Étude de l'effet de l'injection de Cellules Stromales Mésenchymateuses sur un modèle de fibrose colorectale radio-induite chez le rat

Benoît Usunier

▶ **To cite this version:**

Benoît Usunier. Étude de l'effet de l'injection de Cellules Stromales Mésenchymateuses sur un modèle de fibrose colorectale radio-induite chez le rat. Cancer. Université Pierre et Marie Curie - Paris VI, 2016. Français. NNT : 2016PA066434 . tel-01544870

HAL Id: tel-01544870
https://theses.hal.science/tel-01544870

Submitted on 22 Jun 2017

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.

Thèse de Doctorat de

L'Université Pierre et Marie Curie

École Doctorale 394 : Physiologie, physiopathologie et thérapeutique

Institut de Radioprotection et de Sûreté Nucléaire (IRSN)

Laboratoire de Recherche en Régénération des tissus sains Irradiés (LR2I)

Étude de l'effet de l'injection de Cellules Stromales Mésenchymateuses sur un modèle de fibrose colorectale radio-induite chez le rat

Présentée par

Benoît USUNIER

Dirigée par le Docteur Marc Benderitter

Encadrée par le Dr Alain Chapel

Présentée et soutenue publiquement le 14 décembre 2016

Devant un jury composé de :

M le Professeur Norbert-Claude GORIN	Président
Mme le Docteur Rima HADDAD	Rapporteur
M le Docteur Jan VOSWINKEL	Rapporteur
Mme le Docteur Annette K. LARSEN	Examinateur
M le Docteur Jean-Marc SIMON	Examinateur
M le Docteur Alain CHAPEL	Membre invité
M le Docteur Abdellatif ELM'SELMI	Membre invité

« La recherche, c'est l'acte par lequel une société avancée

exprime sa foi en un avenir ouvert. »

Claude Détraz

Remerciements

Je tiens à remercier chacun des membres de mon jury d'avoir accepté d'évaluer ce travail de thèse :

- Le Professeur **Norbert-Claude Gorin**, pour avoir accepté de présider ce jury
- Le Docteur **Rima Haddad**, pour avoir accepté d'en être rapporteur
- Le Docteur **Jan Voswinkel**, pour avoir accepté d'en être rapporteur
- Le Docteur **Annette K. Larsen**, pour avoir accepté d'en être examinateur
- Le Docteur **Jean-Marc Simon**, pour avoir accepté d'en être examinateur

J'adresse également mes sincères remerciements au Docteur **Alain Chapel** et au Docteur **Abdellatif Elm'Selmi** pour avoir accepté de siéger en tant que membre invité au sein de ce jury.

Je tiens à remercier **Marc Benderitter** de m'avoir accueillie au sein du LRTE, puis du SRBE, et d'avoir dirigé ces travaux de thèse. Mes sincères remerciements pour sa confiance et les nombreuses occasions qu'il m'a données de présenter mes travaux en congrès internationaux.

Merci à **Radia Tamarat** pour son accueil au sein du LR2I, ainsi que pour sa disponibilité.

Un chaleureux merci à **Alain Chapel** pour sa confiance, sa disponibilité et ses conseils qui m'ont permis d'affiner mon esprit scientifique. Merci pour tes encouragements, nombreux, qui m'ont permis d'avancer au cours de ces travaux. Merci pour tes conseils et ton expérience que, malgré mon envie constante de te contredire, me suivront au cours de ma carrière et de ma vie. J'ai été honoré de profiter de ton encadrement.

Je tiens également à remercier mes collègues du LR2I, à l'écoute, disponibles et bienveillants, et qui ont contribué à rendre cette expérience mémorable. **Bruno**, merci pour ton aide, continue la surveillance des nouveaux thésards, des fois qu'il y ait besoin de recadrer tout ça. **Christine**, merci pour nos séances de psychanalyse dans ton bureau, pour ta gentillesse et ton entrain communicatif ! Merci à **Alexandra**, **Christelle** et **Noëlle** pour votre aide, vos conseils et le partage de votre expérience. Merci d'avoir répondu présentes à mes nombreuses sollicitations. **Valérie**, merci pour l'aide que tu m'as apportée, notamment dans la dernière ligne droite. Merci à toi **Claire** pour ta gentillesse et pour l'importance que tu as portée à mon avis de jeune chercheur. Merci à **Carine** pour sa bienveillance et ses propositions d'aide répétées. **Stéphane**, merci pour ta bonne humeur et ta disponibilité permanente, quelle que soit la question.

Merci à tout le L3R, mon labo d'adoption (si vous voulez bien, même à titre honorifique). Merci à tous les chercheurs, **Fabien**, **Agnès**, **Olivier**, **Vincent** et **Céline**, avec lesquels les discussions scientifiques (ou pas) ont toujours été intéressantes. **Valérie** et **Georges**, merci pour cette confortable chaise dans laquelle je me suis assis si souvent pour nos conversations endiablées ! Merci à tous pour votre bienveillance et votre considération vis-à-vis des étudiants. J'ai beaucoup apprécié m'incruster à vos pots divers et variés, et j'espère que vous n'avez pas trop regretté de m'avoir « invité ».

Je tiens à remercier les membres du **GSEA** pour leur aide et leur camaraderie au cours de ces années. **Amandine**, merci d'avoir supportée mon humeur si imprévisible. Merci d'avoir été une collègue gentille et attentionnée, je ne t'oublierai pas. Merci à **Mélanie** pour sa disponibilité et sa bonne humeur. Merci à **Delphine**, **Romain**, **Salif**, **Frédéric** et **Sébastien** pour leur aide.

Merci au **LRTOX**, chez lesquels j'ai également souvent profité des anniversaires et autres pots de départ. Les petits tours de vos bureaux vont me manquer, et j'espère qu'ils vous manqueront également. Merci à tous pour votre bienveillance et votre sourire, j'ai beaucoup apprécié passer ce temps avec vous.

Mesdames et messieurs du **LDB**, ne pensez pas que je vais vous oublier ! Ces 3 ans pendant lesquels j'ai tenté de décoder l'ADN du laboratoire le plus mystérieux du SRBE ont été passionnants. S'il-vous-plait, visitez le rez-de-chaussée plus souvent, ils le méritent ! Merci pour votre sourire constant, malgré le caractère imprévisible de mes apparitions ! Continuez d'envoyer les vidéos !

Merci à **Amine** pour sa disponibilité et sa gentillesse ! J'étais très heureux de te côtoyer à nouveau après nos aventures orientales. Continue de ménager les pauvres biologistes, malgré leur ignorance de la science statistique. Merci à **Véronique** pour sa gentillesse et son sourire. **Chloé**, tu as contribué à rendre mon séjour à l'IRSN plus agréable par ta bonne humeur, j'espère en échange avoir contribué à la santé mentale des techniciens SFR. **Sandra**, tu le sais, merci pour tout ! Merci pour ta bonne humeur permanente, pour ton dynamisme extraordinaire et pour toutes ces choses improbables dont toi seule a le secret (poulpes…) ! Grâce à toi l'univers des grandes femmes de ce Monde, et de KimK en particulier, n'a plus de secret pour moi. Merci d'avoir rendu les journées moins mornes (et appelez-moi Berthier).

Thésards, post-doctorants et stagiaires anciens et présents qui êtes arrivés jusqu'ici, vous vous demandez sûrement pourquoi votre nom n'a pas été cité avec ceux des membres de votre laboratoire. Ça arrive tout de suite. **Lara**, tu as toujours été présente pour moi pendant ces 3 ans. Merci pour ta joie de vivre communicative, ton amitié inconditionnelle et ta disponibilité à tout moment. Reste telle que tu es, et n'oublie pas Mabrouk. **Christelle**, merci pour ton oreille attentive dans n'importe quelle

situation. En tant que l'une de mes plus anciennes collègues, tu as su m'écouter et m'apporter des conseils avisés qui m'ont aidé à évoluer dans le bon sens. Merci pour ta bonne humeur de toujours. **Elodie**, merci pour ton amitié pendant ces (presque) 3 ans. Merci pour ton accueil lors de mon arrivée dans ce milieu déroutant des thésards IRSN. Merci pour tes rires et pour ta tolérance à la souffrance psychologique que je t'ai infligée (pas trop j'espère). Ça n'aurait vraiment pas été pareil sans toi ! Mon petit **Cyprien**, mon compagnon de voyage, merci pour tes blagues improbables et ton humeur constante. J'ai apprécié t'avoir comme partenaire de traversée de cet océan qu'est la thèse. Merci aux sœurs Musigrand, **Stéfania** et **Marie**, les deux inséparables du LRTOX ! Le tour du soir n'a plus jamais été le même sans vous. Prenez garde à votre fenêtre, on ne sait jamais qui pourrait toquer ! Merci à **Clélia** pour son dynamisme de toujours, et son humeur bretonne légendaire ! **Aurélie**, notre séjour japonais restera un souvenir fort de ma thèse. J'espère que tu peux enfin travailler en toute tranquillité maintenant que je suis parti, te perturber en plein travail me manquera ! **Yoann**, merci pour ton aide au cours de ces années. Nous avons été heureux de t'adopter au sein du SRBE. **Amélie**, ma fille adoptive, continue à être la plus jeune et à traiter les vieux thésards de « ringards ». Ton rire va me manquer ! **Fanny**, ton départ a laissé un vide au rez-de-chaussée. Merci pour ta bonne humeur de toujours. Je pense à toi et te souhaite bonne chance pour la suite. Merci à **Alexandre** pour sa gentillesse et ses connaissances cinématographiques qui m'ont permis de m'ouvrir au monde incroyable de Marvel. Bon courage pour ta thèse et merci de prendre la relève ! Merci à **Emilie**, l' « ancêtre » des thésards du bâtiment 05, pour sa bonne humeur de toujours. Merci à **Jérémy** et **Frédéric** de reprendre le flambeau de l'élite des thésards de l'IRSN. J'ai été heureux de finir ma thèse en votre compagnie. Bon courage à vous pour la suite. **Julianna**, ton sourire et ta joie communicative vont me manquer. Merci à **Céline** et **Christèle** du LRTOX. Faites attention aux fenêtres ! **Dimitri**, surveille-moi bien tout ça et merci pour les histoires d'autoroute. Merci à **Sabine** et **Lucie** du LEPID pour leur compatissance lors de ces parties de squash endiablées. Merci à tous les autres que j'ai croisé au cours de ces années : **Bastien, Sarra, Maéva, Brice, Baptiste, Louison, Christine, Alexia, Sonia, Aurore, Alyson, Virginie, Morgane, Anthony, Nadia, Nicolas, Tiffany.** Merci à tous ceux que j'ai pu oublier et qui ont contribué à mon expérience de thèse.

Merci du fond du cœur à ma famille pour leur soutien au cours de cette épreuve. Vous m'avez toujours compris et épaulé au cours de ces années et je n'aurai pas pu faire ce travail sans votre aide.

Merci enfin à mon épouse, **Camille**. Rien n'aurait été possible sans toi et ton soutien permanent. Tu as fait preuve d'un courage immense, jonglant entre ta vie de femme active et l'éducation de nos enfants, et tu as relevé ce défi comme personne n'aurait pu le faire. Merci pour nos deux filles, et merci d'être là à mes côtés.

Communications

Publications

Publiées

Lara Moussa, **Benoît Usunier**, Christelle Demarquay, Marc Benderitter, Radia Tamarat, Alexandra Sémont, Noëllle Mathieu, "Bowel Radiation Injury: Complexity of the pathophysiology and promises of cell and tissue engineering" Cell Transplantation, 2016.

Benoît Usunier, Marc Benderitter, Radia Tamarat, and Alain Chapel, "Management of fibrosis: The Mesenchymal Stromal Cells Breakthrough", Stem Cells International, vol. 2014, Article ID 340257, 26 pages, 2014. doi:10.1155/2014/340257.

Aniya Larbi, Maria Teresa Mitjavila-Garcia, Stéphane Flamant, Yannick Valogne, Denis Clay, **Benoît Usunier**, Bruno l'Homme, Olivier Féraud, Ibrahim Casal, Emilie Gobbo, Dominique Divers, Alain Chapel, Ali G. Turhan, Annelise Bennaceur-Griscelli, Rima Haddad, "Generation of Multipotent Early Lymphoid Progenitors from Human Embryonic Stem Cells", Stem Cells and Development. December 2014, 23(24): 2983-2995. doi:10.1089/scd.2014.0171.

Sabine François, **Benoît Usunier**, Luc Douay, Marc Benderitter, Alain Chapel, "Long-Term Quantitative Biodistribution and Side Effects of Human Mesenchymal Stem Cells (hMSCs) Engraftment in NOD/SCID Mice following Irradiation", Stem Cells International. 2014;2014:939275. doi:10.1155/2014/939275.

Soumises

Benoît Usunier, Bruno L'Homme, Marc Benderitter, Alain Chapel, "HGF and TSG-6 released by Mesenchymal Stem Cells attenuate radiation-induced colorectal fibrosis by suppressing the pro-fibrotic activity of colonic smooth muscle cells and macrophages"

Sabine François, **Benoît Usunier**, Marie-Elisabeth Forgue-Lafitte, Thi Cam Ha Che, Bruno L'Homme, Sandrine Bouchet, Fahd Hached, Djaber Benaoumeur, Marc Benderitter, Luc Douay, Norbert-Claude Gorin, Annette K. Larsen, Alain Chapel, "Mesenchymal stem cell administration inhibits colorectal cancer progression and promotes survival: mechanism of action and rationale for clinical use"

Communications orales

Benoît Usunier, Bruno L'Homme, Radia Tamarat, Marc Benderitter and Alain Chapel. "Mesenchymal stem cell therapy reduces fibrosis induced by abdomino-pelvic radiotherapy", JED 2016, ED 394, 25 et 26 mai 2016, Paris.

Benoît Usunier, Bruno L'Homme, Radia Tamarat, Marc Benderitter and Alain Chapel. « Étude de l'effet de l'injection de Cellules Souches Mésenchymateuses sur la fibrose induite par radiothérapie abdomino-pelvienne », Journées des thèses IRSN 2016, 21-24 mars 2016, Le Croizic.

Benoît Usunier, Bruno L'Homme, Radia Tamarat, Marc Benderitter and Alain Chapel. « Effets des Cellules Souches Mésenchymateuses sur les complications sévères et chroniques des radiothérapies abdomino-pelviennes », Journées des thèses SRBE 2016, 10 mars 2016, Fontenay-aux-Roses.

Benoît Usunier, Bruno L'Homme, Radia Tamarat, Marc Benderitter and Alain Chapel. « Effets des Cellules Souches Mésenchymateuses sur les complications sévères et chroniques des radiothérapies abdomino-pelviennes », Journées des thèses IRSN 2015, 31 mars-2 avril 2015, L'Isle-sur-la-Sorgue.

Benoît Usunier, Bruno L'Homme, Radia Tamarat, Marc Benderitter and Alain Chapel. « Effets des Cellules Souches Mésenchymateuses sur les complications sévères et chroniques des radiothérapies abdomino-pelviennes », Journées des thèses SRBE 2015, 18 mars 2015, Fontenay-aux-Roses.

Benoît Usunier, Bruno L'Homme, Radia Tamarat, Marc Benderitter and Alain Chapel. "Mesenchymal Stem Cell therapy for the treatment of severe and chronic radiation-induced abdomino-pelvic complications refractory to standard therapy", Cell & Gene Therapy, 2014, Las Vegas, USA.

Communications affichées

Benoît Usunier, Bruno L'Homme, Radia Tamarat, Marc Benderitter and Alain Chapel. "Mesenchymal Stem Cell therapy for the treatment of severe and chronic radiotherapy-induced abdomino-pelvic complications refractory to standard therapy", JED 2015, ED 394, 6 et 7 mai 2015, Paris.

