₂ à 150 μM en normoxie et en hypoxie ([Figure 77](#)). Ainsi, les résultats montrent que, contrairement à la stimulation par l'H₂O₂ à 150 μM, la stimulation par de l'IFN-γ à 50 et 100 ng/mL n'entraîne pas de modifications de la production de ROS intracellulaires par rapport au contrôle, quelle que soit la tension en oxygène (normoxie ou hypoxie). Cependant, nous observons tout de même qu'en condition d'hypoxie, la réponse est variable d'un prélèvement à l'autre, après stimulation par l'IFN-γ. Ces résultats soulèvent le problème d'hétérogénéité des prélèvements de CSM.

Ces résultats montrent donc que contrairement à la stimulation par l'H₂O₂ à 150 μM, la stimulation par l'IFN-γ à 50 et 100 ng/mL n'entraîne pas de modification dans la production de ROS intracellulaires.

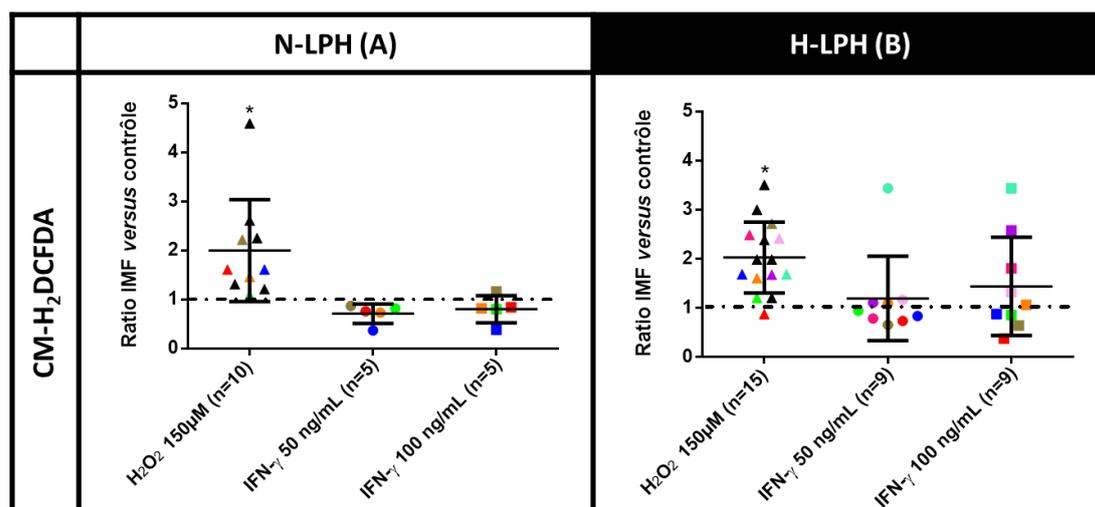


Figure 77 : Production de ROS intracellulaires par les CSM-GW amplifiées en normoxie et en hypoxie avec du lysat plaquettaire humain (LPH) stimulées par de l'interféron- γ ou du peroxyde d'hydrogène

Les CSM de gelée de Wharton (CSM-GW) cultivées jusqu'au passage 3 en normoxie (N) (A) et en hypoxie (H) (B) avec du lysat plaquettaire humain (LPH) ont été trypsinées avant d'être ensemencées à 1000 cellules/cm² au passage suivant. Après 5 jours de culture, les CSM-GW ont été soumises à différentes stimulations : H₂O₂ 150 μ M (peroxyde d'hydrogène) ; IFN- γ (interféron) à 50 ng/mL et à 100 ng/mL. Au jour 7, les CSM-GW des différentes conditions sont trypsinées afin de quantifier les ROS (espèces réactives de l'oxygène) intracellulaires. Les CSM-GW en suspension sont incubées 45 minutes avec la sonde CM-H₂DCFDA à 5 μ M avant d'être lavées et analysées par cytométrie en flux (Gallios, Beckman Coulter). Les intensités médianes de fluorescence (IMF) obtenues après oxydation de la sonde CM-H₂DCFDA sont représentées sous forme de ratios d'IMF (versus contrôle). L'analyse statistique a été réalisée à l'aide du logiciel graphpad, grâce à un test t (* p <0.05).

Nous montrons donc que la stimulation par l'H₂O₂ 150 μ M permet de mimer le stress oxydant pour étudier l'effet du stress oxydant sur les propriétés fonctionnelles des CSM-GW dans un contexte de GVHD. Par ailleurs, nous avons montré que la stimulation par l'IFN- γ 50 et 100 ng/mL utilisée dans la littérature pour augmenter les propriétés immunosuppressives, n'entraîne pas de production de ROS intracellulaires par les CSM-GW

E. Effet de la stimulation par H₂O₂ et IFN- γ sur les propriétés de migration des CSM-GW

Les images obtenues après les tests de migration des CSM-GW stimulées par de l'H₂O₂ à 150 μ M et de l'IFN- γ à 50 ou 100 ng/mL montrent que les CSM migrent en présence de SVF comme chimioattractant quelle que soit la condition d'amplification, normoxie ou hypoxie (Figure 78A). Cependant, les analyses de la surface recouverte par les CSM-GW ayant migré en présence du chimioattractant SVF normalisée par rapport à celle en présence de BSA comme chimioattractant contrôle, montrent une diminution de ce ratio pour les CSM-GW stimulées par l'H₂O₂ à 150 μ M après amplification en normoxie ou hypoxie et par l'IFN- γ à 50 ng/mL après amplification en N-LPH (pour les 2 échantillons) et en H-LPH (pour l'échantillon 3 et 4) (Figure 78B). Il est cependant difficile de lier cette baisse des capacités de migration des CSM-GW stimulées par H₂O₂ 150 μ M à la production de ROS intracellulaires, car celle-ci est augmentée pour l'échantillon 3 mais équivalente pour l'échantillon 4 par rapport aux CSM-GW non traitées (Figure 73). Cependant, nous avons montré que la morphologie de ces CSM-GW est modifiée après stimulation par de l'H₂O₂ 150 μ M (Figure 69).

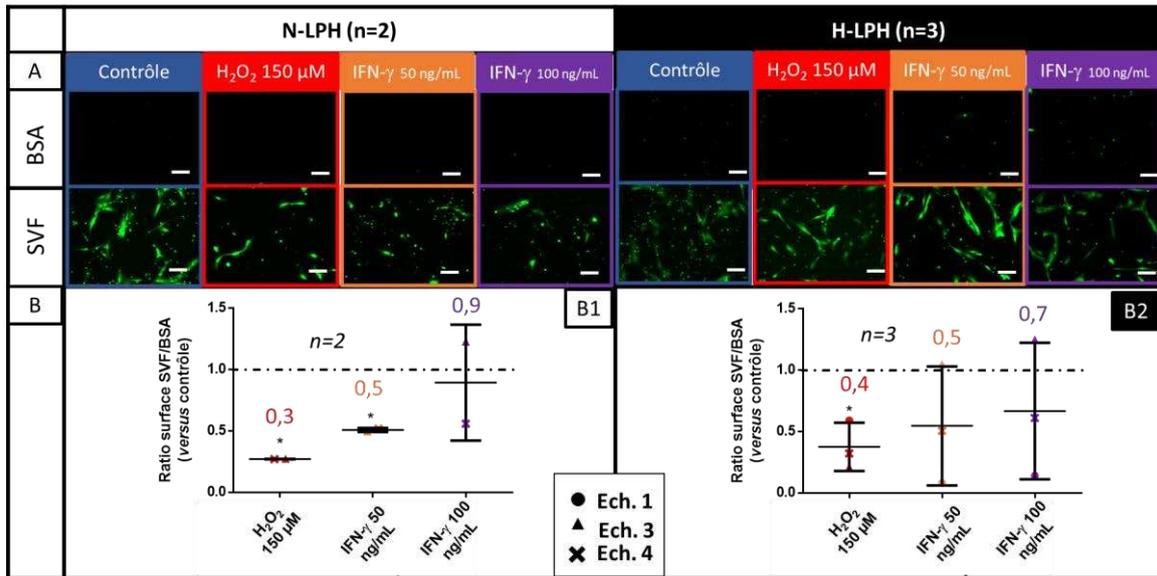


Figure 78 : Propriétés de migration des CSM-GW amplifiées avec du lysat plaquettaire humain (LPH) à passage précoce en normoxie (N) et hypoxie (H) après stimulation par H₂O₂ à 150 µM et IFN-γ (50 et 100 ng/mL)

Les CSM de gelée de Wharton (CSM-GW) cultivées jusqu'au passage 3 en normoxie (N) et en hypoxie (H) ont été trypsinées avant d'êtreensemencées à 1000 cellules/cm² au passage suivant. Après 5 jours de culture, les CSM-GW ont été soumises à différentes stimulations : H₂O₂ 150 µM (peroxyde d'hydrogène) (rouge) ; IFN-γ (interféron) à 50 ng/mL (orange) et à 100 ng/mL (violet) ; cellules contrôles (bleu).. Au jour 7, les CSM-GW sont trypsinées et remises en culture dans des inserts de chambre de boyden à une densité de 100 000 cellules/puits pendant 20 heures en normoxie en présence de chimio attractant SVF 30 % (V/V) (Sérum de Veau Foetal) et BSA 0,25 % (V/V) (Bovine Serum Albumin) comme contrôle. Les cellules vivantes ayant migré sont marquées avec de la calcéïne (fluorescence verte). (A) : Photographie des cellules ayant migré au microscope à épifluorescence (Leica DMI3000B, échelle 100 µm) en N-LPH et H-LPH (n=1) en présence de chimioattractant BSA (partie supérieure) et SVF (partie inférieure). La surface occupée par les cellules ayant migré pour 5 images par condition a été analysée grâce au logiciel Image J (National Institute of Health, USA) afin de calculer le ratio de la surface occupée par les cellules ayant migré en présence de chimioattractant SVF versus BSA (Contrôle). (B) : Représentation du ratio des surface SVF/BSA pour les conditions stimulées versus la condition contrôle sans stimulation en normoxie (B1) et en hypoxie (B2) (n=2). L'analyse statistique a été réalisée à l'aide du logiciel graphpad, grâce à un test t (*p<0.05).

Ces résultats laissent supposer que les propriétés de migration des CSM-GW stimulées par de l'H₂O₂ à 150 µM et qui produisent des ROS intracellulaires et l'IFN-γ à 50 ng/mL sont diminuées après amplification en normoxie ou hypoxie. Néanmoins, ces expériences doivent être répétées.

F. Effet de la stimulation par H₂O₂ et IFN-γ sur les propriétés de immunosuppressives des CSM-GW

Dans cette partie du travail, l'effet de la stimulation par de l'H₂O₂ à 150 µM et de l'IFN-γ à 50-100 ng/mL sur la capacité des CSM à inhiber la prolifération des LT activés a été étudié. Etant donné que deux échantillons ont pu être évalués, des expériences complémentaires doivent être réalisées afin de confirmer ou infirmer les tendances observées (Figure 79 A et B).

Le comportement des CSM provenant deux prélèvements étudiés n'est pas similaire après stimulation par de l'H₂O₂. En effet, le pourcentage d'inhibition de la prolifération des LT CD4 activés est diminué après co-culture avec les CSM-GW du **prélèvement n°3** après amplification en normoxie (58%) et en hypoxie (78%) par rapport au pourcentage obtenu avec les CSM-GW contrôles non stimulées (80% en normoxie et 85% en hypoxie) (Figure 79 B). Au contraire, le pourcentage d'inhibition de la prolifération des LT CD4 activés obtenus pour les CSM-GW provenant du prélèvement n°4 est très faiblement augmenté par rapport aux CSM-GW non traitées après amplification en normoxie (54% versus 50) (Figure 79 A) et en hypoxie (60% versus 57%) (Figure 79 B). De façon intéressante, la

production de ROS intracellulaires des CSM-GW du **prélèvement 3** est augmentée par rapport aux CSM-GW non traitées après amplification en normoxie (ratio=1,6) (*Figure 73 A*) et en hypoxie (ratio=1,7) (*Figure 73 B*), tandis que la production de ROS intracellulaires des CSM-GW du prélèvement 4 est équivalente à celle des CSM-GW non stimulées après amplification en normoxie (ratio 1,1) et en hypoxie (ratio 1,2). **Ces 2 résultats laissent supposer que les propriétés immunosuppressives des CSM-GW stimulées par H₂O₂ 150 µM diminuent quand la production de ROS intracellulaires augmente.**

En revanche, le comportement des CSM-GW stimulées par de l'IFN-γ à 50 et 100 ng/mL est différent par rapport à celui des CSM-GW stimulées par l'H₂O₂. En effet, le pourcentage d'inhibition de prolifération des LT CD4 activés est augmenté par rapport aux CSM-GW contrôles non stimulées que ce soit en normoxie ou en hypoxie quel que soit l'échantillon (3 ou 4) (environ 81% en N-LPH et 89 % en H-LPH) (*Figure 79 B*). **Ces résultats montrent que l'inhibition de la prolifération des LT CD4 activés est plus importante pour les CSM-GW stimulées par de l'IFN-γ à 50 et 100 ng/mL pour lesquelles la production de ROS est équivalente aux CSM-GW non stimulées.**

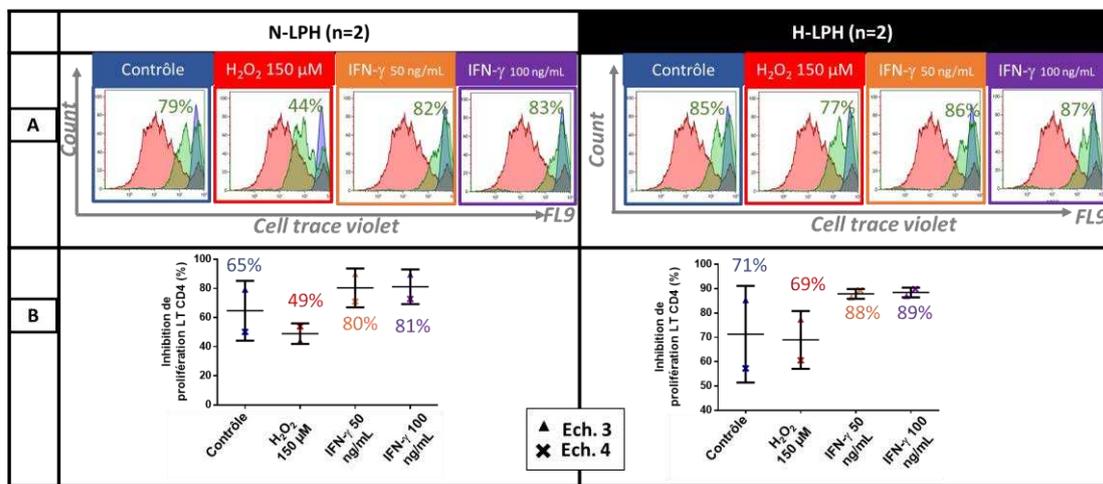


Figure 79 : Effet de la stimulation par H₂O₂ à 150 µM et IFN-γ (50 et 100 ng/mL) des CSM-GW amplifiées avec du lysat plaquettaire humain (LPH) en normoxie (N) et hypoxie (H) sur les propriétés d'inhibition de la prolifération des LT CD4 activés

Les CSM de gelée de Wharton (CSM-GW) cultivées jusqu'au passage 3 en normoxie et en hypoxie ont été trypsinées avant d'être ensemencées à 1000 cellules/cm² au passage suivant. Après 5 jours de culture, les CSM-GW ont été soumises à différentes stimulations : H₂O₂ 150 µM (peroxyde d'hydrogène) (**rouge**) ; IFN-γ (interféron) à 50 ng/mL (**orange**) et à 100 ng/mL (**violet**) ; cellules contrôles (**bleu**). Au jour 7, les CSM-GW sont trypsinées et remises en co-culture avec des lymphocytes T (LT) CD4 marqués au Cell trace V450 (ratio 1:1) en normoxie avec du milieu RPMI 1640 pendant 5 jours. La prolifération des lymphocytes T est mesurée par cytométrie en flux (Gallios, Beckman Coulter). (A) : Représentation des histogrammes monoparamétriques de distribution de l'intensité de la fluorescence du Cell trace violet (FL9) en fonction du nombre d'événements (Count). (**Rouge** : LT activés ; **Bleu** : LT non activés qui ne prolifèrent pas ; **Vert** : CSM-GW en co-culture avec les LT activés avec le pourcentage d'inhibition de prolifération) (n=1). (B) : Histogramme de pourcentage d'inhibition de la prolifération des LT CD4 (n=2). L'analyse statistique a été réalisée à l'aide du logiciel graphpad, grâce au test statistique t. Les résultats sont exprimés en moyennes ± l'écart type (ET), p <0,05 (*).

Nous pouvons donc retenir certaines tendances même si ces expériences nécessitent d'être répétées. Après stimulation par de l' H_2O_2 à 150 μM de deux prélèvements de CSM-GW nous avons deux réponses différentes :

- ✓ Pour l'échantillon n°3, quand la production de ROS augmente, les propriétés immunosuppressives diminuent par rapport aux CSM-GW non traitées.
- ✓ Pour l'échantillon 4, quand la production de ROS n'est pas augmentée après stimulation, les propriétés immunosuppressives ne sont pas modifiées par rapport aux CSM-GW non traitées.

En revanche, après stimulation par de l'IFN- γ à 50 et 100 ng/mL, la production de ROS est stable en N-LPH et H-LPH, les propriétés immunosuppressives sont augmentées par rapport aux CSM-GW non traitées. Cependant, des expériences complémentaires doivent être réalisées afin de confirmer ces conclusions.

G. Effet de la stimulation par H_2O_2 et IFN- γ sur le métabolisme des CSM-GW : consommation de glucose et production de lactate

Etant donné que les modifications dans les propriétés immunosuppressives des CSM peuvent être liés au métabolisme cellulaire, nous avons quantifié le glucose consommé et le lactate produit par les CSM-GW stimulés par de l' H_2O_2 à 150 μM et de l'IFN- γ à 50 et 100 ng/mL après amplification en normoxie et en hypoxie à partir des surnageants récupérés.

Les résultats obtenus montrent des tendances intéressantes. En effet, nous observons une légère augmentation de la consommation de glucose et de production de lactate par les CSM-GW stimulées par de l' H_2O_2 150 μM et par de l'IFN- γ à 50 et 100 ng/mL après amplification en normoxie et en hypoxie par rapport aux CSM-GW non traitées (*Figure 80*). Cette augmentation serait plus importante pour les CSM-GW stimulées par l'IFN- γ à 50 et 100 ng/mL. Ces résultats préliminaires qui nécessitent d'être reproduits et approfondis suggèrent qu'après stimulation par de l'IFN- γ à 50 et 100 ng/mL, l'augmentation de la consommation de glucose et de la production de lactate par les CSM-GW (signe que la glycolyse augmente) pourrait être liée aux propriétés immunosuppressives des cellules.

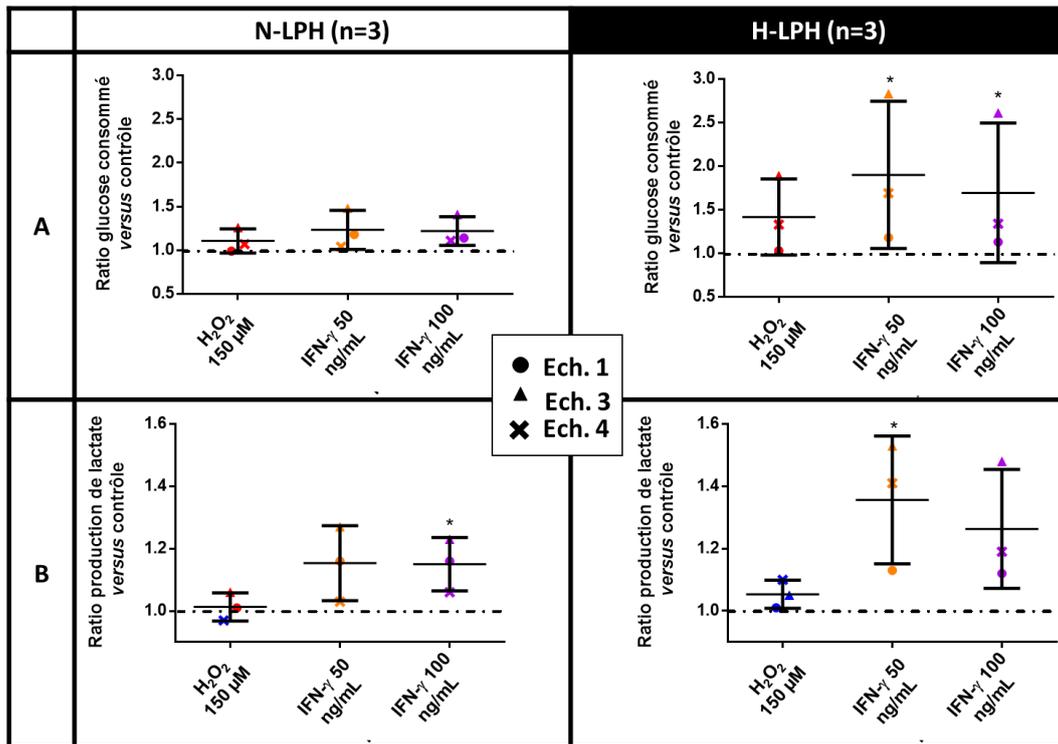


Figure 80 : Consommation du glucose et production de lactate par les CSM-GW amplifiées avec du lysat plaquettaire humain (LPH) à passage précoce en normoxie et hypoxie après stimulation par H₂O₂ à 150 µM et IFN-γ (50 et 100 ng/mL)

Les CSM de gelée de Wharton (CSM-GW) cultivées jusqu'au passage 3 en normoxie (N) et en hypoxie (H) ont été trypsinées avant d'être ensemencées à 1000 cellules/cm² au passage suivant. Après 5 jours de culture, les CSM-GW ont été soumises à différentes stimulations : H₂O₂ 150 µM (peroxyde d'hydrogène) (rouge) ; IFN-γ (interféron) à 50 ng/mL (orange) et à 100 ng/mL (violet). Au jour 7, les surnageants de culture sont récupérés pour quantifier la consommation de glucose (A) et la production de lactate (B) grâce à un automate (Thermo Scientific™ Gallery™). Les résultats sont exprimés en moyenne des ratios de glucose consommé ou lactate produit par cellule versus les cellules non traitées ± écart-type p < 0,05 (*) à l'aide d'un test t apparié (GraphpadPrism).

Nous retenons ici que les CSM-GW stimulées par de l'IFN-γ à 50 et 100 ng/mL tendent à consommer plus de glucose et produisent plus de lactate, ce qui pourrait être associé à leurs propriétés immunosuppressives.

H. Réseau mitochondrial des CSM-GW en sénescence induite et rélicative

Précédemment, nous avons montré que la production de lactate et la consommation de glucose par les CSM-GW amplifiées en normoxie et en hypoxie avaient tendance à augmenter après stimulation par H₂O₂, mais surtout par l'IFN-γ. Sachant que la mitochondrie est impliquée dans le métabolisme énergétique pour produire de l'ATP, nous avons marqué le cytochrome C afin de visualiser l'état du réseau mitochondrial des CSM-GW devenues sénescences après stimulation par H₂O₂. Les images ont également été comparées à celles des CSM-GW en sénescence rélicative (Figure 81). Les images de cytosquelette ne montrent pas de différences entre les conditions normoxie et hypoxie. Cependant, les CSM-GW à passage précoce semblent avoir un réseau de fibres d'actine moins tendu par rapport aux CSM-GW en sénescence rélicative ou en sénescence induite par H₂O₂, pour lesquelles les fibres sont plus rigides, ce qui est confirmé par la littérature. Par ailleurs, nous observons également des différences au niveau du réseau mitochondrial entre les CSM-GW sénescences et non sénescences. En effet, pour les CSM-GW à passage précoce, les images du cytochrome C montrent une majorité de mitochondries fragmentées plutôt localisées autour du noyau, faisant penser à de la fission

mitochondriale. En revanche, pour les CSM-GW en sénescence induite (stimulées par l' H_2O_2) et en sénescence réplivative, le réseau de mitochondries semble fusionné plus diffus dans le cytoplasme. Un marquage des protéines de fusion et de fission permettrait de confirmer les observations faites.

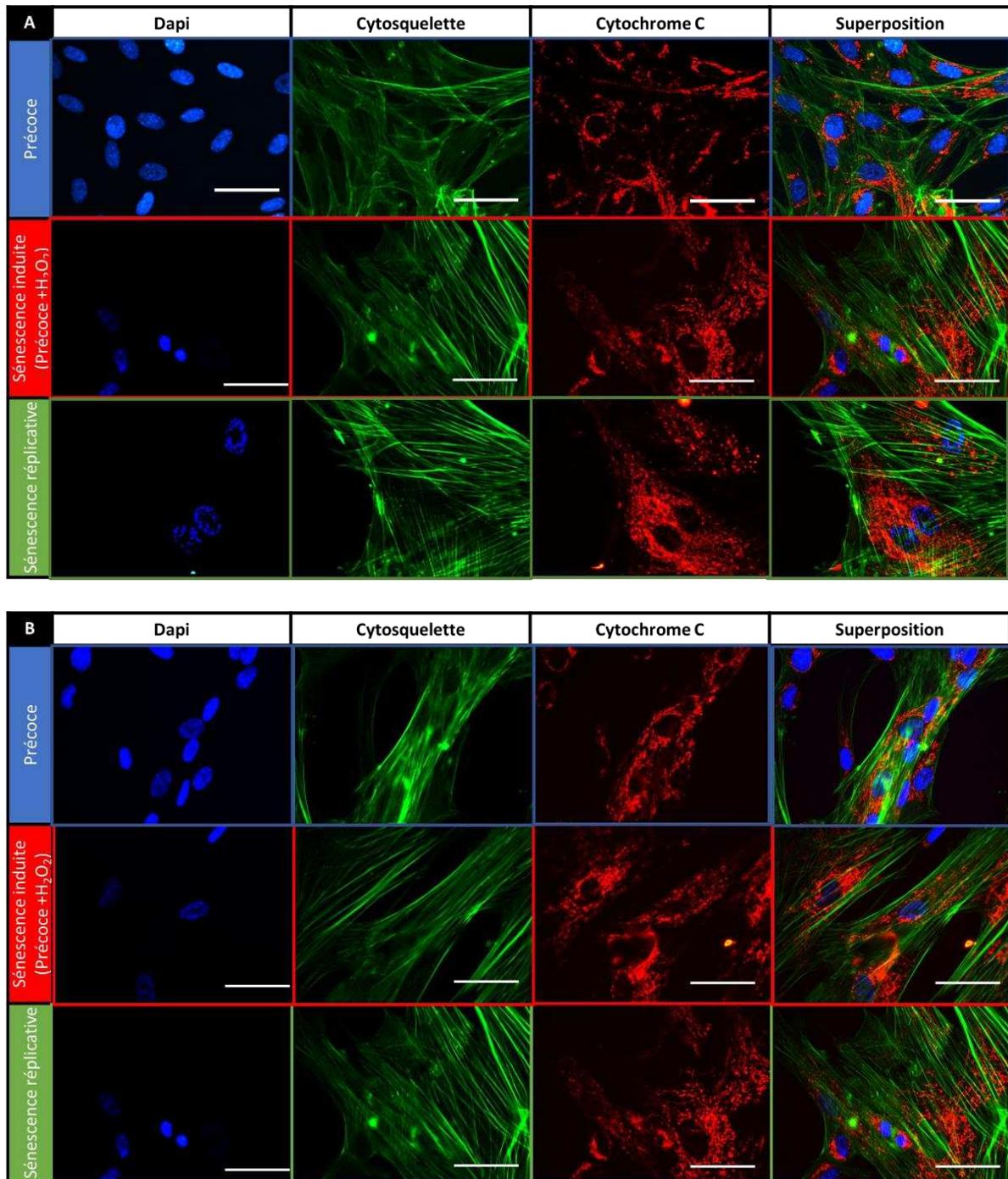


Figure 81 : Images en microscopie de fluorescence montrant les filaments d'actine, cytochrome C et les noyaux dans les CSM-GW amplifiées avec du lysat plaquettaire humain (LPH) à passage précoce, en sénescence induite par H_2O_2 à 150 μM et en sénescence réplivative en normoxie et en hypoxie

Les CSM de gelée de Wharton (CSM-GW) cultivées jusqu'au passage précoce (bleu), en sénescence induite H_2O_2 à 150 μM à passage précoce (rouge) et en sénescence réplivative (verte) en normoxie et en hypoxie ont été ensemencées sur des lamelles en verre pour réaliser le marquage immunofluorescent. Photographie des cellules au microscope à épifluorescence (Leica DMI3000B, échelle 100 μm) en normoxie (A) et en hypoxie (B) ($n=1$) : Noyau en bleu (DAPI), cytosquelette d'actine en vert (Alexa 488) et cytochrome C en rouge (Alexa 555).

Les images des mitochondries des cellules obtenues *via* le marquage du cytochrome C montrent donc que les CSM-GW à passage précoce auraient un réseau mitochondrial en fission, alors qu'il serait en fusion dans les CSM-GW en sénescence induite ou répllicative.

Les résultats concernant l'effet de la stimulation des CSM-GW par de l' H_2O_2 à 150 μM et de l' $IFN-\gamma$ à 50 et 100 ng/mL sont récapitulés dans le [Tableau 26](#).