Benoît Usunier, Bruno L'Homme, Radia Tamarat, Marc Benderitter and Alain Chapel. "Mesenchymal Stem Cell (MSC) therapy for the treatment of severe and chronic radiotherapy-induced abdomino-pelvic complications refractory to standard therapy", ICRR 2015, 25-29 mai 2015, Kyoto, Japon.

Benoît Usunier, Bruno L'Homme, Radia Tamarat, Marc Benderitter and Alain Chapel. "Mesenchymal Stem Cell (MSC) therapy for the treatment of severe and chronic radiotherapy-induced abdomino-pelvic complications refractory to standard therapy", ESRAH 2015, 23-24 mai 2015, Hirosaki, Japon.

Benoît Usunier, Bruno L'Homme, Radia Tamarat, Marc Benderitter and Alain Chapel. "Mesenchymal Stem Cell therapy for the treatment of severe and chronic radiotherapy-induced abdomino-pelvic complications refractory to standard therapy", JED 2015, ED 394, 22 et 23 mai 2014, Paris.

Prix

Benoît Usunier, Bruno L'Homme, Radia Tamarat, Marc Benderitter and Alain Chapel. "Mesenchymal Stem Cell (MSC) therapy for the treatment of severe and chronic radiotherapy-induced abdomino-pelvic complications refractory to standard therapy". Young Investigator Award, 42nd Annual Meeting of the European Radiation Research Society – ERR 2016, 2016

Table des matières

Avant-propos 1

État de l'art 7

A. Effets secondaires de la radiothérapie : les survivants du cancer 7

I. Radiothérapie 7

1. Rayonnements ionisants 8

a. Effets biologiques des rayonnements ionisants 8

2. Modalités de la radiothérapie 11

a. Dose et organes à risque 11

b. Optimisation du protocole 12

II. Radiothérapies abdomino-pelviennes 16

1. Cancers et organes à risque 16

2. Le cancer colorectal 18

a. Carcinogénèse colorectale 19

b. Le microenvironnement tumoral 20

3. Radiothérapies abdomino-pelviennes et complications colorectales 23

a. Anatomie du côlon-rectum 23

b. Complications des radiothérapies abdomino-pelviennes 27

c. Traitements des effets secondaires au côlon-rectum 31

d. Thérapie cellulaire par les CSM pour le traitement des atteintes radio-induites au côlon-rectum 34

B. La fibrose : principale séquelle tardive des radiothérapies 41

I. La cicatrisation à l'origine de la fibrose 41

II. La fibrose radio-induite 42

1. L'initiation de la fibrose 45

2. L'inflammation chronique à l'origine de la fibrose 47

a. Réponse des lymphocytes T 48

b. Influence de la polarisation des macrophages 51

3. Les myofibroblastes : principaux acteurs cellulaires de la fibrose 54
a. Migration des myofibroblastes 58
b. EMT et EndoMT 59
4. Les acteurs moléculaires de la fibrose 61
a. TGF-β1 61
b. CTGF 68
5. Les spécificités de la fibrose intestinale 69
C. Le potentiel de la thérapie cellulaire 71
I. Fonction des cellules souches 72
1. Types de cellules souches 72
2. Hématopoïèse, niche et quiescence des cellules souches 73
II. La thérapie cellulaire 75
1. Le choix des cellules souches en thérapie cellulaire (ES, IPs, CSH, CSM) 75
a. Les cellules différenciées 76
b. Les cellules souches embryonnaires 76
c. Les cellules souches pluripotentes induites (iPSc) 78
d. Les cellules souches hématopoïétiques 79
III. Les cellules souches mésenchymateuses 79
1. Origines et différences phénotypiques des CSM 80
2. Différenciation des CSM 81
3. Fonction des CSM 82
a. Soutien de l'hématopoïèse 82
b. Régénération 83
c. Immunomodulation 85
d. Homing des CSM 91
e. Sécrétion par les CSM 92
4. Effets secondaires de la thérapie cellulaire par les CSM 96
a. Immunogénicité 96

b. Effet pro-fibrosant des CSM 96
c. Effet des CSM sur la tumeur 97
5. Reprogrammation des CSM 105
6. Isolement, amplification et caracterisation des CSM 107
7. Application des CSM en clinique 110
a. Régénération osseuse 110
b. Régénération du myocarde 110
D. Les CSM : la réponse recherchée ? 112
I. Traitements anti-fibrosants actuels 112
II. CSM et fibrose 114
1. Études précliniques 114
a. Immunomodulation 114
b. La voie TGF-β1 116
c. Hypoxie/stress oxydant 118
d. Remodelage matriciel 119
e. Modalités de traitement par les CSM 122
f. HGF et TSG-6 participent à l'effet anti-fibrosant des CSM 125
2. Essais cliniques de traitement de la fibrose par les CSM 134
Problématique et objectifs 137
Article 1 : Mesenchymal stem cell administration inhibits colorectal cancer progression and promotes survival: mechanism of action and rationale for clinical use 139
Article 2 : HGF and TSG-6 released by Mesenchymal Stem Cells attenuate radiation-induced colorectal fibrosis by suppressing the pro-fibrotic activity of colonic smooth muscle cells and macrophages 183
Discussion et perspectives 221
A. Mesenchymal stem cell administration inhibits colorectal cancer progression and promotes survival: mechanism of action and rationale for clinical use 222
I. Description du modèle 222
1. Le modèle de cancérogène colorectale 222

2. Le modèle de stérilisation tumorale par irradiation fractionnée 223

II. Effet des CSM 224

1. Évolution de la cancérogénèse colorectale après traitement par les CSM 224

2. Évolution de la cancérogénèse colorectale et des tissus sains irradiés après radiothérapie puis traitement par les CSM 226

III. Conclusion 226

B. Article 2 : Mesenchymal Stromal Cells attenuate radiotherapy-induced colorectal fibrosis through the release of HGF and TSG-6 227

I. Le modèle d'irradiation à 29 Gy en dose unique 227

1. Le choix du modèle 227

2. Transplantation de CSM 228

II. Description de la lésion 228

1. Évolution de la lésion tardive 229

a. Remodelage matriciel 229

b. Cellules pro-fibrosantes 232

c. Inflammation 234

d. Mécanismes de développement de la fibrose dans le modèle d'irradiation colorectale dose unique 239

2. Conclusion 239

III. Effet des CSM sur le développement de la fibrose colorectale radio-induite 240

1. Remodelage matriciel 241

2. Myofibroblastes/voie TGF-β/Smad 243

a. Myofibroblastes 244

b. CML 244

3. Inflammation 245

a. Apoptose/prolifération 245

b. Réponse des cellules T CD4+ 246

c. Macrophages 247

4. Conclusion sur l'effet des CSM 248

IV. HGF et TSG-6 sécrétés par les CSM participent à la réduction de la fibrose..... 248

1. Implication de HGF dans l'effet anti-fibrosant des CSM 249

2. Implication de TSG-6 dans l'effet anti-fibrosant des CSM..... 251

V. Perspectives..... 255

1. Description du modèle 255

2. Effet des CSM 255

3. Implication de HGF et TSG-6 dans l'effet des CSM sur la fibrose..... 256

4. Optimisation du protocole 257

Conclusion 259

Table des figures

Figure 1 : pouvoir de pénétration des différents types de rayonnements ionisants 8

Figure 2 : séquences d'évènements moléculaires et cellulaires induits par l'irradiation (D'après Bentzen, 2006) (Bentzen, 2006) 10

Figure 3 : Pic de Bragg : comparaison entre le dépôt d'énergie des photons (orange) et des protons (bleu). Le dépôt de dose des protons peut être modulé en largeur et en profondeur. (source : http://protontherapie.curie.fr/fr/la-protontherapie/proprietes-balistiques, consulté le 22/07/2016) 13

Figure 4 : incidence du cancer colorectal dans le Monde. (Taux estimé sur 100,00 personnes). Le cancer colorectal est le troisième en termes d'incidence chez l'homme (746,000 cas, 10% du total) et le second chez les femmes (614,000 cas, 9,2% du total) (source : IARC) 18

Figure 5 : illustration des 4 grades de l'évolution tumorale, du stade 0 au stade IV avec l'invasion des cellules cancéreuses vers d'autres organes via la circulation sanguine (source : http://www.webmd.com/colorectal-cancer/ss/slideshow-colorectal-cancer-overview) 19

Figure 6 : Mécanismes de cancérogenèse induite par les agents chimiques. 20

Figure 7 : Microenvironnement tumoral (D'après Quail et Joyce, 2013) (Quail et Joyce, 2013) 21

Figure 8 : anatomie du côlon-rectum humain (Source : www.servier.fr) 22

Figure 9 : coupe de côlon (coloration Hématoxyline-Éosine-Safran) 23

Figure 10 : Organisation d'une crypte colique (d'après Barker, 2014) (Barker, 2014) 25

Figure 11 : mécanismes et manifestations de la PRD 29

Figure 12 : séquence d'évènements initiant la fibrogénèse au cours de la cicatrisation (D'après Rieder et coll., 2007) (Rieder et coll., 2007) 42

Figure 13 : mécanismes cellulaires et moléculaires de développement de la fibrose 44

Figure 14 : caractéristiques des différents états d'activation des macrophages (Wynn et Barron, 2010, Duffield et coll., 2013, Lech et Anders, 2013) 53

Figure 15 : mécanismes de différenciation des fibroblastes en myofibroblastes : plusieurs paramètres sont nécessaire à l'acquisition des capacités contractiles des myofibroblastes : la présence de contraintes mécaniques au sein du tissu, la disponibilité de TGF-β1 activé et la production du variant d'épissage ED-A de la fibronectine (D'après Tomasek et coll., 2002) (Tomasek et coll., 2002) 56

Figure 16 : marqueurs spécifiques de la transition épithélium-mésenchyme (D'après Kalluri et Weinberg, 2009) (Kalluri et Weinberg, 2009) 60

Figure 17 : mécanismes d'activation et d'inhibition de la voie Smad (D'après Akhurst, 2012) (Akhurst et Hata, 2012) 62

Figure 18 : interactions entre la voie TGF-β/Smad et d'autres voies de signalisation (D'après Meng et coll., 2016) (Meng et coll., 2016) 64

Figure 19 : origine des cellules souches chez l'Homme..... 72

Figure 20 : population cellulaire du système médullaire stromal (D'après Winslow T. et Kibiuk L., 2001) 74

Figure 21 : hypothèse du "mesengenic process" : différenciation des CSM en cellules du mésoderme *in vivo* et *in vitro* (D'après Singer et Caplan, 2011) (Singer et Caplan, 2011) 81

Figure 22 : mécanismes impliqués dans l'immunomodulation par les cellules souches mésenchymateuses (D'après Singer et Caplan, 2011) (Singer et Caplan, 2011)..... 90

Figure 23 : mécanismes de réparation tissulaire et cellulaire par les CSM (D'après Spees et coll., 2016) (Spees et coll., 2016) 93

Figure 24 : interaction des CSM avec le microenvironnement tumoral (D'après Hass, 2012) (Hass et Otte, 2012)..... 103

Figure 25 : reprogrammation des CSM par activation des TLR : l'activation des CSM via des récepteurs différents induit une modification de leur phénotype (D'après Bétancourt, 2013) (Betancourt, 2013) 105

Figure 26 : méthodes d'obtention des CSM et des ASC. *La partie gauche de la figure illustre l'obtention des ASC; noter l'importance de l'étape de digestion. La partie droite de la figure illustre l'obtention des CSM; noter que l'étape de séparation des cellules mononucléées n'est pas indispensable (voir texte).* 109

Figure 27 : effet des CSM sur les cellules du système immunitaire 115

Figure 28 : mécanismes d'action des CSM sur les modèles précliniques de fibrose..... 121

Figure 29 : mécanismes d'action du HGF (D'après Gallo et coll., 2015) (Gallo et coll., 2015) 129

Figure 30 : mécanisme d'action du TSG-6 sur les macrophages (D'après Choi et coll., 2011) (Choi et coll., 2011)..... 132

Figure 31 : mécanismes d'action supposés du TSG-6 sur la fibrose..... 133

Figure 32 : voies d'activation et de répression du signal TGF-β pendant la fibrose..... 231

Figure 33 : mécanismes impliqués dans le développement de la fibrose colorectale radio-induite chez le rat. *1 : les rayonnements ionisants induisent des dommages aux cellules résidentes et le recrutement des cellules immunitaires, la production de ROS et l'activation de TGF-β1. La production de cytokines et de ROS par les cellules immunitaires contribue à l'activation de TGF-β1 et la différenciation des myofibroblastes. 2 : L'activation de la réponse Th2/M2 participe au remodelage de la matrice extracellulaire par les myofibroblastes. 3 : La levée de l'inhibition de la voie Smad et l'activation des CML par IGF-1 amplifie le phénomène de remodelage. 4 : Le remodelage chronique induit la fibrose.*..... 240

Figure 34 : hypothèse sur la régulation autocrine de la fonction des CSM par TGF- et HGF. 251

Figure 35 : hypothèse sur le mécanisme d'immunomodulation par TSG-6. *TSG-6 agit par deux mécanismes principaux au cours de la fibrose : l'augmentation de la disponibilité en hyaluronane de haut poids moléculaire (PM) et l'inhibition de la polarisation M1 des macrophages.*..... 253

Figure 36 : influence de HGF et TSG-6 sécrétés par les CSM sur la fibrose colorectale radio-induite 254

Table des tableaux

Tableau 1 : projections en 2015 de l'incidence des cancers de la zone abdomino-pelvienne par sexe en France (Source : Institut National du Cancer - Les cancers en France - édition 2015). * : estimation pour 2011 16

Tableau 2 : organes à risque en fonction de l'organe de la sphère abdomino-pelvienne traité par radiothérapie (Source : Institut National du Cancer - Les cancers en France - édition 2015). 17

Tableau 3 : Étapes impliqués dans le processus de cancérogénèse (D'après Riboli, 2014) (Riboli, 2014)..... 19

Tableau 4 : interventions chirurgicales et non-chirurgicales pour le traitement des complications colorectales chroniques et sévères des radiothérapies (D'après Denton et coll., 2002 ; Hong et coll., 2001 ; Rustagi et coll., 2011) (Hong et coll., 2001, Denton et coll., 2002, Rustagi et Mashimo, 2011)..... 32

Tableau 5: effet des CSM sur les modèles précliniques de complications intestinales des radiothérapies abdomino-pelviennes 35

Tableau 6 : résultats de l'utilisation des CSM en clinique pour le traitement des atteintes radio-induites, des pathologies inflammatoires et des MICI 38

Tableau 7 : caractéristiques cliniques des patients d'Épinal traités par transplantation de CSM 40

Tableau 8 : résumé des critères miminum pour identifier les CSM in vitro (D'après Dominici et al., 2006) (Dominici et coll., 2006)..... 108

Tableau 9 : voies d'action des CSM sur les modèles de fibrose précliniques..... 125

Liste des abréviations

α-SMA : α-Smooth Muscle Actin
ACE : Angiotensin Converting Enzyme
Akt = PKB : Protein kinase B
AMPc : Adénosine cyclique 3', 5'-MonoPhosphate cyclique
AOM : AzOxyMethane
AP-1 : Activator Protein-1
APC : Argon Plasma Coagulation
Arg : Arginase
BAD : Bcl-2-Associated Death promoter
Bcl-2 : B cell lymphoma-2
BMP : Bone Morphogenic Protein
C4S ; Chondroïtine-4-Sulfate
c-Abl (Abelson murine leukemia viral oncogene homolog 1
CAF : Cancer-Associated Fibroblasts
CCL : chemokine (C-C motif) ligand
CDC-42 : Cell Division Control protein 42 homolog
CDH1 : CaDHérine-1
CIC : Cellule Interstitielle de Cajal
CMH : Complexe Majeur d'Histocompatibilité
CML : Cellule Musculaire Lisse
CMP : collagen-to-MMP-to-TIMP
c-Myc : v-Myc avian myelocytomatosis viral oncogene homolog
COL : COLlagène
Co-Smad : Common mediator Smad
CPA : Cellules Présentatrices de l'Antigène
CREB : C-AMP Response Element-binding protein
CSC : Cancer Stem Cell
CSH : Cellules Souches Hématopoïétiques
CSM : Cellules Souches Mésenchymateuses
CTGF : Connective Tissue Growth Factor
CXCL : chemokine (C-X-C motif) Ligand
CXCR : CXC chemokine Receptor
DAMP : Damage-Associated Molecular Patterns
DKK : DicKKopf-related protein
DMH : DiMéthylHydrazine
EGF : Epidermal Growth Factor
eGFP : enhanced Green Fluorescent Protein)
EMT : Epithelial-to-Mesenchymal Transition
EndMT = EndoMT : Endothelial-to-Mesenchymal Transition
EPGN : EPiGeN
ERK : Extracellular signal-Regulated Kinase
ES : Embryonic Stem
EV : Extracellular Vesicles
FCH : Facteurs de Croissance Hématopoïétiques
FDA : Food and Drug Administration
FGF-2 : Fibroblast Growth Factor-2
FLT : Fms-Like Tyrosine kinase
Foxp3 : Foxhead box P3
FPI : Fibrose Pulmonaire Idiopathique
FSP : Fibroblast-Specific Protein
FVS : Fraction Vasculaire Stromale
GAG : Glycosaminoglycanes
G-CSF : Granulocyte-Colony Stimulating Factor
GM-CSF : Granulocyte –Macrophage-Colony Stimulating Factor
GPx : Glutathione Peroxidase
Gr : Glutathione reductase
GSK : Glycogen Synthase Kinase
GTPases : Guanosine TriPhosphatases
GVHD : Graft-Versus-Host Disease
HA : Hyaluronane
HES1 : Hairy and Enhancer of Split 1
HGF : Hepatocyte Growth Factor
HGFA : HGF Activator
HIF-1α : Hypoxia-Inducible Factor-1α
HK2 : Human Kidney 2
HLA : Human Leukocyte Antigen
HLA-DR : Human Leukocyte Antigen – antigen D Related
HLA-I : Human Leukocyte Antigen-1
HMOX1 : HeMe Oxygenase 1
HO-1 : Heme Oxygenase 1
HR : Homologous Recombination
ICAM-1 : Intercellular Adhesion Molecule-1
IDO : Indoleamine-pyrrole 2,3-DiOxygenase
IFN-γ : Interferon-γ
IGF-1 : Insulin-like Gowth Factor-1
IGFBP : Insulin-like Growth Factor-Binding Protein
IL : Interleukine
ILC2 : type 2 Innate Lymphoid Cells
ILK : Integrin-Linked Kinase
INCa : Institut National du Cancer
iNOS = NOS2 : inducible Nitric Oxide Synthase
iPSc : induced Pluripotent Stem cell
ISCT : International Society for Cellular Therapy
I-SMAD : Smad inhibiteur
ITG : Integrin
IαI : Inter-α-Inhibitor)
JNK : c-Jun N-terminal Kinase
KLF: Kruppel-Like Factor
KRT : KeRaTin
LAP : Latency Associated Peptide

LIF : Leukemia Inhibitory Factor
LLC : Large Latent Complex
LPS : LipoPolySaccharides
LRP5/6 : Lipoprotein Receptor-related Protein 5/6
LTBP : Latent TGF-β Binding Protein
M cell : microfold cell
MAP : Mitogen-Activated Protein
MAP3K : Mitogen-Activated Protein kinase kinase kinase
MCP : Monocyte Chemoattractant Protein
M-CSF : Macrophage-Colony Stimulating Factor
MDSC : Myeloid-derived Suppressor Cells
MEC : Matrice ExtraCellulaire
MEK1 : MAPK/ERK Kinase-1
MELD : Model for End-stage Liver Disease
MET : Mesenchymal-to-Epithelial Transition
MICI : Maladie Inflammatoire Chronique de l'Intestin
MIP : Macrophage Inflammatory Protein
Miro : Mitochondrial Rho GTPase
MKK : Mitogen-activated protein Kinase Kinase
MMP : Matrix MetalloProteinases
MNNG : N-Methyl-N'-Nitro-N-NitrosoGuanidine
mpCCL2 : MMP-processed CCL2
MPO : MyéloPérOxydase
MPZL : Myelin Protein Zero Like
Mrc : Mannose Receptor C type
Mreg : Macrophage M régulateur
MRTF : Myocardin-Related Transcription Factor
mTOR : mammalian Target Of Rapamycin
NF-κB : Nuclear Factor-kappa B
NHEJ : Non-Homologous End Joining
NK : Natural Killer
NOD : Nucleotide-binding Oligomerization Domain
NQO : NADPH Quinone Oxidoreductase
Nrf2 : Nuclear factor (erythroid-derived 2)-like 2
OAR : Organes A Risque
OCT : OCTamer-binding transcription factor
OSF : Osteoblast Specific Factor
PAI-1 : Plasminogen Activator Inhibitor-1
PAMP : Pathogen-Associated Molecular Patterns
PAR6 : PARtitioning defective 6 homolog alpha
PCNA : Proliferating Cell Nuclear Antigen
PDGF : Platelet-Derived Growth Factor
PECAM-1 : Platelet endothelial cell adhesion molecule-1
PGE : ProstaGlandine E
PGI2 : prostacycline
PI3K : Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-kinase
PIGF : PhosphatidylInositol-Glycan biosynthesis class F protein
PRD : Pelvic Radiation Disease
PTX : PenTaXine
RAC-1 : RAs-related C3 botulinum toxin substrate-1
RAF : Rapidly Accelerated Fibrosarcoma
RANKL : Receptor Activator of NF-B Ligand
RANTES : Regulated on Activation, Normal T cell Expressed and Secreted
RCMI : Radiothérapie Conformationnelle par Modulation d'Intensité
RHO : Ras Homologous
RNS : Reactive Nitrogen Species
ROCK : Rho-associated Coiled-coil-containing Kinase
ROR : RAR-related Orphan Receptor gamma
ROS : Reactive Oxygen Species
R-SMAD : Receptor-activated Smad
SARA : Smad Anchor for Receptor Activation
SCEL : SCiELLin
SCF : Stem Cell Factor
SDF : Stromal-Derived Factor
SED : SubEpithelial Dome
siRNA : small interfering RNA
SMA : Smooth Muscle Actin
SMAD : Small Mother Against Decapentaplegic
SnoN = Skil : Ski-like protein
SOD : SuperOxide Dismutase
SOX2 : (Sex determining region Y)-bOX 2
Sp-1 : Specificity Protein-1
TA cells : Transit Amplifying cells
TAK1 : Transforming growth factor beta-Activated Kinase 1
TAL : T-cell Acute Lymphocytic leukemia protein
TAM : Tumor-Associated Macrophages
TBX : T-BoX transcription factor
TERT : TElomerase Reverse Transcriptase
TFF : TreFoil Factor
TGF-β : Transforming Growth Factor
TGIF : Transforming Growth Interacting Factor
Th : T helper
TIMP : Tissue Inhibitors of MetalloProteinases
TLR : Toll-Like Receptor
TMPRSS : TransMembrane PRotease Serine S1 member
TNF-α : Tumor Necrosis Factor-α

TNT : Tunneling NanoTubes
tPA : tissue-type Plasminogen Activator
TRAF6 : TNF receptor associated factor 6
TRAIL : Tumor-necrosis-factor Related Apoptosis Inducing Ligand
Treg : lymphocytes T régulateurs
TSG-6 : Tumor necrosis factor Stimulated Gene-6
TSP : ThromboSPondine-1
TXA2 : Thromboxane
TβR = TGFβR : Tumor Growth Factor-β Receptor
uPA : urokinase-type Plasminogen Activator
VCAM-1 : Vascular Cell Adhesion Molecule-1
VEGF : Vascular Endothelial Growth Factor
WNT : Wingless Type
XIAP : X-linked Inhibitor of Apoptosis

Avant-propos

En France, le nombre de nouveaux cas de cancers a augmenté de 109% entre 1980 et 2012. L'Institut National du Cancer prévoit 384 442 nouveaux cas en 2015. Néanmoins, les progrès de la médecine ont permis de limiter la progression de la mortalité des patients concernés, qui a augmentée dans des proportions 5 à 10 fois inférieures au cours de la même période. En particulier, les méthodes de diagnostic et de traitement des tumeurs ont été significativement améliorées au cours des 50 dernières années. A l'heure actuelle, la détection précoce des cancers et la mise en place de protocoles de traitement plus adaptés à la pathologie permettent de diminuer la mortalité et le risque de récidive. La radiothérapie est une méthode de stérilisation tumorale locorégionale employée dans le traitement d'environ 50% des tumeurs solides. Son principe repose sur une sensibilité aux rayonnements ionisants accrue des cellules tumorales comparées aux cellules saines. Elle est souvent employée en association avec la chimiothérapie et/ou la chirurgie. Grâce, notamment, aux progrès de l'imagerie médicale, la délivrance des rayonnements est aujourd'hui plus précise et plus efficace. Cependant, l'irradiation de la tumeur implique l'exposition de tissus sains alentours à des doses variables de rayonnements. Ainsi, la radiothérapie peut induire de nombreux effets secondaires précoces, apparaissant dans les heures à semaines suivant le traitement, et tardifs, pouvant survenir 20 ans après arrêt du traitement. Ces complications sont souvent bénignes mais peuvent parfois prendre des formes létales, dans le cas d'une fibrose radio-induite par exemple. La prise en charge des patients survivants du cancer est donc devenue une problématique majeure, tant pour l'amélioration de la qualité de vie des patients que du coût des traitements.

La sphère abdomino-pelvienne concentre le plus grand nombre de cas de cancers, tous sexes confondus. Les cancers de la prostate, du côlon-rectum, de la vessie et du corps de l'utérus font partie des 6 plus fréquents. En particulier, chez l'homme, le cancer de la prostate représentait environ un quart des nouveaux cas de cancer en 2011 en France. Cette zone regroupe également des organes particulièrement radiosensibles, notamment en raison du taux de renouvellement élevé de certains des tissus. C'est le cas par exemple du côlon et du rectum dont l'épithélium est remplacé en quelques jours. Les radiothérapies de la sphère abdomino-pelvienne peuvent induire des effets secondaires allant de légères diarrhées à des complications très sévères telles que la rectite radique. La principale complication tardive sévère des radiothérapies est la fibrose, caractérisée par un épaississement et une rigidification du tissu, pouvant mener à une occlusion létale dans le cas de l'intestin. Il n'existe actuellement pas de thérapie efficace de ces séquelles et la prise en charge des patients repose majoritairement sur des traitements palliatifs.

La question de la prise en charge des complications des radiothérapies abdomino-pelviennes est illustrée par l'accident d'irradiation d'Épinal. Entre 2001 et 2006, au centre hospitalier d'Épinal, plus de 400 patients ont reçu une dose de rayonnements de 10 à 20% plus élevée que préconisée lors du traitement de cancers de la prostate. Pour des doses équivalentes, certains de ces patients n'ont pas développé de séquelles, alors que d'autres présentaient quelques mois plus tard des rectites ou cystites invalidantes. Ces lésions ont nécessité dans certains cas des chirurgies lourdes et occasionnaient parfois des douleurs intenses résistantes aux composés morphiniques. En l'absence de traitements efficaces, un essai compassionnel de thérapie par les Cellules Souches Mésenchymateuses a été proposé à quatre patients présentant des colites hémorragiques radio-induites.

Les Cellules Souches Mésenchymateuses (CSM) sont des cellules pluripotentes adultes pouvant être facilement isolées à partir d'explants de moelle osseuse ou de tissu adipeux. Au sein de l'organisme, elles ont de nombreux rôles, notamment dans le soutien de l'hématopoïèse, le maintien de l'homéostasie tissulaire et la modulation de la réponse inflammatoire. Depuis leur découverte en 1996, ces cellules ont fait l'objet de nombreuses études qui ont montré, entre autres, le pouvoir régénératif de la greffe de CSM. En particulier, les propriétés immunomodulatrices des CSM ont été exploitées avec succès pour le traitement de pathologies du système immunitaire telles que la maladie du greffon contre l'hôte ou les maladies inflammatoires chroniques de l'intestin. De plus, l'efficacité des CSM a déjà été démontrée dans le cadre de brûlures radiologiques accidentelles et de séquelles des radiothérapies. Enfin, leur effet de régénération du côlon irradié a été démontré sur des modèles animaux au sein de notre laboratoire. Chez les patients surirradiés d'Épinal traités, la transplantation de CSM a permis de diminuer la douleur, la fréquence des diarrhées et les saignements, en raison en partie d'un effet immunosuppresseur.

Malgré le potentiel apparent de la thérapie par CSM, il existe de nombreuses questions concernant l'innocuité d'un tel traitement. Ces doutes tiennent notamment à l'impossibilité de prédire avec exactitude le comportement des CSM après transplantation. Ce problème est particulièrement prononcé dans le cas de survivants du cancer en raison du possible effet pro-tumoral des CSM, qui pourraient induire la récidive de la maladie. De nombreuses études ont évalué l'effet des CSM sur des modèles de tumeurs injectées *in vivo*, sans qu'aucun consensus n'ait pu être établi sur leur effet pro ou anti-tumoral. Néanmoins, il n'existe à notre connaissance aucun travaux portant sur l'effet des CSM sur le développement tumoral *in vivo* avant et après radiothérapie abdomino-pelvienne. De plus, l'impact de la transplantation de CSM sur la fibrose colorectale radio-induite n'est que peu documenté à l'heure actuelle.

Ainsi, au cours des travaux présentés dans ce document, nous nous sommes attachés à mettre en évidence : (i) l'innocuité de la transplantation de CSM chez des animaux irradiés, (ii) l'absence d'effet pro-tumoral des CSM et (iii) l'effet des CSM sur les complications colorectales sévères des radiothérapies. Lors d'une première étude sur des tumeurs coliques induites à une cohorte de rats Sprague-Dawley auxquels un protocole d'irradiation fractionnée similaire à celui employé pour le traitement de tumeurs prostatiques chez l'homme a été appliqué. Des CSM ont été injectées à différents temps afin d'évaluer leur effet sur la tumorigénèse, l'évolution de la tumeur après radiothérapie et l'apparition de complications tardives. Dans un deuxième temps, nous avons étudié l'efficacité de cette thérapeutique sur un modèle de fibrose colorectale radio-induite, également chez le rat. Deux injections de CSM ont été réalisées chez ces animaux dans les semaines suivant l'irradiation afin d'observer l'évolution des marqueurs caractéristiques de la fibrose.

Nous avons démontré l'absence d'effets secondaire des CSM dans nos modèles. En effet, aucune augmentation du nombre ou de la taille des tumeurs n'a été observée au cours de cette étude. Après radiothérapie, la transplantation de CSM a induit une diminution du volume tumoral au sein du côlon. L'effet anti-tumoral des CSM a été notamment associé à la modification du statut immunitaire à savoir la population de leucocytes au sein du tissu, en particulier de la polarisation des macrophages et lymphocytes T ainsi qu'à une modification de la balance entre miRNA anti et pro-oncogéniques. De même, la transplantation de CSM a permis de limiter la progression de la fibrose après irradiation colorectale, mis en évidence par une diminution du dépôt de matrice extracellulaire chez les animaux traités. Cet effet, attribué également à la modulation de la nature de l'infiltrat inflammatoire, a permis d'améliorer la survie des animaux transplantés. Nous avons également montré l'importance de deux protéines sécrétées par les CSM et nécessaires pour la mise en place de la réponse anti-fibrosante, HGF (Hepatocyte Growth Factor) et TSG-6 (Tumor necrosis factor Stimulated Gene-6).