Tableau 26 : Récapitulatif de la comparaison des résultats obtenus après stimulation des CSM-GW par l' H_2O_2 150 μM et par l' $IFN-\gamma$ à 50 et 100 ng/mL par rapport aux CSM-GW non stimulées

	Stimulation H_2O_2 150 μM		Stimulation $IFN-\gamma$ 50-100 ng/mL	
	N-LPH	H-LPH	N-LPH	H-LPH
Production de ROS	↑↑	↑↑	≈ ou ↓	≈ ou ↓
Morphologie	altérée	altérée	fibroblastique	fibroblastique
Prolifération	↓↓↓	↓↓↓	↓	↓
Apoptose	↑	↑	≈ ou ↓	≈ ou ↓
Sénescence	↑↑↑	↑↑↑	↑	↑
Migration	↓	↓	≈ ou ↓	≈ ou ↓
Immunosuppression	↓	↓	↑↑	↑↑

H : hypoxie ; **IFN- γ** : interféron gamma ; **H₂O₂** : peroxyde d'hydrogène ; **N** : normoxie ; **LPH** : lysat plaquettaire humain ; **ROS** : reactive oxygen species (espèces réactives de l'oxygène) intracellulaires
 ↓ : diminue ; ↑ : augmente ; ≈ : équivalent

II. Partie 3 : Discussion

Dans cette troisième partie du travail de thèse, nous nous sommes intéressés à 2 composantes que l'on pouvait retrouver chez les patients atteints de GVHD et qui pourraient affecter les propriétés fonctionnelles des CSM : le contexte de stress oxydant (Sari et al., 2008) et le contexte inflammatoire (Toubai et al., 2012). Le stress oxydant peut être induit dans les CSM par des composés chimiques (Fonteneau et al., 2017), par l'expansion *in vitro* (Heo et al., 2009), ou avec l'augmentation de l'âge des donneurs (Hu et al., 2018), tandis que l'IFN- γ , retrouvée dans le contexte inflammatoire de la GVHD (Toubai et al., 2012) est utilisée pour stimuler les CSM dans un modèle de GVH murin (Kim et al., 2018). Les CSM-GW ont donc été stimulées par de l' H_2O_2 afin de mimer le contexte de stress oxydant et par de l'IFN- γ pour mimer le contexte inflammatoire retrouvé dans la GVHD, dans l'objectif d'évaluer leur impact sur les propriétés fonctionnelles des CSM-GW.

Tout d'abord, nous avons mis en place la méthode de dosage des ROS intracellulaires dans les CSM-GW à l'aide de la sonde CM- H_2DCFDA qui est oxydée par les ROS et les RNS tels que l'anion peroxy-nitrite au niveau cytosolique. Nous avons montré que la tension en oxygène lors de la culture affecte la production de ROS intracellulaires dans les CSM-GW. En effet, la majorité des prélèvements de CSM-GW amplifiés en H-LPH produisent plus de ROS par rapport aux ceux amplifiés en N-LPH. Néanmoins, quelques prélèvements n'ont montré aucune différence entre les 2 taux d'oxygène, soulevant le problème d'hétérogénéité lors de la réponse des CSM. Dans la littérature, des résultats confirment cette augmentation de la production de ROS intracellulaires après amplification ou préconditionnement par l'hypoxie (Prabhakar et al., 2010) alors que d'autres la contredisent (Haque et al., 2013; Li et al., 2017a; Noronha et al., 2019). Certains travaux réalisés à partir de mitochondries de lapin isolées montrent que la normoxie ou l'hypoxie n'induit pas de différence dans la production de ROS, mais que ce serait plutôt la réoxygénation des mitochondries en hypoxie qui entraînerait une augmentation de la production de ROS. Cette augmentation serait même proportionnelle à la durée de l'hypoxie (Korge et al., 2008). En effet, dans notre laboratoire comme lors de la production en grade clinique, l'expansion des CSM-GW se fait dans des incubateurs en hypoxie, mais les étapes de changements de milieux se font en dehors des incubateurs, donc en normoxie, condition également retrouvée au moment où la sonde est ajoutée aux cellules. Toutes ces étapes entraînent des étapes de réoxygénation qui sont de durées plus ou moins similaires. Cependant, il est difficile de contrôler les durées d'ouverture des incubateurs par les autres manipulateurs qui entraînent aussi une réoxygénation. Lors de nos quantifications nous nous sommes assurés de ne pas atteindre la confluence, car celle-ci entraîne une augmentation du niveau de ROS (Hu and Li, 2018).

La production de ROS intracellulaires par les CSM-GW peut également être induite après stimulation par l' H_2O_2 quel que soit le taux d'oxygène (normoxie et hypoxie). Cette stimulation induit une baisse des capacités de prolifération, associée à l'induction de l'apoptose et de la sénescence. La baisse de la prolifération des CSM-MO induite par les ROS a déjà été montrée (Xiao et al., 2014). Par ailleurs, même si les ROS peuvent avoir des effets bénéfiques sur la prolifération, leur augmentation induit l'apoptose des CSM (Sart et al., 2015). De plus, certains travaux ont montré une augmentation modérée de la production de ROS dans des CSM à passage tardif (Fernandez-Rebollo et al., 2020), alors que d'autres rapportent une augmentation des ROS intracellulaires avec la sénescence des CSM-MO (Heo et al., 2009). En effet, ces ROS agiraient sur l'apurinic/aprimidinic endonuclease1/redox factor-1 (APE1/Ref-1) qui fait partie des systèmes antioxydants (Heo et al., 2009). De plus, dans un contexte de stress oxydant, l'activité du facteur de transcription nuclear factor erythroid 2-related factor 2 (NRF2) décline. Ce facteur permet de réguler l'expression des gènes codants pour des agents antioxydants tels que la catalase. (Li et al., 2017d). En effet, les cellules

utilisent leur systèmes anti-oxydants pour prendre en charge les ROS et maintenir un niveau basal de ROS. D'après nos résultats, lorsque la production de ROS augmente dans les CSM-GW stimulées par H₂O₂, les cassures de l'ADN sont plus importantes et l'expression de la SOD2 est également augmentée. Nous avons également montré que l'expression de la SOD2 était augmentée à passage précoce dans les CSM-MO sénescents, provenant de donneurs âgés par rapport aux CSM-GW (Charif et al., 2019).

Les ROS sont également impliquées dans la diminution de l'expression des molécules d'adhésion telles que l'intégrine $\alpha V\beta 3$, l'intégrine $\alpha 5\beta 1$ et les FAK (focal adhesion related kinases) dans les CSM-MO de rats (Song et al., 2010). Les intégrines sont en effet très importantes à l'adhésion des CSM lors du processus de homing permettant aux CSM de migrer vers le site de lésion (Yagi et al., 2010). Cela explique nos résultats qui montrent une baisse des propriétés de migration des CSM-GW après stimulation par de l'H₂O₂. En effet, les ROS sont impliquées dans la baisse des capacités de migration des CSM-MO de rats (Yang et al., 2010) ou humaines (Sepúlveda et al., 2014). Dans notre étude, la stimulation par H₂O₂ des CSM-GW induit leur sénescence, ce qui pourrait expliquer nos résultats, car les capacités de migration des CSM-MO sénescents sont altérées (Sepúlveda et al., 2014; Turinetti et al., 2016). D'ailleurs, dans un modèle de sénescence répliquative *in vitro*, la baisse de ces capacités de migration des CSM-MO de rats est associée à une augmentation de la production de ROS (i), à une diminution des capacités antioxydantes (ii) et à une altération de la morphologie des mitochondries (iii). Des travaux montrent également une diminution de l'expression des gènes impliqués dans la fonction mitochondriale, le remodelage du cytosquelette d'actine et l'organisation des adhésions focales avec l'augmentation des ROS intracellulaires lors du vieillissement répliquatif de CSM-MO de rats (Geißler et al., 2012).

Notre étude laisse supposer que, les propriétés immunosuppressives des CSM-GW seraient diminuées après stimulation par de l'H₂O₂. Très peu de travaux concernent l'effet des ROS sur les propriétés immunosuppressives des CSM, alors que des travaux suggèrent que les ROS ont un rôle important dans l'activation de la prolifération et la mort des lymphocyte T (Belikov et al., 2015; Nathan and Cunningham-Bussel, 2013; Yang and Lian, 2020). Par ailleurs, les ROS exogènes pourraient inhiber ou inactiver les facteurs de transcription dans les lymphocytes T (Franchina et al., 2018). Il est possible que les ROS produites par les CSM diffusent dans les milieux extracellulaires, sachant qu'il existe des systèmes antioxydants tels que la SOD3 dans le milieu extracellulaire de fibroblastes (Nozik-Grayck et al., 2005). Malheureusement, nous n'avons pas quantifié les ROS dans les surnageants de culture des CSM, afin de confirmer qu'elles puissent agir sur l'inhibition de la prolifération des LT en co-culture. Étant donné que les ROS sont impliquées dans la régulation des voies de signalisation (Nathan and Cunningham-Bussel, 2013), nous pouvons supposer que les ROS modifient la sécrétion de facteurs solubles impliqués dans l'immunomodulation des CSM.

À l'heure actuelle, il est proposé que le stress oxydant entraîne une diminution des propriétés immunosuppressives des CSM (Denu and Hematti, 2021), étant donné que le stress oxydant est associé au vieillissement et à la sénescence et des CSM qui sont moins immunosuppressives (Turinetti et al., 2016). D'ailleurs, les données de l'équipe confirment que les CSM-GW en sénescence répliquative sont moins immunosuppressives, mais que leur stimulation par l'IFN- γ permet d'augmenter leur capacité d'immunosuppression (Master 2 Mériem El Ouafy).

C'est d'ailleurs la stimulation par l'IFN- γ à 50 et 100 ng/mL (doses élevées) qui a été utilisée dans cette thèse pour mimer le contexte inflammatoire retrouvée dans la GVHD (Toubai et al., 2012). Cette stimulation entraîne peu de sénescence et une diminution légère de la prolifération et très peu d'apoptose comme déjà observée chez les CSM de tissu adipeux (Andreeva et al., 2018) ou de CSM-MO de rats (Kadle et al., 2018). En revanche, il semblerait que cette stimulation ne modifie pas la

production de ROS intracellulaires, voir la diminue. En effet, même si certains prélèvements ont une production de ROS intracellulaires qui tend à augmenter avec des doses croissantes en INF- γ après une amplification en hypoxie, la majorité des prélèvements stimulés par l'INF- γ ont une production stable et produisent parfois moins de ROS. Or, d'après la littérature, la stimulation par l'INF- γ peut également induire la production ROS dans d'autres types cellulaires ou sources de CSM, tels que les hépatocytes (Watanabe et al., 2003), les CSM de tissu adipeux (Andreeva et al., 2018) et les CSM-MO de souris (Yang et al., 2017). Cependant, même si nos données préliminaires ne permettent pas de conclure sur l'effet de l'INF- γ sur les propriétés de migration des CSM-GW, certains travaux montrent que les cellules souches de la pulpe dentaire stimulées par l'INF- γ à faible dose (0,5 ng/mL) ont des propriétés de migration diminuées (He et al., 2017).

Néanmoins, nos données confirment l'effet bénéfique de l'INF- γ sur les propriétés immunosuppressives déjà décrit dans la littérature sur : les CSM-de cordon ombilical de porc (Noone et al., 2013), les CSM-MO humaines (Kim et al., 2018; Noone et al., 2013), les CSM humaines de tissu adipeux (Andreeva et al., 2018; Kim et al., 2018), les CSM humaines de sang de cordon (Kim et al., 2018) et les CSM-GW humaines (Kim et al., 2018). Les mécanismes dépendraient d'ailleurs de l'enzyme IDO qui dégrade le tryptophane (Kim et al., 2018; Noone et al., 2013; Noronha et al., 2019). En effet, les CSM expriment le gène codant pour IDO *via* la voie de signalisation JAK/STAT1 (Janus kinase/ signal transducer and activator of transcription 1) après stimulation par de l'INF- γ et cette stimulation augmente la survie des CSM après injection dans un modèle de GVH murin (Kim et al., 2018). Par ailleurs, l'utilisation de l'INF- γ seule ou combinée à l'hypoxie (pour avoir un effet synergique) permet d'augmenter les propriétés immunosuppressives des CSM de tissu adipeux et induit la sur-expression de molécules impliquées dans l'immunomodulation (IDO, HLA-E, HLA-G, PD-L1, COX2). De plus, le préconditionnement par l'hypoxie ou par hypoxie/INF- γ entraîne un switch métabolique vers la glycolyse, permettant au lactate produit d'inhiber la prolifération des LT (Wobma et al., 2018). Nos résultats préliminaires ont montré que lors de l'expansion en normoxie et hypoxie, la consommation de glucose et la production de lactate sont augmentées dans les CSM-GW préconditionnées par de l'INF- γ , comme il a déjà été montré dans les CSM de cordon préconditionnées par l'hypoxie avec de meilleures propriétés immunosuppressives (Lavrentieva et al., 2010). Ces données suggèrent qu'il existe un lien étroit entre le métabolisme des CSM et leurs propriétés immunosuppressives. En effet, les gènes impliqués dans le métabolisme des CSM sont régulés par le facteur de transcription HIF-1 α (Haque et al., 2013; Lavrentieva et al., 2010). D'ailleurs, il a été montré que HIF-1 α pouvait gouverner les propriétés immunorégulatrices des CSM de souris en reprogrammant leur métabolisme (Contreras-Lopez et al., 2020). Etant donné que les ROS sont impliquées dans le métabolisme des cellules (Ren et al., 2020), il est possible d'envisager un lien entre la production de ROS par les CSM-GW, leur métabolisme et leurs capacités à inhiber la prolifération des LT.

Dans les cellules, la source majeure d'énergie en ATP de la cellule provient de la mitochondrie, *via* la phosphorylation oxydative. La glycolyse permet également la production d'ATP, bien qu'en quantité faible. Les CSM ont un réseau de mitochondries matures et spécialisées dont la dynamique fission/fusion permettrait d'organiser l'approvisionnement en énergie et la production de ROS intracellulaires (Ren et al., 2020). Les tendances de nos résultats préliminaires montrent que quel que soit le taux d'oxygène (normoxie ou hypoxie), les CSM-GW à passage précoce ont un réseau mitochondrial fissionné périnucléaire, tandis qu'il est fusionné et plus diffus dans le cytoplasme des CSM-GW en sénescence répllicative ou en sénescence induite à l'H₂O₂. D'après la littérature, les CSM qui vieillissent ont un réseau mitochondrial fusionné favorisant l'augmentation de la production de ROS intracellulaires et favorisant la réparation mitochondriale (Ren et al., 2020). Par ailleurs, certains

travaux montrent que les CSM sénescentes auraient plutôt un métabolisme oxydatif (Yuan et al., 2019, 2020) et qu'avec la sénescence, les mitochondries des CSM-MO seraient moins fonctionnelles (Yuan et al., 2020). Cependant, d'autres travaux sur les CSM-MO sénescentes montrent qu'elles auraient plutôt un métabolisme glycolytique (Fernandez-Rebollo et al., 2020). Actuellement des travaux sont en cours afin de comprendre ces nouveaux mécanismes d'immunosuppression *via* le métabolisme et notamment le transfert de mitochondries (Contreras-Lopez et al., 2020; Court et al., 2020; Luz-Crawford et al., 2019). D'ailleurs, une des stratégies étudiées actuellement dans le cadre de la médecine régénérative consiste à moduler le métabolisme des CSM pour favoriser leur ajustement à leur nouvel environnement (Salazar-Noratto et al., 2020). Ainsi, afin d'augmenter l'efficacité thérapeutique, nous pourrions envisager de favoriser le métabolisme glycolytique des CSM en les préconditionnant par l'hypoxie et/ou l'IFN- γ pour augmenter leurs propriétés immunosuppressives comme cela a déjà été démontré (Wobma et al., 2018).

Ce préconditionnement des CSM-GW par l'hypoxie et/ou l'IFN- γ pourrait être proposé dans le cadre de la GVHD. Les tendances observées dans nos résultats préliminaires ont confirmé l'effet bénéfique de la stimulation par l'IFN- γ (contexte inflammatoire) sur leurs propriétés immunosuppressives, tandis que la stimulation par H₂O₂ (contexte de stress oxydant) pourrait diminuer ces propriétés. Il faut également noter que dans le contexte inflammatoire utilisé dans ce travail, la production de ROS est parfois diminuée, suggérant que celle-ci affecte leurs propriétés immunosuppressives. Ainsi, après avoir répété et confirmé les résultats précédents, il serait intéressant de pouvoir mimer le contexte de stress oxydant et inflammatoire en même temps sur les mêmes CSM-GW afin d'évaluer l'effet sur leurs propriétés fonctionnelles. Cela permettrait de savoir, si l'effet bénéfique de la stimulation par l'IFN- γ permet de contrecarrer la baisse des propriétés immunosuppressives induites par les ROS. En revanche, il s'agit là d'un modèle *in vitro* qui reste assez éloigné de ce qui se passe réellement dans la GVHD. En effet, même si l'IFN- γ est utilisé en préconditionnement des CSM pour des applications cliniques comme la GVHD, d'autres cytokines sont également impliquées dans la pathologie, telles que les cytokines pro-inflammatoires (TNF- α , l'IL-6, l'IL-8...) et anti-inflammatoires (IL-10, TGF- β ...) (Toubai et al., 2012). De même, pour mimer le contexte de stress oxydant, nous avons utilisé l'H₂O₂ qui est responsable de la formation de l'anion superoxyde entre autres. Or, dans les plasma de patients atteints de GVHD, d'autres agents pro- (malondialdéhyde, oxyde nitrique) et antioxydants (SOD, GPX et catalase) sont également retrouvés (Sari et al., 2008). Ainsi, il serait intéressant afin d'évaluer la contribution de tous les facteurs retrouvés dans la GVHD, de stimuler les CSM-GW avec du serum obtenu à partir de ces patients et d'évaluer leurs propriétés fonctionnelles. En effet, cette approche a déjà été utilisée afin de démontrer l'implication du stress oxydant présent chez les patients atteints de sclérose systémique sur la baisse des propriétés immunosuppressives des CSM-MO. Cette maladie auto-immune est caractérisée par la fibrose de plusieurs organes et une atteinte vasculaire impliquant le stress oxydant (Fonteneau et al., 2017).

Ces résultats permettraient d'envisager des stratégies thérapeutiques afin d'augmenter le potentiel des CSM-GW. En effet, des travaux ont montré que le prétraitement par la NAC augmente la viabilité et l'activité des agents anti-oxydant (GSH, SOD, catalase) dans les CSM-GW stimulées par H₂O₂ (Ali et al., 2017). D'ailleurs, l'utilisation de certaines drogues ayant des propriétés antioxydantes telles que la NAC, la vitamine E ou l'acide ascorbique a été proposée pour leurs effets bénéfiques sur les propriétés des CSM comme l'autorenouvellement, la multipotence, l'apoptose et l'adhésion (Hu and Li, 2018; Li et al., 2015, 2017b).

Les résultats concernant l'effet du contexte de stress oxydant et inflammatoire sont résumés dans la **Figure 82**.

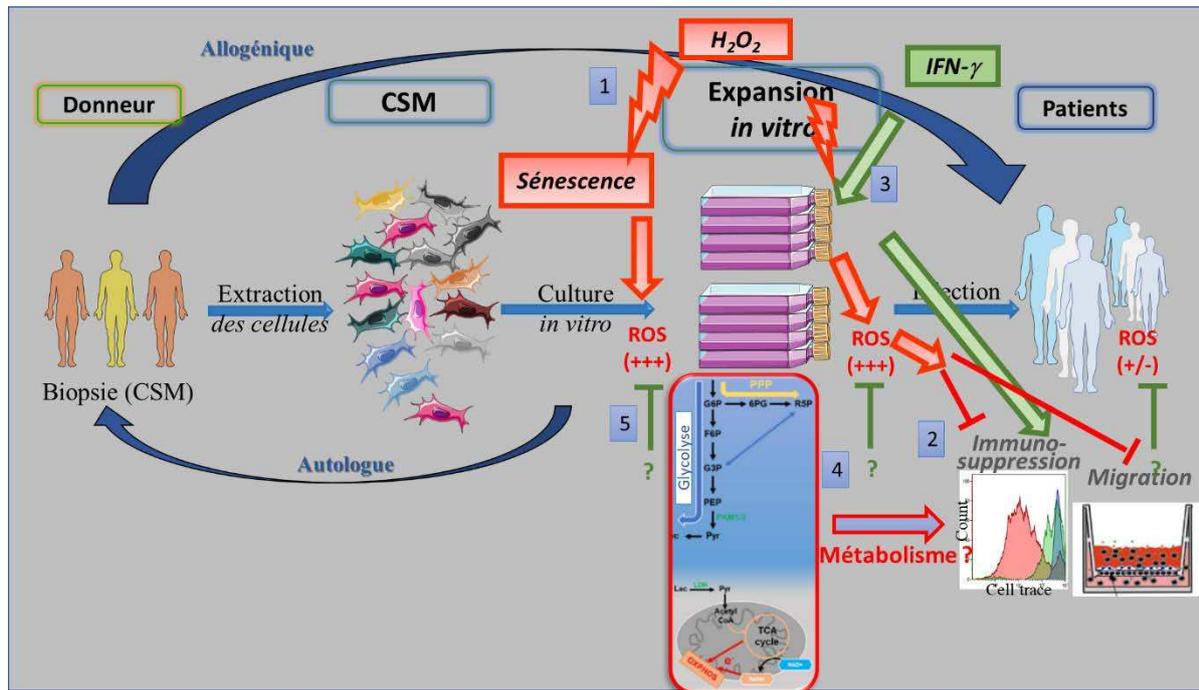


Figure 82 : Schéma récapitulatif des principaux résultats obtenus dans la partie 3

Dans cette troisième partie, nous nous sommes intéressés à l'effet du contexte de stress oxydant et inflammatoire sur les propriétés fonctionnelles des CSM-GW. Nous avons montré que lors de l'expansion qui induit la sénescence répliquative (*expansion in vitro*), les CSM-GW produisent plus d'espèces réactives de l'oxygène (ROS). Cette sénescence est également induite par la stimulation par l' H_2O_2 qui mime le contexte de stress oxydant (1). Cette production de ROS entraîne une diminution des propriétés fonctionnelles des CSM-GW telles que la migration et l'immunosuppression (2). Avec la deuxième stimulation par l'interféron gamma ($IFN-\gamma$) qui mime le contexte inflammatoire, les CSM-GW ont des propriétés immunosuppressives augmentées (3), probablement influencées par le métabolisme des CSM-GW (4). Des stratégies thérapeutiques inhibant les ROS peuvent être envisagées afin d'augmenter l'efficacité thérapeutique (5).

Discussion générale

L'objectif de cette thèse était d'étudier l'effet de l'environnement et de rechercher des marqueurs de qualité afin de pouvoir utiliser les CSM en tant que produit de thérapie cellulaire dans le cadre de pathologies telles que la GVHD.

Ce travail de thèse a permis de montrer que le microenvironnement pouvait affecter les propriétés fonctionnelles des CSM telles que la migration et l'immunosuppression. Nous avons testé différents paramètres tels que le taux d'oxygène (N=normoxie et H=hypoxie) et les suppléments de culture tels que le sérum de veau fœtal (SVF) utilisé en grade recherche et le lysat plaquettaire humain (LPH) utilisé en grade clinique. Les résultats ont montré que les CSM-MO et CSM-GW amplifiées dans les 4 conditions répondaient aux critères de l'ISCT tels que l'adhésion au plastique, l'expression de marqueurs de surface et la différenciation (Dominici et al., 2006). Le **LPH** qui est enrichi en facteurs de croissance par rapport au SVF tels que bFGF, le PDGF, l'IGF, l'EGF et le VEGF (Crespo-Diaz et al., 2011; Doucet et al., 2005; Fekete et al., 2012a; Hemeda et al., 2014; Laner-Plamberger et al., 2015; Shanskii et al., 2013) permet d'améliorer les propriétés de clonogénicité, de prolifération et induit une morphologie de type fibroblaste-like que ce soit pour les CSM-GW ou les CSM-MO. Par ailleurs, les CSM-GW et CSM-MO avec de meilleures capacités de prolifération après amplification avec du LPH sont moins sénescentes et confirment les résultats antérieurs (Charif et al., 2019). La forte concentration en bFGF dans le LPH par rapport au SVF (Altaie et al., 2016; Doucet et al., 2005; Shanskii et al., 2013) peut en être la cause, étant donné que le bFGF inhibe la sénescence des CSM-MO (Coutu et al., 2011). De façon intéressante, le LPH n'entraîne pas de transformation pour la culture des CSM-GW, rendant compatible leur utilisation avec une application clinique. Les analyses des biomarqueurs ont permis de confirmer que l'expression des marqueurs de sous-population CD71 (high) et CD146 (high) ou que l'expression des marqueurs ARNm tels que ATP11B est associée aux meilleures capacités de prolifération des CSM tandis que le marqueur de surface CD157 est associé à la sénescence des CSM et que le miR-9 est associé au moins bonnes capacités de prolifération des CSM.

Ces premiers résultats nous ont laissés supposer que les **propriétés fonctionnelles** des CSM pouvaient être améliorées avec le **LPH** comme supplément de culture. En effet, l'expression des clusters de différenciation CD71 et CD146, est associée aux meilleures capacités de prolifération des CSM-MO amplifiées avec le LPH, tandis que celle de CD157 est diminuée dans les CSM-MO moins sénescentes amplifiées avec le LPH. Ces marqueurs de surface, ainsi que le marqueur moléculaire miR-9 sont à prendre en compte pour sélectionner les CSM-MO qui prolifèrent mieux. Cependant un autre facteur comme le taux d'oxygène affecte les propriétés fonctionnelles des CSM. En effet, même si les CSM amplifiées avec le LPH migrent, **l'hypoxie** permet d'améliorer ces **propriétés de migration**. Il est montré que le marqueur miR-9 serait impliqué dans les propriétés de migration (Li et al., 2017c) et de homing (Bing et al., 2016) des CSM-MO de rats. Les CSM-GW à bonne capacités de prolifération n'expriment pas miR-9 et migrent moins bien que les CSM-MO. En accord avec la littérature, le LPH en supplément de culture ne semble pas avoir d'impact sur les **propriétés immunosuppressives** des CSM-MO (Baker et al., 2015; Becherucci et al., 2018; Bernardo et al., 2011; Doucet et al., 2005; Naskou et al., 2018; Savelli et al., 2018; Skific et al., 2018) et des CSM-GW (Kandoi et al., 2018), alors que l'hypoxie permet les améliorer quel que soit le supplément de culture. Ce résultat est intéressant quand on sait que les CSM sont en hypoxie dans leur niche (Calvo-Asensio et al., 2018; Haque et al., 2013; Lataillade et al., 2010; Mohyeldin et al., 2010) dans laquelle HIF-1 α pourrait avoir un rôle clé (Haque et al., 2013).

Dans ce travail de thèse, nous avons étudié d'autres paramètres liés à l'expansion *in vitro* tels que la sénescence réplivative, ou liés à la stimulation par différentes molécules telles que H₂O₂ pour mimer un **stress oxydant** et induire la sénescence réplivative et montré qu'ils pouvaient affecter leurs propriétés fonctionnelles. De même, le pré-conditionnement des CSM par des cytokines pro-inflammatoires telles que l'IFN- γ peut affecter leurs propriétés immunosuppressives. La stimulation par l'H₂O₂ 150 μ M, qui mime le contexte de stress oxydant de la GVHD entraîne une baisse des capacités de migration des CSM-GW amplifiées avec du LPH, quelle que soit la concentration en oxygène comme le confirme la littérature (Sepúlveda et al., 2014). Cette stimulation entraîne la production de ROS et induit la sénescence des CSM-GW. Ces ROS seraient impliquées dans les modifications de la fonction mitochondriale, le remodelage du cytosquelette d'actine et l'organisation des adhésions focales (Geißler et al., 2012). De la même manière, les CSM-GW en sénescence induite ou réplivative sont moins immunosuppressives, suggérant un lien entre les ROS intracellulaires et l'inhibition de la prolifération des T. Nous pourrions imaginer des stratégies à base d'agents anti-oxydants afin de cibler les ROS et d'augmenter l'efficacité thérapeutique. En effet, les ROS pourraient être impliquées dans l'activation des LT, mais pourraient également inhiber l'activation de facteurs de transcription dans les LT (Franchina et al., 2018). Etant donné que la source majoritaire de ROS provient de la mitochondrie, nous avons réalisé des expériences préliminaires montrant un réseau mitochondrial fusionné dans les cellules en sénescence induite et réplivative et fissionné dans les cellules non sénescentes. La littérature montre qu'avec le vieillissement, les CSM ont un réseau mitochondrial en fusion (Ren et al., 2020).

Or, nous savons également que la stimulation des CSM-GW en sénescence réplivative par **de l'IFN- γ** permet de rétablir leur fonction immunosuppressive (Master 2 Mériem El Ouafy). L'effet bénéfique du pré-conditionnement par de l'IFN- γ a déjà été montré dans CSM-GW humaines et d'autres sources, mais non sénescentes, par des mécanismes impliquant l'enzyme IDO qui dégrade le tryptophane (Kim et al., 2018). Cette stimulation mime le contexte inflammatoire retrouvé dans la GVHD. Les résultats préliminaires ont montré pour un échantillon de CSM-GW stimulées par l'IFN- γ , que les propriétés immunosuppressives sont diminuées quand la production de ROS augmente. Ainsi, après avoir répété et confirmé les résultats précédents, il serait intéressant de pouvoir mimer le contexte de stress oxydant et inflammatoire en même temps sur les mêmes CSM-GW afin d'évaluer l'effet sur leurs propriétés fonctionnelles. Cela permettrait de savoir, si l'effet bénéfique de la stimulation par l'IFN- γ permet de contrecarrer la baisse des propriétés immunosuppressives induites par les ROS. En revanche, il s'agit là d'un modèle *in vitro* qui reste assez éloigné de ce qui se passe réellement dans la GVHD. En effet, chez le patient d'autres facteurs tels que les cytokines pro- et anti-inflammatoires sont également présents (Toubai et al., 2012). Ainsi, il serait intéressant afin d'évaluer la contribution de tous les facteurs retrouvés dans la GVHD. Pour cela, nous pourrions stimuler les CSM-GW avec du serum obtenu à partir de ces patients et évaluer leurs propriétés fonctionnelles. Cette approche a déjà été utilisée pour montrer que le sérum de patients atteints de sclérose systémique entraîne une diminution des propriétés immunosuppressives des CSM (Fonteneau et al., 2017).