Nos résultats démontrent la faisabilité, l'innocuité et l'efficacité de la transplantation de CSM chez les patients développant une fibrose induite par radiothérapie et apporte de nouvelles preuves de l'intérêt des CSM dans le traitement de pathologies résistantes aux thérapies médicamenteuses. Par un effet pléiotropie et durable dans le temps, les CSM sont en mesure de reprogrammer le microenvironnement afin d'orienter les processus cellulaires vers la régénération du tissu.

État de l'art

A. Effets secondaires de la radiothérapie : les survivants du cancer

I. Radiothérapie

La radiothérapie est un traitement locorégional des tumeurs cancéreuses; ainsi, son action se limite à la tumeur et à la région avoisinante. La radiothérapie diffère donc de la chimiothérapie ou l'hormonothérapie qui sont des traitements agissant sur l'ensemble de l'organisme. Elle repose sur la différence de radiosensibilité entre les cellules tumorales cibles et les cellules saines de l'organisme. La zone à traiter est exposée à des rayonnements ionisants, c'est-à-dire pouvant induire l'ionisation des atomes cibles, produits à l'aide d'une source radioactive ou d'un accélérateur. Les dommages induits par les rayonnements ionisants au niveau de l'ADN des cellules cibles entrainent la mort de celles-ci. Les cellules tumorales, plus radiosensibles que les cellules saines, sont donc plus susceptibles d'être impactées par cette exposition. Les tissus normaux pouvant se régénérer plus rapidement, la radiothérapie est souvent administrée par fractions, sur des périodes de plusieurs semaines de façon à créer un effet différentiel entre la destruction des tissus sains et celle des tissus tumoraux.

Suivant l'emplacement de la source du rayonnement, on distingue :

- La radiothérapie externe : les rayons sont émis par un accélérateur de particules (photons, électrons, protons) ou, plus rarement, par une source radioactive. Il existe différents types d'appareils, permettant de recourir à différentes techniques d'irradiation : rayonnement par modulation d'intensité, tomothérapie, stéréotaxie (Novalis)…
- La radiothérapie interne : la source des rayons est implantée dans l'organisme, au contact de la tumeur. Cette technique n'est utilisée que pour traiter des tumeurs situées dans certaines zones du corps : sein, utérus, vagin, prostate, verge, langue, voile du palais, peau, bronches, œsophage et anus.

1. Rayonnements ionisants

Le terme rayonnement (ou radiation) désigne un processus d'émission d'énergie sous forme de photons ou de particules chargées. Les rayonnements sont dits « ionisants » lorsqu'ils sont susceptibles d'induire l'ionisation de la matière par excitation ou arrachement d'électrons.

Il existe différents types de rayonnements ionisants : α, β, γ et X. Les rayonnements électromagnétiques γ et X sont privilégiés lors des protocoles de radiothérapie. En effet, leur capacité de pénétration est beaucoup plus importante que celle des rayonnements α et β, qui ne peuvent passer la barrière cutanée (Figure 1). De plus, ils permettent la délivrance de rayonnements d'énergie plus importante et donc plus impactants au niveau des cellules tumorales.

Les rayonnements γ et X sont émis par des méthodes différentes. Les rayons γ sont émis par une source radioactive telle que le Cobalt^{60} ou le Césium^{137} et sont la résultante de désintégrations radioactives des atomes de la source. Les rayonnements X, les plus couramment utilisés lors des protocoles de radiothérapie, sont produits par un accélérateur linéaire de particules ou un tube à rayon X.

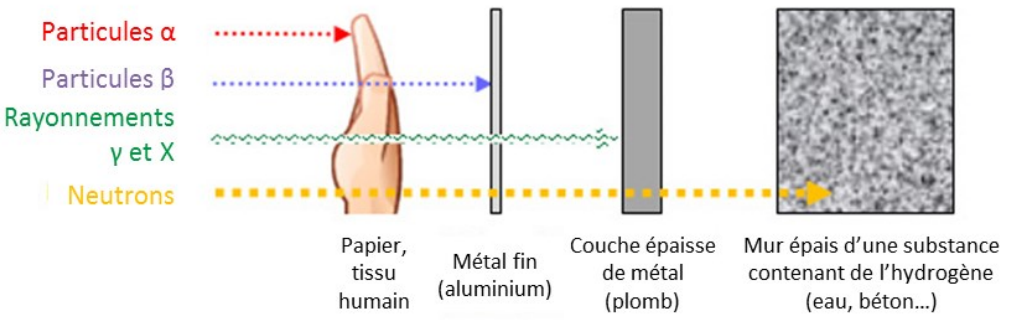


Figure 1 : pouvoir de pénétration des différents types de rayonnements ionisants

a. Effets biologiques des rayonnements ionisants

i. Aspect moléculaire

Les rayonnements ionisants induisent principalement des dommages à l'ADN, qui sont la première cause de mort cellulaire après irradiation (Figure 2). On peut distinguer les effets des rayonnements selon deux catégories :

- Les effets directs correspondent à l'interaction des rayonnements avec les composants cellulaires tels que l'ADN, les protéines, les lipides et les glucides.
- Les effets indirects regroupent principalement les interactions avec les molécules d'eau. Les rayonnements ionisant induisent la radiolyse de l'eau qui conduit à la production d'espèces réactives de l'oxygène (ROS : Reactive Oxygen Species) qui sont des radicaux libres hautement réactifs. Ces ROS, tels que H_2O_2 ou OH^-, sont responsables d'environ 80% des lésions radio-induites à l'ADN et ont également un effet délétère sur les autres composants cellulaires (Chapman, 1981).

Les lésions à l'ADN sont de différentes natures. Les rayonnements ionisant peuvent induire des modifications des nucléotides telles que l'oxydation ou la désamination mais également des pontages ou cassures. Ces cassures peuvent être simple ou double brin. Dans ce cas, le devenir de la cellule dépend de la capacité de la cellule à réparer ces dommages.

Les radicaux libres interagissent avec les acides aminés soufrés, générant des radicaux libres qui formeront des ponts disulfures inter et intramoléculaires capables d'altérer les fonctions des protéines. Les lipides sont une autre cible majeure par peroxydation des acides gras insaturés qui induisent une modification de la fluidité membranaire.

Les dommages radio-induits entrainent l'apparition de différents phénomènes de mort cellulaire :

- la nécrose des cellules ayant reçu une dose directe de rayonnements trop importante
- l'apoptose des cellules dont l'ADN est trop endommagé pour être pris en charge par les systèmes de réparation par recombinaison homologue (HR : Homologous Recombination) ou jonction d'extrémités non homologues (NHEJ : Non-Homologous End Joining)
- la mort mitotique ou reproductive si les dommages à l'ADN sont importants mais n'entrainent pas l'apoptose. La cellule peut alors perdre sa capacité de division et entrer dans un processus de mort différée.

Les cellules dont les altérations de l'ADN n'induisent pas la mort transmettent ces mutations aux cellules filles, pouvant entrainer à terme l'apparition de tumeurs. Les cellules cancéreuses prolifèrent de façon incontrôlée et sont résistantes aux signaux d'apoptose et d'arrêt de cycle cellulaire. Ces propriétés sont à l'origine de la différence de sensibilité des cellules cancéreuses par rapport aux cellules saines vis-à-vis des rayonnements ionisants.

Les lésions cellulaires induites par l'exposition aux rayonnements ionisants sont aussi associées au phénomène décrit en 1992 par Nagasawa et Little, appelé « effet bystander » (Nagasawa et Little,

1992). Ce processus désigne les effets aux cellules non irradiées à proximité de cellules exposées. L'exposition aux rayonnements ionisants induit la sécrétion de protéines responsables d'un effet délétère sur les cellules saines. L'effet bystander complète la théorie existante jusqu'alors de la « cellule cible », qui décrit l'effet des rayonnements ionisants comme localisé aux cellules qui y sont directement exposées.

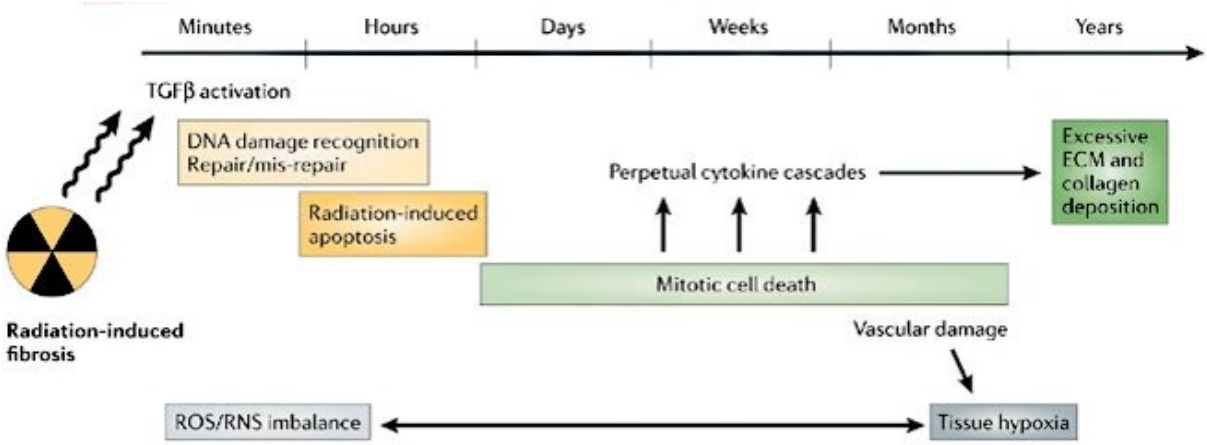


Figure 2 : séquences d'évènements moléculaires et cellulaires induits par l'irradiation (D'après Bentzen, 2006) (Bentzen, 2006)

ii. Aspect tissulaire

Les effets des rayonnements ionisants sur les cellules cibles induisent à terme, dans les jours à années suivants, la perte d'homéostasie tissulaire. Denham et coll. ont décrit trois origines d'atteintes tissulaires radio-induites (Denham et Hauer-Jensen, 2002) :

- L'effet cytocide désigne la mort des cellules exposées aux rayonnements ionisants. Cet effet est directement lié à la radiosensibilité des cellules considérées. Les compartiments cellulaires à renouvellement rapide, tels que l'épithélium intestinal, sont plus radiosensibles et les effets sur le tissu apparaissent donc rapidement. A l'inverse, dans les compartiments à renouvellement lent, les atteintes tissulaires apparaissent tardivement
- Les effets indirects apparaissent en réponse aux lésions radio-induites d'autres cellules ou tissus. Ils incluent
    - l'effet bystander ou effet de voisinage: observé dans les cellules non directement touchées ou non traversées par le rayonnement et impliquant l'émission de signaux par les cellules irradiées. Les cellules irradiées peuvent produire des signaux tels que les espèces actives de l'oxygène et l'oxyde d'azote (NO) ainsi que des cytokines (TNF-α : Tumor Necrosis Factor-α, IL 1 : Interleukine-1, IL-6...). La stimulation des cellules

irradiées par ces signaux aboutit à l'induction de cassures double brin dans l'ADN, d'aberrations chromosomiques, de micronoyaux et d'apoptose. Ce terme désigne plus particulièrement l'influence des médiateurs vasoactifs, pro-coagulants et inflammatoires sécrétés en réponse à l'irradiation. Ces médiateurs incluent des cytokines, facteurs de croissance et chimiokines.

  - l'effet abscopal. Originellement défini par Mole en 1953 (Mole, 1953), l'étymologie du mot vient du latin « ab » qui signifie « loin de » et du grec « skopos » qui veut dire « cible ». Ce phénomène représente tous les effets produits en dehors de la cible irradiée (Sun et coll., 2014).

- Les effets fonctionnels résultent des effets non-létaux sur les compartiments intra et extracellulaires ainsi que sur le transcriptome. Ces effets peuvent conduire à l'activation de facteurs de croissance latents comme le Transforming Growth Factor 1 (TGF-β1) ou encore à l'activation de protéases.

En règle générale, les lésions tissulaires apparaissent comme une conséquence d'une association complexe de ces trois types d'effets. Pour exemple, la rectite radique est induite par des effets cytocides sur les cellules épithéliales et endothéliales, des effets fonctionnels qui promeuvent la coagulation, l'inflammation et la production de matrice extracellulaire et des effets indirects comme l'activation de TGF-β1 (Denham et coll., 2001, Denham et Hauer-Jensen, 2002).

2. Modalités de la radiothérapie

Les protocoles de radiothérapie sont définis afin de (i) bloquer la progression tumorale et de provoquer la mort des cellules cancéreuses et (ii) limiter les atteintes aux tissus sains présents dans le champ d'irradiation, également appelés organes à risque (OAR).

a. Dose et organes à risque

La Société Française de Radioprotection a édité le « Guide des procédures de radiothérapie externe » (http://www.has-sante.fr/portail/upload/docs/application/pdf/2008-08/guide_de_rth_des_tumeurs_v7_complet.pdf) définissant les modalités d'optimisation des protocoles de radiothérapie. Il est nécessaire de respecter :

- La « dose de contrôle tumoral » qui correspond à la dose nécessaire pour obtenir la stérilisation locale définitive de la tumeur dans 90% des cas.

- La dose aux OAR qui doit être la plus faible possible afin de limiter les complications de la radiothérapie. Cette « dose de tolérance » est définie comme une dose maximale à ne pas dépasser sur un volume donné.

La dose de contrôle tumorale est connue de façon empirique. Elle dépend du type histologique de la tumeur, le volume tumoral et l'aspect de tumeur, par exemple en termes de vascularisation.

Ces doses sont exprimées en Grays (Gy), 1 Gy correspondant à 1 $J.kg^{-1}$.

b. Optimisation du protocole

i. Type de radiothérapie

En fonction des caractéristiques de la tumeur et des OAR à proximité, deux types de radiothérapie peuvent être choisis : la radiothérapie externe et la radiothérapie interne. La radiothérapie externe représentait 92% des prises en charge en 2014 (*Les cancers en France - édition 2015 – Institut National du cancer*). Les travaux présentés dans ce document portent sur des protocoles de radiothérapie externe et il sera donc sujet de cette technique dans les pages suivantes.

La radiothérapie externe repose sur l'utilisation d'une source de rayonnements extracorporelle. Les progrès technologiques ont permis d'améliorer les méthodes de radiothérapie externe. La radiothérapie conformationnelle est actuellement largement utilisée. Elle consiste en l'utilisation de plusieurs faisceaux de rayonnements, d'intensité moindre afin de limiter la dose aux OAR, convergeant sur la tumeur. Les progrès de l'imagerie médicale permettent de mieux définir le volume tumoral et de prendre en compte les variations anatomiques du patient au cours du protocole. La Radiothérapie Conformationnelle par Modulation d'Intensité (RCMI) permet ainsi d'orienter le faisceau en cours d'irradiation afin de suivre au mieux la tumeur. De même, les méthodes de stéréotaxie utilisent des faisceaux de taille adaptable afin d'irradier de façon précise des volumes réduits.

Méthodes innovantes de radiothérapie

Principe de la RCMI, Tomothérapie…

Le préalable à la réalisation de la radiothérapie conformationnelle est de disposer d'un scanner et de stations de travail associées (ordinateurs) qui permettront de reconstruire la région anatomique du patient à traiter et de projeter les faisceaux de l'accélérateur sur cette région. Cette technique de simulation virtuelle du traitement permet la reconstruction en 3D des volumes à traiter (patient

virtuel) et assure une grande précision dans le repérage des tumeurs et la mise en place de la balistique de faisceaux. L'IMRT utilise des scans 3D du corps pour guider les faisceaux de rayons vers la tumeur sous de nombreux angles différents. À chacun de ces angles, l'intensité du rayonnement est modulée et la forme du faisceau est modifiée pour correspondre à la forme de la tumeur. Ces réglages permettent de délivrer la dose prescrite de radiation à chaque partie de la tumeur, tout en minimisant l'exposition pour les tissus sains environnants.

La protonthérapie

La protonthérapie est une méthode de radiothérapie utilisant des faisceaux de protons, contrairement à la radiothérapie conventionnelle qui utilise des faisceaux de photons ou d'électrons.

Les protons présentent des propriétés balistiques avantageuses (Figure 3). En effet, le dépôt d'énergie dépend de la vitesse d'émission des protons. À faible vitesse, les protons interagissent fortement avec la matière et perdent leur énergie sur une faible distance. A l'inverse, à haute vitesse, les protons perdent leur énergie sur un parcours plus long. On peut ainsi faire varier la profondeur à laquelle l'énergie des protons va être déposée en faisant varier le niveau d'énergie du rayonnement. Il est également possible de moduler l'énergie en cours de traitement afin d'augmenter la gamme de profondeurs traitées.

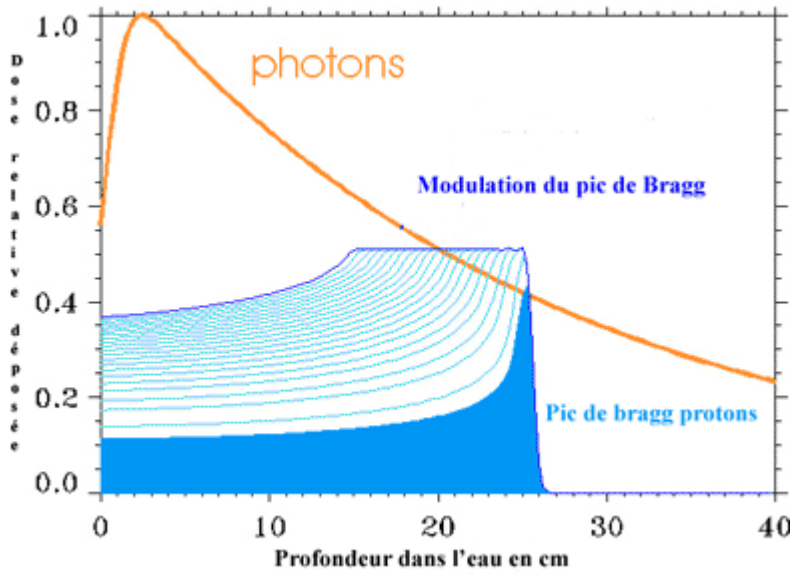


Figure 3 : Pic de Bragg : comparaison entre le dépôt d'énergie des photons (orange) et des protons (bleu). Le dépôt de dose des protons peut être modulé en largeur et en profondeur. (source : http://protontherapie.curie.fr/fr/la-protontherapie/proprietes-balistiques, consulté le 22/07/2016)

Mais pour atteindre la haute précision permise par ces propriétés, des technologies lourdes sont requises (un accélérateur de particules à protons, une enceinte de radioprotection) et sophistiquées (des systèmes de planification du traitement, de conformation du faisceau et de positionnement).

La protonthérapie s'avère pertinente pour les traitements nécessitant une très grande, précision par exemple pour le mélanome de la choroïde ou pour certaines tumeurs intracrâniennes.

ii. Dose

Comme expliqué précédemment, la dose de rayonnements prescrite dépend des caractéristiques de la tumeur et des OAR compris dans le champ d'irradiation.

La radiosensibilité des tumeurs malignes est très variable. Par exemple, les lymphomes non hodgkiniens nécessitent en général des doses de 35 à 40 Gy. A l'inverse, les adénocarcinomes requièrent généralement une dose de plus de 70 Gy. En outre, la radiosensibilité varie fortement selon les OAR. Par exemple, la dose seuil (dose à laquelle apparaissent les complications) est de 20 Gy pour le larynx et de 50 Gy pour le tronc cérébral. Il est donc nécessaire d'opérer un compromis entre ces doses.

iii. Le cycle cellulaire

Les cellules sont les plus radiosensibles lors des phases G2 et M du cycle cellulaire (Pawlik et Keyomarsi, 2004). Or, les cellules irradiées sont temporairement bloquées en G2 et sont donc synchronisées après une séance de radiothérapie.

iv. Oxygénation de la tumeur

Les effets des rayonnements ionisants reposent en grande partie sur la production de ROS (. Les espèces réactives produites par radiolyse de l'eau réagissent avec l'oxygène et produisent des dommages au niveau de l'ADN. L'état d'oxygénation de la tumeur et sa vascularisation sont donc des paramètres importants pour la radiothérapie.

Différentes stratégies ont été développées afin d'optimiser l'apport d'oxygène à la tumeur (oxygène hyperbare, respiration de carbogène…). Le fractionnement de l'irradiation reste à l'heure actuelle le moyen le plus efficace de contourner cet obstacle. En effet, au fil des séances de radiothérapie, les couches supérieures de la tumeur, les mieux oxygénées, sont détruites et les cellules internes sont « ré-oxygénées » entre chaque séance.

v. Fractionnement

Plusieurs facteurs sont à prendre en compte lors de l'établissement d'un protocole de radiothérapie fractionnée : le nombre de fractions, la dose par fraction et l'étalement du protocole dans le temps :

- La durée totale de traitement influe à la fois sur l'efficacité de la stérilisation tumorale et sur les atteintes secondaires aux tissus sains. Un étalement plus long du protocole permettra aux tissus sains de se régénérer, au moins partiellement, entre chaque séance. En revanche, cela profitera aux tumeurs à prolifération rapide qui se repeupleront au cours du traitement. A l'inverse, un étalement court augmentera le risque d'effet secondaire mais assurera une meilleure destruction de la tumeur. La durée classique d'un protocole de radiothérapie fractionnée est de 7 semaines.
- La dose par fraction est un paramètre important, influençant notamment les risques de complications. Le schéma « étalement-fractionnement classique » compte 5 séances de 2 Gy par semaine. En général, la dose prescrite par fraction est de 1,8 à 2 Gy. En effet, l'augmentation de la dose par fraction n'a que rarement d'impact sur la stérilisation tumorale. En revanche, les doses plus élevées, à dose totale égale, induisent plus de toxicité à long terme.

L'étalement du traitement permet donc de protéger les tissus sains. Néanmoins, de nombreuses études montrent l'intérêt de l'hypo-fractionnement qui consiste à réduire le nombre de fractions et donc à augmenter la dose par fraction. Pour les cancers de la prostate, des essais de radiothérapies extrêmement hypo-fractionnées ont donné de bons résultats en termes d'efficacité et de complications pour les patients. Les médecins soulignent également que ce type de traitements est moins coûteux et que la diminution du nombre de séances améliore le confort du patient (Arcangeli et Greco, 2016). A l'inverse, des études suggèrent un intérêt de l'hyper-fractionnement pour certains types de cancers. Une étude des résultats obtenus au cours de 15 essais cliniques suggère que, dans le cas des cancers tête et cou, l'hyper-fractionnement permettrait un meilleur contrôle tumoral (Baujat et coll., 2010).

II. Radiothérapies abdomino-pelviennes

1. Cancers et organes à risque

Le dernier rapport de l'Institut National du Cancer sur les cancers en France fait état d'une projection de 384 442 nouveaux cas de cancers en France pour 2015. Ce chiffre est en augmentation constante depuis le XXème siècle. Entre 1980 et 2012, le nombre de nouveaux cas de cancers a augmenté de 109%. La sphère abdomino-pelvienne concentre la plus grande incidence de cancers : chez l'homme, la prostate, le côlon-rectum, la vessie, les testicules. Chez la femme, le côlon-rectum, le corps et le col de l'utérus, les ovaires font partie des organes à taux de cancer élevé. Ces cancers et leur incidence respective en France sont détaillés dans le Tableau 1.

Tableau 1 : projections en 2015 de l'incidence des cancers de la zone abdomino-pelvienne par sexe en France (Source : Institut National du Cancer - Les cancers en France - édition 2015). * : estimation pour 2011

Organe	Sexe	Incidence
Prostate*	Hommes	53 913
Côlon-rectum	Hommes	23 535
	Femmes	19 533
Vessie	Hommes	9 758
	Femmes	2 547
Corps de l'utérus	Femmes	8 151
Ovaire	Femmes	4 575
Col de l'utérus	Femmes	2 797
Testicule	Hommes	2 300

Environ 60% des patients atteints de cancer seront traités par radiothérapie au cours de leur parcours de soins. En 2014, 198 168 personnes ont été traitées par radiothérapie. Un pourcentage important de ces séances cible la sphère abdomino-pelvienne : prostate (14,2% des prises en charge), côlon-rectum-anus (4,7%) et corps et col de l'utérus (3,3%). De nombreux OAR sont compris dans cette zone et sont donc impactés par ces protocoles : intestin grêle, vessie, testicules… Le Tableau 2 liste les OAR concernés lors des radiothérapies de la sphère abdomino-pelvienne.

Tableau 2 : organes à risque en fonction de l'organe de la sphère abdomino-pelvienne traité par radiothérapie (Source : Institut National du Cancer - Les cancers en France - édition 2015).

Organe traité par radiothérapie	Organes à risque
Rectum	Intestin grêle
Canal anal	Intestin grêle, vessie, vulve, grandes lèvres
Col de l'utérus	Rectum, vessie, canal anal, intestin grêle, colon sigmoïde, vagin
Endomètre	Rectum, vessie, canal anal, intestin grêle, côlon sigmoïde, vagin
Vulve	Rectum, vessie, urètre, canal anal, intestin grêle, côlon sigmoïde, vagin
Prostate	Rectum, vessie, canal anal
Vessie	Rectum, canal anal, intestin grêle, côlon sigmoïde
Testicule	Moelle épinière, rein, estomac, intestin grêle, côlon

Comme indiqué sur le Tableau 2, le côlon et le rectum sont fréquemment à risque lors des radiothérapies de la zone pelvienne. Il existe des méthodes permettant de limiter les effets secondaires à ces tissus sains. Par exemple, réaliser la séance de radiothérapie sur un patient ayant la

vessie pleine limite l'exposition de cette dernière lors de l'irradiation du rectum ou du col de l'utérus. A l'inverse, il est difficile de protéger l'intestin grêle qui est très mobile et pourra donc avoir changé de position entre deux séances. Il est impossible à l'heure actuelle de prévenir totalement les atteintes aux tissus sains et une forte proportion de ces patients développera des complications aigües, voire tardives dans un nombre plus limité de cas.

2. Le cancer colorectal

Le cancer colorectal est au premier rang des cancers (tous sexes confondus), représentant 15 à 20% des cancers. En France son incidence est estimée à plus de 34 000 nouveaux cas par an (avec une augmentation d'environ 40% dans les vingt dernières années) (Figure 4).

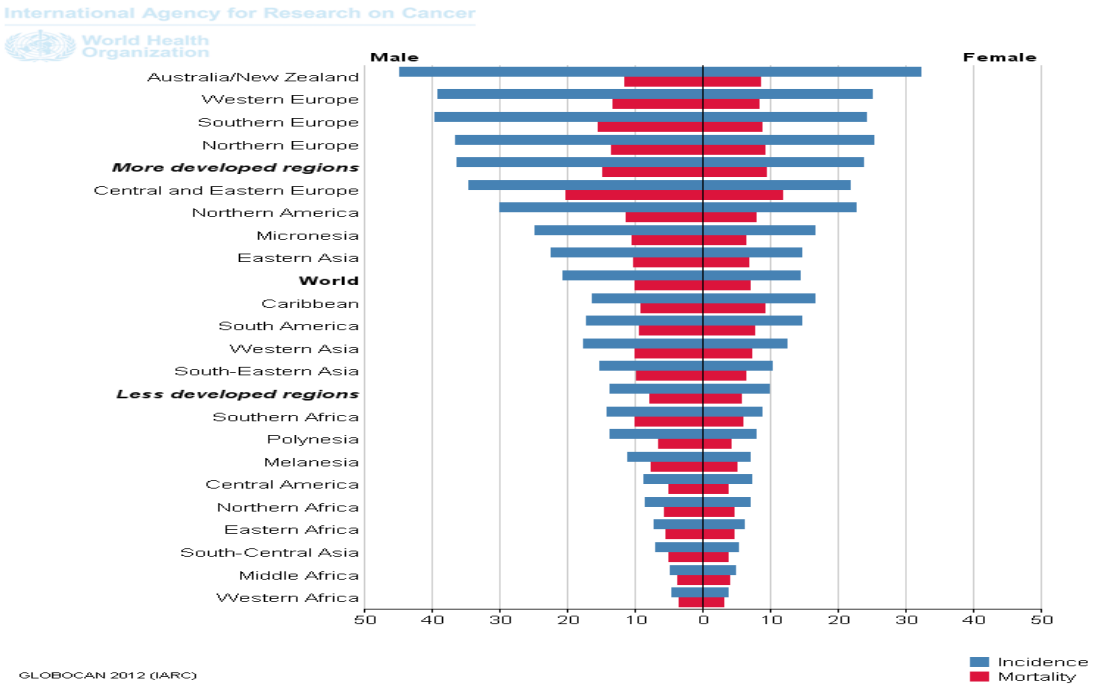


Figure 4 : incidence du cancer colorectal dans le Monde. (Taux estimé sur 100,00 personnes). Le cancer colorectal est le troisième en termes d'incidence chez l'homme (746,000 cas, 10% du total) et le second chez les femmes (614,000 cas, 9,2% du total) (source : IARC)

Les cancers du côlon et du rectum étant assez semblables, on les regroupe sous le terme de cancer colorectal. Les différents stades du cancer colorectal (Figure 5) sont :

- -Stade I : le cancer est encore localisé dans la paroi du côlon
- Stade II : le cancer s'est propagé à la couche musculaire du côlon

- Stade III : le cancer s'est propagé à un ou plusieurs ganglions lymphatiques en place
- Stade IV : le cancer s'est propagé à d'autres organes des parties du corps, tels que le foie, les poumons ou les os (métastases).

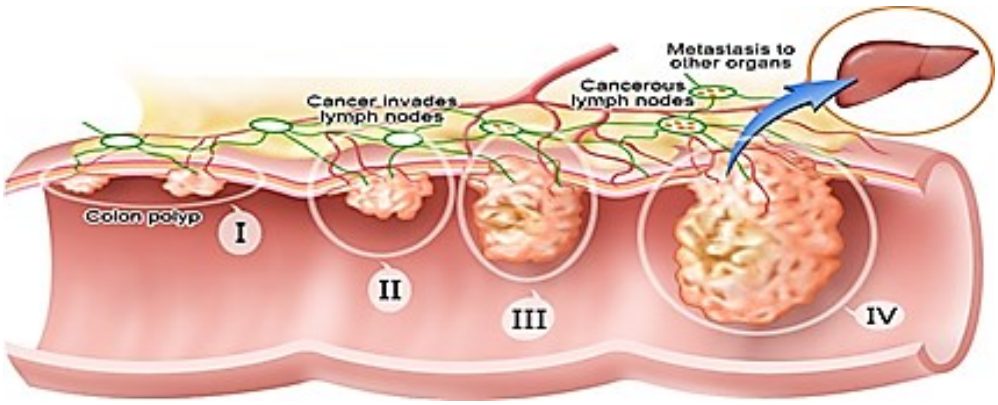


Figure 5 : illustration des 4 grades de l'évolution tumorale, du stade 0 au stade IV avec l'invasion des cellules cancéreuses vers d'autres organes via la circulation sanguine (source : http://www.webmd.com/colorectal-cancer/ss/slideshow-colorectal-cancer-overview)

a. Carcinogénèse colorectale

Le développement de la maladie est un phénomène prolongé dans le temps pouvant comporter plusieurs étapes et implique des interactions complexes entre différents facteurs exogènes de types environnementaux et/ou endogènes de types génétique et épigénétique qui sont résumé dans le Tableau 3.