Par ailleurs, la stimulation par IFN- γ entraîne peu de sénescence et d'apoptose sur les CSM-GW à passage précoce. Des expériences complémentaires ont permis de montrer que cette stimulation entraînait une augmentation de la consommation de glucose et de la production de lactate par les CSM-GW. En effet, de récents travaux ont montré que la combinaison de l'hypoxie et de la stimulation par l'IFN- γ permettait d'augmenter l'immunosuppression *via* l'acidification du milieu induite par la production de lactate (Wobma et al., 2018) et donc *via* un métabolisme glycolytique (Liu et al., 2019). D'ailleurs d'après la littérature, les CSM sénescents ont un métabolisme oxydatif (Yuan et al., 2019,

2020) et auraient des mitochondries dysfonctionnelles (Yuan et al., 2020), ce qui explique nos données de l'équipe montrant que les CSM-GW sénescents sont moins immunosuppressives. Cependant, d'après d'autres travaux, les CSM-MO sénescents auraient un métabolisme glycolytique (Fernandez-Rebollo et al., 2020). En effet, la mitochondrie permet à la cellule de fournir de l'énergie sous forme d'ATP *via* la glycolyse et la phosphorylation oxydative, mais constitue également la source majeure de production de ROS. Il serait donc intéressant d'expliquer les mécanismes qui sont mis en jeu *via* les mitochondries pour que les CSM exercent leurs propriétés immunosuppressives *via* leur plasticité métabolique. Récemment, le transfert de mitochondries a été décrit entre les CSM et les lymphocytes T (Contreras-Lopez et al., 2020; Court et al., 2020; Luz-Crawford et al., 2019) afin d'exercer leurs propriétés immunosuppressives.

Conclusion générale-Perspectives

Les cellules stromales/souches mésenchymateuses (CSM), considérées aujourd'hui comme des médicaments de thérapie innovante au niveau européen, constituent un outil thérapeutique intéressant. Elles sont utilisées actuellement dans des essais cliniques pour le traitement de diverses pathologies ostéoarticulaires, du système nerveux mais aussi dans le cadre du choc septique, du syndrome de détresse respiratoire aiguë (SDRA) retrouvé dans les complications de la Covid-19, ou dans la maladie du greffon contre l'hôte (GVHD). L'utilisation des CSM en thérapie cellulaire nécessite une étape d'expansion *in vitro* afin d'avoir un nombre suffisant de cellules qui peut affecter leur qualité ou leurs propriétés fonctionnelles. L'objectif de ce travail de thèse était d'étudier l'effet de l'environnement et de rechercher des marqueurs de qualité pour la contribution au développement d'un produit de thérapie cellulaire à base de CSM. Pour cela, nous nous sommes focalisés sur 3 points nécessaires à l'obtention d'un produit de thérapie cellulaire à base de CSM, représentés par les 3 parties des résultats suivantes :

1. La première a concerné l'étape d'expansion *in vitro* et donc l'effet des conditions de culture sur leur comportement.
2. La deuxième s'est focalisée sur la recherche des marqueurs de surface et moléculaires en lien avec leur prolifération.
3. Enfin, la troisième partie, en lien avec leur fonctionnalité, a permis de savoir comment les CSM se comportent dans un contexte de stress oxydant et/ou inflammatoire qui peut être retrouvé chez le patient atteint de GVHD, chez le donneur ou même induit pas l'expansion *in vitro*.

Tout d'abord, ce travail de thèse a permis de montrer que le microenvironnement, et plus particulièrement les conditions de culture (normoxie, hypoxie, le sérum de veau fœtal (SVF) ou le lysat plaquettaire humain (LPH) comme supplément de culture), pouvaient affecter les propriétés fonctionnelles des CSM telles que la migration et l'immunosuppression. Nous avons montré que les propriétés de clonogénicité et de prolifération étaient meilleures avec le LPH et que les CSM avaient une morphologie fibroblastique et étaient moins sénescents. Cela est dû à la forte concentration en facteurs de croissance du LPH. En revanche, les propriétés fonctionnelles comme la migration et l'immunosuppression étaient meilleures en hypoxie quel que soit le supplément de culture (LPH/SVF).

Ensuite, nous avons pu mettre en évidence des marqueurs de qualité tels que le marqueur moléculaire miR-9 associé aux faibles capacités de prolifération des CSM-GW et CSM-MO. L'utilisation de ces marqueurs peut être envisagée pour sélectionner les CSM qui prolifèrent le mieux dès le début de la culture. Par ailleurs, nous avons confirmé l'expression de marqueurs à la surface des CSM tels que les clusters de différenciation CD71 (high) et CD146 (high) associées aux meilleures capacités de prolifération des CSM-MO et celle de CD157 (high) associé à la sénescence des CSM. L'expression de ces marqueurs pourrait permettre de valider les lots de CSM amplifiées en conditions de grade clinique avant de les libérer.

Enfin, nous avons montré qu'un autre paramètre du microenvironnement peut affecter la fonctionnalité des CSM : le contexte de stress oxydant. En effet, les CSM-GW amplifiées en hypoxie produisent plus d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) par rapport à celles amplifiées en normoxie. La stimulation de ces CSM-GW par du peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) induit une augmentation de la production de ROS (i), une induction de l'apoptose et de la sénescence (ii), une baisse de leurs propriétés de prolifération (iii), de migration (iv) et d'immunosuppression (v) quelle que soit le taux d'oxygène. Cependant, la stimulation des CSM-GW par de l'interféron gamma ($IFN-\gamma$) permet d'augmenter les propriétés fonctionnelles des CSM-GW.

Pour la suite de ce travail, il serait intéressant, dans un premier temps, de confirmer l'implication des marqueurs moléculaires dans la prolifération des CSM et ainsi avoir des biomarqueurs précoces pour le contrôle de la qualité des CSM. Les résultats ont montré que miR-9 était sur-exprimé et que miR-675 était sous-exprimé dans les CSM-MO provenant de donneurs âgés à faibles capacités de prolifération. Ainsi, afin de confirmer l'implication de miR-9 et miR-675 dans les capacités de prolifération des CSM-MO, nous pourrions utiliser des miR mimics pour mimer l'expression du miR dans les CSM-MO qui ne l'expriment pas et observer l'effet. Ainsi, si le miR est impliqué dans l'inhibition de la prolifération, les CSM-MO devraient pouvoir proliférer. Par ailleurs, nous pourrions utiliser des antagoniMiRs pour inhiber l'expression des miR et observer l'effet. Ainsi, si le miR est impliqué dans la prolifération, les CSM-MO ne devraient pas proliférer.

De plus, le couplage de miR-9/CBX7 a déjà été démontré dans la littérature. MiR-9 entraîne d'ailleurs la sous-expression du gène CBX7 dans un modèle de sénescence répllicative de fibroblastes (O'Loghlen et al., 2015). Nous avons montré que le gène ATP11B est sous-exprimé dans les CSM-MO provenant de donneurs âgés. Nous savons également que la région 3'-UTR des ARNm ATP11B présente une complémentarité de base avec miR-9 qui est sur-exprimé dans les CSM-MO provenant de donneurs âgés. Il serait donc intéressant de vérifier le couplage non décrit dans la littérature, miR9/ATP11B en établissant un gène rapporteur luciférase dans lequel la phase codante du gène de la luciférase *Firefly* sera fusionnée à la région 3'-UTR du gène ATP11B et de le co-transfecter dans des cellules avec un vecteur recombinant exprimant le pré-miR9. Si le couplage fonctionnel miR9/ATP11B est avéré, l'appariement de base au sein de la région 3'-UTR fusionnée devrait moduler l'activité luciférase et la mutation des séquences impliquées dans l'appariement miR9/ATP11B devraient abolir l'effet de la surexpression de miR-9 sur l'expression d'ATP11B.

Enfin, Il serait également intéressant d'étudier l'expression de miR-9, miR-675 et ATP11B selon la condition de culture (N-SVF, H-SVF, N-LPH et H-LPH).

Dans un deuxième temps, nous pourrions réaliser certaines expériences pour augmenter la robustesse des marqueurs de surface mis en évidence en tant que biomarqueurs de qualité.

- ✓ Par exemple, il serait intéressant de réaliser des tris magnétiques à partir du marqueur CD157 associé à la sénescence des CSM-GW et de réaliser tests fonctionnels (migration et immunosuppression) afin de confirmer que les CSM-GW CD157 (low) sont plus fonctionnelles.
- ✓ L'expression de CD157 (high) associée à la sénescence répllicative des CSM-GW d'après notre équipe, pourrait également être vérifiée dans les CSM-GW en sénescence induite par H_2O_2 et ainsi confirmer son implication dans les moins bonnes propriétés fonctionnelles de ces CSM-GW en sénescence induite.

Dans un troisième temps, afin de mieux comprendre l'implication du métabolisme dans les propriétés immunosuppressives des CSM-GW amplifiées en hypoxie, en sénescence et stimulées par IFN- γ , il serait intéressant :

2. D'étudier le métabolisme de CSM-GW non sénescents, en sénescence répliquative et induite par H₂O₂ préconditionnées par IFN- γ ou non. La production de lactate et la consommation en glucose pourrait être mesurée par l'automate utilisé dans cette thèse. En parallèle, des mesures de consommation en oxygène et d'acidification du milieu pourraient être réalisées avec le Seahorse XFp Analyzer.
3. De moduler le métabolisme des CSM à l'aide d'inhibiteurs de la glycolyse ou de la phosphorylation oxydative et d'étudier leur effet sur leurs propriétés immunosuppressives.
4. D'analyser le réseau mitochondrial de ces mêmes cellules et d'étudier l'état du réseau mitochondrial (fusion ou fission) par des marquages spécifiques des protéines impliquées dans la fusion (mitofusine 1/2 (Mfn 1/2) et fission (dynamine-liée 1 (Drp1) sur les mêmes cellules.
5. De modifier le réseau mitochondrial à l'aide d'inhibiteurs des protéines impliquées dans la fusion et la fission des mitochondries des CSM et d'étudier leur effet sur leurs propriétés immunosuppressives.
6. De réaliser des co-cultures entre les CSM-GW et les lymphocytes T après avoir marqué les mitochondries des CSM-GW et afin d'étudier la contribution du transfert de mitochondries depuis les CSM-GW dans leurs propriétés immunosuppressives.

Enfin, pour mieux comprendre l'impact du contexte de stress oxydant et inflammatoire (que l'on peut retrouver dans la GVHD) sur les propriétés immunosuppressives des CSM-GW, nous pourrions :

- ✓ Répéter les tests fonctionnels (migration et immunosuppression) avec les CSM-GW stimulées par l'H₂O₂ et à l'IFN- γ qui miment le contexte de stress oxydant et inflammatoire, afin de connaître leur contribution de manière séparée.
- ✓ Les mêmes expériences devront être réalisées avec des CSM-GW mais soumises aux stimulations par l'H₂O₂ et à l'IFN- γ simultanément.
- ✓ Évaluer la contribution de tous les facteurs retrouvés dans la GVHD, comme nous l'avons évoqué dans la discussion de la partie 3 et la discussion générale. Pour cela, nous pourrions, stimuler les CSM-GW avec du sérum obtenu à partir de patients atteints de GVHD et voir l'effet sur leurs propriétés fonctionnelles (migration et immunosuppression), étant donné que chez le patient atteint de GVHD, d'autres facteurs peuvent intervenir telles que les cytokines pro- et anti-inflammatoires (Toubai et al., 2012). Ce concept a déjà été utilisé dans le cas de la sclérose systémique et a permis de montrer l'implication du stress oxydant dans la diminution des propriétés immunosuppressives des CSM-GW (Fonteneau et al., 2017).

Tous ces travaux complémentaires, permettraient de mieux comprendre les mécanismes impliqués dans les propriétés immunosuppressives des CSM et de mettre en place des stratégies afin d'augmenter leur efficacité thérapeutique dans le cadre pathologies telles que la GVHD.

Bibliographie

Abdelmohsen, K., and Gorospe, M. (2015). Noncoding RNA control of cellular senescence. *Wiley Interdiscip Rev RNA* 6, 615–629.

Ahangar, P., Mills, S.J., Smith, L.E., Strudwick, X.L., Ting, A.E., Vaes, B., and Cowin, A.J. (2020). Human multipotent adult progenitor cell-conditioned medium improves wound healing through modulating inflammation and angiogenesis in mice. *Stem Cell Res Ther* 11, 299.

Ali, F., Qadir, A.U.R., Nishat, F., and Wajid, N. (2017). The effect of N-acetyl cysteine on H₂O₂ mediated oxidative stress in Wharton's jelly derived mesenchymal stem cells. 137–142.

Almeida, M.I., Silva, A.M., Vasconcelos, D.M., Almeida, C.R., Caires, H., Pinto, M.T., Calin, G.A., Santos, S.G., and Barbosa, M.A. (2016). miR-195 in human primary mesenchymal stromal/stem cells regulates proliferation, osteogenesis and paracrine effect on angiogenesis. *Oncotarget* 7, 7–22.

Al-Nbaheen, M., vishnubalaji, R., Ali, D., Bouslimi, A., Al-Jassir, F., Megges, M., Prigione, A., Adjaye, J., Kassem, M., and Aldahmash, A. (2013). Human Stromal (Mesenchymal) Stem Cells from Bone Marrow, Adipose Tissue and Skin Exhibit Differences in Molecular Phenotype and Differentiation Potential. *Stem Cell Rev* 9, 32–43.

Altaie, A., Owston, H., and Jones, E. (2016). Use of platelet lysate for bone regeneration - are we ready for clinical translation? *World J Stem Cells* 8, 47–55.

Andreeva, E.R., Udartseva, O.O., Zhidkova, O.V., Buravkov, S.V., Ezdakova, M.I., and Buravkova, L.B. (2018). IFN-gamma priming of adipose-derived stromal cells at "physiological" hypoxia. *J. Cell. Physiol.* 233, 1535–1547.

Aomatsu, E., Takahashi, N., Sawada, S., Okubo, N., Hasegawa, T., Taira, M., Miura, H., Ishisaki, A., and Chosa, N. (2014). Novel SCRG1/BST1 axis regulates self-renewal, migration, and osteogenic differentiation potential in mesenchymal stem cells. *Sci Rep* 4.

Armstrong, L., Lako, M., Lincoln, J., Cairns, P.M., and Hole, N. (2000). mTert expression correlates with telomerase activity during the differentiation of murine embryonic stem cells. *Mech. Dev.* 97, 109–116.

Asgharzadeh, A., Alizadeh, S., Keramati, M.R., Soleimani, M., Atashi, A., Edalati, M., Kashani Khatib, Z., Rafiee, M., Barzegar, M., and Razavi, H. (2018). Upregulation of miR-210 promotes differentiation of mesenchymal stem cells (MSCs) into osteoblasts. *Bosn J Basic Med Sci* 18, 328–335.

Astori, G., Amati, E., Bambi, F., Bernardi, M., Chierigato, K., Schäfer, R., Sella, S., and Rodeghiero, F. (2016). Platelet lysate as a substitute for animal serum for the ex-vivo expansion of mesenchymal stem/stromal cells: present and future. *Stem Cell Res Ther* 7, 93.

Atashi, F., Modarressi, A., and Pepper, M.S. (2015). The Role of Reactive Oxygen Species in Mesenchymal Stem Cell Adipogenic and Osteogenic Differentiation: A Review. *Stem Cells Dev* 24, 1150–1163.

Babaei, G., Aziz, S.G.-G., and Jaghi, N.Z.Z. (2021). EMT, cancer stem cells and autophagy; The three main axes of metastasis. *Biomed Pharmacother* 133, 110909.

- Bahat-Stroomza, M., Barhum, Y., Levy, Y., Karpov, O., Bulvik, S., Melamed, E., and Offen, D. (2009). Induction of Adult Human Bone Marrow Mesenchymal Stromal Cells into Functional Astrocyte-Like Cells: Potential for Restorative Treatment in Parkinson's Disease. *Journal of Molecular Neuroscience* 39, 199–210.
- Baker, N., Boyette, L.B., and Tuan, R.S. (2015). Characterization of bone marrow-derived mesenchymal stem cells in aging. *Bone* 70, 37–47.
- Baksh, D., Yao, R., and Tuan, R.S. (2007). Comparison of Proliferative and Multilineage Differentiation Potential of Human Mesenchymal Stem Cells Derived from Umbilical Cord and Bone Marrow. *STEM CELLS* 25, 1384–1392.
- Balasubramanian, S., Venugopal, P., Sundarraj, S., Zakaria, Z., Majumdar, A.S., and Ta, M. (2012). Comparison of chemokine and receptor gene expression between Wharton's jelly and bone marrow-derived mesenchymal stromal cells. *Cytotherapy* 14, 26–33.
- Batsali, A.K., Georgopoulou, A., Mavroudi, I., Matheakakis, A., Pontikoglou, C.G., and Papadaki, H.A. (2020). The Role of Bone Marrow Mesenchymal Stem Cell Derived Extracellular Vesicles (MSC-EVs) in Normal and Abnormal Hematopoiesis and Their Therapeutic Potential. *J Clin Med* 9.
- Baxter, M.A., Wynn, R.F., Jowitt, S.N., Wraith, J.E., Fairbairn, L.J., and Bellantuono, I. (2004). Study of telomere length reveals rapid aging of human marrow stromal cells following in vitro expansion. *Stem Cells* 22, 675–682.
- Becherucci, V., Piccini, L., Casamassima, S., Bisin, S., Gori, V., Gentile, F., Ceccantini, R., De Rienzo, E., Bindi, B., Pavan, P., et al. (2018). Human platelet lysate in mesenchymal stromal cell expansion according to a GMP grade protocol: a cell factory experience. *Stem Cell Res Ther* 9, 124.
- Beillard, E., Pallisgaard, N., van der Velden, V.H.J., Bi, W., Dee, R., van der Schoot, E., Delabesse, E., Macintyre, E., Gottardi, E., Saglio, G., et al. (2003). Evaluation of candidate control genes for diagnosis and residual disease detection in leukemic patients using "real-time" quantitative reverse-transcriptase polymerase chain reaction (RQ-PCR) - a Europe against cancer program. *Leukemia* 17, 2474–2486.
- Belikov, A.V., Schraven, B., and Simeoni, L. (2015). T cells and reactive oxygen species. *J Biomed Sci* 22, 85.
- Beltrami, A.P., Cesselli, D., Bergamin, N., Marcon, P., Rigo, S., Puppato, E., D'Aurizio, F., Verardo, R., Piazza, S., Pignatelli, A., et al. (2007). Multipotent cells can be generated in vitro from several adult human organs (heart, liver, and bone marrow). *Blood* 110, 3438–3446.
- Benameur, L., Charif, N., Li, Y., Stoltz, J.-F., and de Isla, N. (2015). Toward an understanding of mechanism of aging-induced oxidative stress in human mesenchymal stem cells. *Biomed Mater Eng* 25, 41–46.
- Bernardo, M.E., and Fibbe, W.E. (2013). Mesenchymal stromal cells: sensors and switchers of inflammation. *Cell Stem Cell* 13, 392–402.
- Bernardo, M.E., Cometa, A.M., Pagliara, D., Vinti, L., Rossi, F., Cristantielli, R., Palumbo, G., and Locatelli, F. (2011). Ex vivo expansion of mesenchymal stromal cells. *Best Pract Res Clin Haematol* 24, 73–81.

- Binato, R., de Souza Fernandez, T., Lazzarotto-Silva, C., Du Rocher, B., Mencialha, A., Pizzatti, L., Bouzas, L.F., and Abdelhay, E. (2012). Stability of human mesenchymal stem cells during in vitro culture: considerations for cell therapy. *Cell Prolif* 46, 10–22.
- Bing, W., Pang, X., QU, Q., Bai, X., Yang, W., Bi, Y., and Bi, X. (2016). Simvastatin improves the homing of BMSCs via the PI3K/AKT/miR-9 pathway. *J Cell Mol Med* 20, 949–961.
- Blázquez-Prunera, A., Almeida, C.R., and Barbosa, M.A. (2019). Fibroblast growth factor improves the motility of human mesenchymal stem cells expanded in a human plasma-derived xeno-free medium through $\alpha V\beta 3$ integrin. *J Tissue Eng Regen Med* 13, 36–45.
- Boucher, H., and Cras, A. (2018). Médicaments de thérapie innovante : réglementation et applications cliniques. *Revue Francophone des Laboratoires* 2018, 44–51.
- Bréchet C (2002). *Cellules souches: thérapies du futur* (Paris, France: INSERM).
- Brown, J.W.S., Marshall, D.F., and Echeverria, M. (2008). Intronic noncoding RNAs and splicing. *Trends Plant Sci.* 13, 335–342.
- Burnouf, T., Strunk, D., Koh, M.B.C., and Schallmoser, K. (2016). Human platelet lysate: Replacing fetal bovine serum as a gold standard for human cell propagation? *Biomaterials* 76, 371–387.
- Cai, H., Yang, X., Gao, Y., Xu, Z., Yu, B., Xu, T., Li, X., Xu, W., Wang, X., and Hua, L. (2019). Exosomal MicroRNA-9-3p Secreted from BMSCs Downregulates ESM1 to Suppress the Development of Bladder Cancer. *Mol Ther Nucleic Acids* 18, 787–800.
- Calvo-Asensio, I., Dillon, E.T., Lowndes, N.F., and Ceredig, R. (2018). The Transcription Factor Hif-1 Enhances the Radio-Resistance of Mouse MSCs. *Front Physiol* 9.
- Campisi, J. (2005). Aging, tumor suppression and cancer: high wire-act! *Mech. Ageing Dev.* 126, 51–58.
- Capelli, C., Gotti, E., Morigi, M., Rota, C., Weng, L., Dazzi, F., Spinelli, O., Cazzaniga, G., Trezzi, R., Gianatti, A., et al. (2011). Minimally manipulated whole human umbilical cord is a rich source of clinical-grade human mesenchymal stromal cells expanded in human platelet lysate. *Cytotherapy* 13, 786–801.
- Caplan, A.I. (1991). Mesenchymal stem cells. *J. Orthop. Res.* 9, 641–650.
- Carreras-Planella, L., Monguió-Tortajada, M., Borràs, F.E., and Franquesa, M. (2019). Immunomodulatory Effect of MSC on B Cells Is Independent of Secreted Extracellular Vesicles. *Front Immunol* 10, 1288.
- Carrière, A., Galinier, A., Fernandez, Y., Carmona, M.-C., Pénicaud, L., and Casteilla, L. (2006). [Physiological and physiopathological consequences of mitochondrial reactive oxygen species]. *Med Sci (Paris)* 22, 47–53.
- Castro-Manreza, M.E., and Montesinos, J.J. (2015). Immunoregulation by mesenchymal stem cells: biological aspects and clinical applications. *J Immunol Res* 2015, 394917.
- Chakraborty, A., Ramani, P., Sherlin, H.J., Premkumar, P., and Natesan, A. (2014). Antioxidant and pro-oxidant activity of Vitamin C in oral environment. *Indian J Dent Res* 25, 499–504.

- Chan, J.L., Tang, K.C., Patel, A.P., Bonilla, L.M., Pierobon, N., Ponzio, N.M., and Rameshwar, P. (2006). Antigen-presenting property of mesenchymal stem cells occurs during a narrow window at low levels of interferon-gamma. *Blood* 107, 4817–4824.
- Chandel, N.S., McClintock, D.S., Feliciano, C.E., Wood, T.M., Melendez, J.A., Rodriguez, A.M., and Schumacker, P.T. (2000). Reactive oxygen species generated at mitochondrial complex III stabilize hypoxia-inducible factor-1 α during hypoxia: a mechanism of O₂ sensing. *J Biol Chem* 275, 25130–25138.
- Charbord, P., and Casteilla, L. (2011). La biologie des cellules souches mésenchymateuses d'origine humaine. *Médecine/Sciences* 27, 261–267.
- Charif, N., Li, Y.Y., Targa, L., Zhang, L., Ye, J.S., Li, Y.P., Stoltz, J.F., Han, H.Z., and de Isla, N. (2017). Aging of bone marrow mesenchymal stromal/stem cells: Implications on autologous regenerative medicine. *Biomed Mater Eng* 28, S57–S63.
- Charif, N., Yueying, L., Targa, L., ZHANG, L., Li, Y., Mainard, D., Stoltz, J.-F., and De Isla, N. (2019). Higher Proliferative Potential of Human Mesenchymal Stromal Cells from Wharton's Jelly Compared to Bone Marrow Is Linked to Decreased Senescence. In *Ios Press Ebooks, (China: Stem Cells and Regenerative Medicine)*, pp. 6–14.
- Cho, K.-A., Lee, J.-K., Kim, Y.-H., Park, M., Woo, S.-Y., and Ryu, K.-H. (2017). Mesenchymal stem cells ameliorate B-cell-mediated immune responses and increase IL-10-expressing regulatory B cells in an EB13-dependent manner. *Cell Mol Immunol*.
- Choo, K.B., Tai, L., Hymavathe, K.S., Wong, C.Y., Nguyen, P.N.N., Huang, C.-J., Cheong, S.K., and Kamarul, T. (2014). Oxidative stress-induced premature senescence in Wharton's jelly-derived mesenchymal stem cells. *Int J Med Sci* 11, 1201–1207.
- Chotinantakul, K., and Leeanansaksiri, W. (2012). Hematopoietic Stem Cell Development, Niches, and Signaling Pathways. *Bone Marrow Res* 2012.
- Clark, D.A. (2005). Tolerance signaling molecules. *Chem Immunol Allergy* 89, 36–48.
- Contreras-Lopez, R., Elizondo-Vega, R., Paredes, M.J., Luque-Campos, N., Torres, M.J., Tejedor, G., Vega-Letter, A.M., Figueroa-Valdés, A., Pradenas, C., Oyarce, K., et al. (2020). HIF1 α -dependent metabolic reprogramming governs mesenchymal stem/stromal cell immunoregulatory functions. *FASEB J* 34, 8250–8264.
- Coppé, J.-P., Desprez, P.-Y., Krtolica, A., and Campisi, J. (2010). The senescence-associated secretory phenotype: the dark side of tumor suppression. *Annu Rev Pathol* 5, 99–118.
- Costa, L.A., Eiro, N., Fraile, M., Gonzalez, L.O., Saá, J., Garcia-Portabella, P., Vega, B., Schneider, J., and Vizoso, F.J. (2020). Functional heterogeneity of mesenchymal stem cells from natural niches to culture conditions: implications for further clinical uses. *Cell Mol Life Sci* 1–21.
- Costa, V., Raimondi, L., Conigliaro, A., Salamanna, F., Carina, V., De Luca, A., Bellavia, D., Alessandro, R., Fini, M., and Giavaresi, G. (2017). Hypoxia-inducible factor 1A may regulate the commitment of mesenchymal stromal cells toward angio-osteogenesis by mirna-675-5P. *Cytotherapy* 19, 1412–1425.
- Cournil-Henrionnet, C., Huselstein, C., Wang, Y., Galois, L., Mainard, D., Decot, V., Netter, P., Stoltz, J.-F., Muller, S., Gillet, P., et al. (2008). Phenotypic analysis of cell surface markers and gene expression

of human mesenchymal stem cells and chondrocytes during monolayer expansion. *Biorheology* 45, 513–526.

Court, A.C., Le-Gatt, A., Luz-Crawford, P., Parra, E., Aliaga-Tobar, V., Bátiz, L.F., Contreras, R.A., Ortúzar, M.I., Kurte, M., Elizondo-Vega, R., et al. (2020). Mitochondrial transfer from MSCs to T cells induces Treg differentiation and restricts inflammatory response. *EMBO Rep* 21, e48052.

Coutu, D.L., François, M., and Galipeau, J. (2011). Inhibition of cellular senescence by developmentally regulated FGF receptors in mesenchymal stem cells. *Blood* 117, 6801–6812.

Crespo-Diaz, R., Behfar, A., Butler, G.W., Padley, D.J., Sarr, M.G., Bartunek, J., Dietz, A.B., and Terzic, A. (2011). Platelet lysate consisting of a natural repair proteome supports human mesenchymal stem cell proliferation and chromosomal stability. *Cell Transplant* 20, 797–811.

Curtin, J.F., Donovan, M., and Cotter, T.G. (2002). Regulation and measurement of oxidative stress in apoptosis. *J. Immunol. Methods* 265, 49–72.

Cyranoski, D. (2014a). Next-generation stem cells cleared for human trial. *Nature*.

Cyranoski, D. (2014b). Japanese woman is first recipient of next-generation stem cells. *Nature*.

Cyranoski, D. (2018). “Reprogrammed” stem cells approved to mend human hearts for the first time. *Nature* 557, 619–620.

Dazzi, F., Ramasamy, R., Glennie, S., Jones, S.P., and Roberts, I. (2006). The role of mesenchymal stem cells in haemopoiesis. *Blood Rev.* 20, 161–171.

De Barros, S., Dehez, S., Arnaud, E., Barreau, C., Cazavet, A., Perez, G., Galinier, A., Casteilla, L., and Planat-Bénard, V. (2013). Aging-related decrease of human ASC angiogenic potential is reversed by hypoxia preconditioning through ROS production. *Mol Ther* 21, 399–408.

Debacq-Chainiaux, F., Erusalimsky, J.D., Campisi, J., and Toussaint, O. (2009). Protocols to detect senescence-associated beta-galactosidase (SA-beta-gal) activity, a biomarker of senescent cells in culture and in vivo. *Nat Protoc* 4, 1798–1806.

Delaloy, C., Liu, L., Lee, J.-A., Su, H., Shen, F., Yang, G.-Y., Young, W.L., Ivey, K.N., and Gao, F.-B. (2010). MicroRNA-9 coordinates proliferation and migration of human embryonic stem cell-derived neural progenitors. *Cell Stem Cell* 6, 323–335.

Denu, R.A., and Hematti, P. (2016). Effects of Oxidative Stress on Mesenchymal Stem Cell Biology. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* 2016, 1–9.

Denu, R.A., and Hematti, P. (2021). Optimization of oxidative stress for mesenchymal stromal/stem cell engraftment, function and longevity. *Free Radic Biol Med* 167, 193–200.