Tableau 3 : Étapes impliqués dans le processus de cancérogénèse (D'après Riboli, 2014) (Riboli, 2014)

Etapes de la cancérogenèse	Mécanismes impliqués
Initiation = altérations génétiques stables et transmissibles ⇒ Cellules initiées • Etat irréversible	• Activation et détoxication des cancérogènes chimiques • Mutations spontanées, altérations primaires du génome : alkylation des bases, adduits à l'ADN, coupures, pontages intra et interbrins, aberrations chromosomiques • Mutations induites : en particulier sur les oncogènes et/ou les gènes suppresseurs de tumeurs • Réparation de l'ADN : fidèle par excison-resynthèse ou recombinaison ; fautive par le système SOS
Promotion = altérations épigénétiques = expansion clonale des cellules initiées ⇒ Lésion pré-cancéreuse (hyperplasie, dysplasie) • Etat réversible	• Stimulation de la prolifération cellulaire • Perte de différenciation cellulaire • Perte de communication intercellulaire • Altération des mécanismes de signalisation cellulaire • Modulation de l'expression des gènes • Action pro-oxydante des radicaux libres
Progression = altérations génétiques stables et transmissibles ⇒ Tumeur maligne • Etat irréversible	• Instabilité génomique : translocation, recombinaison, amplification des gènes, remaniements chromosomiques • Mutation d'oncogènes et/ou de gènes suppresseurs de tumeurs
Invasion = dissémination des cellules tumorales ⇒ Métastases	• Perte d'adhésivité des cellules, capacité de migration

L'initiation consiste en la formation de lésions stables et irréversibles de l'ADN de la cellule souche et transmissible aux cellules filles. Différents mécanismes sont susceptibles d'entraîner ces lésions. Les mutations spontanées sont de faible probabilité (10^{-8} à 10^{-5} selon les gènes). Les mutations induites par de brèves expositions avec des agents cancérigènes sont conditionnées par les capacités de métabolisation des agents chimiques et l'efficacité des systèmes de réparation de l'ADN (Figure 6).

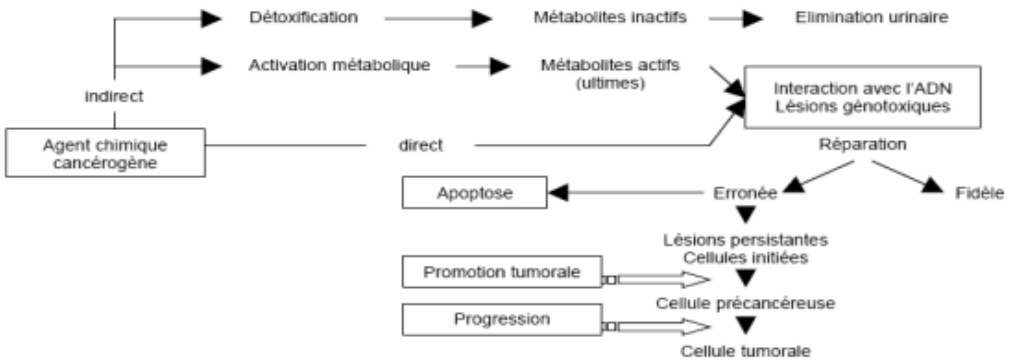


Figure 6 : Mécanismes de cancérogenèse induite par les agents chimiques.

Tout individu possède un certain nombre de cellules initiées, phénotypiquement indistinctes des cellules normales, mais qui mémorise une altération génétique exprimée lors d'une stimulation ultérieure. L'étape de promotion se produit sous l'action continue ou répétée d'un agent promoteur en concentration suffisante sur les cellules initiées. L'étape de progression consiste en la transformation irréversible de cellules initiées précancéreuses et aboutit à l'émergence clinique de la tumeur (Gurzu et coll., 2016, Simon, 2016).

b. Le microenvironnement tumoral

La communication bidirectionnelle entre les cellules et leur microenvironnement est critique pour la croissance tumorale (Figure 7). L'interaction entre cellules tumorales et le stroma associé influe sur l'initiation et la progression de la maladie. Dans le cancer, les interactions intercellulaires coordonnées qui sont présentes dans les tissus adultes normaux sont perturbées car la tumeur acquiert la capacité de détourner le microenvironnement à son profit, et à son tour, le microenvironnement évolue pour favoriser la croissance tumorale (Fessler et coll., 2013, Quail et Joyce, 2013).

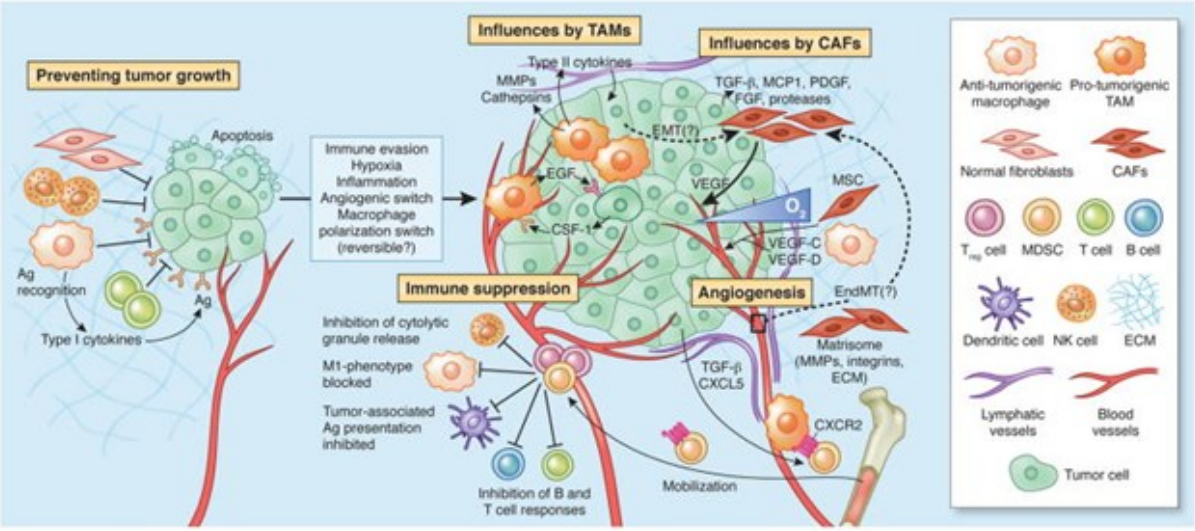


Figure 7 : Microenvironnement tumoral (D'après Quail et Joyce, 2013) (Quail et Joyce, 2013)

Après avoir contourné les mécanismes cellulaires intrinsèques de l'apoptose, les cellules tumorales sont soumis à des pressions d'élimination par le système immunitaire. Les antigènes spécifiques des cellules tumorales jouent un rôle au cours de ce processus. Ils sont reconnus par les cellules immunitaires cytotoxiques, conduisant à leur destruction. Les fibroblastes et les macrophages dans le microenvironnement tumoral contribuent également à un état de croissance-suppressive ; cependant, ces cellules peuvent plus tard devenir instruits par la tumeur afin d'acquérir des fonctions pro-tumorigène (Egeblad et coll., 2010). Par exemple, les macrophages associés à la tumeur (TAM : Tumor-Associated Macrophages) prennent en charge divers phénotypes au sein de la tumeur primitive, dont la croissance, l'angiogenèse et l'invasion en sécrétant une pléthore de protéases pro-tumorigènes, de cytokines et de facteurs de croissance, par exemple EGF (Epidermal Growth Factor), qui participe à une boucle de signalisation paracrine via une sécrétion tumorale de CSF-1) (Qian et Pollard, 2010).

Lors du développement des tumeurs, les cellules immunitaires-suppressives, y compris les Cellules myéloïdes suppressives (MDSC : Myeloid-derived Suppressor Cells) et les cellules Treg (lymphocytes T régulateurs) sont mobilisés dans la circulation en réponse aux cytokines induite par la tumorigénèse : TGF-β, CXCL5 (chemokine (C-X-C motif) Ligand 5) et CXCR2 (CXC chemokine Receptor 2) (Almand et coll., 2001). Les MDSC et les cellules Treg infiltrent la tumeur croissante visant à désorganiser la surveillance immunitaire par l'intermédiaire de plusieurs mécanismes notamment la perturbation de la présentation des antigènes par les cellules dendritiques, l'inhibition de la

prolifération des cellules T et des lymphocytes B et de la cytotoxicité des NK (Natural Killer) (Diaz-Montero et coll., 2009). Les fibroblastes associés au cancer (CAF : Cancer-Associated Fibroblasts) activés par des facteurs dérivées de tumeurs (TGF-β, FGF-2 : Fibroblast Growth Factor-2, PDGF : Platelet-Derived Growth Factor, etc.) sécrètent des protéines de la Matrice ExtraCellulaire (MEC) et des composants de la membrane basale, régulent la différenciation, modulent la réponse immunitaire et contribuent à la dérégulation de l'homéostasie (Tomasek et coll., 2002). Les CAF sont également une source essentielle de VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor), qui induit l'angiogenèse au cours de la croissance tumorale (Kalluri et Zeisberg, 2006). Outre ses contributions cellulaires, plusieurs propriétés extracellulaires contribuent à la progression tumorale, y compris l'hypo-oxygénation, la haute pression du fluide interstitielle et les changements dans les composants spécifiques de la matrice extra cellulaire (Kalluri et Zeisberg, 2006). Les stratégies thérapeutiques contre le cancer ciblent la tumeur directement ; cependant, les cellules du stroma dans le microenvironnement tumoral sont génétiquement stables par rapport aux cellules tumorales et sont donc susceptibles d'être moins sensible aux mécanismes classiques de résistance thérapeutique (Quail et Joyce, 2013).

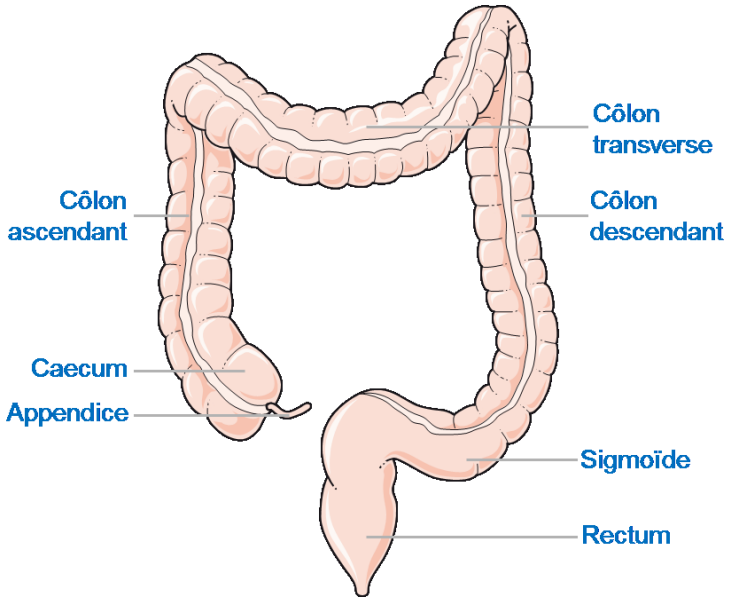


Figure 8 : anatomie du côlon-rectum humain (Source : www.servier.fr)

3. Radiothérapies abdomino-pelviennes et complications colorectales

a. Anatomie du côlon-rectum

L'intestin est un organe à risque particulièrement radiosensible en raison du renouvellement rapide de son épithélium. En particulier, la fréquence des complications de radiothérapie au côlon et au rectum est élevée en raison de la forte incidence des cancers de la zone abdomino-pelvienne. Nous avons donc choisi d'axer ce projet sur le traitement des effets secondaires colorectaux.

Le côlon et le rectum, aussi appelés gros intestin, ont une structure similaire. Le gros intestin mesure environ 1,5 m de long et est légèrement plus large que l'intestin grêle (entre 3 et 7 cm de diamètre). Il se situe entre le caecum et le canal anal et comprend : le côlon ascendant, le côlon transverse, le côlon descendant, le côlon sigmoïde et le rectum (Figure 8). Le gros intestin a plusieurs fonctions :

(i) La transformation du bol intestinal en fèces par absorption de l'eau et des sels solubles par les entérocytes. Il n'y a pas d'activité enzymatique de digestion à cette étape. La contraction des muscles du côlon permet le brassage du bol fécal.

(ii) La digestion finale de la cellulose est assurée par la flore microbienne et certaines vitamines sont absorbées.

(iii) Les mouvements péristaltiques propulsent les fèces vers le rectum. Cette progression est facilitée par la sécrétion de mucus par les cellules caliciformes.

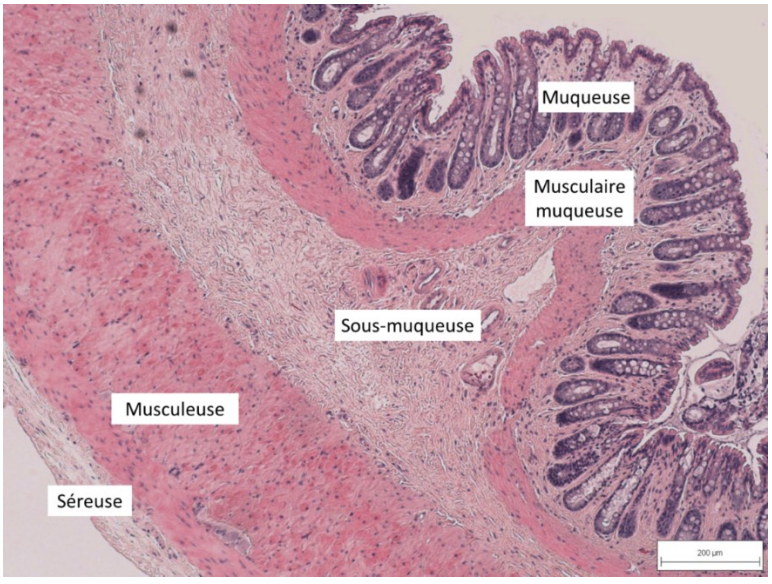


Figure 9 : coupe de côlon (coloration Hématoxyline-Éosine-Safran)

Le côlon et le rectum diffèrent de l'intestin grêle par la disparition des villosités, laissant place à une muqueuse lisse. Le gros intestin est composé de 5 couches distinctes (Figure 9). En partant de la lumière : la muqueuse (comprenant l'épithélium et le chorion), la musculaire muqueuse (muscle lisse), la sous-muqueuse (composée de tissu conjonctif), la musculeuse (une tunique constituée de muscles lisses innervés) et la séreuse (une couche externe riche en tissu adipeux).

i. La muqueuse colique

La muqueuse colique est constituée de cryptes, également appelées glandes de Lieberkühn, ouvrant sur la lumière intestinale. Ces cryptes reposent dans le chorion (ou lamina propria), terme désignant le tissu conjonctif de la muqueuse. Un important réseau de microvaisseaux assure l'irrigation des cryptes et est associé à un réseau lymphatique de canaux chylifères. Les glandes de Lieberkühn sont composées de nombreux types cellulaires (Figure 10) :