Derrien, T., Johnson, R., Bussotti, G., Tanzer, A., Djebali, S., Tilgner, H., Guernec, G., Martin, D., Merkel, A., Knowles, D.G., et al. (2012). The GENCODE v7 catalog of human long noncoding RNAs: analysis of their gene structure, evolution, and expression. *Genome Res.* 22, 1775–1789.

Desantis, S., Accogli, G., Crovace, A., Francioso, E.G., and Crovace, A.M. (2018). Surface glycan pattern of canine, equine, and ovine bone marrow-derived mesenchymal stem cells. *Cytometry A* 93, 73–81.

- Deschaseaux, F., Sensébé, L., and Heymann, D. (2009). Mechanisms of bone repair and regeneration. *Trends Mol Med* 15, 417–429.
- Diederichs, S., Gabler, J., Autenrieth, J., Kynast, K.L., Merle, C., Walles, H., Utikal, J., and Richter, W. (2016). Differential Regulation of SOX9 Protein During Chondrogenesis of Induced Pluripotent Stem Cells Versus Mesenchymal Stromal Cells: A Shortcoming for Cartilage Formation. *Stem Cells and Development* 25, 598–609.
- DiGirolamo, C.M., Stokes, D., Colter, D., Phinney, D.G., Class, R., and Prockop, D.J. (1999). Propagation and senescence of human marrow stromal cells in culture: a simple colony-forming assay identifies samples with the greatest potential to propagate and differentiate. *British Journal of Haematology* 107, 275–281.
- Dimeloe, S., Burgener, A.-V., Grähler, J., and Hess, C. (2017). T-cell metabolism governing activation, proliferation and differentiation; a modular view. *Immunology* 150, 35–44.
- Dimri, G.P., Lee, X., Basile, G., Acosta, M., Scott, G., Roskelley, C., Medrano, E.E., Linskens, M., Rubelj, I., and Pereira-Smith, O. (1995). A biomarker that identifies senescent human cells in culture and in aging skin in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 92, 9363–9367.
- Dominici, M., Le Blanc, K., Mueller, I., Slaper-Cortenbach, I., Marini, F.C., Krause, D.S., Deans, R.J., Keating, A., Prockop, D.J., and Horwitz, E.M. (2006). Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy* 8, 315–317.
- Doucet, C., Ernou, I., Zhang, Y., Llense, J.-R., Begot, L., Holy, X., and Lataillade, J.-J. (2005). Platelet lysates promote mesenchymal stem cell expansion: a safety substitute for animal serum in cell-based therapy applications. *J. Cell. Physiol.* 205, 228–236.
- El Omar, R., Beroud, J., Stoltz, J.-F., Menu, P., Velot, E., and Decot, V. (2014). Umbilical cord mesenchymal stem cells: the new gold standard for mesenchymal stem cell-based therapies? *Tissue Eng Part B Rev* 20, 523–544.
- Escors, D., Liechtenstein, T., Perez-Janices, N., Schwarze, J., Dufait, I., Goyvaerts, C., Lanna, A., Arce, F., Blanco-Luquin, I., Kochan, G., et al. (2013). Assessing T-cell responses in anticancer immunotherapy: Dendritic cells or myeloid-derived suppressor cells? *Oncoimmunology* 2, e26148.
- Fazzina, R., Iudicone, P., Fioravanti, D., Bonanno, G., Totta, P., Zizzari, I.G., and Pierelli, L. (2016). Potency testing of mesenchymal stromal cell growth expanded in human platelet lysate from different human tissues. *Stem Cell Res Ther* 7, 122.
- Fekete, N., Gadelorge, M., Fürst, D., Maurer, C., Dausend, J., Fleury-Cappellesso, S., Mailänder, V., Lotfi, R., Ignatius, A., Sensebé, L., et al. (2012a). Platelet lysate from whole blood-derived pooled platelet concentrates and apheresis-derived platelet concentrates for the isolation and expansion of human bone marrow mesenchymal stromal cells: production process, content and identification of active components. *Cytotherapy* 14, 540–554.
- Fekete, N., Rojewski, M.T., Fürst, D., Kreja, L., Ignatius, A., Dausend, J., and Schrezenmeier, H. (2012b). GMP-compliant isolation and large-scale expansion of bone marrow-derived MSC. *PLoS ONE* 7, e43255.
- Felipe de Sousa E Melo, Vermeulen, L., Medema, J.P., and Guessous, I. (2011). Cellules souches cancéreuses et futures modalités thérapeutiques du cancer. *Rev Med Suisse* 7, 774–777.

- Fernandez-Rebollo, E., Mentrup, B., Ebert, R., Franzen, J., Abagnale, G., Sieben, T., Ostrowska, A., Hoffmann, P., Roux, P.-F., Rath, B., et al. (2017). Human Platelet Lysate versus Fetal Calf Serum: These Supplements Do Not Select for Different Mesenchymal Stromal Cells. *Sci Rep* 7, 5132.
- Fernandez-Rebollo, E., Franzen, J., Goetzke, R., Hollmann, J., Ostrowska, A., Oliverio, M., Sieben, T., Rath, B., Kornfeld, J.-W., and Wagner, W. (2020). Senescence-Associated Metabolomic Phenotype in Primary and iPSC-Derived Mesenchymal Stromal Cells. *Stem Cell Reports* 14, 201–209.
- Filipowicz, W., Bhattacharyya, S.N., and Sonenberg, N. (2008). Mechanisms of post-transcriptional regulation by microRNAs: are the answers in sight? *Nat. Rev. Genet.* 9, 102–114.
- Fonteneau, G., Bony, C., Goulabchand, R., Maria, A.T.J., Le Quellec, A., Rivière, S., Jorgensen, C., Guilpain, P., and Noël, D. (2017). Serum-Mediated Oxidative Stress from Systemic Sclerosis Patients Affects Mesenchymal Stem Cell Function. *Front Immunol* 8, 988.
- Franchina, D.G., Dostert, C., and Brenner, D. (2018). Reactive Oxygen Species: Involvement in T Cell Signaling and Metabolism. *Trends Immunol* 39, 489–502.
- Friedenstein, A.J., Gorskaja, J.F., and Kulagina, N.N. (1976). Fibroblast precursors in normal and irradiated mouse hematopoietic organs. *Exp. Hematol.* 4, 267–274.
- Friedenstein, A.J., Chailakhyan, R.K., and Gerasimov, U.V. (1987). Bone marrow osteogenic stem cells: in vitro cultivation and transplantation in diffusion chambers. *Cell Tissue Kinet* 20, 263–272.
- Geißler, S., Textor, M., Kühnisch, J., Könnig, D., Klein, O., Ode, A., Pfitzner, T., Adjaye, J., Kasper, G., and Duda, G.N. (2012). Functional Comparison of Chronological and In Vitro Aging: Differential Role of the Cytoskeleton and Mitochondria in Mesenchymal Stromal Cells. *PLoS One* 7.
- George, J.H.S. (2009). *Engineering of Fibrous Scaffolds for use in Regenerative Medicine*. 200.
- Gharibi, B., and Hughes, F.J. (2012). Effects of medium supplements on proliferation, differentiation potential, and in vitro expansion of mesenchymal stem cells. *Stem Cells Transl Med* 1, 771–782.
- Griffiths, S., Baraniak, P.R., Copland, I.B., Nerem, R.M., and McDevitt, T.C. (2013). Human platelet lysate stimulates high-passage and senescent human multipotent mesenchymal stromal cell growth and rejuvenation in vitro. *Cytotherapy* 15, 1469–1483.
- Gu, Y., Xue, Q., Chen, Y., Yu, G.-H., Qing, M., Shen, Y., Wang, M., Shi, Q., and Zhang, X.-G. (2013). Different roles of PD-L1 and FasL in immunomodulation mediated by human placenta-derived mesenchymal stem cells. *Hum. Immunol.* 74, 267–276.
- Guzy, R.D., and Schumacker, P.T. (2006). Oxygen sensing by mitochondria at complex III: the paradox of increased reactive oxygen species during hypoxia. *Exp. Physiol.* 91, 807–819.
- Halliwell, B. (2007). Oxidative stress and cancer: have we moved forward? *Biochem. J.* 401, 1–11.
- Halliwell, B. (2014). Cell culture, oxidative stress, and antioxidants: avoiding pitfalls. *Biomed J* 37, 99–105.
- Haque, N., Rahman, M.T., Abu Kasim, N.H., and Alabsi, A.M. (2013). Hypoxic culture conditions as a solution for mesenchymal stem cell based regenerative therapy. *ScientificWorldJournal* 2013, 632972.

- Hayflick, L. (1965). THE LIMITED IN VITRO LIFETIME OF HUMAN DIPLOID CELL STRAINS. *Exp. Cell Res.* 37, 614–636.
- He, X., Jiang, W., Luo, Z., Qu, T., Wang, Z., Liu, N., Zhang, Y., Cooper, P.R., and He, W. (2017). IFN- γ regulates human dental pulp stem cells behavior via NF- κ B and MAPK signaling. *Sci Rep* 7, 40681.
- Hemeda, H., Kalz, J., Walenda, G., Lohmann, M., and Wagner, W. (2013). Heparin concentration is critical for cell culture with human platelet lysate. *Cytotherapy* 15, 1174–1181.
- Hemeda, H., Giebel, B., and Wagner, W. (2014). Evaluation of human platelet lysate versus fetal bovine serum for culture of mesenchymal stromal cells. *Cytotherapy* 16, 170–180.
- Heo, J.-Y., Jing, K., Song, K.-S., Seo, K.-S., Park, J.-H., Kim, J.-S., Jung, Y.-J., Hur, G.-M., Jo, D.-Y., Kweon, G.-R., et al. (2009). Downregulation of APE1/Ref-1 is involved in the senescence of mesenchymal stem cells. *Stem Cells* 27, 1455–1462.
- Horwitz, E.M., Le Blanc, K., Dominici, M., Mueller, I., Slaper-Cortenbach, I., Marini, F.C., Deans, R.J., Krause, D.S., Keating, A., and International Society for Cellular Therapy (2005). Clarification of the nomenclature for MSC: The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy* 7, 393–395.
- Hsieh, J.-Y., Huang, T.-S., Cheng, S.-M., Lin, W.-S., Tsai, T.-N., Lee, O.K., and Wang, H.-W. (2013). miR-146a-5p circuitry uncouples cell proliferation and migration, but not differentiation, in human mesenchymal stem cells. *Nucleic Acids Res.* 41, 9753–9763.
- Hu, C., and Li, L. (2018). Preconditioning influences mesenchymal stem cell properties in vitro and in vivo. *J Cell Mol Med* 22, 1428–1442.
- Hu, C., Zhao, L., Peng, C., and Li, L. (2018). Regulation of the mitochondrial reactive oxygen species: Strategies to control mesenchymal stem cell fates ex vivo and in vivo. *J Cell Mol Med* 22, 5196–5207.
- Hung, S.-C., Pochampally, R.R., Hsu, S.-C., Sanchez, C., Chen, S.-C., Spees, J., and Prockop, D.J. (2007). Short-Term Exposure of Multipotent Stromal Cells to Low Oxygen Increases Their Expression of CX3CR1 and CXCR4 and Their Engraftment In Vivo. *PLoS One* 2.
- Jackson, M.V., Morrison, T.J., Doherty, D.F., McAuley, D.F., Matthay, M.A., Kissenpfennig, A., O’Kane, C.M., and Krasnodembskaya, A.D. (2016). Mitochondrial Transfer via Tunneling Nanotubes is an Important Mechanism by Which Mesenchymal Stem Cells Enhance Macrophage Phagocytosis in the In Vitro and In Vivo Models of ARDS. *Stem Cells* 34, 2210–2223.
- Jacobs, S.R., Herman, C.E., Maciver, N.J., Wofford, J.A., Wieman, H.L., Hammen, J.J., and Rathmell, J.C. (2008). Glucose uptake is limiting in T cell activation and requires CD28-mediated Akt-dependent and independent pathways. *J Immunol* 180, 4476–4486.
- Jacques Poirier, Martin Catala, Jean-Michel André, Romain Gherardi, and Jean-François Bernaudin (2011). *Histologie, Les tissus* (Elsevier-Masson).
- Jardin, F., Ruminy, P., and Penther, D. (2008). MicroRNA and haematology. *Hématologie* 14, 117–128.
- Jeong, S.-G., and Cho, G.-W. (2015). Endogenous ROS levels are increased in replicative senescence in human bone marrow mesenchymal stromal cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 460, 971–976.

- Jiang, C.M., Liu, J., Zhao, J.Y., Xiao, L., An, S., Gou, Y.C., Quan, H.X., Cheng, Q., Zhang, Y.L., He, W., et al. (2015). Effects of hypoxia on the immunomodulatory properties of human gingiva-derived mesenchymal stem cells. *J. Dent. Res.* *94*, 69–77.
- Juárez-Navarro, K.J., Padilla-Camberos, E., Díaz, N.F., Miranda-Altamirano, A., and Díaz-Martínez, N.E. (2020). Human Mesenchymal Stem Cells: The Present Alternative for High-Incidence Diseases, Even SARS-Cov-2. *Stem Cells Int* *2020*.
- Juhl, M., Tratwal, J., Follin, B., Søndergaard, R.H., Kirchhoff, M., Ekblond, A., Kastrup, J., and Haack-Sørensen, M. (2016). Comparison of clinical grade human platelet lysates for cultivation of mesenchymal stromal cells from bone marrow and adipose tissue. *Scand. J. Clin. Lab. Invest.* *76*, 93–104.
- Kadle, R.L., Abdou, S.A., Villarreal-Ponce, A.P., Soares, M.A., Sultan, D.L., David, J.A., Massie, J., Rifkin, W.J., Rabbani, P., and Ceradini, D.J. (2018). Microenvironmental cues enhance mesenchymal stem cell-mediated immunomodulation and regulatory T-cell expansion. *PLoS ONE* *13*, e0193178.
- Kandoi, S., L, P.K., Patra, B., Vidyasekar, P., Sivanesan, D., S, V., K, R., and Verma, R.S. (2018). Evaluation of platelet lysate as a substitute for FBS in explant and enzymatic isolation methods of human umbilical cord MSCs. *Sci Rep* *8*, 12439.
- Keniry, A., Oxley, D., Monnier, P., Kyba, M., Dandolo, L., Smits, G., and Reik, W. (2012). The H19 lincRNA is a developmental reservoir of miR-675 that suppresses growth and *Igf1r*. *Nat. Cell Biol.* *14*, 659–665.
- Khan, R.S., and Newsome, P.N. (2019). A Comparison of Phenotypic and Functional Properties of Mesenchymal Stromal Cells and Multipotent Adult Progenitor Cells. *Front Immunol* *10*, 1952.
- Khosravi, M., Karimi, M.H., Hossein Aghdaie, M., Kalani, M., Naserian, S., and Bidmeshkipour, A. (2017). Mesenchymal stem cells can induce regulatory T cells via modulating miR-126a but not miR-10a. *Gene* *627*, 327–336.
- Kim, B.S., Jung, J.S., Jang, J.H., Kang, K.S., and Kang, S.K. (2011). Nuclear Argonaute 2 regulates adipose tissue-derived stem cell survival through direct control of miR10b and selenoprotein N1 expression. *Aging Cell* *10*, 277–291.
- Kim, D.S., Jang, I.K., Lee, M.W., Ko, Y.J., Lee, D.-H., Lee, J.W., Sung, K.W., Koo, H.H., and Yoo, K.H. (2018). Enhanced Immunosuppressive Properties of Human Mesenchymal Stem Cells Primed by Interferon- γ . *EBioMedicine* *28*, 261–273.
- Kim, J.H., Song, S.-Y., Park, S.G., Song, S.U., Xia, Y., and Sung, J.-H. (2012). Primary involvement of NADPH oxidase 4 in hypoxia-induced generation of reactive oxygen species in adipose-derived stem cells. *Stem Cells Dev* *21*, 2212–2221.
- Kim, J.H., Kim, S.-H., Song, S.Y., Kim, W.-S., Song, S.U., Yi, T., Jeon, M.-S., Chung, H.-M., Xia, Y., and Sung, J.-H. (2014). Hypoxia induces adipocyte differentiation of adipose-derived stem cells by triggering reactive oxygen species generation. *Cell Biol Int* *38*, 32–40.
- Kinzebach, S., Dietz, L., Klüter, H., Thierse, H.-J., and Bieback, K. (2013). Functional and differential proteomic analyses to identify platelet derived factors affecting ex vivo expansion of mesenchymal stromal cells. *BMC Cell Biol* *14*, 48.
- Kolf, C.M., Cho, E., and Tuan, R.S. (2007). Mesenchymal stromal cells. Biology of adult mesenchymal stem cells: regulation of niche, self-renewal and differentiation. *Arthritis Res Ther* *9*, 204.

- Korge, P., Ping, P., and Weiss, J.N. (2008). Reactive Oxygen Species Production in Energized Cardiac Mitochondria During Hypoxia/Reoxygenation: Modulation by Nitric Oxide. *Circ Res* 103, 873–880.
- Krampera, M., Galipeau, J., Shi, Y., Tarte, K., Sensebe, L., and MSC Committee of the International Society for Cellular Therapy (ISCT) (2013). Immunological characterization of multipotent mesenchymal stromal cells--The International Society for Cellular Therapy (ISCT) working proposal. *Cytotherapy* 15, 1054–1061.
- Laner-Plamberger, S., Lener, T., Schmid, D., Streif, D.A., Salzer, T., Öller, M., Hauser-Kronberger, C., Fischer, T., Jacobs, V.R., Schallmoser, K., et al. (2015). Mechanical fibrinogen-depletion supports heparin-free mesenchymal stem cell propagation in human platelet lysate. *J Transl Med* 13, 354.
- Larghero, J., Vija, L., Lecourt, S., Michel, L., Verrecchia, F., and Farge, D. (2009). [Mesenchymal stem cells and immunomodulation: toward new immunosuppressive strategies for the treatment of autoimmune diseases?]. *Rev Med Interne* 30, 287–299.
- Larochette, N., El-Hafci, H., Potier, E., Setterblad, N., Bensidhoum, M., Petite, H., and Logeart-Avramoglou, D. (2020). Osteogenic-differentiated mesenchymal stem cell-secreted extracellular matrix as a bone morphogenetic protein-2 delivery system for ectopic bone formation. *Acta Biomater* 116, 186–200.
- Laroye, C., Gauthier, M., Antonot, H., Decot, V., Reppel, L., and Bensoussan, D. (2019). Mesenchymal Stem/Stromal Cell Production Compliant with Good Manufacturing Practice: Comparison between Bone Marrow, the Gold Standard Adult Source, and Wharton's Jelly, an Extraembryonic Source. *J Clin Med* 8.
- Laroye, C., Gibot, S., Huselstein, C., and Bensoussan, D. (2020). Mesenchymal stromal cells for sepsis and septic shock: Lessons for treatment of COVID-19. *STEM CELLS Translational Medicine* 9, 1488–1494.
- Lataillade, J.-J., Brunet de la Grange, P., Uzan, G., and Le Bousse-Kerdilès, M.-C. (2010). Les cellules souches ont-elles l'âge de leur niche ? *Médecine/Sciences* 26, 582–585.
- Laurentieva, A., Majore, I., Kasper, C., and Hass, R. (2010). Effects of hypoxic culture conditions on umbilical cord-derived human mesenchymal stem cells. *Cell Commun Signal* 8, 18.
- Lee, S., Yun, I., Ham, O., Lee, S.-Y., Lee, C.Y., Park, J.-H., Lee, J., Seo, H.-H., Choi, E., and Hwang, K.-C. (2015). Suppression of miR-181a attenuates H₂O₂-induced death of mesenchymal stem cells by maintaining hexokinase II expression. *Biol. Res.* 48, 45.
- Li, Y. (2015). Vieillissement des cellules stromales mésenchymateuses de la moelle osseuse : implications en médecine régénérative. Université de Lorraine.
- Li, B., Li, C., Zhu, M., Zhang, Y., Du, J., Xu, Y., Liu, B., Gao, F., Liu, H., Cai, J., et al. (2017a). Hypoxia-Induced Mesenchymal Stromal Cells Exhibit an Enhanced Therapeutic Effect on Radiation-Induced Lung Injury in Mice due to an Increased Proliferation Potential and Enhanced Antioxidant Ability. *Cell. Physiol. Biochem.* 44, 1295–1310.
- Li, C.-J., Sun, L.-Y., and Pang, C.-Y. (2015). Synergistic Protection of N-Acetylcysteine and Ascorbic Acid 2-Phosphate on Human Mesenchymal Stem cells Against Mitoptosis, Necroptosis and Apoptosis. *Sci Rep* 5.

- Li, C.-J., Chen, P.-K., Sun, L.-Y., and Pang, C.-Y. (2017b). Enhancement of Mitochondrial Transfer by Antioxidants in Human Mesenchymal Stem Cells. *Oxid Med Cell Longev* 2017.
- Li, X., He, L., Yue, Q., Lu, J., Kang, N., Xu, X., Wang, H., and Zhang, H. (2017c). MiR-9-5p promotes MSC migration by activating β -catenin signaling pathway. *Am. J. Physiol., Cell Physiol.* 313, C80–C93.
- Li, Y., Charif, N., Mainard, D., Bensoussan, D., Stoltz, J.-F., and de Isla, N. (2014). Donor's age dependent proliferation decrease of human bone marrow mesenchymal stem cells is linked to diminished clonogenicity. *Biomed Mater Eng* 24, 47–52.
- Li, Y., Wu, Q., Wang, Y., Li, L., Bu, H., and Bao, J. (2017d). Senescence of mesenchymal stem cells (Review). *Int. J. Mol. Med.* 39, 775–782.
- Lin, N., Lin, J., Bo, L., Weidong, P., Chen, S., and Xu, R. (2010). Differentiation of bone marrow-derived mesenchymal stem cells into hepatocyte-like cells in an alginate scaffold. *Cell Prolif.* 43, 427–434.
- Liu, D., Gao, Y., Liu, J., Huang, Y., Yin, J., Feng, Y., Shi, L., Meloni, B.P., Zhang, C., Zheng, M., et al. (2021). Intercellular mitochondrial transfer as a means of tissue revitalization. *Signal Transduct Target Ther* 6, 65.
- Liu, G., Jiang, X., Zhu, X., He, W., Kuang, Y., Ren, K., Lin, Y., and Gou, X. (2015a). ROS activates JNK-mediated autophagy to counteract apoptosis in mouse mesenchymal stem cells in vitro. *Acta Pharmacol Sin* 36, 1473–1479.
- Liu, J., Hao, H., Huang, H., Tong, C., Ti, D., Dong, L., Chen, D., Zhao, Y., Liu, H., Han, W., et al. (2015b). Hypoxia regulates the therapeutic potential of mesenchymal stem cells through enhanced autophagy. *Int J Low Extrem Wounds* 14, 63–72.
- Liu, X., Xu, H., Kou, J., Wang, Q., Zheng, X., and Yu, T. (2016). MiR-9 promotes osteoblast differentiation of mesenchymal stem cells by inhibiting DKK1 gene expression. *Mol. Biol. Rep.* 43, 939–946.
- Liu, Y., Yuan, X., Muñoz, N., Logan, T.M., and Ma, T. (2019). Commitment to Aerobic Glycolysis Sustains Immunosuppression of Human Mesenchymal Stem Cells. *Stem Cells Transl Med* 8, 93–106.
- Liu, Z., Ren, Z., Zhang, J., Chuang, C.-C., Kandaswamy, E., Zhou, T., and Zuo, L. (2018). Role of ROS and Nutritional Antioxidants in Human Diseases. *Front Physiol* 9, 477.
- Lohmann, M., Walenda, G., Hemedda, H., Jousen, S., Drescher, W., Jockenhoevel, S., Hutschenreuter, G., Zenke, M., and Wagner, W. (2012). Donor age of human platelet lysate affects proliferation and differentiation of mesenchymal stem cells. *PLoS ONE* 7, e37839.
- Luo, H., Gao, H., Liu, F., and Qiu, B. (2017). Regulation of Runx2 by microRNA-9 and microRNA-10 modulates the osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells. *Int. J. Mol. Med.* 39, 1046–1052.
- Luz-Crawford, P., Hernandez, J., Djouad, F., Luque-Campos, N., Caicedo, A., Carrère-Kremer, S., Brondello, J.-M., Vignais, M.-L., Pène, J., and Jorgensen, C. (2019). Mesenchymal stem cell repression of Th17 cells is triggered by mitochondrial transfer. *Stem Cell Res Ther* 10, 232.
- Lv, F.-J., Tuan, R.S., Cheung, K.M.C., and Leung, V.Y.L. (2014). Concise review: the surface markers and identity of human mesenchymal stem cells. *Stem Cells* 32, 1408–1419.
- Ma, O.K.-F., and Chan, K.H. (2016). Immunomodulation by mesenchymal stem cells: Interplay between mesenchymal stem cells and regulatory lymphocytes. *World J Stem Cells* 8, 268–278.

- Mantovani, G., and Madeddu, C. (2006). Oxidative Stress and Cancer Cachexia. In *Oxidative Stress, Disease and Cancer*, (IMPERIAL COLLEGE PRESS), pp. 733–759.
- Martinez, V.G., Ontoria-Oviedo, I., Ricardo, C.P., Harding, S.E., Sacedon, R., Varas, A., Zapata, A., Sepulveda, P., and Vicente, A. (2017). Overexpression of hypoxia-inducible factor 1 alpha improves immunomodulation by dental mesenchymal stem cells. *Stem Cell Res Ther* 8, 208.
- Melnik, S., Gabler, J., Dreher, S.I., Hecht, N., Hofmann, N., Großner, T., and Richter, W. (2020). MiR-218 affects hypertrophic differentiation of human mesenchymal stromal cells during chondrogenesis via targeting RUNX2, MEF2C, and COL10A1. *Stem Cell Res Ther* 11, 532.
- Ménard, C., and Tarte, K. (2011). [Immunosuppression and mesenchymal stem cells: back to the future]. *Med Sci (Paris)* 27, 269–274.
- Menasché, P., Vanneau, V., Hagège, A., Bel, A., Cholley, B., Cacciapuoti, I., Parouchev, A., Benhamouda, N., Tachdjian, G., Tosca, L., et al. (2015). Human embryonic stem cell-derived cardiac progenitors for severe heart failure treatment: first clinical case report. *Eur Heart J* 36, 2011–2017.
- Menasché, P., Vanneau, V., Hagège, A., Bel, A., Cholley, B., Parouchev, A., Cacciapuoti, I., Al-Daccak, R., Benhamouda, N., Blons, H., et al. (2018). Transplantation of Human Embryonic Stem Cell-Derived Cardiovascular Progenitors for Severe Ischemic Left Ventricular Dysfunction. *J Am Coll Cardiol* 71, 429–438.
- Mihaylova, Z., Tsikandelova, R., Sanimirov, P., Gateva, N., Mitev, V., and Ishkitiev, N. (2018). Role of PDGF-BB in proliferation, differentiation and maintaining stem cell properties of PDL cells in vitro. *Arch. Oral Biol.* 85, 1–9.
- Mohammadipour, A., Dumbali, S.P., and Wenzel, P.L. (2020). Mitochondrial Transfer and Regulators of Mesenchymal Stromal Cell Function and Therapeutic Efficacy. *Front Cell Dev Biol* 8, 603292.
- Mohyeldin, A., Garzón-Muvdi, T., and Quiñones-Hinojosa, A. (2010). Oxygen in stem cell biology: a critical component of the stem cell niche. *Cell Stem Cell* 7, 150–161.
- Moisley, K.M., El-Jawhari, J.J., Owston, H., Tronci, G., Russell, S.J., Jones, E.A., and Giannoudis, P.V. (2019). Optimising proliferation and migration of mesenchymal stem cells using platelet products: A rational approach to bone regeneration. *J Orthop Res* 37, 1329–1338.
- Mougiakakos, D., Johansson, C.C., and Kiessling, R. (2009). Naturally occurring regulatory T cells show reduced sensitivity toward oxidative stress-induced cell death. *Blood* 113, 3542–3545.
- Moulin, D., Salone, V., Koufany, M., Clément, T., Behm-Ansmant, I., Branlant, C., Charpentier, B., and Jouzeau, J.-Y. (2017). MicroRNA-29b Contributes to Collagens Imbalance in Human Osteoarthritic and Dedifferentiated Articular Chondrocytes. *Biomed Res Int* 2017.
- Na, T., Liu, J., Zhang, K., Ding, M., and Yuan, B.-Z. (2015). The notch signaling regulates CD105 expression, osteogenic differentiation and immunomodulation of human umbilical cord mesenchymal stem cells. *PLoS One* 10, e0118168.
- Najar, M., Raicevic, G., Boufker, H.I., Fayyad Kazan, H., De Bruyn, C., Meuleman, N., Bron, D., Toungouz, M., and Lagneaux, L. (2010). Mesenchymal stromal cells use PGE2 to modulate activation and proliferation of lymphocyte subsets: Combined comparison of adipose tissue, Wharton’s Jelly and bone marrow sources. *Cell. Immunol.* 264, 171–179.

- Najar, M., Raicevic, G., Jebbawi, F., De Bruyn, C., Meuleman, N., Bron, D., Toungouz, M., and Lagneaux, L. (2012). Characterization and functionality of the CD200-CD200R system during mesenchymal stromal cell interactions with T-lymphocytes. *Immunol Lett* *146*, 50–56.
- Naskou, M.C., Sumner, S.M., Chocallo, A., Kemelmakher, H., Thoresen, M., Copland, I., Galipeau, J., and Peroni, J.F. (2018). Platelet lysate as a novel serum-free media supplement for the culture of equine bone marrow-derived mesenchymal stem cells. *Stem Cell Res Ther* *9*, 75.
- Nassereddine, S., Rafei, H., Elbahesh, E., and Tabbara, I. (2017). Acute Graft Versus Host Disease: A Comprehensive Review. *Anticancer Res* *37*, 1547–1555.
- Nathan, C., and Cunningham-Bussel, A. (2013). Beyond oxidative stress: an immunologist's guide to reactive oxygen species. *Nat Rev Immunol* *13*, 349–361.
- Nathan, C., and Ding, A. (2010). SnapShot: Reactive Oxygen Intermediates (ROI). *Cell* *140*, 951-951.e2.
- Nauta, A.J., Kruisselbrink, A.B., Lurvink, E., Willemze, R., and Fibbe, W.E. (2006). Mesenchymal stem cells inhibit generation and function of both CD34+-derived and monocyte-derived dendritic cells. *J Immunol* *177*, 2080–2087.
- Nitzsche, F., Müller, C., Lukomska, B., Jolkkonen, J., Deten, A., and Boltze, J. (2017). Concise Review: MSC Adhesion Cascade-Insights into Homing and Transendothelial Migration. *Stem Cells* *35*, 1446–1460.
- Noël, D., Djouad, F., Bouffi, C., Mrugala, D., and Jorgensen, C. (2007). Multipotent mesenchymal stromal cells and immune tolerance. *Leuk Lymphoma* *48*, 1283–1289.
- Noone, C., Kihm, A., English, K., O'Dea, S., and Mahon, B.P. (2013). IFN- γ Stimulated Human Umbilical-Tissue-Derived Cells Potently Suppress NK Activation and Resist NK-Mediated Cytotoxicity In Vitro. *Stem Cells Dev* *22*, 3003–3014.
- Noronha, N. de C., Mizukami, A., Caliári-Oliveira, C., Cominal, J.G., Rocha, J.L.M., Covas, D.T., Swiech, K., and Malmegrim, K.C.R. (2019). Priming approaches to improve the efficacy of mesenchymal stromal cell-based therapies. *Stem Cell Res Ther* *10*, 131.
- Nozik-Grayck, E., Suliman, H.B., and Piantadosi, C.A. (2005). Extracellular superoxide dismutase. *Int J Biochem Cell Biol* *37*, 2466–2471.
- O'Loghlen, A., Brookes, S., Martin, N., Rapisarda, V., Peters, G., and Gil, J. (2015). CBX7 and miR-9 are part of an autoregulatory loop controlling p16^{INK4a}. *Aging Cell* *14*, 1113–1121.
- Ortiz, L.A., Gambelli, F., McBride, C., Gaupp, D., Baddoo, M., Kaminski, N., and Phinney, D.G. (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*, 8407–8411.
- Oses, C., Olivares, B., Ezquer, M., Acosta, C., Bosch, P., Donoso, M., Léniz, P., and Ezquer, F. (2017). Preconditioning of adipose tissue-derived mesenchymal stem cells with deferoxamine increases the production of pro-angiogenic, neuroprotective and anti-inflammatory factors: Potential application in the treatment of diabetic neuropathy. *PLoS ONE* *12*, e0178011.
- Owen, M. (1988). Marrow stromal stem cells. *J. Cell Sci. Suppl.* *10*, 63–76.

- P, M., S, H., R, M., M, G., and W S, K. (2011). Adult mesenchymal stem cells and cell surface characterization - a systematic review of the literature. *Open Orthop J* 5, 253–260.
- Palecek, S.P., Loftus, J.C., Ginsberg, M.H., Lauffenburger, D.A., and Horwitz, A.F. (1997). Integrin-ligand binding properties govern cell migration speed through cell-substratum adhesiveness. *Nature* 385, 537–540.
- Palomäki, S., Pietilä, M., Laitinen, S., Pesälä, J., Sormunen, R., Lehenkari, P., and Koivunen, P. (2013). HIF-1 α is upregulated in human mesenchymal stem cells. *Stem Cells* 31, 1902–1909.
- Paquet, J., Deschepper, M., Moya, A., Logeart-Avramoglou, D., Boisson-Vidal, C., and Petite, H. (2015). Oxygen Tension Regulates Human Mesenchymal Stem Cell Paracrine Functions. *Stem Cells Transl Med* 4, 809–821.
- Peiris-Pagès, M., Martinez-Outschoorn, U.E., Pestell, R.G., Sotgia, F., and Lisanti, M.P. (2016). Cancer stem cell metabolism. *Breast Cancer Res* 18, 55.
- Pelttari, K., Wixmerten, A., and van Martin, I. (2009). Do we really need cartilage tissue engineering? *Swiss Medical Weekly* 139, 602–609.
- Penolazzi, L., Vecchiatini, R., Bignardi, S., Lambertini, E., Torreggiani, E., Canella, A., Franceschetti, T., Calura, G., Vesce, F., and Piva, R. (2009). Influence of obstetric factors on osteogenic potential of umbilical cord-derived mesenchymal stem cells. *Reproductive Biology and Endocrinology* 7, 106.
- Pers, Y.-M., Maumus, M., Bony, C., Jorgensen, C., and Noël, D. (2018). Contribution of microRNAs to the immunosuppressive function of mesenchymal stem cells. *Biochimie* 155, 109–118.
- Pestka, S., Kotenko, S.V., Muthukumar, G., Izotova, L.S., Cook, J.R., and Garotta, G. (1997). The interferon gamma (IFN-gamma) receptor: a paradigm for the multichain cytokine receptor. *Cytokine Growth Factor Rev* 8, 189–206.
- Pittenger, M., Martin, B., Finkel, T., and Bolli, R. (2004). Mesenchymal Stem Cells and Their Potential as Cardiac Therapeutics. *Circulation Research* July 9, 2004 95, 9–20.
- Pittenger, M.F., Mackay, A.M., Beck, S.C., Jaiswal, R.K., Douglas, R., Mosca, J.D., Moorman, M.A., Simonetti, D.W., Craig, S., and Marshak, D.R. (1999). Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science* 284, 143–147.
- Plumas, J., Chaperot, L., Richard, M.-J., Molens, J.-P., Bensa, J.-C., and Favrot, M.-C. (2005). Mesenchymal stem cells induce apoptosis of activated T cells. *Leukemia* 19, 1597–1604.
- Pontikoglou, C., Deschaseaux, F., Sensebé, L., and Papadaki, H.A. (2011). Bone marrow mesenchymal stem cells: biological properties and their role in hematopoiesis and hematopoietic stem cell transplantation. *Stem Cell Rev* 7, 569–589.
- Potter, M.L., Hill, W.D., Isales, C.M., Hamrick, M.W., and Fulzele, S. (2021). MicroRNAs are critical regulators of senescence and aging in mesenchymal stem cells. *Bone* 142, 115679.
- Prabhakar, N.R., Kumar, G.K., and Nanduri, J. (2010). Intermittent hypoxia augments acute hypoxic sensing via HIF-mediated ROS. *Respir Physiol Neurobiol* 174, 230–234.
- Qiu, G., Zheng, G., Ge, M., Wang, J., Huang, R., Shu, Q., and Xu, J. (2018). Mesenchymal stem cell-derived extracellular vesicles affect disease outcomes via transfer of microRNAs. *Stem Cell Res Ther* 9.

- Ren, F., Wang, K., Zhang, T., Jiang, J., Nice, E.C., and Huang, C. (2015). New insights into redox regulation of stem cell self-renewal and differentiation. *Biochim. Biophys. Acta* *1850*, 1518–1526.
- Ren, J., Ward, D., Chen, S., Tran, K., Jin, P., Sabatino, M., Robey, P.G., and Stroncek, D.F. (2018). Comparison of human bone marrow stromal cells cultured in human platelet growth factors and fetal bovine serum. *J Transl Med* *16*, 65.
- Ren, L., Chen, X., Chen, X., Li, J., Cheng, B., and Xia, J. (2020). Mitochondrial Dynamics: Fission and Fusion in Fate Determination of Mesenchymal Stem Cells. *Front. Cell Dev. Biol.* *8*.
- Reppel, L., Caunday, O., Bultel, S., Stoltz, J.-F., Huselstein, C., and Bensoussan, D. (2012). Cellules souches et nouvelle loi de bioéthique française. *Hématologie* *18*, 175–181.
- Reppel, L., Margossian, T., Yaghi, L., Moreau, P., Mercier, N., Leger, L., Hupont, S., Stoltz, J.-F., Bensoussan, D., and Huselstein, C. (2014). Hypoxic culture conditions for Mesenchymal Stromal/Stem Cells from Wharton's jelly: a critical parameter to consider in a therapeutic context. *Curr Stem Cell Res Ther* *9*, 306–318.
- Rimmelé, P., Zhang, X., and Ghaffari, S. (2012). Rôle des facteurs de transcription FoxO dans la maintenance des cellules souches. *Médecine/Sciences* *28*, 250–254.
- Roese-Koerner, B., Stappert, L., and Brüstle, O. (2017). Notch/Hes signaling and miR-9 engage in complex feedback interactions controlling neural progenitor cell proliferation and differentiation. *Neurogenesis (Austin)* *4*, e1313647.
- Roobrouck, V.D., Clavel, C., Jacobs, S.A., Ulloa-Montoya, F., Crippa, S., Sohni, A., Roberts, S.J., Luyten, F.P., Van Gool, S.W., Sampaolesi, M., et al. (2011). Differentiation Potential of Human Postnatal Mesenchymal Stem Cells, Mesoangioblasts, and Multipotent Adult Progenitor Cells Reflected in Their Transcriptome and Partially Influenced by the Culture Conditions. *STEM CELLS* *29*, 871–882.
- Rustom, A., Saffrich, R., Markovic, I., Walther, P., and Gerdes, H.-H. (2004). Nanotubular highways for intercellular organelle transport. *Science* *303*, 1007–1010.
- Ryan, J.M., Barry, F.P., Murphy, J.M., and Mahon, B.P. (2005). Mesenchymal stem cells avoid allogeneic rejection. *Journal of Inflammation* *2*, 8.
- Ryan, J.M., Barry, F., Murphy, J.M., and Mahon, B.P. (2007). Interferon- γ does not break, but promotes the immunosuppressive capacity of adult human mesenchymal stem cells. *Clin Exp Immunol* *149*, 353–363.
- Sabharwal, S.S., and Schumacker, P.T. (2014). Mitochondrial ROS in cancer: initiators, amplifiers or an Achilles' heel? *Nat. Rev. Cancer* *14*, 709–721.
- Salami, F., Tavassoli, A., Mehrzad, J., and Parham, A. (2018). Immunomodulatory effects of mesenchymal stem cells on leukocytes with emphasis on neutrophils. *Immunobiology* *223*, 786–791.
- Salazar-Noratto, G.E., Luo, G., Denoëud, C., Padrona, M., Moya, A., Bensidhoum, M., Bizios, R., Potier, E., Logeart-Avramoglou, D., and Petite, H. (2020). Understanding and leveraging cell metabolism to enhance mesenchymal stem cell transplantation survival in tissue engineering and regenerative medicine applications. *Stem Cells* *38*, 22–33.

- Samsonraj, R.M., Raghunath, M., Nurcombe, V., Hui, J.H., van Wijnen, A.J., and Cool, S.M. (2017). Concise Review: Multifaceted Characterization of Human Mesenchymal Stem Cells for Use in Regenerative Medicine. *Stem Cells Transl Med*.
- Sangiorgi, B., and Panepucci, R.A. (2016). Modulation of Immunoregulatory Properties of Mesenchymal Stromal Cells by Toll-Like Receptors: Potential Applications on GVHD. *Stem Cells Int 2016*.
- Sari, I., Cetin, A., Kaynar, L., Saraymen, R., Hacıoglu, S.K., Ozturk, A., Kocyigit, I., Altuntas, F., and Eser, B. (2008). Disturbance of pro-oxidative/antioxidative balance in allogeneic peripheral blood stem cell transplantation. *Ann. Clin. Lab. Sci.* 38, 120–125.
- Sart, S., Song, L., and Li, Y. (2015). Controlling Redox Status for Stem Cell Survival, Expansion, and Differentiation. *Oxid Med Cell Longev 2015*, 105135.
- Savelli, S., Trombi, L., D'Alessandro, D., Moscato, S., Pacini, S., Giannotti, S., Lapi, S., Scatena, F., and Petrini, M. (2018). Pooled human serum: A new culture supplement for bioreactor-based cell therapies. Preliminary results. *Cytotherapy 20*, 556–563.
- Schallmoser, K., Bartmann, C., Rohde, E., Bork, S., Guelly, C., Obenauf, A.C., Reinisch, A., Horn, P., Ho, A.D., Strunk, D., et al. (2010). Replicative senescence-associated gene expression changes in mesenchymal stromal cells are similar under different culture conditions. *Haematologica 95*, 867–874.
- Schroedl, C., McClintock, D.S., Budinger, G.R.S., and Chandel, N.S. (2002). Hypoxic but not anoxic stabilization of HIF-1 α requires mitochondrial reactive oxygen species. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol 283*, L922-931.
- Sekiya, I., Larson, B.L., Smith, J.R., Pochampally, R., Cui, J.-G., and Prockop, D.J. (2002). Expansion of human adult stem cells from bone marrow stroma: conditions that maximize the yields of early progenitors and evaluate their quality. *Stem Cells 20*, 530–541.
- Selmani, Z., Naji, A., Zidi, I., Favier, B., Gaiffe, E., Obert, L., Borg, C., Saas, P., Tiberghien, P., Rouas-Freiss, N., 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*, 212–222.
- Semenza, G.L. (1999). Perspectives on oxygen sensing. *Cell 98*, 281–284.
- Sensebé, L., and Bourin, P. (2011). [Mesenchymal stem cells - The challenge of a good therapeutic product]. *Med Sci (Paris) 27*, 297–302.
- Sepúlveda, J.C., Tomé, M., Fernández, M.E., Delgado, M., Campisi, J., Bernad, A., and González, M.A. (2014a). Cell senescence abrogates the therapeutic potential of human mesenchymal stem cells in the lethal endotoxemia model. *Stem Cells 32*, 1865–1877.
- Shang, J., Yao, Y., Fan, X., Shangguan, L., Li, J., Liu, H., and Zhou, Y. (2016). miR-29c-3p promotes senescence of human mesenchymal stem cells by targeting CNOT6 through p53-p21 and p16-pRB pathways. *Biochim. Biophys. Acta 1863*, 520–532.
- Shanskii, Y.D., Sergeeva, N.S., Sviridova, I.K., Kirakozov, M.S., Kirsanova, V.A., Akhmedova, S.A., Antokhin, A.I., and Chissov, V.I. (2013). Human platelet lysate as a promising growth-stimulating additive for culturing of stem cells and other cell types. *Bull Exp Biol Med 156*, 146–151.

- Shih, D.T.-B., and Burnouf, T. (2015). Preparation, quality criteria, and properties of human blood platelet lysate supplements for ex vivo stem cell expansion. *N Biotechnol* 32, 199–211.
- Siegel, G., Kluba, T., Hermanutz-Klein, U., Bieback, K., Northoff, H., and Schäfer, R. (2013). Phenotype, donor age and gender affect function of human bone marrow-derived mesenchymal stromal cells. *BMC Med* 11, 146.
- Simm, A., and Campisi, J. (2014). Stress and aging. *Exp. Gerontol.* 59, 1–2.
- Singer, N.G., and Caplan, A.I. (2011). Mesenchymal stem cells: mechanisms of inflammation. *Annu Rev Pathol* 6, 457–478.
- Singh, M., and Piekorz, R.P. (2013). Senescence-associated lysosomal α -L-fucosidase (SA- α -Fuc): A sensitive and more robust biomarker for cellular senescence beyond SA- β -Gal. *Cell Cycle* 12, 1996.
- Skific, M., Golemovic, M., Crkvenac-Gornik, K., Vrhovac, R., and Golubic Cepulic, B. (2018). Comparative Analysis of Biological and Functional Properties of Bone Marrow Mesenchymal Stromal Cells Expanded in Media with Different Platelet Lysate Content. *Cells Tissues Organs (Print)* 205, 226–239.
- Smith, K.A., Waypa, G.B., and Schumacker, P.T. (2017). Redox signaling during hypoxia in mammalian cells. *Redox Biol* 13, 228–234.
- Song, H., Cha, M.-J., Song, B.-W., Kim, I.-K., Chang, W., Lim, S., Choi, E.J., Ham, O., Lee, S.-Y., Chung, N., et al. (2010). Reactive oxygen species inhibit adhesion of mesenchymal stem cells implanted into ischemic myocardium via interference of focal adhesion complex. *Stem Cells* 28, 555–563.
- Sorrentino, A., Ferracin, M., Castelli, G., Biffoni, M., Tomaselli, G., Baiocchi, M., Fatica, A., Negrini, M., Peschle, C., and Valtieri, M. (2008). Isolation and characterization of CD146+ multipotent mesenchymal stromal cells. *Experimental Hematology* 36, 1035–1046.
- Spees, J.L., Olson, S.D., Whitney, M.J., and Prockop, D.J. (2006). Mitochondrial transfer between cells can rescue aerobic respiration. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103, 1283–1288.
- Stenderup, K., Justesen, J., Clausen, C., and Kassem, M. (2003). Aging is associated with decreased maximal life span and accelerated senescence of bone marrow stromal cells. *Bone* 33, 919–926.
- Swarbrick, S., Wragg, N., Ghosh, S., and Stolzing, A. (2019). Systematic Review of miRNA as Biomarkers in Alzheimer’s Disease. *Mol Neurobiol* 56, 6156–6167.
- Taganov, K.D., Boldin, M.P., Chang, K.-J., and Baltimore, D. (2006). NF-kappaB-dependent induction of microRNA miR-146, an inhibitor targeted to signaling proteins of innate immune responses. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 103, 12481–12486.
- Tai, L., Huang, C.-J., Choo, K.B., Cheong, S.K., and Kamarul, T. (2020). Oxidative Stress Down-Regulates MiR-20b-5p, MiR-106a-5p and E2F1 Expression to Suppress the G1/S Transition of the Cell Cycle in Multipotent Stromal Cells. *Int J Med Sci* 17, 457–470.
- Takahashi, K., and Yamanaka, S. (2006). Induction of Pluripotent Stem Cells from Mouse Embryonic and Adult Fibroblast Cultures by Defined Factors. *Cell* 126, 663–676.
- Takahashi, K., Tanabe, K., Ohnuki, M., Narita, M., Ichisaka, T., Tomoda, K., and Yamanaka, S. (2007). Induction of Pluripotent Stem Cells from Adult Human Fibroblasts by Defined Factors. *Cell* 131, 861–872.

- Tan, B.L., Norhaizan, M.E., and Liew, W.-P.-P. (2018). Nutrients and Oxidative Stress: Friend or Foe? *Oxid Med Cell Longev* 2018, 9719584.
- Targa, L. (2019). Contribution to the study of mesenchymal stromal / stem cells heterogeneity, focus on surface markers and senescence. Université de Lorraine.
- Targa, L., Charif, N., Cauchois, G., François Stoltz, J., Vincourt, J.-B., and de Isla, N. (2016). Differences in the expression of cell surface proteins between young and replicative senescent bone marrow mesenchymal stromal / stem cells.
- Targa, L., Charif, N., Cauchois, G., Stoltz, J.-F., Vincourt, J.-B., and de Isla, N. (2017). Replicative senescent bone marrow mesenchymal stem cells spotting by surface protein expression.
- Thomson, J.A., Itskovitz-Eldor, J., Shapiro, S.S., Waknitz, M.A., Swiergiel, J.J., Marshall, V.S., and Jones, J.M. (1998). Embryonic Stem Cell Lines Derived from Human Blastocysts. *Science* 282, 1145–1147.
- Torre, M.L., Lucarelli, E., Guidi, S., Ferrari, M., Alessandri, G., De Girolamo, L., Pessina, A., Ferrero, I., and Gruppo Italiano Staminali Mesenchimali (GISM) (2015). Ex vivo expanded mesenchymal stromal cell minimal quality requirements for clinical application. *Stem Cells Dev.* 24, 677–685.
- Toubai, T., Tanaka, J., Paczesny, S., Shono, Y., Reddy, P., and Imamura, M. (2012). Role of cytokines in the pathophysiology of acute graft-versus-host disease (GVHD): are serum/plasma cytokines potential biomarkers for diagnosis of acute GVHD following allogeneic hematopoietic cell transplantation (Allo-HCT)? *Curr Stem Cell Res Ther* 7, 229–239.
- Tsang, W.P., Ng, E.K.O., Ng, S.S.M., Jin, H., Yu, J., Sung, J.J.Y., and Kwok, T.T. (2010). Oncofetal H19-derived miR-675 regulates tumor suppressor RB in human colorectal cancer. *Carcinogenesis* 31, 350–358.
- Turinetto, V., Vitale, E., and Giachino, C. (2016). Senescence in Human Mesenchymal Stem Cells: Functional Changes and Implications in Stem Cell-Based Therapy. *Int J Mol Sci* 17.
- Umeno, A., Biju, V., and Yoshida, Y. (2017). In vivo ROS production and use of oxidative stress-derived biomarkers to detect the onset of diseases such as Alzheimer's disease, Parkinson's disease, and diabetes. *Free Radic. Res.* 51, 413–427.
- Urao, N., and Ushio-Fukai, M. (2013). Redox regulation of stem/progenitor cells and bone marrow niche. *Free Radic. Biol. Med.* 54, 26–39.
- Valko, M., Rhodes, C.J., Moncol, J., Izakovic, M., and Mazur, M. (2006). Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chem Biol Interact* 160, 1–40.
- Vono, R., Jover Garcia, E., Spinetti, G., and Madeddu, P. (2018). Oxidative Stress in Mesenchymal Stem Cell Senescence: Regulation by Coding and Noncoding RNAs. *Antioxid. Redox Signal.* 29, 864–879.
- Walter, J., Ware, L.B., and Matthay, M.A. (2014). Mesenchymal stem cells: mechanisms of potential therapeutic benefit in ARDS and sepsis. *Lancet Respir Med* 2, 1016–1026.
- Wang, K., Zhang, T., Dong, Q., Nice, E.C., Huang, C., and Wei, Y. (2013). Redox homeostasis: the linchpin in stem cell self-renewal and differentiation. *Cell Death Dis* 4, e537.

- Wang, L.-T., Ting, C.-H., Yen, M.-L., Liu, K.-J., Sytwu, H.-K., Wu, K.K., and Yen, B.L. (2016a). Human mesenchymal stem cells (MSCs) for treatment towards immune- and inflammation-mediated diseases: review of current clinical trials. *J Biomed Sci* 23, 76.
- Wang, Q., Xu, C., Zhao, Y., Xu, Z., Zhang, Y., Jiang, J., Yan, B., Gu, D., Wu, M., Wang, Y., et al. (2016b). miR-26b-3p Regulates Human Umbilical Cord-Derived Mesenchymal Stem Cell Proliferation by Targeting Estrogen Receptor. *Stem Cells Dev* 25, 415–426.
- Watanabe, Y., Suzuki, O., Haruyama, T., and Akaike, T. (2003). Interferon-gamma induces reactive oxygen species and endoplasmic reticulum stress at the hepatic apoptosis. *J. Cell. Biochem.* 89, 244–253.
- Waterman, R.S., Morgenweck, J., Nossaman, B.D., Scandurro, A.E., Scandurro, S.A., and Betancourt, A.M. (2012). Anti-inflammatory mesenchymal stem cells (MSC2) attenuate symptoms of painful diabetic peripheral neuropathy. *Stem Cells Transl Med* 1, 557–565.
- Waypa, G.B., Smith, K.A., and Schumacker, P.T. (2016). O₂ sensing, mitochondria and ROS signaling: The fog is lifting. *Mol. Aspects Med.* 47–48, 76–89.
- Weber, M., Sotoca, A.M., Kupfer, P., Guthke, R., and van Zoelen, E.J. (2013). Dynamic modelling of microRNA regulation during mesenchymal stem cell differentiation. *BMC Syst Biol* 7, 124.
- West, A.P., Brodsky, I.E., Rahner, C., Woo, D.K., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P., Walsh, M.C., Choi, Y., Shadel, G.S., and Ghosh, S. (2011). TLR signalling augments macrophage bactericidal activity through mitochondrial ROS. *Nature* 472, 476–480.
- Wobma, H.M., Kanai, M., Ma, S.P., Shih, Y., Li, H.W., Duran-Struuck, R., Winchester, R., Goeta, S., Brown, L.M., and Vunjak-Novakovic, G. (2018). Dual IFN- γ /hypoxia priming enhances immunosuppression of mesenchymal stromal cells through regulatory proteins and metabolic mechanisms. *J Immunol Regen Med* 1, 45–56.
- Wright, G.J., Cherwinski, H., Foster-Cuevas, M., Brooke, G., Puklavec, M.J., Bigler, M., Song, Y., Jenmalm, M., Gorman, D., McClanahan, T., et al. (2003). Characterization of the CD200 receptor family in mice and humans and their interactions with CD200. *J Immunol* 171, 3034–3046.
- Wu, A.G., Michejda, M., Mazumder, A., Meehan, K.R., Menendez, F.A., Tchabo, J.G., Slack, R., Johnson, M.P., and Bellanti, J.A. (1999). Analysis and characterization of hematopoietic progenitor cells from fetal bone marrow, adult bone marrow, peripheral blood, and cord blood. *Pediatr. Res.* 46, 163–169.
- Wu, J., Huang, G.T.-J., He, W., Wang, P., Tong, Z., Jia, Q., Dong, L., Niu, Z., and Ni, L. (2012). Basic fibroblast growth factor enhances stemness of human stem cells from the apical papilla. *J Endod* 38, 614–622.
- Wu, L.W., Wang, Y.-L., Christensen, J.M., Khalifian, S., Schneeberger, S., Raimondi, G., Cooney, D.S., Lee, W.P.A., and Brandacher, G. (2014). Donor age negatively affects the immunoregulatory properties of both adipose and bone marrow derived mesenchymal stem cells. *Transpl Immunol* 30, 122–127.
- Xiao, Y., Li, X., Cui, Y., Zhang, J., Liu, L., Xie, X., Hao, H., He, G., Kander, M.C., Chen, M., et al. (2014). Hydrogen peroxide inhibits proliferation and endothelial differentiation of bone marrow stem cells partially via reactive oxygen species generation. *Life Sci* 112, 33–40.

- Xu, J., Huang, Z., Lin, L., Fu, M., Gao, Y., Shen, Y., Zou, Y., Sun, A., Qian, J., and Ge, J. (2014). miR-210 over-expression enhances mesenchymal stem cell survival in an oxidative stress environment through antioxidation and c-Met pathway activation. *Sci China Life Sci* 57, 989–997.
- Xu, M., Su, X., Xiao, X., Yu, H., Li, X., Keating, A., Wang, S., and Zhao, R.C. (2021). Hydrogen Peroxide-Induced Senescence Reduces the Wound Healing-Promoting Effects of Mesenchymal Stem Cell-Derived Exosomes Partially via miR-146a. *Aging Dis* 12, 102–115.
- Xu, Y., Liu, N., Wei, Y., Zhou, D., Lin, R., Wang, X., and Shi, B. (2020). Anticancer effects of miR-124 delivered by BM-MSC derived exosomes on cell proliferation, epithelial mesenchymal transition, and chemotherapy sensitivity of pancreatic cancer cells. *Aging (Albany NY)* 12, 19660–19676.
- Yagi, H., Soto-Gutierrez, A., Parekkadan, B., Kitagawa, Y., Tompkins, R.G., Kobayashi, N., and Yarmush, M.L. (2010). Mesenchymal stem cells: Mechanisms of immunomodulation and homing. *Cell Transplant* 19, 667–679.
- Yang, S., and Lian, G. (2020). ROS and diseases: role in metabolism and energy supply. *Mol Cell Biochem* 467, 1–12.
- Yang, K., Wang, X.Q., He, Y.S., Lu, L., Chen, Q.J., Liu, J., and Shen, W.F. (2010). Advanced glycation end products induce chemokine/cytokine production via activation of p38 pathway and inhibit proliferation and migration of bone marrow mesenchymal stem cells. *Cardiovasc Diabetol* 9, 66.
- Yang, Z.X., Mao, G.X., Zhang, J., Wen, X.L., Jia, B.B., Bao, Y.Z., Lv, X.L., Wang, Y.Z., and Wang, G.F. (2017). IFN- γ induces senescence-like characteristics in mouse bone marrow mesenchymal stem cells. *Adv Clin Exp Med* 26, 201–206.
- Yuan, X., Logan, T.M., and Ma, T. (2019). Metabolism in Human Mesenchymal Stromal Cells: A Missing Link Between hMSC Biomanufacturing and Therapy? *Front Immunol* 10, 977.
- Yuan, X., Liu, Y., Bijonowski, B.M., Tsai, A.-C., Fu, Q., Logan, T.M., Ma, T., and Li, Y. (2020). NAD⁺/NADH redox alterations reconfigure metabolism and rejuvenate senescent human mesenchymal stem cells in vitro. *Commun Biol* 3, 774.
- Zeng, R., Wang, L.-W., Hu, Z.-B., Guo, W.-T., Wei, J.-S., Lin, H., Sun, X., Chen, L.-X., and Yang, L.-J. (2011). Differentiation of human bone marrow mesenchymal stem cells into neuron-like cells in vitro. *Spine* 36, 997–1005.
- Zhai, W., Yong, D., El-Jawhari, J.J., Cuthbert, R., McGonagle, D., Win Naing, M., and Jones, E. (2019). Identification of senescent cells in multipotent mesenchymal stromal cell cultures: Current methods and future directions. *Cytotherapy* 21, 803–819.
- Zhang, Y., and Zhou, S. (2015). MicroRNA-29a inhibits mesenchymal stem cell viability and proliferation by targeting Roundabout 1. *Mol Med Rep* 12, 6178–6184.
- Zhao, J., Li, X., Hu, J., Chen, F., Qiao, S., Sun, X., Gao, L., Xie, J., and Xu, B. (2019). Mesenchymal stromal cell-derived exosomes attenuate myocardial ischaemia-reperfusion injury through miR-182-regulated macrophage polarization. *Cardiovasc Res* 115, 1205–1216.
- Zhao, W., Ji, X., Zhang, F., Li, L., and Ma, L. (2012). Embryonic Stem Cell Markers. *Molecules* 17, 6196–6236.