- Des cellules souches responsables du renouvellement de l'épithélium
- Des cellules non-différenciées, également impliquées dans le renouvellement de l'épithélium
- Des entérocytes, aussi appelés colonocytes, garants de l'activité d'absorption de l'épithélium
- Des cellules en gobelet ou caliciformes, sécrétant du mucus afin de faciliter la progression des fèces
- Des cellules entéroendocrines ou neuroendocrines assurant la régulation de différentes activités du côlon.
- Des cellules Tuft dont la fonction est encore peu connue.
- Des myofibroblastes « péricryptaux » situés sous la base de la crypte
- Des cellules M (M cells : Microfold cells) couvrant les follicules lymphoïdes et capables de présenter les pathogènes aux cellules du système immunitaire

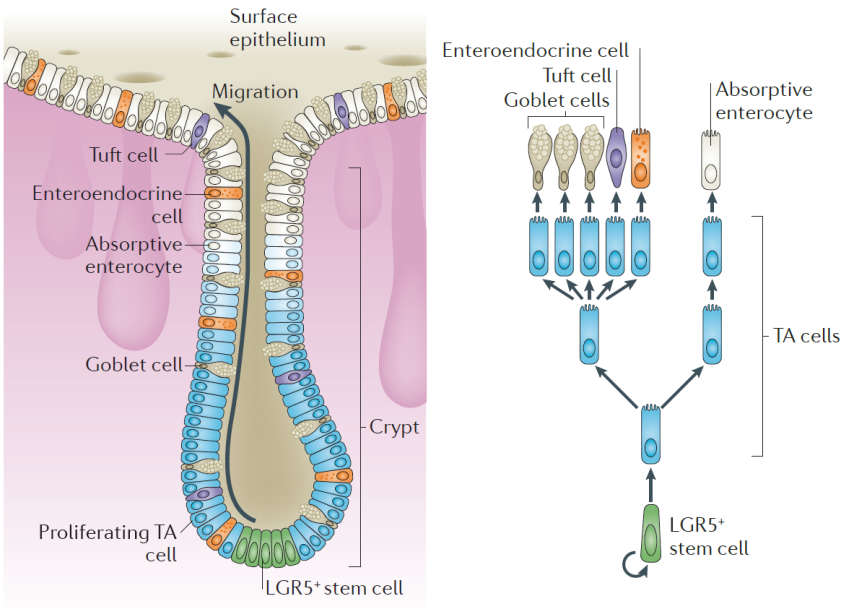


Figure 10 : organisation d'une crypte colique (d'après Barker, 2014) (Barker, 2014)

Le compartiment prolifératif

A la base des cryptes se situent environ 4 à 6 cellules souches pluripotentes. Ces cellules prolifèrent rapidement afin de participer au renouvellement constant de l'épithélium. Chez l'Homme, le renouvellement complet de l'épithélium colique se fait en 5 à 7 jours, ce qui correspond à la durée de vie des colonocytes et cellules caliciformes. Les cellules souches se différencient en progéniteurs des cellules épithéliales, également appelés « TA cells » (Transit Amplifying cells). Ces cellules progénitrices remontent progressivement le long de la crypte. Les cellules TA se différencient et assurent le renouvellement des types cellulaires composant l'épithélium (entérocytes, cellules en gobelets, cellules entéroendocrines et cellules Tuft). Arrivées dans la lumière intestinale, les cellules cessent de se différencier et meurent par anoïkis. La prolifération des cellules souches permet en outre le maintien de la niche à la base de la crypte.

L'épithélium colique fonctionnel

Différents types cellulaires assurent les fonctions de l'épithélium colique. Les entérocytes sont responsables de l'activité d'absorption du côlon. Ils assèchent les fèces en absorbant l'eau contenue dans le bol intestinal. Ils permettent également la récupération de certaines vitamines et d'électrolytes.

Les cellules en gobelet sécrètent le mucus afin de lubrifier la lumière du côlon et de faciliter la progression des fèces. Elles sont en nombre plus important à mesure que l'on s'approche du canal anal.

Les cellules endocrines sécrètent des hormones vers le sang, mais également vers l'épithélium afin de réguler la prolifération des cellules épithéliales ainsi que les fonctions de sécrétion, d'absorption, de motilité et de contrôle de la barrière immunitaire.

La fonction des cellules Tuft est encore mal connue, mais il semble qu'elles soient responsables de l'initiation de la réponse immunitaire de type T helper 2 (Th2). Elles sont capables de reconnaitre les parasites présents dans la lumière intestinale. Il semble que, en réponse à ce stimulus, les cellules Tuft favorisent l'expansion et la prolifération des cellules lymphoïdes innées de type 2 (ILC2 : type 2 Innate Lymphoid Cells), via la sécrétion de IL-25 (von Moltke et coll., 2016). En réponse, les ILC2 sécrètent IL-13 qui stimule les cellules souches des cryptes et promeut leur différenciation en nouvelles cellules Tuft.

Les myofibroblastes empruntent des propriétés aux fibroblastes et aux cellules musculaires, comme leur activité contractile. Les myofibroblastes péricryptaux, outre leur fonction de soutien de la crypte, activent les récepteurs Frizzled des cellules souches épithéliales, via la sécrétion de ligands de la voie Wnt (Fevr et coll., 2007). Ils contrôlent différentes activités des cellules souches : maintenance de la niche, migration et différenciation (Humphries et Wright, 2008).

Les cellules M sont spécialisées dans l'assimilation et le transport d'antigènes. Ces antigènes sont transportés depuis la lumière vers la région du dôme subépithélial (SED : SubEpithelial Dome), riche en cellules dendritiques, dans laquelle ils sont présentés aux cellules immunitaires. Les cellules M couvrent les follicules lymphoïdes, principalement constitués de cellules B, de cellules dendritiques et de cellules de la réponse innée.

Des cellules de Paneth, spécifiques à l'intestin grêle, sont parfois observées au sein du côlon ascendant ou dans des situations pathologiques et ont un rôle de protection contre les micro-organismes pathogènes en secrétant le lysozyme.

La lamina propria contient également des lymphocytes B et T, des macrophages ainsi que des éosinophiles et des mastocytes.

ii. La sous-muqueuse

Située entre la muqueuse et la musculaire muqueuse, la sous-muqueuse ou submucosa est constituée de tissu conjonctif fibreux dans lequel se trouvent des fibroblastes, des mastocytes, des vaisseaux sanguins et lymphatiques. Elle contient également un plexus de fibres nerveuses, le plexus de Meissner, composé de fibres sympathiques et parasympathiques.

iii. La musculaire muqueuse

Aussi appelée muscularis mucosa, elle sépare la couche muqueuse de la sous-muqueuse. C'est une couche de tissu musculaire lisse d'épaisseur variable. Elle est traversée par les complexes lymphoglandulaires, des invasions des cryptes à travers la musculaire musculeuse, et des réseaux vasculaires et nerveux.

iv. La musculaire propre ou musculeuse

Cette tunique est principalement responsable des mouvements péristaltiques du côlon. Elle est constituée de deux couches de muscles lisses : une couche interne circulaire et une couche externe longitudinale. Un important plexus de fibres nerveuses est localisé entre ces deux couches : le plexus myentérique ou plexus d'Auerbach. Les cellules interstitielles de Cajal se trouvent dans le plexus myentérique, ainsi que dans la musculeuse et la sous-muqueuse. Ces cellules sont responsables de la régulation de la motilité du côlon.

v. La séreuse

C'est une mince couche de cellules mésothéliales qui bordent la sous-séreuse. Elle est composée de tissu conjonctif qui soutient les vaisseaux et les nerfs de la musculaire externe. Le tissu adipeux y est abondant.

b. Complications des radiothérapies abdomino-pelviennes

L'exposition des organes sains entourant la tumeur lors d'une séance de radiothérapie induit une toxicité forte au niveau de ces organes. De nombreux patients subissent des effets secondaires après radiothérapie, allant de l'érythème cutané à des pathologies potentiellement létales, telles que

la fibrose. En raison de l'incidence des cancers abdomino-pelviens et de la forte radiosensibilité des organes y siégeant, les effets secondaires au côlon et au rectum sont particulièrement fréquents.

Les effets secondaires des radiothérapies dans la zone abdomino-pelvienne sont classés par délai d'apparition : aigus (0-3 mois) et tardifs (supérieurs à 3 mois). La toxicité tardive peut se manifester jusqu'à 30 ans après le traitement. Les effets secondaires aigus sont de différentes natures selon l'organe considéré : érythème sur la peau, diarrhées et douleurs en ce qui concerne l'intestin et pneumopathie entre autres. Ils touchent essentiellement les tissus à renouvellement rapide, telle que la peau, les muqueuses et la moelle osseuse. Le côlon, dont l'épithélium se renouvelle en 5 à 6 jours chez l'Homme, est donc particulièrement sensible aux rayonnements ionisants. Les effets tardifs atteignent majoritairement les tissus de soutien avec développement d'une fibrose pouvant entrainer la perte de fonctionnalité de l'organe atteint. L'activation d'oncogènes par les rayonnements ionisants peut également engendrer l'apparition de tumeurs radio-induites à des temps tardifs. Il est à l'heure actuelle impossible de circonscrire l'effet de l'irradiation aux seules cellules tumorales et le traitement des effets secondaires reste un enjeu prioritaire dans l'amélioration de la prise en charge des patients.

Lors du traitement des cancers abdomino-pelviens, les organes du tractus gastro-intestinal (intestin grêle, côlon et rectum) sont donc à risque. Aux États-Unis, environ 300 000 patients reçoivent une radiothérapie abdominale ou pelvienne chaque année. L'incidence des effets aigus au tractus gastro-intestinal est d'environ 60 à 80% (Hauer-Jensen et coll., 2014). Les effets tardifs sont moins fréquents, mais leur incidence augmente avec la survie des patients. Ainsi, on compte 4 à 10% de patients atteints de complications chroniques 5 à 10 ans après radiothérapie, et jusqu'à 20% sur 20 ans (Andreyev et coll., 2011). Il y a plus de 13 millions de survivants de cancers aux États-Unis et des estimations projettent une augmentation jusqu'à 18 millions en 2022. Plus de la moitié de ces patients ont subi une radiothérapie abdominale ou pelvienne. Il est donc probable que le nombre de patients souffrant de séquelles tardives de radiothérapies abdomino-pelviennes croitra dans les mêmes proportions au cours de cette période. La réduction de l'incidence et le traitement de ces complications est donc une priorité.

Andreyev et coll. ont proposé en 2011 d'établir un nouveau formalisme pour les atteintes secondaires des radiothérapies abdomino-pelviennes. L'ensemble des troubles liés à l'utilisation thérapeutique des rayonnements ionisants au niveau abdomino-pelvien est à présent désigné par le terme « Pelvic Radiation Disease » (PRD). Cette nouvelle terminologie est destinée à mettre en avant cette pathologie, mal connue des médecins et à laquelle peu d'attention est apportée d'après les auteurs (Andreyev et coll., 2011). La Figure 11 présente les mécanismes d'apparition de la PRD ainsi que les manifestations physiopathologiques et cliniques de cette pathologie.

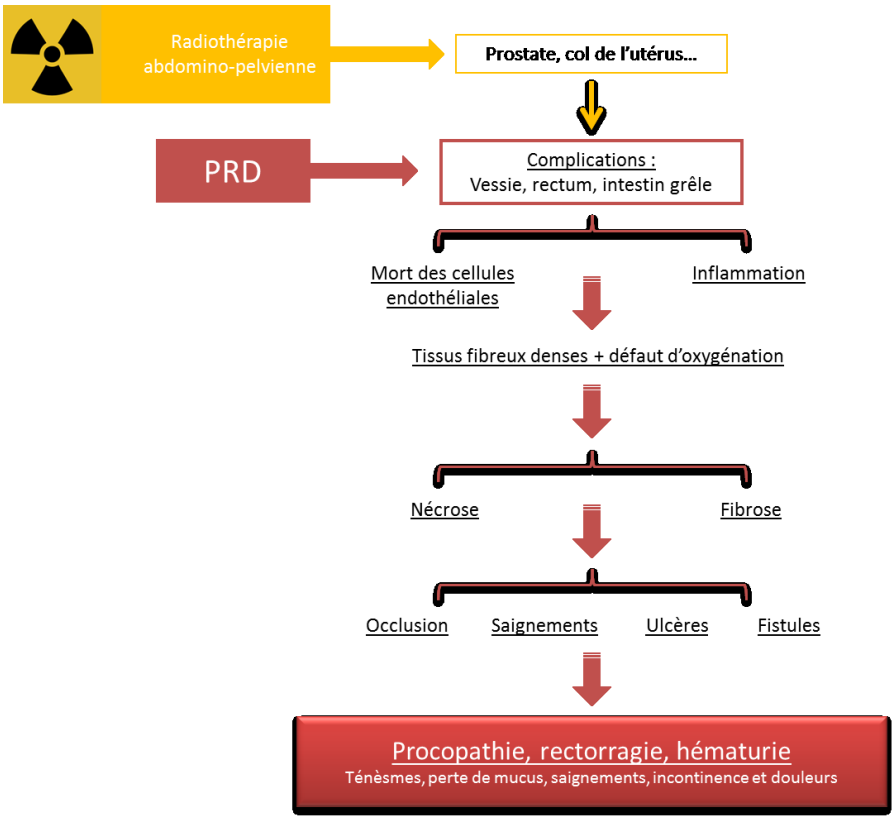


Figure 11 : mécanismes et manifestations de la PRD

i. Dommages aigus au côlon-rectum

Les dommages aigus apparaissent chez 60 à 80% des patients subissant une radiothérapie abdomino-pelvienne. Au niveau de l'intestin, ils deviennent apparents dans les jours suivant le début de la radiothérapie et sont principalement la conséquence de la mort des cellules épithéliales des cryptes et d'une réaction inflammatoire prolongée au sein de la lamina propria. La mort des cellules épithéliales et des cellules souches des cryptes produit des ulcères et favorise la destruction de la barrière muqueuse et l'inflammation de cette dernière (Theis et coll., 2010). Les symptômes de ces dommages aigus sont : nausées, douleurs abdominales, diarrhées et fatigue. Chez la majorité des patients, ces symptômes disparaissent 1 à 3 mois après arrêt du traitement.

ii. Dommages chroniques au côlon-rectum

20 ans après la radiothérapie, le nombre de patients souffrant de complications intestinales chroniques peut atteindre 20%. Les symptômes apparaissent typiquement dans un délai de 6 mois à 3

ans, mais la période de latence peut dans certains cas atteindre 20 ans. En situation de complication chronique, l'activation des fibroblastes et des cellules musculaires lisse du côlon-rectum se traduit par l'accumulation de collagène menant à la fibrose. Cette activation des cellules résidentes résulte de la mise en place d'une réaction inflammatoire chronique, permettant l'activation de facteurs de croissance pro-fibrosant. La mort des cellules endothéliales associée à la production de matrice extracellulaire (MEC) dense induit l'ischémie du tissu, pouvant mener à la nécrose. Ces modifications peuvent résulter en la dégénération vasculaire, la formation de vaisseaux télangiectasiques, l'ulcération de la muqueuse et l'adhésion de la séreuse. Les principales caractéristiques cliniques de ces pathologies sont : l'altération du transit intestinal (diarrhées, constipation), l'incontinence, les vomissements, les saignements et des douleurs viscérales chroniques. Les modifications pathologiques de la barrière intestinale peuvent conduire à l'obstruction par perte des mouvements péristaltiques et sténose. Certains patients développent des fistules en conséquence des effets décrits ci-dessus.