Annexes

Annexe 1 : Choix de la concentration en sonde CM-H₂DCFDA

Nous avons testé plusieurs concentrations en sonde CM-H₂DCFDA allant de 0,5 à 10 μ M comme il était recommandé sur la fiche technique du fournisseur avec 3 prélèvements différents de CSM-GW amplifiés en hypoxie. Nous observons un plateau aux alentours de 5 μ M pour les 3 prélèvements (IMF = 170), cependant pour 2 prélèvements nous observons une valeur qui sort du lot pour la concentration 8 μ M. De plus, à partir de la concentration 5 μ M le pic de l'histogramme de fluorescence est bien dans la dernière décade. Nous avons également vérifié qu'à cette concentration il était possible de voir des différences dans l'estimation de la quantité de ROS produite par les CSM-GW et les CSM-GW stimulées par des agents pro-oxydants tels que l'H₂O₂. En effet, il ne faut pas que le signal soit saturé non plus. Pour la suite des expériences, nous avons décidé de travailler avec la concentration de 5 μ M pour la sonde CM-H₂DCFDA (Figure 1). Concernant la sonde dihydroéthidium (DHE), nous avons décidé de travailler à 10 μ M, comme il est recommandé par le fournisseur. La sonde DHE est perméable et va émettre de la fluorescence orange une fois oxydée par l'anion superoxyde. En fonction de la quantité de ROS présentes, la fluorescence pourra être mesurée par spectrofluorimétrie ou cytométrie en flux λ_{ex} 518 nm/ λ_{em} 606 nm.

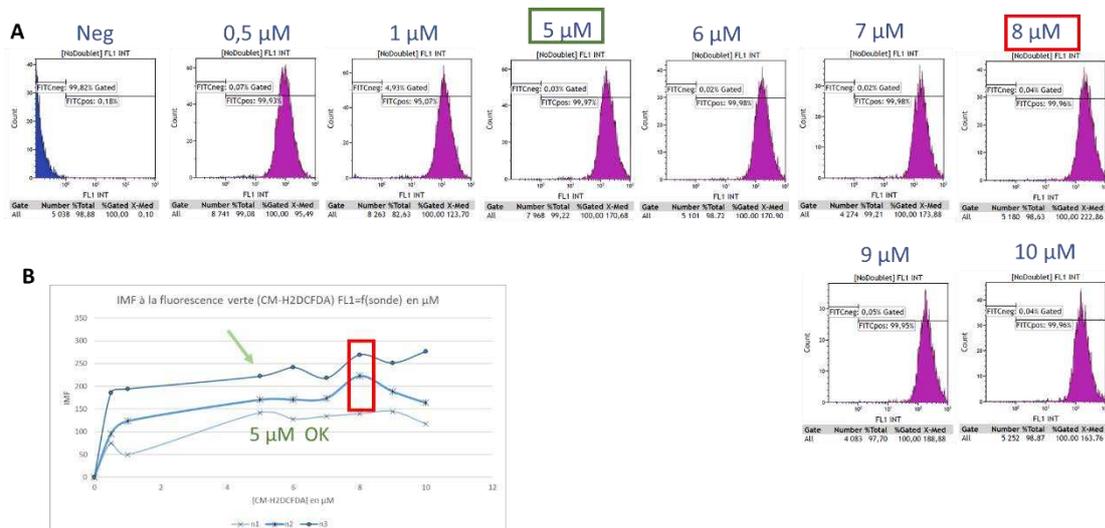


Figure 1 : Optimisation de la concentration d'utilisation de la sonde CM-H₂DCFDA

Les cellules stromales/souches mésenchymateuses (CSM-GW) amplifiées en hypoxie avec du milieu supplémenté en lysat plaquettaire humain (LPH) ont été trypsinées puis incubées pendant 45 minutes en hypoxie avec la sonde Di(Acetoxy-méthyl Ester) 6-Carboxy-2',7'-Dichlorodihydrofluorescein Diacetate (Fisher, Réf C2938, CM-H₂DCFDA) à différentes concentrations (de 0,5 à 10 μ M) avant d'être lavées et analysées par cytométrie en flux (Gallios, Beckman Coulter). Histogrammes de fluorescence obtenus pour les différentes concentrations en sonde (A). Représentation de courbe d'intensité moyenne de fluorescence (IMF) en fonction de la concentration en sonde CM-H₂DCFDA (B).

Nous avons donc montré que la concentration en sonde CM-H₂DCFDA de 5 μ M était optimale pour doser les ROS intracellulaires produites par les CSM-GW par cytométrie en flux.

Annexe 2 : Quantification des espèces réactives de l'oxygène (ROS) avec la sonde DHE

Nous avons également quantifié les ROS intracellulaires produites par les CSM-GW amplifiées en normoxie (N) et en hypoxie (H) avec du lysat plaquettaire humain (LPH), à l'aide de la sonde dihydroéthidium (DHE) (INVITROGEN, France) qui est oxydée par l'anion superoxyde. Les résultats montrent la même tendance que celle présentée dans la thèse avec la sonde CM-H₂DFDA. Les résultats de la *Figure 1* montrent que la production de ROS intracellulaires est légèrement augmentée pour les CSM-GW amplifiées en hypoxie (IMF=118,1) par rapport à la normoxie (IMF=112,1). De plus, la production de ROS intracellulaires est augmentée après stimulation par de l'H₂O₂ quelle que soit la tension en oxygène (N-LPH : IMF=142,7 ; H-LPH : IMF=133,3) et peut être limitée après prétraitement des CSM-GW par de la NAC en normoxie (IMF=103,4) et en hypoxie (IMF=116,7).

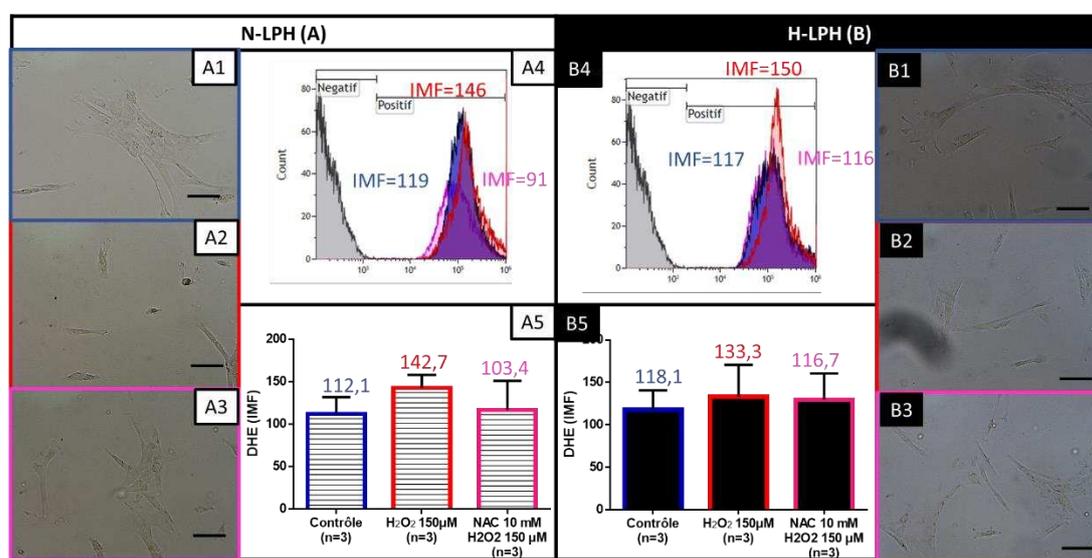


Figure 1 : Production de ROS intracellulaires des CSM-GW amplifiées en normoxie et en hypoxie à passage précoce avec la sonde DHE

Les cellules stromales mésenchymateuses de gelée de Wharton (CSM-GW) cultivées à passage précoce (P3) en normoxie (N) (A) ou hypoxie (H) (B) avec du milieu supplémenté en lysat plaquettaire humain (LPH) ont étéensemencées à 1000 cellules/cm². Après 5 jours de culture, les CSM-GW ont été traitées avec de l'H₂O₂ (peroxyde d'hydrogène) 150 µM pendant 2 heures (rouge) avec éventuellement un prétraitement de 2 heures avec de la N-acetylcystéine (NAC) 10 mM (rose). La condition « contrôle » (bleu) correspond aux cellules sans traitement. À J7, les CSM-GW ont été photographiées par microscope inversé (Leica DMI3000B, échelle=100 µm) pour les conditions contrôles (A1) l'H₂O₂ 150 µM (A2) et NAC 10mM + l'H₂O₂ 150 µM (A3) en normoxie et pour les conditions contrôles (B1) l'H₂O₂ 150 µM (B2) et NAC10mM + l'H₂O₂ 150 µM (B3) en hypoxie, avant d'être trypsinées. Les cellules en suspension sont incubées 45 minutes avec la sonde dihydroéthidium (DHE) à 10 µM avant d'être lavées et analysées par cytométrie en flux (Gallios, Beckman Coulter). Représentation des histogrammes d'intensité moyenne de fluorescence (IMF) obtenus avec la sonde CM-H₂DCFDA (n=1) (A4 (N-LPH), B4 (H-LPH)) et histogramme d'IMF (n=4) (A5 (N-LPH), B5 (H-LPH)). L'analyse statistique a été réalisée à l'aide du logiciel graphpad, grâce au test t. Les résultats sont exprimés en moyennes ± l'écart type (ET), p < 0,05 (*).

Ces expériences ont permis de valider notre méthode de quantification des ROS par cytométrie en flux à l'aide de la sonde DHE.

Annexe 3 : Effets de la stimulation par des concentrations croissantes en interféron gamma (IFN- γ) sur les cellules stromales mésenchymateuses de la moelle osseuse

Afin de mimer le contexte inflammatoire retrouvé dans les pathologies comme la GVHD, nous avons stimulé nos cellules stromales mésenchymateuses (CSM-GW) par de l'interféron gamma (IFN- γ). Dans notre équipe, l'IFN- γ est utilisé seul à forte dose (50-100 ng/mL) en préconditionnement des CSM-GW pour mimer le contexte inflammatoire retrouvé dans les pathologies telles que la GVHD et ainsi augmenter leurs propriétés immunosuppressives (Noronha et al., 2019).

L'objectif de ces expériences, réalisées uniquement avec les CSM-GW amplifiées en **hypoxie avec du lysat plaquettaire humain (H-LPH)**, était d'étudier la réponse des CSM-GW en fonction de la dose en IFN- γ . Pour cela, différents paramètres ont été étudiés : la production de ROS intracellulaires (i), l'apoptose (ii) et la sénescence (iii).

I. Effet de la stimulation par IFN- γ sur la production de ROS intracellulaires

Les résultats de la quantification des ROS intracellulaires produites par les CSM-GW stimulées par des concentrations croissantes en IFN- γ montrent une tendance à l'augmentation (*Figure 1*).

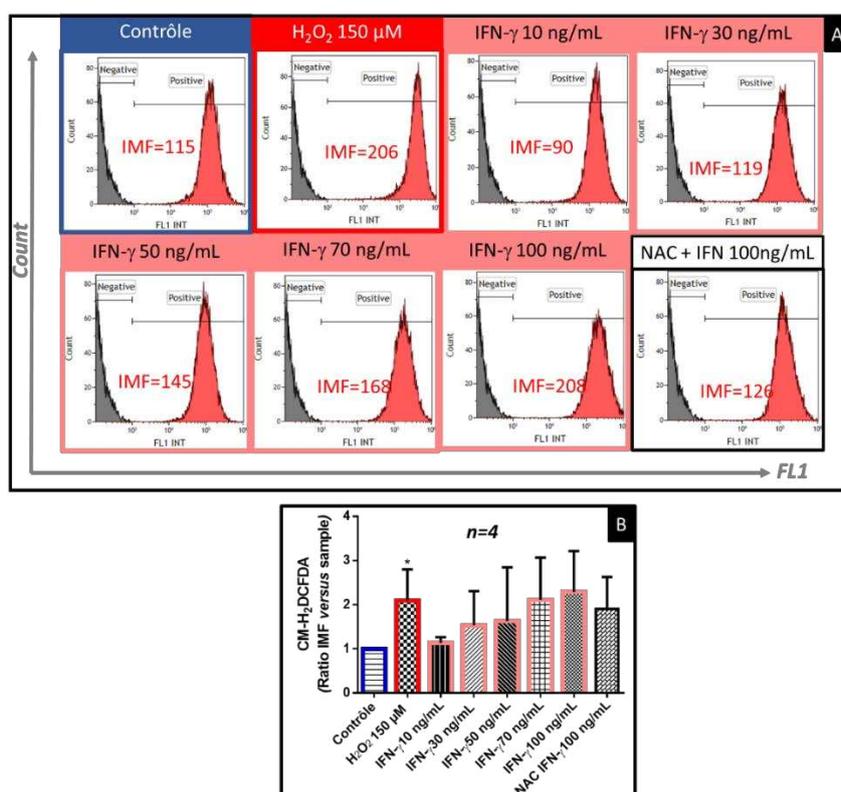


Figure 1 : Production de ROS intracellulaires dans les CSM-GW amplifiées en hypoxie à passage précoce et stimulées par des concentrations croissantes en interféron- γ (IFN- γ)

Les CSM de gelée de Wharton (CSM-GW) cultivées jusqu'au passage 3 en hypoxie ont été trypsinées avant d'êtreensemencées à 1000 cellules/cm² au passage suivant. Après 5 jours de culture, les CSM-GW ont été soumises à différentes stimulations : concentrations croissantes en interféron- γ (IFN- γ) (10 à 100 ng/mL (*rose saumon*) pendant 48 heures, H₂O₂ 150 μ M (peroxyde d'hydrogène) (*rouge*) pendant 2 heures seul ou avec éventuellement un prétraitement de 2 heures avec de la N-acétylcystéine (NAC) 10 mM suivi d'une stimulation par IFN- γ à 100ng/mL (*noir*) puis maintien en culture pendant 48 heures (*contrôle en bleu*). Au jour 7, les CSM-GW des différentes conditions sont trypsinées afin de quantifier les ROS intracellulaires. Les CSM-GW en suspension sont incubées 45 minutes avec la sonde CM-H2DCFDA à 5 μ M avant d'être lavées et analysées par cytométrie en flux (Gallios, Beckman Coulter). (A) : Représentation des histogrammes monoparamétriques de la distribution de la

fluorescence verte (FL1) associée à la sonde CM-H₂DCFDA oxydée en fonction du nombre d'événements (Count). (B) Représentation graphiques des ratios d'intensité médiane de fluorescence (IMF) (versus contrôle). L'analyse statistique a été réalisée à l'aide du logiciel graphpad, grâce à un test t (*p<0.05 versus contrôle).

II. Effet de la stimulation par IFN- γ sur la prolifération cellulaire

Les résultats montrent, qu'après préconditionnement par de l'IFN- γ , les CSM-GW gardent une morphologie fibroblastique, mais une tendance à une diminution de leur prolifération est observée aux plus fortes concentrations en IFN- γ (Figure 2).

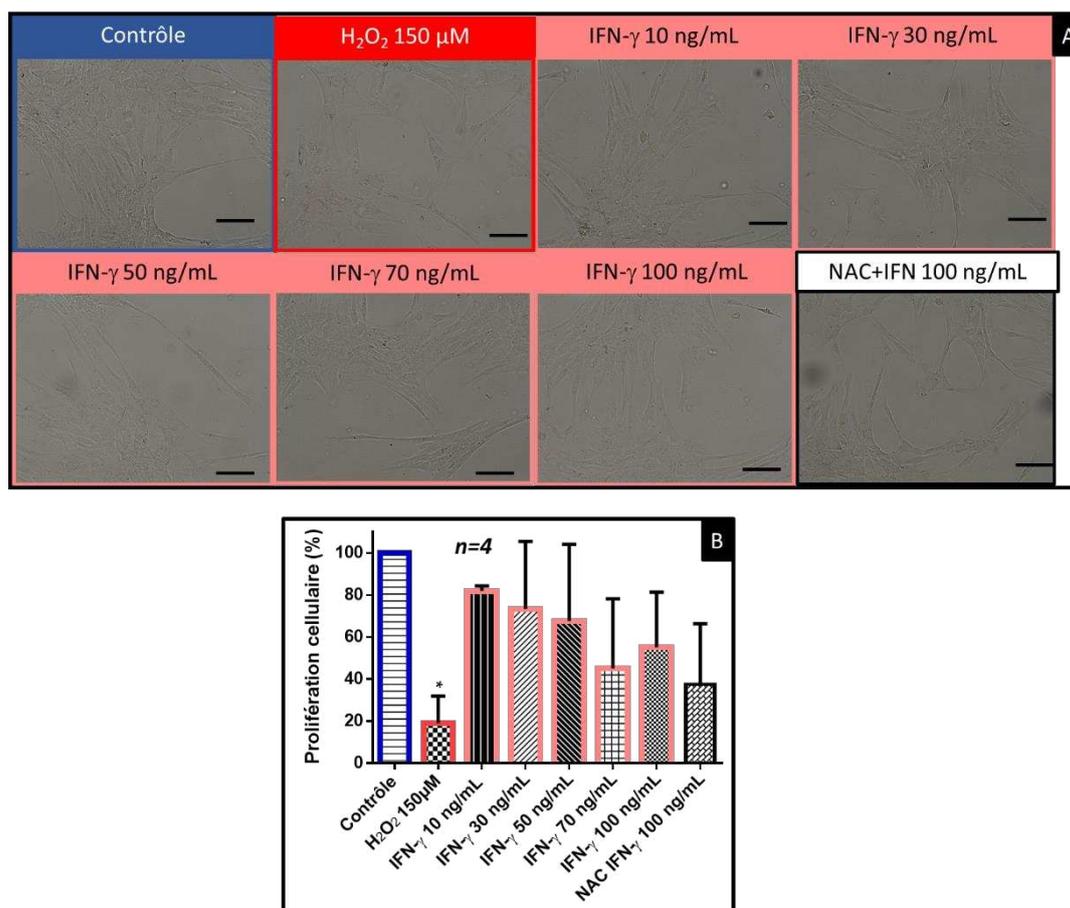


Figure 2 : Effet de la stimulation par de l'interféron- γ sur la prolifération des CSM-GW amplifiées en hypoxie avec du lysat plaquettaire humain (LPH) à passage précoce

Les CSM de gelée de Wharton (CSM-GW) cultivées jusqu'au passage 3 en hypoxie ont été trypsinées avant d'être ensemencées à 1000 cellules/cm² au passage suivant. Après 5 jours de culture, les CSM-GW ont été soumises à différentes stimulations : concentrations croissantes en interféron- γ (IFN- γ) (10 à 100 ng/mL (**rose saumon**) pendant 48 heures, H₂O₂ 150 μ M (peroxyde d'hydrogène) (**rouge**) pendant 2 heures seul ou avec éventuellement un prétraitement de 2 heures avec de la N-acétylcystéine (NAC) 10 mM suivi d'une stimulation par IFN- γ à 100ng/mL (**blanc**) puis maintien en culture pendant 48 heures (**contrôle en bleu**). Au jour 7, les CSM-GW sont trypsinées et dénombrées. Photographie des cellules au microscope inversé (Leica DMI3000B, échelle 100 μ m) avant trypsination (A) et représentation du pourcentage de prolifération (vs CSM-GW non traitées « contrôle ») après dénombrement (n=4) (B). L'analyse statistique a été réalisée à l'aide du logiciel graphpad, grâce à un test t (*p<0.05).

III. Effet de la stimulation par IFN- γ sur l'apoptose

Les résultats montrent que quelle que soit la dose d'IFN- γ (10 à 100 ng/mL) utilisée pour stimuler les CSM-GW, le pourcentage de cellules apoptotiques reste équivalent par rapport aux cellules contrôles et entre les différentes doses et faible par rapport aux cellules stimulées avec de l'H₂O₂ (Figure 3).

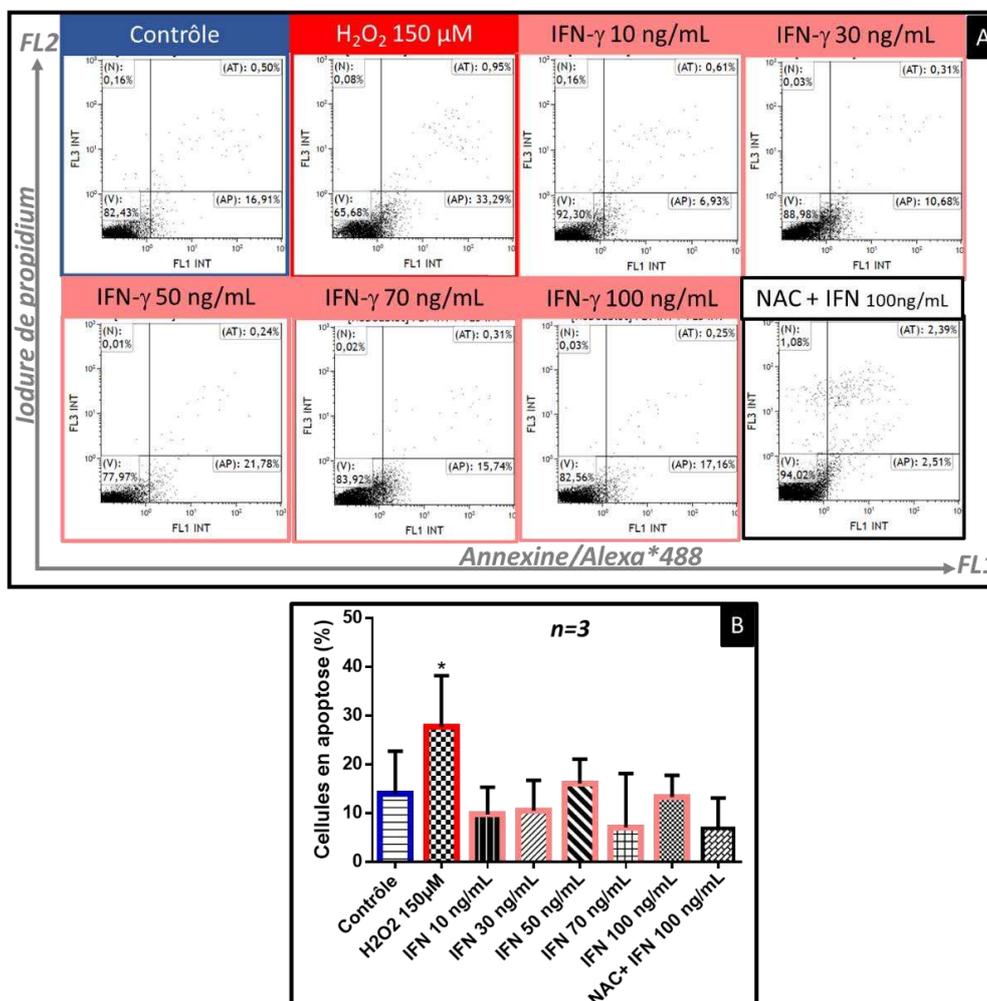


Figure 3 : Effet de la stimulation par de l'interféron- γ sur l'apoptose des CSM-GW amplifiées en hypoxie avec du lysat plaquettaire humain (LPH) à passage précoce

Les CSM de gelée de Wharton (CSM-GW) cultivées jusqu'au passage 3 en hypoxie ont été trypsinées avant d'être ensemencées à 1000 cellules/cm² au passage suivant. Après 5 jours de culture, les CSM-GW ont été soumises à différentes stimulations : concentrations croissantes en interféron- γ (IFN- γ) (10 à 100 ng/mL (rose saumon) pendant 48 heures, H₂O₂ 150 μ M (peroxyde d'hydrogène) (rouge) pendant 2 heures seul ou avec éventuellement un prétraitement de 2 heures avec de la N-acétylcystéine (NAC) 10 mM suivi d'une stimulation par IFN- γ à 100ng/mL (noir) puis maintien en culture pendant 48 heures (contrôle en bleu). Au jour 7, les CSM-GW sont trypsinées et marquées à l'annexine V couplé à l'Alexa*488 pour le test d'apoptose par cytométrie en flux (Gallios, Beckman Coulter). Représentation des histogrammes biparamétriques de fluorescence de l'annexine V (Alexa 488) et de l'iodure de propidium (A) (n=1) et du pourcentage de cellules en apoptose (B) (n=3). L'analyse statistique a été réalisée à l'aide du logiciel graphpad, grâce à un test t apparié (*p<0.05 versus contrôle).

Ces résultats montrent que quelle que soit la dose d'IFN- γ (10 à 100 ng/mL) utilisée pour stimuler les CSM-GW, le pourcentage de cellules apoptotiques reste équivalent par rapport aux cellules contrôles et entre les différentes doses et faible par rapport aux cellules stimulées avec de l'H₂O₂.

IV. Effet de la stimulation par IFN- γ sur la sénescence

Les résultats montrent que le traitement des CSM-GW avec des concentrations croissantes en IFN- γ entraîne une légère augmentation de la sénescence, mais que celle-ci peut être inhibée *via* un prétraitement par de la NAC 10 mM (*Figure 4*).

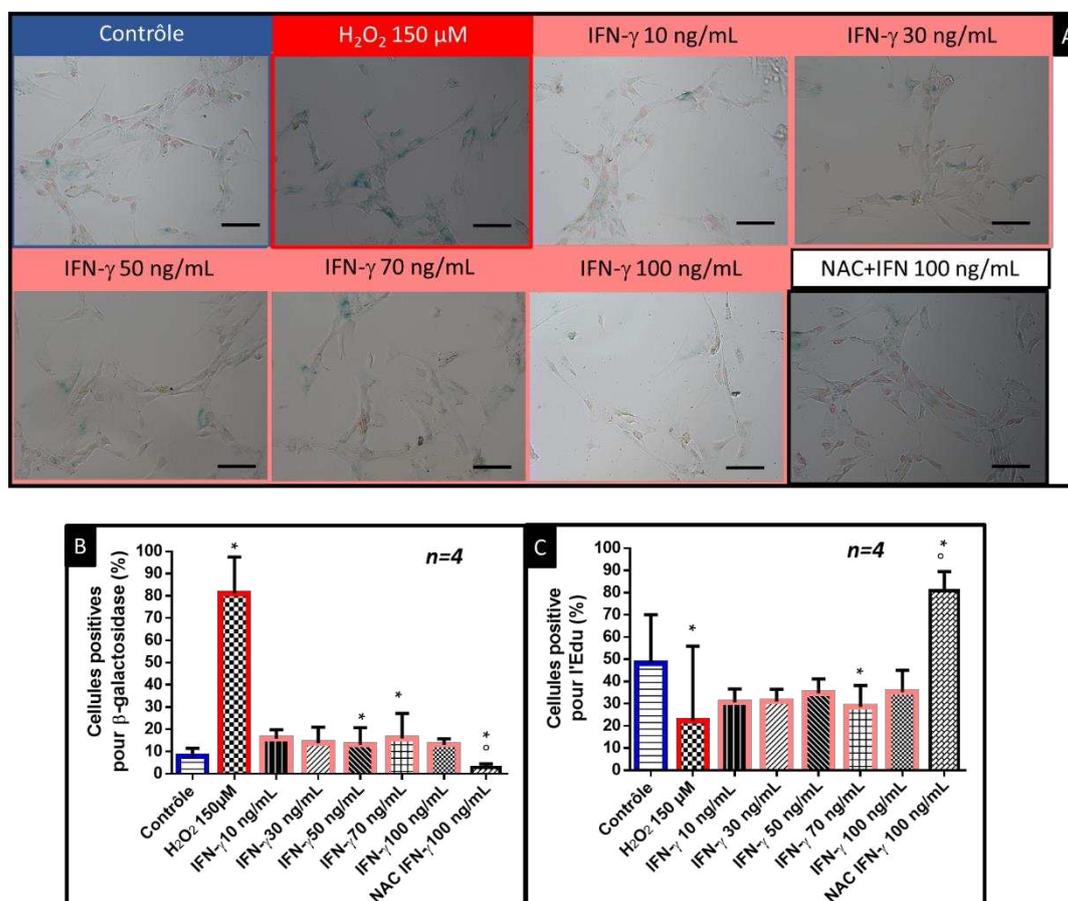


Figure 4 : Effet de la stimulation par de l'interféron- γ sur la sénescence des CSM-GW amplifiées en hypoxie avec du lysat plaquettaire humain (LPH) à passage précoce

Les CSM de gelée de Wharton (CSM-GW) cultivées jusqu'au passage 3 en hypoxie ont été trypsinées avant d'être ensemencées à 1000 cellules/cm² au passage suivant. Après 5 jours de culture, les CSM-GW ont été soumises à différentes stimulations : concentrations croissantes en interféron- γ (IFN- γ) (10 à 100 ng/mL (*rose saumon*) pendant 48 heures, H₂O₂ 150 μ M (peroxyde d'hydrogène) (*rouge*) pendant 2 heures seul ou avec éventuellement un prétraitement de 2 heures avec de la N-acétylcystéine (NAC) 10 mM suivi d'une stimulation par IFN- γ à 100ng/mL (*noir*) puis maintien en culture pendant 48 heures (*contrôle en bleu*). Au jour 7, les CSM-GW sont trypsinées et remises en culture pour le test de sénescence. Photographie des cellules au microscope inversé (Leica DMI3000B, échelle 100 μ m) après le test de sénescence (A) : précipité bleu (X-gal) et cellules positives à l'Edu (noyaux rouges). Analyse des images (n=4), représentation du pourcentage de cellules sénescents (positives au marquage X-Gal et négatives à l'Edu) (B) et en prolifération (positives à l'Edu) (C) Les noyaux ont été marqués au DAPI afin de déterminer le nombre de cellules totales. L'analyse statistique a été réalisée à l'aide du logiciel graphpad, grâce à un test t ($p < 0.05$) (* versus contrôle ; ° versus IFN- γ 100 ng/mL).

**Annexe 4 : Revue ; Aging of bone marrow mesenchymal stromal/stem cells:
Implications on autologous regenerative medicine**

Aging of bone marrow mesenchymal stromal/stem cells: Implications on autologous regenerative medicine

N. Charif^{a,b}, Y.Y. Li^{a,b}, L. Targa^{a,b}, L. Zhang^{b,d}, J.S. Ye^{b,d}, Y.P. Li^{b,e}, J.F. Stoltz^{a,b,c}, H.Z. Han^{b,f} and N. de Isla^{a,b,*}

^a CNRS-UL, UMR 7365, IMoPA, Faculté de Médecine, Vandoeuvre-lès-Nancy, France

^b CNRS – GDRI 0851, France-Chine « Stem cells and Regenerative medicine »

^c CHRU de Nancy, Unité de Thérapie Cellulaire et Tissulaire (UTCT) (FR CNRS-INSERM-UL-CHU), Vandoeuvre-Lès-Nancy, France

^d Centre de Recherche Biomedicale, Calmette Hospital, Kunming, China

^e College Médical, Université de Wuhan, Wuhan, Chine

^f Centre de Recherche sur les cellules souches, Beijing et Tianjin, China

Abstract. With their proliferation, differentiation into specific cell types, and secretion properties, mesenchymal stromal/stem cells (MSC) are very interesting tools to be used in regenerative medicine. Bone marrow (BM) was the first MSC source characterized. In the frame of autologous MSC therapy, it is important to detect donor's parameters affecting MSC potency. Age of the donors appears as one parameter that could greatly affect MSC properties. Moreover, *in vitro* cell expansion is needed to obtain the number of cells necessary for clinical developments. It will lead to *in vitro* cell aging that could modify cell properties. This review recapitulates several studies evaluating the effect of *in vitro* and *in vivo* MSC aging on cell properties.

Keywords: Mesenchymal stromal/stem cells, bone marrow, aging, regenerative medicine

*Corresponding author. E-mail: natalia.de-isla@univ-lorraine.fr.

Annexe 5 : Article 1 ; Higher Proliferative Potential of Human Mesenchymal Stromal Cells from Wharton's Jelly Compared to Bone Marrow Is Linked to Decreased Senescence

Higher Proliferative Potential of Human Mesenchymal Stromal Cells from Wharton's Jelly Compared to Bone Marrow Is Linked to Decreased Senescence

Naceur CHARIF^{a,b,1}, Yueying LI^{a,f}, Laurie TARGA^{a,b}, Lei ZHANG^{b,c}, Yinping LI^{b,f}, Didier MAINARD^{a,c}, Jean-François STOLTZ^{a,b,c,d} and Natalia DE ISLA^{a,b,2}

^aCNRS-UL, UMR 7365, IMoPA, Faculté de Médecine, Vandoeuvre-lès-Nancy, France

^bCNRS – GDRI 0851, France-Chine Stem cells and Regenerative medicine

^cCHRU de Nancy

^dUnité de Thérapie Cellulaire et Tissulaire (UTCT), Vandoeuvre-Lès-Nancy, France

^eCentre de Recherche Biomedicale, Calmette Hospital, Kunming, China

^fCollege Médical, Université de Wuhan, Wuhan, Chine

Abstract. Mesenchymal stromal cells (MSC) represent an interesting cell source for cell therapy, nevertheless their use in clinic involve an expansion step which could affect their quality because of replicative aging. Moreover, the proliferation rate depends on the MSC source. This work compares the proliferation kinetics at early and late passage of young and old Bone Marrow MSC (BM-MSC) and Wharton's Jelly MSC (WJ-MSC) to know if senescence could affect their proliferation properties. Phenotype, cell cycle analysis, relative size and cell structure determination were performed by flow cytometry. Senescence was estimated by β -Galactosidase activity. Immunofluorescent staining was performed for proliferation antigen Ki67, protection enzyme against oxidative stress superoxide dismutase 2 (SOD2) and cytoskeleton. Results showed better proliferation properties for WJ-MSC compared to young and old BM-MSC. For WJ-MSC the high proliferation rate was linked to a lower senescent cells percentage and SOD2 expression. On the contrary, old BM-MSC have a low proliferation rate linked to an increase in G0/G1 cell cycle phase, an increase in cell size, a higher senescent cells percentage and SOD2 expression. The comprehension of the process of MSC proliferation and the development of strategies to prevent senescence could help to improve therapeutic efficacy.

Keywords. Mesenchymal stem cells, bone-marrow, Wharton Jelly, WJ-MSC, senescence, proliferation

1. Introduction

Mesenchymal stromal cells (MSC) are mesodermal cells present in adult (like bone marrow, BM-MSC) or fetal tissues (like Wharton's Jelly, WJ-MSC), characterized by their capacity of self-renewal and differentiation into specific cells types like chondrocytes, osteocytes, adipocytes [1] or even hepatocytes and neuronal cells [2,3]. They can be identified by the presence or the absence of several markers at their surface. For example, these cell are positive for CD90, CD73 or CD105 and negative for CD45, CD34 or HLA-DR [4]. Moreover, numerous data indicate immunoregulatory properties as a key feature of MSC [5–8].

Because of their interesting immunomodulatory properties, MSC are proposed to be used for cell therapy applications [9,10]. Despite the fact there are different sources of MSC, BM is the better characterized one. However, recent studies have evocated a decrease in proliferation and clonogenicity when donor's age increases [11–15]. That's why some studies suggested to use WJ-MSC for clinical applications because of their high *in vitro* proliferation rate [16,17].

Address for correspondence:

¹ Naceur Charif, CNRS, UMR 7365 IMoPA, Vandoeuvre-lès-Nancy, France. E-mail: naceur.charif@univ-lorraine.fr.

² Natalia de Isla, CNRS, UMR 7365 IMoPA, Vandoeuvre-lès-Nancy, France. E-mail: natalia.de-isla@univ-lorraine.fr.

For clinical applications, MSC need to be expanded in order to obtain enough cells which can induce replicative senescence and affect therapeutic efficacy. Senescence is an *in vitro* process which limit cells proliferation [18] and is characterized by an irreversible cell cycle arrest [19]. These cells are characterized by a senescent associated secretory phenotype (SASP) [20] which could affect the non-senescent cells. That's why the aim of this study was to compare the proliferation properties at early (passage 3, P3) and late passage (passage 7, P7) of young and old BM-MSc to WJ-MSc and to know if senescence could affect their proliferation properties. Human BM-MSc were obtained from bone marrow (adult origin) of 7 donors. These donors were distributed in two groups: young (n = 4) and old donors (n = 3). Their proliferation kinetics, cell cycle and morphology were compared to human WJ-MSc from Wharton Jelly of umbilical cord of fetal origin (n = 3) considered as young cells.

2. Materials and Methods

2.1. Cell Culture

The BM-MSc were obtained from the Cell and Tissue Therapy Unit (UTCT) or from the Orthopaedics and Traumatology Unit (COT) of Nancy Hospital from young (n = 4) and old donor (n = 3). The bone marrow suspensions were collected and centrifuged for 10 min at 300 g. After removal of the supernatant, the resulting cell pellet was resuspended in α -MEM supplemented with 10% fetal calf serum (FCS) (Dutscher, France), L-glutamine at 2 mM, penicillin at 10 mU/ml and fungizone at 2.5 μ g/ml and plated at a density of 50×10^3 mononucleated cells/cm² at passage 0 and 1000 MSC/cm² after passage 1 according to Chen et al [21]. The WJ-MSc (n = 3) were extracted from umbilical cords coming from the Regional Maternity according to Capelli et al [22] and cultivated with the same medium. Media were changed every 3 days, and cells were passaged after 70 % of confluence and replated at a density of 1×10^3 cells/cm². At early passage (P3) and late passage (P7), BM-MSc and WJ-MSc were detached from flasks (25 cm²) by trypsin after 1, 2, 3, 4 and 7 days (d) and counted to perform kinetics proliferation. Cellular expansion growth rate was evaluated by number of cells and Doubling time (DT). DT was calculated via the formula: $DT = t/(\log 2[y/m])$, with t – time in culture, y – number of cells at end of culture, m – number of cells at beginning of culture.

2.2. Cell Phenotype by Flow Cytometry

Flow cytometry analysis for phenotype was performed at the end of passage 1 in a flow cytometer (Gallios, Beckman Coulter). For cell surface staining, detached cells were blocked with 1% BSA and incubated with specific fluorescein isothiocyanate-conjugated (FITC) or phycoerythrin-conjugated (PE) monoclonal antibodies from BD-Biosciences. The markers analysed were CD45, CD34, CD73, CD90, CD105 and HLA-DR. FITC- or PE-non-specific IgG were used as isotype matched controls. For each marker, the percentage of antigen positive cells were determined.

2.3. Cell Cycle by Flow Cytometry

The detached BM-MSc and WJ-MSc at d4 (day 4) and d7 (day 7) were washed with PBS before staining for cell cycle analysis by flow cytometry (Gallios, Beckman Coulter). Coulter® DNA PREP™ Reagents kit (Beckman Coulter) was used to stain the cells according to the manufacturers protocol. The different phases (G0/1 and S+G2M) of cell cycle were determined thanks to Gallios software and the median of FSC (Forward Scatter) and SSC (Side Scatter) parameters were used to determine the relative size and granularity of the cells.

2.4. β -Galactosidase Activity

Senescence β -Galactosidase Staining kit (Cell Signaling) was used to assess senescence according to the manufacturers protocol. β -Galactosidase staining is made at suboptimal pH (pH 6.0), only cells that strongly overexpress the enzyme appear with a blue staining in the cytoplasm. DAPI staining was also made to stain all nucleus and

count the total number of cells. The cells were observed using fluorescence microscopy (Leica DMI3000B). At least 30 microscopy images were used to determine the percentage of β -Galactosidase positive cells.

2.5. Immunofluorescence Staining

After seeding at a density of 1×10^3 cells/cm² on coverslips, BM-MSc and WJ-MSc were cultivated for 4 or 7 days. They were then washed with PBS (Phosphate Buffer Saline) and fixed with paraformaldehyde 1% for 10 min. After permeabilization with PBS-Triton 0,5%, the cells were blocked with PBS-BSA 0,5% and washed. The cells were then labelled with primary antibodies (Ki67 (Millipore), SOD2 (Abcam),) or Phalloidin*Alexa488 for 45 minutes. The secondary antibody labelled with Alexa-Fluor® 488 diluted at 1/100 was incubated for 45 minutes. DAPI staining was also made to stain all nucleus and count the total number of cells. The cells were observed using fluorescence microscopy (Leica DMI3000B).

2.6. Statistical Analysis

All data are presented as means \pm standards deviation (SD). One-way ANOVA analysis followed by Tukey's t-test was used for statistical analyses. A p-value less than 0,05 was considered to be statistically significant.

3. Results

3.1. Cell Phenotype

All BM-MSc and WJ-MSc samples express MSC-associated markers CD105, CD73, CD44, CD90 and CD166, while no or very few cells expressed hematopoietic markers (CD34 and CD45), HLA-DR as recommended by the ISCT.

3.2. WJ-MSc and BM-MSc Proliferation

We analysed the potential of proliferation of BM-MSc and WJ-MSc by cell number and doubling time at early (P3) and late passage (P7). The proliferation kinetics tendencies of each group were similar between the P3 and P7. Nevertheless, the proliferation properties were better at P3 compared to P7 for WJ-MSc (DT at P3 = 1 day and at P7 = 2 days) and young BM-MSc (DT at P3 = 2 day and at P7 = 4 days) as shown by proliferation kinetics (Fig. 1) and doubling time (Fig. 2). For old BM-MSc, the doubling time was the same at P3 and P7 (DT = 3,5 days). Moreover, at P3, the cell number at day 7 was more important for WJ-MSc (800 000 cells/flask) than young BM-MSc (between 100 000 and 200 000 cells/flask) than old BM-MSc (below 50000 cells/flask). These results were confirmed by the expression of proliferation antigen Ki67 which was increased for WJ-MSc at d4 (60%) and d7 (40%) compared to young and old BM-MSc (Fig. 3). Moreover, old BM-MSc didn't express Ki67 antigen at d4 or d7 contrary to young BM-MSc (d4 and d7: 20%) (Fig. 3).

3.3. WJ-MSc and BM-MSc Cell Cycle

To explain the proliferation properties, we analysed the G0/G1 (quiescence) and S+G2/M (growth) phases of WJ-MSc and young/old BM-MSc. Results showed an increase in the percentage of G0/G1 for WJ-MSc and young BM-MSc at d7 (80%) versus d4 (60%) for all samples. For old BM-MSc, the high percentage of G0/G1 was observed at d4 and d7 (> 80%) (Fig. 4). These results were in relationship with the expression of proliferation antigen Ki67 (Fig. 3).

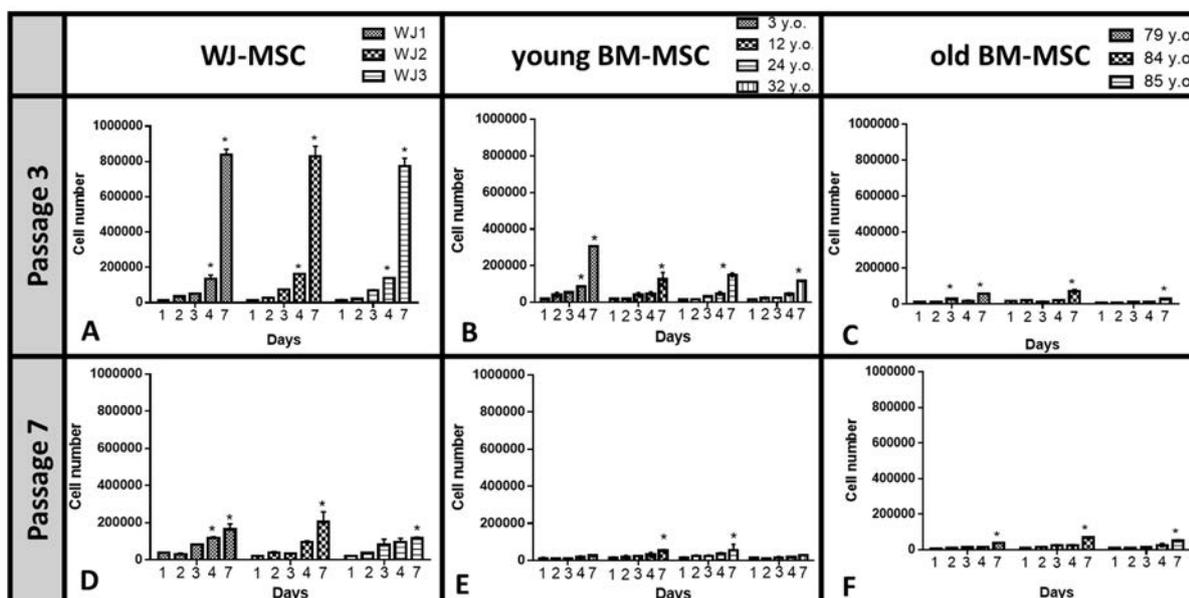


Figure 1. Proliferation kinetics at early (P3) and late (P7) passage for WJ-MSC and young/old BM-MSC. After seeding, MSC were cultivated during 7 days. The cell number was determined after trypsinization at days 1, 2, 3, 4 and 7. The proliferation kinetics is presented at passage 3 and 7 for WJ-MSC (A (P3), D (P7)) for young BM-MSC (B (P3), E (P7)) and old BM-MSC (C (P3), F (P7)). $p < 0,05$ versus day 1 (*).

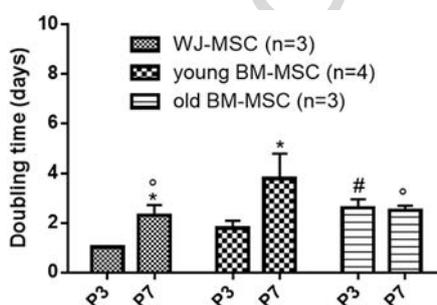


Figure 2. Doubling time at early (P3) and late (P7) passage for WJ-MSC and young/old BM-MSC: The doubling time is represented at passage 3 and 7 for WJ-MSC (n = 3) for young BM-MSC (n = 4) and old BM-MSC (n = 3) at day 4 (d4) and 7 (d7) ater seeding. Results are expressed by mean \pm SD. $P < 0,05$ versus P3 (*), versus P3 WJ-MSC (#) and versus P3 young BM-MSC (°).

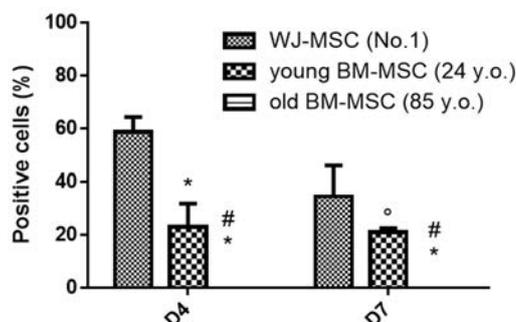


Figure 3. Percentage of Ki67 positive cells at early passage (P3) for WJ-MSC and young/old BM-MSC at day 4 and 7 of culture: The percentage of cells expressing Ki67 was calculated from images obtained by fluorescent microscopy DMI3000B (Leica) for WJ-MSC, young BM-MSC and old BM-MSC after 4 or 7 days of culture at passage 3. Between 5 and 10 images by condition are taken and results are expressed by mean \pm SD. $P < 0,05$ versus WJ-MSC (*), versus young BM-MSC (#) and versus D4 (°).

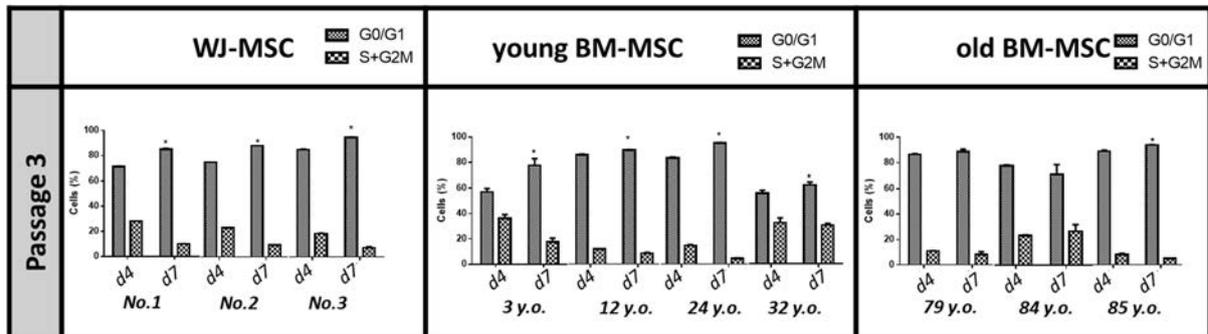


Figure 4. Cell cycle at early passage (P3) for WJ-MSC and young/old BM-MSC at day 4 and 7 of culture: The G0/G1 and S+G2M phases of cell cycle are presented at passage 3 for WJ-MSC (n = 3) for young BM-MSC (n = 4) and old BM-MSC (n = 3). Results are expressed by mean \pm SD. $p < 0,05$ versus d4 (*).

3.4. WJ-MSC and BM-MSC Morphology

During the expansion, we observed for WJ-MSC and young/old BM-MSC characteristic for MSC-like spindle-shape, however WJ-MSC and young BM-MSC showed a thinner shape and elongated compared to wider old BM-MSC at passage 3 (Fig. 5A). These morphological changes were also confirmed by flow cytometry analysis of forward scatter (FSC) and side scatter (SSC) after 7 days of culture (Fig. 5B). At P3, the relative size (FSC) increases for old BM-MSC compared to young BM-MSC. For WJ-MSC, young or old BM-MSC group we didn't observe any differences for relative size between P7 and P3 (Fig. 5B). Nevertheless, the relative structure (SSC) increases for young and old BM-MSC compared to WJ-MSC. Moreover, we observed a tendency for the SSC parameters, which increase for each group at P7 versus P3 (Fig. 5B).

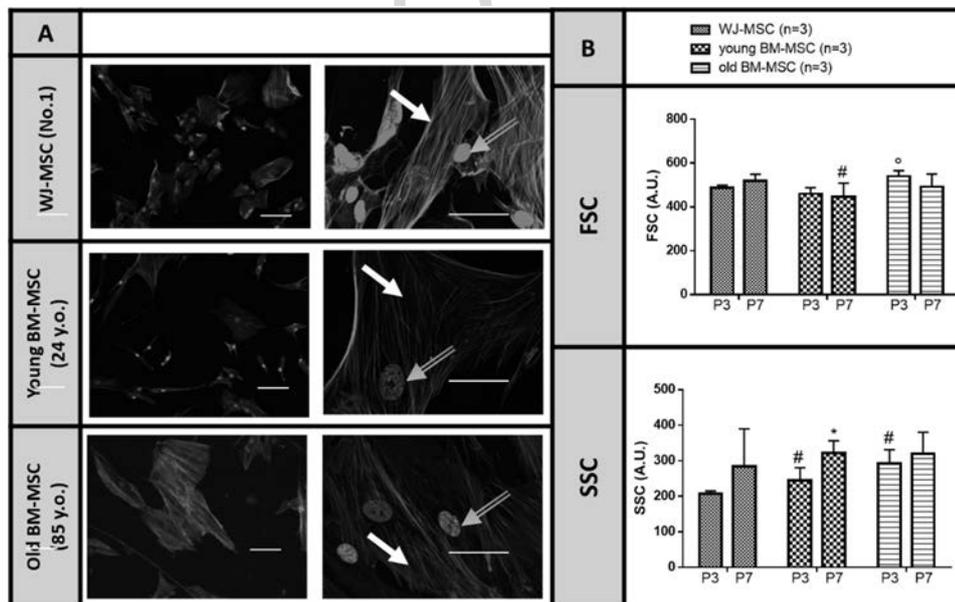


Figure 5. Cytoskeleton staining (A) and SSC and FSC at early (P3) and late (P7) passage (B) for WJ-MSC and young/old BM-MSC after 7 days of culture: Images of cytoskeleton obtained by fluorescent microscopy DMI3000B (Leica) for WJ-MSC, young BM-MSC and old BM-MSC after 7 days of culture at passage 3. Scale bar = 100 μ m (A). The SSC and FSC parameters obtained by flow are represented at passage 3 and 7 for WJ-MSC (n = 3) for young BM-MSC (n = 3) and old BM-MSC (n = 3) (B). Results are expressed by mean \pm SD. $P < 0,05$ versus P3 (*), versus WJ-MSC (#) and versus young BM-MSC (°).

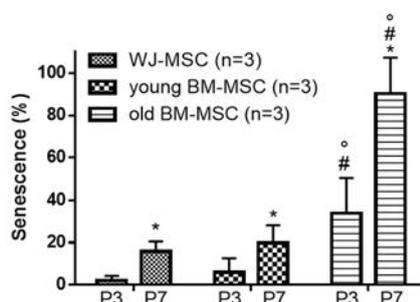


Figure 6. Senescence at early (P3) and late passage (P7) for WJ-MSC and young/old BM-MSC at day 4 of culture. After 4 days of culture a senescence test (β -galactosidase activity) was performed at early passage (P3) and later passage (P7) for WJ-MSC, young BM-MSC and old BM-MSC. Transmitted light images of blue staining specific of senescent cells, dapi staining images for quantifying the total cell number were taken by fluorescent microscope DMI3000B (Leica) for WJ-MSC, young BM-MSC and old BM-MSC were taken in order to calculate the percentage of senescent cells after 4 or 7 days of culture at passage 3 and 7. 15 images by condition were taken. Results are expressed as mean \pm SD. $p < 0,05$ versus P3 (*), versus young BM-MSC (#) and versus WJ-MSC (°).

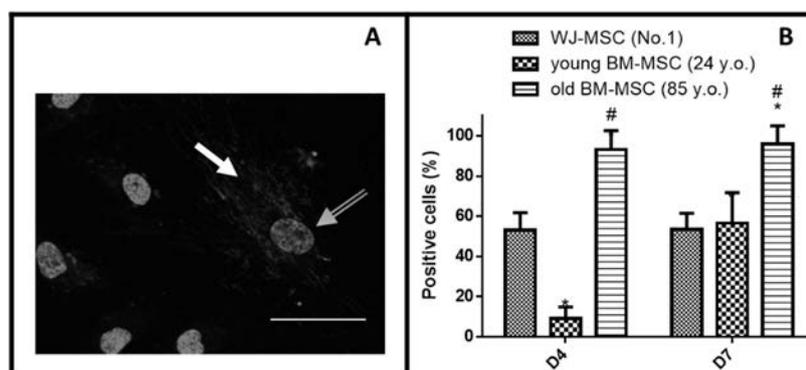


Figure 7. SOD2 expression at early passage (P3) for WJ-MSC and young/old BM-MSC at day 4 and 7 of culture: Image of SOD2 mitochondrial expression (white arrow) and nucleus stained with dapi (gray arrow) obtained by fluorescent microscopy DMI3000B (Leica) for young BM-MSC (24 y.o.) after 4 days of culture at passage 3. Scale bar = 100 μ m (A) The percentage of cells which express SOD2 at passage 3 after 4 and 7 days of culture for WJ-MSC, young BM-MSC and old BM-MSC is represented on graph (B). Results are expressed by mean \pm SD. $P < 0,05$ versus WJ-MSC (*), versus young BM-MSC (#) and versus D4 (°).

3.5. Senescence of MSC Is Dependent on Cell Source and Passage

As illustrated in Fig. 6, the senescence percentage is low at P3 for WJ-MSC and young BM-MSC, but increases at P7. Moreover, at P3, we observed no significant differences for the senescence percentage between WJ-MSC and young BM-MSC. We made the same observation at P7. For old BM-MSC, the senescence percentage is quite high at P3 (50%) compared to young BM-MSC and WJ-MSC. This percentage significantly increases at P7 (90%) compared to P3.

3.6. WJ-MSC and BM-MSC SOD2 Expression

The immunofluorescent staining of the protection enzyme against oxidative stress, SOD2, showed that this protein is expressed by WJ-MSC and young/old BM-MSC in mitochondria (Fig. 7B).

Nevertheless, the percentage of cells which express SOD2 is more important for old BM-MSC compared young BM-MSC and WJ-MSC (Fig. 7B).

4. Discussion

Mesenchymal stromal cells represent one of the most promising tools in cellular therapy because of their immune regulatory properties and regenerative potential. Many clinical trials use MSC from bone marrow, nevertheless procurement of BM-MSC involves a painful and potentially iatrogenic bleeding and these cells, of adult origin, have lower proliferation properties than fetal sources like WJ [16,23]. Nevertheless, MSC quality could be affected by chronological aging linked to donor parameters [11] or replicative aging linked to the *in vitro* expansion. In this study, we investigated the impact of MSC sources and aging on MSC proliferation and senescence in order to know if senescence could affect proliferation of MSC.

Thanks to proliferation kinetics we confirm our previous results [11] showing that old BM-MSC proliferate more slowly than cells from young donors which was consistent with previous studies reported in the literature [24,25]. We also confirmed differences concerning the proliferation capacities of WJ-MSC and BM-MSC as described before [16,23,26]. In this study, we showed that WJ-MSC have a higher proliferative potential than BM-MSC which is linked to cellular senescence. In fact, at early passage (P3) and late passage (P7) WJ-MSC have better proliferation properties than young and old BM-MSC (Fig. 1). Nevertheless, WJ-MSC and young BM-MSC proliferate faster at early passage, contrary to old BM-MSC which proliferate slowly at early and late passage (Fig. 1). These results were confirmed by doubling time calculations (Fig. 2) and the expression of proliferation antigen Ki67 (Fig. 3). The expression of Ki67 is strongly associated with tumor cell proliferation and growth [27], that's why we could imagine to use this biomarker to select the MSC with the best proliferation properties. Moreover, we showed in a previous work that BM-MSC can form colonies at early passage (passage 1), but this clonogenicity decreases for old BM-MSC versus young BM-MSC [11]. According to these results, it will be interesting to study the clonogenicity of young/old BM-MSC and WJ-MSC with expansion.

The cell cycle analysis confirms the low proliferation properties of old BM-MSC which have a high level percentage of cells in G0/G1 phase (Fig. 4). We can suppose that this high level is linked to the expression cell cycle inhibitors like P16 [19,28], P21 or P53 [29,30], because in G0/G1 phase, cells do not divide. Another study showed that the expression of transcription FOXO3 inhibits BM-MSC cell cycle by increasing the cell percentage in G0/G1 phase in order to enable chondrocyte differentiation [31], suggesting that FOXO3 is implicated in MSC cell cycle arrest.

During cell expansion, morphological differences were observed between old BM-MSC and young BM-MSC/WJ-MSC. Old BM-MSC are bigger and contains more granules than young BM-MSC and WJ-MSC. These observations were confirmed by cytoskeleton staining at early passage (P3) (Fig. 5) and FSC/SSC parameters at early (P3) and late (P7) passages (Fig. 5). It is shown in the literature that senescent phenotype is characterised by growth arrest in the G1 phase of the cell cycle, enlarged or flattened morphology, increased expression of senescence-associated β -galactosidase (SA- β -gal) [28]. That's why we analysed β -galactosidase activity and we showed that at early passage, WJ-MSC and young BM-MSC are less senescent than old BM-MSC and this senescent increases for the three groups of MSC at late passage (Fig. 6). We note also that at early and late passage, the old BM-MSC with lower proliferation properties (Figs 1 and 2) are the most senescent (Fig. 6). Senescence could be induced by many stimuli like dysfunctional telomeres, non-telomeric DNA damage, chromatin perturbations and other non-genotoxic stresses or even strong mitogenic signals [28]. Some works showed that long-term cultured human BM-MSC undergo replicative senescence [32–35], but few compare the replicative senescence of young/old BM-MSC and WJ-MSC in the same study. In this work, we showed that WJ-MSC undergo replicative senescence more slowly than young/old BM-MSC. It will be interesting to compare the secretory phenotype of BM-MSC and WJ-MSC, because it is known secretory phenotype of senescent cells could lead to a decrease in BM-MSC proliferation properties [36].

Many reports found that MSCs exposed to oxidative stress are able to undergo stress-induced premature senescence *in vitro* [37] and that ROS accumulation in MSC contributes to the loss of homeostasis, leading to senescence [38]. Oxidative stress (OS) is defined as an imbalance between the production of free radicals and antioxidants [28,37,38]. In this study we showed that the protection enzyme against OS, the superoxide dismutase 2 (SOD2) is more expressed in old BM-MSC compared to young BM-MSC and WJ-MSC (Fig. 7), which could suggest that either old BM-MSC protect themselves from OS or that there is more OS in the microenvironment. Even it is difficult to conclude if replicative aging of MSC reflects its *in vivo* ageing [1], these results suggest to

check the senescence or free radicals' levels of MSC in order to know if it could affect their functional properties like immunomodulation. Indeed, it is important to clarify the factors which may influence their immunomodulatory functions [8]. Some work suggest to use strategies to prevent senescence efficacy like antioxidants [39], or caloric restriction [40]. We can imagine to use these strategies in order to improve therapeutic efficacy.

5. Conclusion

In conclusion, this study showed that the effect of donor's age and sources on the proliferation capacity of MSC is linked to senescence. Indeed, it will be interesting to understand if the MSC senescent phenotype could affect the MSC functional properties. The comprehension of molecular mechanisms involved in this process could help to improve the clinical application of mesenchymal stromal cells.

Acknowledgements

This work was supported in part by a research funding from Loraine Region and Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS – GDR1 0851, *France-Chine Stem cells and Regenerative medicine*).

We thank Dr. Huguette LOUIS from Cytometry core facility of UMS2008 IBSLor UL-CNRS-INSERM for cell phenotype and cell cycle analysis.

References

- [1] Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, Jaiswal RK, Douglas R, Mosca JD, et al. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science*. 2 avr 1999; 284(5411):143–7.
- [2] Zhang L, Ye J-S, Decot V, Stoltz J-F, de Isla N. Research on stem cells as candidates to be differentiated into hepatocytes. *Biomed Mater Eng*. 2012; 22(1–3):105–11.
- [3] Ye J-S, Su X-S, Stoltz J-F, de Isla N, Zhang L. Signalling pathways involved in the process of mesenchymal stem cells differentiating into hepatocytes. *Cell Prolif*. avr 2015; 48(2):157–65.
- [4] Dominici M, Le Blanc K, Mueller I, Slaper-Cortenbach I, Marini FC, Krause DS, et al. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy*. 2006; 8(4):315–7.
- [5] Ménard C, Tarte K. Immunosuppression and mesenchymal stem cells: back to the future. *Médecine Sci MS*. mars 2011; 27(3):269–74.
- [6] Khosravi M, Karimi MH, Hossein Aghdaie M, Kalani M, Naserian S, Bidmeshkipour A. Mesenchymal stem cells can induce regulatory T cells via modulating miR-126a but not miR-10a. *Gene*. 5 sept 2017; 627:327–36.
- [7] Yoo KH, Jang IK, Lee MW, Kim HE, Yang MS, Eom Y, et al. Comparison of immunomodulatory properties of mesenchymal stem cells derived from adult human tissues. *Cell Immunol*. 2009; 259(2):150–6.
- [8] Qu G, Xie X, Li X, Chen Y, Isla ND, Huselstein C, et al. Immunomodulatory function of mesenchymal stem cells: regulation and application. *J Cell Immunother*. 1 sept 2018; 4(1):1–3.
- [9] Giebel B, Kordelas L, Börger V. Clinical potential of mesenchymal stem/stromal cell-derived extracellular vesicles. *Stem Cell Investig*. 2017; 4:84.
- [10] Laroye C, Lemarié J, Boufenzar A, Labroca P, Cunat L, Alauzet C, et al. Clinical-grade mesenchymal stem cells derived from umbilical cord improve septic shock in pigs. *Intensive Care Med Exp*. 8 août 2018; 6(1):24.
- [11] Li Y, Charif N, Mainard D, Bensoussan D, Stoltz J-F, de Isla N. Donor's age dependent proliferation decrease of human bone marrow mesenchymal stem cells is linked to diminished clonogenicity. *Biomed Mater Eng*. 2014; 24(1 Suppl):47–52.
- [12] Charif N, Li YY, Targa L, Zhang L, Ye JS, Li YP, et al. Aging of bone marrow mesenchymal stromal/stem cells: Implications on autologous regenerative medicine. *Biomed Mater Eng*. 2017; 28(s1):S57–63.
- [13] Baker N, Boyette LB, Tuan RS. Characterization of bone marrow-derived mesenchymal stem cells in aging. *Bone*. janv 2015; 70:37–47.
- [14] Stolzing A, Jones E, McGonagle D, Scutt A. Age-related changes in human bone marrow-derived mesenchymal stem cells: consequences for cell therapies. *Mech Ageing Dev*. mars 2008; 129(3):163–73.
- [15] Dexheimer V, Mueller S, Braatz F, Richter W. Reduced reactivation from dormancy but maintained lineage choice of human mesenchymal stem cells with donor age. *PLoS One*. 2011; 6(8):e22980.
- [16] El Omar R, Beroud J, Stoltz J-F, Menu P, Velot E, Decot V. Umbilical cord mesenchymal stem cells: the new gold standard for mesenchymal stem cell-based therapies? *Tissue Eng Part B Rev*. oct 2014; 20(5):523–44.
- [17] Reppel L, Margossian T, Yaghi L, Moreau P, Mercier N, Leger L, et al. Hypoxic culture conditions for Mesenchymal Stromal/Stem Cells from Wharton's jelly: a critical parameter to consider in a therapeutic context. *Curr Stem Cell Res Ther*. 2014; 9(4):306–18.
- [18] Hayflick L. The limited in vitro lifetime of human diploid cell strains. *Exp Cell Res*. mars 1965; 37:614–36.
- [19] Campisi J. Senescent cells, tumor suppression, and organismal aging: good citizens, bad neighbors. *Cell*. 25 févr 2005; 120(4):513–22.

- [20] Coppé J-P, Desprez P-Y, Krtolica A, Campisi J. The senescence-associated secretory phenotype: the dark side of tumor suppression. *Annu Rev Pathol.* 2010; 5:99–118.
- [21] Chen HH, Decot V, Ouyang JP, Stoltz JF, Bensoussan D, de Isla NG. In vitro initial expansion of mesenchymal stem cells is influenced by the culture parameters used in the isolation process. *Biomed Mater Eng.* 2009; 19(4–5):301–9.
- [22] Capelli C, Gotti E, Morigi M, Rota C, Weng L, Dazzi F, et al. Minimally manipulated whole human umbilical cord is a rich source of clinical-grade human mesenchymal stromal cells expanded in human platelet lysate. *Cytotherapy.* août 2011; 13(7):786–801.
- [23] Reppel L, Margossian T, Yaghi L, Moreau P, Mercier N, Leger L, et al. Hypoxic culture conditions for Mesenchymal Stromal/Stem Cells from Wharton's jelly: a critical parameter to consider in a therapeutic context. *Curr Stem Cell Res Ther.* 2014; 9(4):306–18.
- [24] Zaim M, Karaman S, Cetin G, Isik S. Donor age and long-term culture affect differentiation and proliferation of human bone marrow mesenchymal stem cells. *Ann Hematol.* août 2012; 91(8):1175–86.
- [25] Siegel G, Kluba T, Hermanutz-Klein U, Bieback K, Northoff H, Schäfer R. Phenotype, donor age and gender affect function of human bone marrow-derived mesenchymal stromal cells. *BMC Med.* 2013; 11:146.
- [26] Baksh D, Yao R, Tuan RS. Comparison of Proliferative and Multilineage Differentiation Potential of Human Mesenchymal Stem Cells Derived from Umbilical Cord and Bone Marrow. *STEM CELLS.* 1 juin 2007; 25(6):1384–92.
- [27] Li LT, Jiang G, Chen Q, Zheng JN. Ki67 is a promising molecular target in the diagnosis of cancer (review). *Mol Med Rep.* mars 2015; 11(3):1566–72.
- [28] Campisi J, d'Adda di Fagagna F. Cellular senescence: when bad things happen to good cells. *Nat Rev Mol Cell Biol.* sept 2007; 8(9):729–40.
- [29] Wilson A, Shehadeh LA, Yu H, Webster KA. Age-related molecular genetic changes of murine bone marrow mesenchymal stem cells. *BMC Genomics.* 2010; 11:229.
- [30] Campisi J. Fragile fugue: p53 in aging, cancer and IGF signaling. *Nat Med.* mars 2004; 10(3):231–2.
- [31] Guérit D, Brondello J-M, Chuchana P, Philipot D, Toupet K, Bony C, et al. FOXO3A regulation by miRNA-29a Controls chondrogenic differentiation of mesenchymal stem cells and cartilage formation. *Stem Cells Dev.* 1 juin 2014; 23(11):1195–205.
- [32] Jeong S-G, Cho G-W. Endogenous ROS levels are increased in replicative senescence in human bone marrow mesenchymal stromal cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 15 mai 2015; 460(4):971–6.
- [33] Heo J-Y, Jing K, Song K-S, Seo K-S, Park J-H, Kim J-S, et al. Downregulation of APE1/Ref-1 is involved in the senescence of mesenchymal stem cells. *Stem Cells Dayt Ohio.* juin 2009; 27(6):1455–62.
- [34] Stenderup K, Justesen J, Clausen C, Kassem M. Aging is associated with decreased maximal life span and accelerated senescence of bone marrow stromal cells. *Bone.* déc 2003; 33(6):919–26.
- [35] Wagner W, Horn P, Castoldi M, Diehlmann A, Bork S, Saffrich R, et al. Replicative senescence of mesenchymal stem cells: a continuous and organized process. *PLoS One.* 2008; 3(5):e2213.
- [36] Severino V, Alessio N, Farina A, Sandomenico A, Cipollaro M, Peluso G, et al. Insulin-like growth factor binding proteins 4 and 7 released by senescent cells promote premature senescence in mesenchymal stem cells. *Cell Death Dis.* 2013; 4:e911.
- [37] Benameur L, Charif N, Li Y, Stoltz J-F, de Isla N. Toward an understanding of mechanism of aging-induced oxidative stress in human mesenchymal stem cells. *Biomed Mater Eng.* 2015; 25(1 Suppl):41–6.
- [38] Li Y, Wu Q, Wang Y, Li L, Bu H, Bao J. Senescence of mesenchymal stem cells (Review). *Int J Mol Med.* avr 2017; 39(4):775–82.
- [39] Lin T-M, Tsai J-L, Lin S-D, Lai C-S, Chang C-C. Accelerated growth and prolonged lifespan of adipose tissue-derived human mesenchymal stem cells in a medium using reduced calcium and antioxidants. *Stem Cells Dev.* févr 2005; 14(1):92–102.
- [40] Fontana L, Nehme J, Demaria M. Caloric restriction and cellular senescence. *Mech Ageing Dev.* 2018; 176:19–23.

Annexe 6 : Poster avec publication ; Impact of culture conditions on the behavior of mesenchymal STROMAL/STEM cells: choosing critical parameters related to cell quality and immunomodulation properties

hematology department of Saint Antoine Hospital. The cells will be prepared in two production centers (EFS Mondor and CTSA). Treatment is a suspension of allogeneic MSCs. Eligible patients must have a grade greater than 2 for rectoragya or hematuria at inclusion and absence of active cancer. Each patient receives 3 injections of MSCs at 7-day intervals. Patients will be followed up over a 12-month period. The main objective is a decrease of one grade on the LENT SOMA scale for rectorrhagia or hematuria. The secondary objective is to reduce the frequency of diarrhea; analgesic consumption, pain and improved quality of life.

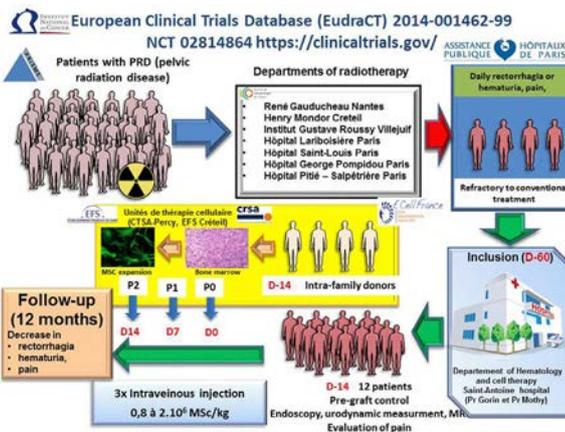
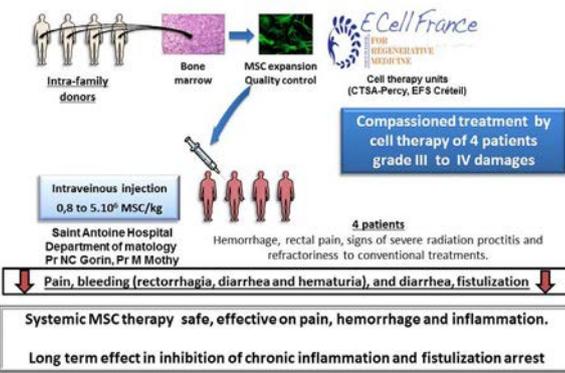
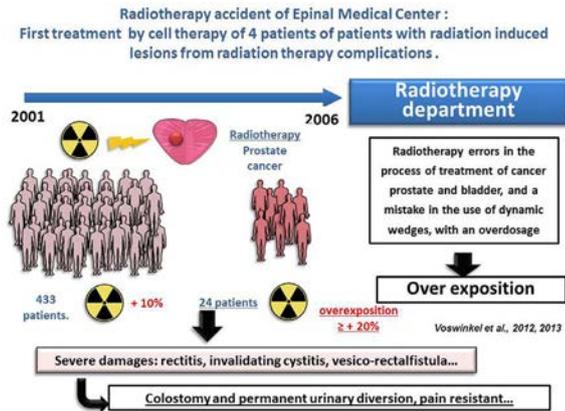


Table
Clinical status and cell therapy treatment of four patients suffering from severe pelvic side effects

Dose plan	Dose received	Pathology induced by over-irradiation	Treatment after radiotherapy	Source MSC & treatment	Observations
78Gy prostate cavity	93,2 Gy	Urine loss in rectum Polakisuria Emictional pain Bleeding Large necrotic zone Fistula in prostate cavity	Colostomy Suprapubic Catherization	5.106 MSC/Kg Intravenous Donor niece	Pain disappeared 10 days after injection and reappeared 3 weeks later
73Gy prostate cavity	91 Gy	Chronic pain -Permanent rectal bleeding -Retracted urinary bladder, -Active cystitis and rectitis Decomposition of the bladder-prostate bond as well as a recto-prostatic fistula	Discharging colostomy Application of a Foley's urinary tube	2.6.106 MSC/Kg Intravenous Donor son 0.82.106MSC/Kg (6 months latter) Intra-venous Donor son	Pain and bleeding disappeared 4 weeks after injection and relapse 6 month latter Pain and bleeding partially disappeared and relapse 3 month latter
69 Gy prostate cavity	86 Gy	Reduced capacity of bladder due to strongly enlarged walls Atrophy of the seminal glands and fatty conversion by irradiation of the sacral spine	Discharging colostomy followed by 20 sessions of hyperbar oxygen therapy	2.6.106 MSC/Kg Intravenous Donor daughter	6 months later clinical response with reduction of analgesic therapy
70 Gy prostate cavity	78 Gy	Rectorrhagia to grade 3 and diarrhea of grade 2. Cystitis of grade 1, associated by polakisuria grade 1 Pain permanently on 3-4 on the EVA pain scale, accompanied by pain crisis appearing once to twice per week growing up to EVA 6-7.	Discharging colostomy followed by 20 sessions of hyperbar oxygen therapy	1.86.106 MSC/Kg Intravenous Donor son 2.4.106MSC/Kg (7 days latter) Intra-venous Donor son	6 months later clinical response Stable reduction of diarrhea and bleeding, pain Improvement of the quality of life

Between 1987 and 2006, the radiotherapy department of the Jean Monnet Hospital in Epinal, France, had a series of mistakes leading to overexposure of many patients. For prescribed doses of 69 Gy to 78 Gy, 24 patients with prostate cancer received total doses between 81 Gy to 120 Gy, corresponding to overexposure of 13% to 54%. Twelve patients were seriously injured. They developed pelvic necrosis, and vesico-rectal fistula, requiring colostomy and permanent urinary diversion. Seven patients have CTCAE v3 grade 3 or 4 rectal complications, and 4 patients have grade 1 proctitis and cystitis. Ten patients died of pelvic necrosis. In four patients, the association of hemorrhage, rectal pain, signs of severe radiation proctitis and refractoriness to symptomatic treatments suggested that these patients could benefit from MSC transplantation. Before, one month and six months after MSC therapy the clinical parameters pain, hemorrhage and fistulization (Magnet resonance imaging MRI and colonoscopy) were evaluated. At baseline patient's diary was handed to the patient for the follow-up (rectorrhagia, diarrhea and hematuria, pain, drug-consumption, every day evaluation of pain (EN pain); questionnaires to evaluate the quality of life was handed out to the patient HADS, SF36, LENT-SOMA scale. MSC were obtained by culture from bone marrow (BM) aspirates of their children. A quantity of between 0.8 × 10⁶ and 6 × 10⁶ MSC per Kg body weight of the recipient were administered to the patient by intravenous infusion. For biological security the following biological tests had been performed on the cell products: Cell count, viability, functional cell test CFU-F, phenotyping by flow-cytometry, sterility-testing (bacteriology, fungi, mycoplasmas) cariotype and telomerase activity. For liberation criteria were demanded: cellular viability > 80% for the non-frozen product, normal cariotype and sterile cultures. The patient was hospitalized for the night following the MSC infusion and could check out if the physical examination and the laboratory controls were normal.

115

Impact of culture conditions on the behavior of mesenchymal STROMAL/STEM cells: choosing critical parameters related to cell quality and immunomodulation properties

N. Charif^{1,*}, M. EL Ouafy¹, D. Ghannoum¹, G. Cauchois¹, L. Reppel², N. de Isla¹

¹ CNRS-UL UMR 7365 IMoPA, Campus Brabois-Santé, Vandœuvre-Lès-Nancy, France; ² Unité de Thérapie Cellulaire et Tissulaire (UTCT), Vandœuvre-Lès-Nancy, France

Background & Aim Mesenchymal Stromal/Stem Cells (MSC) are a heterogeneous population of self-renewal multipotent cells which can be obtained from adult sources (Bone Marrow MSC (BMMSC)) and fetal

sources (Wharton Jelly MSC (WJMSC)). MSC are a very interesting tool for tissue engineering because of their differentiation properties and for cell therapy because of their immunomodulation properties. Indeed, MSC secrete soluble factors which can modulate the immune response.

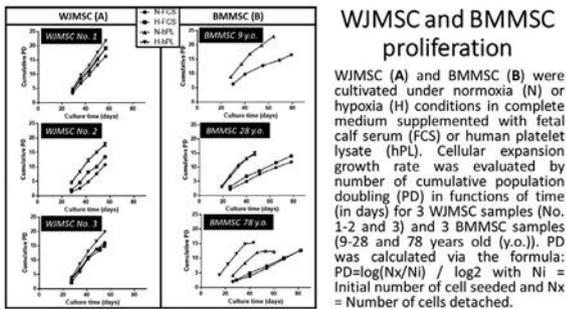
Before their clinical use, an *in vitro* expansion step must be performed in order to obtain the sufficient dose. However, this expansion step could affect MSC quality and need to be controlled in order to increase the therapeutic efficacy.

The first challenge was to optimize the culture conditions and to choose the most appropriate media for the MSC culture to ensure that they retain their functional properties and thus their therapeutic potential. The second challenge was to know the impact of *in vitro* expansion on MSC functional properties.

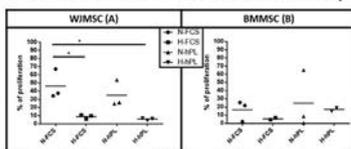
Methods, Results & Conclusion We firstly studied the impact of culture conditions (normoxia (N), hypoxia (H), fetal calf serum (FCS) supplement, human platelet lysate (hPL) supplement) on the behavior of MSC. Our results showed that better proliferation properties were obtained for MSC expanded with human platelet lysate (hPL) in hypoxia for WJMSC and in normoxia for BMMSC. Moreover, we observed that WJMSC and BMMSC expanded with hPL have better clonogenicity and are less senescent. Using neutralizing antibodies, we confirmed the involvement of high concentration of growth factors (PDGF, EGF, ...) in hPL in WJMSC proliferation properties. The main surface markers and differentiation capacities were found to be equivalent for WJMSC and BMMSC for the different culture conditions.

We secondly studied the impact of *in vitro* expansion on MSC immunomodulation properties. We showed that WJMSC and BMMSC expanded in hypoxia have better immunosuppressive properties when they are co-cultivated with CD4+ T cells and that senescence and interferon- γ (IFN- γ) stimulation could affect the MSC immunomodulatory properties.

To conclude MSC expansion with hPL gives better clonogenicity properties and better proliferation properties in normoxia for BMMSC and in hypoxia for WJMSC without affecting surface markers and differentiation properties. Moreover, WJMSC expanded in hypoxia with hPL with low senescence are more immunosuppressive. This property can be improved by IFN- γ stimulation.



WJMSC and BMMSC immunomodulatory properties



MSC were cultivated under normoxia (N) or hypoxia (H) conditions in complete medium supplemented with fetal calf serum (FCS) or human platelet lysate (hPL) until passage 3 for WJMSC (A) or passage 2 for BMMSC (B). 50 000 MSC were co-cultivated either with 50 000 CD4+ T cells (ratio 1:1) activated by mouse anti-human CD3 and mouse anti-human CD28 like an allogenic context for immunosuppression properties in normoxia. CD4+ T cells were labelled with cell proliferation dye effluor ⁴⁵⁰ proliferation before. CD4+ T cells proliferation was analysed by flow cytometry (Gallios, Beckman Coulter) for WJMSC (A) and BMMSC (B). Results are expressed as mean \pm SD, $p < 0.05$ (*). One-way ANOVA analysis followed by Tukey's multiple comparison test was used for statistical analyses (GraphpadPrism).

116

Cardiac function evaluation of bone marrow mesenchymal stromal cells intracoronary transplantation in acute myocardial infarction Lee-Sung mini-PIG model

C. Hou², C. Lin¹, C. Wu¹, L. Tsung², M. Lin¹, Y. Chen¹, S. Chang¹, C. Hsu², C. Liao¹, Y. Shih², Y. Li², L. Hsu¹, P. Li¹, W. Yu¹, K. Chen¹, M. Wang¹, C. Yang², P. Lin¹, H. Shen¹, W. Chen^{1,*}

¹ Biomedical Technology and Device Research Laboratories, Industrial Technology Research Institute, HsinChu, Taiwan; ² Animal Technology Laboratories, Agricultural Technology Research Institute, Miaoli, Taiwan

Background & Aim Acute myocardial infarction (AMI) is the single most common cause of death worldwide. Mesenchymal stromal cells (MSC) exert strong immunomodulatory effects and angiogenesis property. MSC cell therapy in AMI therefore showed some beneficial effects in several studies and clinical trials. Here we isolated, expanded and characterized human bone marrow MSC in serum free condition under GTP regulation and evaluated the efficacy of these MSC in porcine AMI model after intracoronary injection.

Methods, Results & Conclusion These MSC also showed strong immunosuppression, T cell suppression, immunomodulation and anti-inflammatory activity by MLR, T cell proliferation, IDO activity and INF- γ TNF- α expression assay. AMI was induced in Lee-Sung mini pigs by inflating an angioplasty balloon for 90 mins in the mid-left anterior descending artery. After reperfusion for 90min, MSC or buffer were intracoronary injected through the central lumen of the balloon catheter. Fifteen animals were randomly divided into three groups: sham control; AMI-M (MSCs injection); AMI-B (Buffer injection). After 90 min balloon occlusion, the left ventricular ejection fraction (LVEF) by echocardiography of three groups were reduced from 62.94 \pm 4.28% (sham), 62.46 \pm 2.10% (AMI-B), 61.01 \pm 3.21% (AMI-M) to 63.08 \pm 5.69% (sham), 37.44 \pm 4.27% (AMI-B), 39.92 \pm 2.67% (AMI-M), respectively. ST-segment elevation were observed by electrocardiography. Three months after AMI, LVEF of sham group was 60.98 \pm 3.82%. LVEF of AMI-B group remained low at 36.68 \pm 3.12% while AMI-M group rose to 53.71 \pm 4.46%. The concentration of cardiac troponin I (cTnI) and cardiac troponin T (cTnT) of three groups were 4.6, 19.5 pg/mL (sham); 149.2, 388.6 pg/mL (AMI-B) and 21.9, 46.1 pg/mL (AMI-M) after 24 hours of AMI, respectively. Those biomarker of AMI-B was higher than ULRF while AMI-M group was reduced to lower than the MI reference value. It suggested that the MSC transplantation may suppress the myocardial necrosis caused by AMI. LVEF and MRI images as well as blood concentration of cTnT I/T were analyzed during five-month follow-up. After 5 months of observation, the status of tissue necrosis, fibrosis or angiogenesis were assayed by tissue analysis including TCC staining; hematoxylin-eosin staining; Masson Trichrome staining; immunohistochemistry staining with cTnT, cTnI, vWF and isolectin-B4. In conclusion, our bone marrow MSCs showed promising potential for cardiac function improvement after intracoronary transplantation into AMI Lee-Sung mini-pig.

117

Basic Fibroblast Growth Factor and Epithelial Growth Factor could Induce Trans-differentiation of Mesenchymal Stem Cell into Neural Stem Cell

A. Chow^{*}, G. Facicilia, E.D. Pratiwi, A.N. Arofah, C.R. Sartika, Y. Dirgantara, S.F. Jundan

Laboratory, PT. Prodia Stem Cell Indonesia, Jakarta Pusat, DKI Jakarta, Indonesia

Background & Aim Background Stem cell therapy has been considered as a potential strategy in regenerative for the patient with neurological deficits. Mesenchymal Stem/Stromal Cells (MSC) have been extensively investigated as a treatment in stroke. However, the MSC lost its potency for neural repair in aged patients due to the limited

Contribution au développement d'un produit de thérapie cellulaire à base de cellules stromales mésenchymateuses (CSM) : effet de l'environnement et recherche de marqueurs de qualité

Les cellules stromales/souches mésenchymateuses (CSM) sont une population hétérogène présente dans des tissus adultes et fœtaux. Elles sont intéressantes en médecine régénérative pour leurs propriétés de différenciation et d'immunomodulation *via* la sécrétion de facteurs solubles qui modulent la réponse immunitaire. Une étape d'expansion *in vitro* est nécessaire afin d'obtenir assez de cellules pour des applications cliniques, qui peut affecter la qualité CSM et doit être contrôlée afin de maintenir leur efficacité thérapeutique. **Le premier objectif** de ce travail de thèse, était d'étudier l'impact des conditions de culture (normoxie, hypoxie, le sérum de veau fœtal (SVF) ou le lysat plaquettaire humain (LPH) comme supplément de culture) sur le comportement et la fonctionnalité des CSM de gelée de Wharton (CSM-GW) et de moelle osseuse (CSM-MO). Nous avons montré que les CSM cultivées en présence du LPH ont de meilleures propriétés clonogéniques et de prolifération accompagnées d'une faible sénescence. Par ailleurs, la culture en hypoxie améliore les propriétés immunosuppressives et amplifie l'effet du LPH sur les propriétés de migration. **Le deuxième objectif** était de trouver des marqueurs de qualité en lien avec la prolifération. Nous avons montré que miR-9 est associé aux faibles capacités de prolifération des CSM-GW et CSM-MO. Des expériences complémentaires permettraient de confirmer que ce marqueur est prédictif de la qualité des CSM. **Le troisième objectif** était d'étudier l'impact du contexte de stress oxydant et inflammatoire sur la fonctionnalité des CSM-GW. Nous avons montré que le peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) induit la sénescence des CSM-GW ce qui altère les propriétés de migration et d'immunosuppression. **Pour conclure**, les CSM-GW et CSM-MO amplifiées en hypoxie avec du LPH, sont moins sénescentes et ont de meilleures propriétés de prolifération, de migration et d'immunosuppression. Néanmoins, des expériences complémentaires sont nécessaires afin de comprendre l'implication des ROS dans les propriétés immunosuppressives des CSM.

Mots clés : cellules stromales souches/mésenchymateuses, expansion *in vitro*, microenvironnement, immunomodulation, marqueurs de qualité, espèces réactives de l'oxygène (ROS), sénescence.

Contribution to the development of a cell therapy product based on mesenchymal stromal cells (MSC): environmental effect and search for quality markers

Mesenchymal Stromal/Stem Cells (MSC) are a heterogeneous population present in adult and fetal tissues. They are interesting in regenerative medicine for their differentiation and immunomodulation properties *via* the secretion of soluble factors that modulate the immune response. An *in vitro* expansion step is necessary to obtain enough cells for clinical applications, which can affect the MSC quality and must be controlled to maintain their therapeutic efficacy. **The first objective** of this thesis was to study the impact of culture conditions (normoxia, hypoxia, fetal calf serum (FCS) or human platelet lysate (HPL) as a culture supplement) on the behavior and functionality of Wharton's jelly (WJ-MSC) and bone marrow (BM-MSC) MSC. We showed that MSC cultured in the presence of HPL have better clonogenic and proliferative properties with low senescence. Moreover, culture in hypoxia improves immunosuppressive properties and amplifies the effect of LPH on migration properties. **The second objective** was to find quality markers related to proliferation. We have shown that miR-9 is associated with low proliferation capacities of WJ-MSC and BM-MSC. Further experiments should be performed to confirm that this marker is predictive of MSC quality. **The third objective** was to study the impact of oxidative stress and inflammatory context on WJ-MSC functionality. We have shown that hydrogen peroxide (H₂O₂) induces senescence of WJ-MSC which alters their migration and immunosuppression properties. **To conclude** WJ-MSC and BM-MSC expanded in hypoxia with HPL are less senescent and have better proliferation, migration and immunosuppression properties. Nevertheless, further experiments need to be performed to understand the involvement of ROS in the MSC immunosuppressive properties.

Key words: Mesenchymal stromal/stem cells, *in vitro* expansion, microenvironnement, immunomodulation, quality markers, reactive oxygen species (ROS), senescence.