Il est important de noter que l'association de la radiothérapie avec d'autres types de traitements, tels que la chimiothérapie ou la chirurgie, peut augmenter les risques de complications. Les facteurs de risque sont également nombreux : Maladie Inflammatoire Chronique de l'Intestin (MICI), diabète, pathologies vasculaires, collagénoses des vaisseaux, tabagisme… Ces facteurs sont à prendre en compte lors des prises en charge de patients atteints de complications radio-induites chroniques.

iii. Effets secondaires aux autres organes de la sphère abdomino-pelvienne

Vessie

La cystite radique est une lésion de la vessie associée aux radiothérapies pelviennes externes qui peut survenir des années après le traitement (Crew et coll., 2001). La cystite radique se traduit par l'apparition d'hématurie caractérisée par une inflammation hémorragique de la muqueuse du tractus urinaire. Les symptômes cliniques varient de l'hématurie microscopique asymptomatique à l'apparition de caillots et la survenue de l'obstruction du tractus urinaire (Trotman et coll., 1999, Lee et coll., 2003). Cette pathologie provoque des douleurs sévères, une hématurie importante ainsi que des incontinences et syndromes d'irritation. Dans sa forme sévère, la cystite hémorragique détériore la qualité de vie des patients, prolonge leur hospitalisation et peut devenir létale. De plus, les patients en rémission de cette pathologie présentent une survie sans maladie plus faible que les patients n'ayant pas présenté ce type de troubles (Cesaro et coll., 2003, Cesaro et coll., 2008). Les dommages causés par les rayonnements aux muscles et aux cellules endothéliales de la vessie compromettent l'apport sanguin et de nutriments au tissu (Neheman et coll., 2005, Haldar et coll., 2014). La survenue

de la cystite radique est difficile à prévenir, en particulier car les vaisseaux endommagés peuvent survivre des mois voire des années.

Les mécanismes d'induction de la cystite radique incluent :

- Le passage d'irritants tels que la caféine ou l'urokinase à travers l'urothélium, causant l'inflammation chronique de la vessie ainsi que la destruction ou la dysfonction de la couche de glycosaminoglycanes (Parsons, 2011)
- La sécrétion chronique d'histamine par les mastocytes, induisant des dommages à l'urothélium, une inflammation chronique et des douleurs (Sant et coll., 2007).
- La pyroptose, principale cause d'hyperplasie et de mort des cellules musculaires de la vessie au cours de la cystite hémorragique. Ce phénomène entraine notamment la production de ROS ainsi que la sécrétion de cytokines par les cellules immunitaires (Lee et Lee, 2013).

c. Traitements des effets secondaires au côlon-rectum

Il existe trois types de thérapies possibles pour traiter la PRD : pharmacologique, endoscopique et chirurgical. La plupart des traitements existant sont symptomatiques : anti-diarrhéiques, anti-vomitifs, anti-inflammatoires entre autres. Trois mécanismes à l'origine des symptômes de la PRD ont particulièrement été visés : l'inflammation, l'hypoxie et le stress oxydant. Hanson et coll. ont réalisé une méta-analyse des résultats obtenus lors d'essais cliniques de thérapies innovantes pour la PRD (Hanson et coll., 2012). Ces traitements sont décrits dans le Tableau 4.

La méthode endoscopique de coagulation par plasma argon (APC : Argon Plasma Coagulation) a fait l'objet de nombreuses études cliniques. L'APC consiste à appliquer un courant à haute fréquence sur le tissu afin de cautériser les vaisseaux hémorragiques. Les essais cliniques réalisés jusqu'à présent montrent que cette méthode permet de réduire les saignements rectaux à court et long terme. Des cas de résolution complète de ces symptômes ont également été observés. Néanmoins, les effets secondaires sont nombreux et parfois lourdement impactant pour la qualité de vie des patients. En effet, le plasma produit des brûlures sur le tissu environnant les vaisseaux à traiter. Ces lésions peuvent par conséquent donner lieu à divers effets secondaires dont les plus fréquents sont des crampes abdominales et des ulcérations. En revanche, des lésions plus sévères apparaissent avec une fréquence moindre : explosion gazeuse, perforation, fistule, sténose et douleur chronique (Frazzoni et coll., 2015). D'autres méthodes reposant sur un principe similaire, telles que la coagulation par laser Nd:YAG, ont été utilisées sans succès en raisons d'effets secondaires lourds ou d'un manque de

données fiables en cliniques. En ce qui concerne l'APC, il est encore nécessaire de réaliser des essais sur des cohortes plus importantes, randomisés, en double aveugle et contre placebo, et ce à court et long terme.

Les méthodes pharmacologiques sont à l'heure actuelle considérées comme moins prometteuses. Le formaldéhyde peut être appliqué directement sur les vaisseaux hémorragiques afin de stopper les saignements, mais les effets secondaires sont sévères (ulcérations, incontinence, colite…). Le stress oxydant est un mécanisme majeur d'induction des dommages radio-induit. Différents agents ont été utilisés pour limiter ce stress oxydant chez les patients irradiés : le tocophérol et la pentoxifylline par exmple. Cependant, aucune de ces molécules n'a pour l'instant produit un effet satisfaisant sur la réduction des lésions radio-induites (Hanson et coll., 2012).

Des stratégies visant à favoriser l'angiogenèse au sein du tissu lésé sont à l'étude. La thérapie par oxygène hyperbare induit la régénération des tissus endothéliaux et épithéliaux. Les méthodologies employées lors des essais cliniques correspondant ne permettent pas à l'heure actuelle de conclure sur l'efficacité du traitement. Un essai sur 120 patients souffrant de saignements rectaux réfractaires aux traitements médicamenteux a permis de montrer une diminution de 32% du risque absolu de nouvelles hémorragies chez ces patients. En revanche, une analyse rétrospective sur des patients souffrant de cancers récurrents de la tête et du cou a montré une augmentation du risque de récidive cancéreuse chez les patients traités par oxygène hyperbare.

Enfin, la chirurgie est la méthode actuellement la plus employée en dernière intension, mais les taux de morbidité et de mortalité qui y sont associés sont élevés.

Il n'existe en conclusion aucun traitement validé en termes d'efficacité et d'innocuité pour la PRD et les thérapies innovantes, telles que la thérapie cellulaire, font donc l'objet d'études approfondies.

Tableau 4 : interventions chirurgicales et non-chirurgicales pour le traitement des complications colorectales chroniques et sévères des radiothérapies (D'après Denton et coll., 2002 ; Hong et coll., 2001 ; Rustagi et coll., 2011) (Hong et coll., 2001, Denton et coll., 2002, Rustagi et Mashimo, 2011)

Thérapie	Mécanisme	Résultat	Effets secondaires
Anti-inflammatoires : **Prednisolone** **Sulfasalazine** **Hydrocortisone**	Traitement anti-inflammatoire de première intention	Réduction des saignements, des ulcères de la muqueuse (4 semaines) des diarrhées, des œdèmes, des	Pas d'effets secondaires enregistrés

Bétaméthasone **Métronidazole**		érythèmes rectaux (1 an, 22/24 patients)	
Acide gras à chaînes courtes	Effet trophique sur la muqueuse colique, dilatation des parois des artères : entraine l'amélioration du flux sanguin	Efficace à court terme : diminution des saignements (5 semaines), pas d'effet significatif à long terme	Pas d'effets secondaires enregistrés
Sucralfate **Polysulfate de pentosane**	Stimulation de la régénération de l'épithélium, formation d'une barrière protectrice, réduction de la perméabilité épithéliale et prévention de l'adhérence	Amélioration de l'état clinique et de la muqueuse sans score permettant de démontrer l'efficacité	Un cas d'éruption cutanée avec le pentosane
Formaline	Sclérose et fermeture de la néovascularisation prévenant les saignements. L'application locale induit la cautérisation	208 patients suivis en moyennes sur 6 mois. Réduction des saignements pendant au moins 3 mois	11 cas d'effets secondaires sévères : 5 cas d'ulcérations anales, 2 cas de sténose rectale, 2 cas d'incontinence et 2 cas de douleurs anales
Thérapies par coagulation thermique : **Laser ND :YAG** **Laser argon** **Ablation par radiofréquence** **Cryoablation**	Coagulation locale des vaisseaux télangiectasiques, cicatrisation et ré-épithélialisation avec apparition de tissu normal à long terme	Diminution des saignements rectaux (80 – 90% des cas), des ténèsmes (60 – 75%) et de la qualité de vie	19 à 35% de complications Nécrose transmurale, fibrose, sténose, fistules recto-vaginales, douleurs.
Oxygène hyperbare	Effet pro-angiogénique, particulièrement adapté aux phases chroniques des lésions radio-induites	Pas d'évaluation de l'efficacité disponible	Augmentation du risque de résurgence dans le cas des cancers de la tête et du cou (67,3% contre 30% chez les patients non traités)
Autres traitements : **Vitamine C et E** **Pentoxifylline**	Antioxydants	Pas d'évaluation de l'efficacité disponible	1 cas de douleurs abdominales et 1 cas de perforation
Chirurgie	Généralement réservé aux cas sévères et réfractaires aux traitements conventionnels impliquant : hémorragies, occlusions, sténoses, fistules et/ou perforations	-	Taux de morbidité et de mortalité élevés

d. Thérapie cellulaire par les CSM pour le traitement des atteintes radio-induites au côlon-rectum

i. Études précliniques

L'utilisation de la thérapie cellulaire pour les complications des radiothérapies de la sphère abdomino-pelvienne a fait l'objet de plusieurs études précliniques (Tableau 5). Les atteintes observées dans le cas de MICI, telles que la maladie de Crohn, sont similaires aux complications apparaissant lors de la PRD, hormis les effets auto-immuns et ophtalmiques. De plus, l'inflammation joue un rôle central dans ces pathologies, à l'instar des complications radio-induites. Les manifestations cliniques des MICI sont identiques à celles de la PRD au niveau intestinal : fibrose, nécrose, fistules. Les symptômes sont également les mêmes : douleurs, diarrhées, saignement. Ainsi, les résultats d'études précliniques et cliniques sur les MICI peuvent être transposés aux atteintes digestives de la PRD.

En 2003, Chapel et coll. ont démontré la capacité des CSM à migrer spécifiquement vers l'intestin après irradiation (Chapel et coll., 2003), résultat confirmé ensuite par d'autres études (Francois et coll., 2006, Mouiseddine et coll., 2007, Zhang et coll., 2008). Spécifiquement, les CSM peuvent se localiser dans la muqueuse entérique dans laquelle elles inhibent l'ulcération et favorisent la régénération (Semont et coll., 2006, Kudo et coll., 2010, Semont et coll., 2010). En 2010, une étude chez la souris humanisée a permis de montrer que la transplantation de CSM améliore l'homéostasie cellulaire de l'intestin, notamment au niveau de la muqueuse, en augmentant la prolifération et en inhibant l'apoptose (Semont et coll., 2010, Francois et coll., 2012). Cet effet passe en particulier par la stimulation de la prolifération des cellules épithéliales, potentialisée par la sécrétion autocrine de WNT4 (Wingless Type 4) par les cellules épithéliales (Semont et coll., 2013).La transplantation de cellules stromales dérivées de la moelle osseuse augmente la concentration sanguine de facteurs de croissance intestinaux et induit la régénération des villosités, accélérant ainsi la récupération fonctionnelle de l'intestin (Saha et coll., 2011). Une étude *in vitro* sur des organoïdes issus de l'épithélium intestinal de souris indique que les CSM exercent un effet anti-apoptotique et de stimulation de la prolifération sur les cellules des cryptes (Chang et coll., 2016). De plus, les CSM améliorent la régénération musculaire et augmentent la fonction contractile des sphincters de l'anus (Lorenzi et coll., 2008). Gao et coll. ont montré que l'injection répétée de milieu conditionné par les CSM augmente la survie et diminue la fréquence des diarrhées sur un modèle murin d'irradiation intestinale (Gao et coll., 2012). Ce résultat suggère une action paracrine des CSM, ne nécessitant pas de contacts intercellulaires. Dans un modèle d'irradiation colorectale chez le rat, la transplantation de CSM induit la production de glucocorticoïdes qui participent à la diminution de la migration des cellules T, favorisant ainsi également la régénération de l'épithélium (Bessout et coll., 2014). Cet effet immunosuppresseur a également été identifié après irradiation abdominale chez le rat, où une

diminution de l'infiltration des polymorphonucléaires a été observée (Chang et coll., 2013). Chez le cochon, les CSM améliorent la rectite radique par un effet pro-angiogénique associé au remodelage de la MEC. La régression de la fibrose ainsi que la diminution de l'inflammation ont également été observées dans ce modèle (Linard et coll., 2013). Enfin, les CSM induisent une réversion de l'hypersensibilité viscérale dans un modèle d'irradiation colorectale chez le rat. Cet effet a été attribué à la diminution des interactions entre mastocytes et fibres nerveuses (Durand et coll., 2015).

Tableau 5: effet des CSM sur les modèles précliniques de complications intestinales des radiothérapies abdomino-pelviennes

Effet	Référence
Migration dans la muqueuse entérique	Chapel et coll., 2003 ; François et coll., 2006 ; Mouiseddine et coll., 2007 : Zhang et coll., 2008 ; Sémont et coll., 2010
Amélioration de l'architecture intestinale	Sémont et coll., 2006 ; Sémont et coll., 2010 ; Kudo et coll., 2010 ; Saha et coll., 2011
Augmentation de la prolifération/diminution de l'apoptose	Sémont et coll., 2010 ; François et coll., 2012, Chang et coll., 2016
Effet pro-angiogénique	Linard et coll., 2013 ; Chang et coll., 2013
Effet immunosuppresseur	Bessout et coll., 2014 ; Chang et coll., 2013
Augmentation de la survie	Gao et coll., 2012
Diminution des diarrhées	Gao et coll., 2012
Réversion de l'hypersensibilité viscérale	Durand et coll., 2015

Les CSM ont également été utilisées sur des modèles précliniques de MICI. Ainsi, la transplantation de CSM a un effet bénéfique sur des modèles expérimentaux de colite (Duijvestein et coll., 2011, Castelo-Branco et coll., 2012, He et coll., 2012). Cet effet se traduit par une diminution de la perte de poids et des saignements rectaux, ainsi que par une amélioration de la consistance des fèces. L'effet des CSM sur ces modèles repose en partie sur leurs propriétés immunomodulatrices, en particulier par la diminution de l'expression de cytokines pro-inflammatoires, telles que TNF-α et IL-1β (Castelo-Branco et coll., 2012, He et coll., 2012). Plus généralement, l'injection de CSM permet de limiter l'infiltrat inflammatoire dans ces modèles (Duijvestein et coll., 2011, He et coll., 2012). La régénération de la muqueuse colique a également été observée au cours de ces études, associée à la réduction du nombre d'évènements apoptotiques (Castelo-Branco et coll., 2012). Enfin, la transplantation de CSM a induit une diminution du dépôt de collagène au sein du tissu (Castelo-Branco et coll., 2012).

ii. Cas cliniques

Dans un premier temps, les CSM ont été utilisées afin d'améliorer la reconstitution hématopoïétique. Leur aspect immunomodulateur a été mis à profit dans le traitement de pathologies telles que la maladie du greffon contre l'hôte (GVHD : Graft-Versus-Host Disease). Des essais cliniques ont été menés pour le traitement des fistules chez les patients atteints de la maladie de Crohn. Dans ce dernier cas, les résultats montrent un potentiel de régénération de la muqueuse intestinale par les CSM (Duijvestein et coll., 2010, Rastegar et coll., 2010).

Les CSM ont été utilisées pour le traitement des atteintes secondaires chroniques des radiothérapies. Les premiers résultats positifs ont été obtenus chez des patients présentant une insuffisance médullaire suite à une prise de greffe incomplète survenue après transplantation de cellules souches hématopoïétiques autologues. Après chimiothérapie, l'injection de CSM a amélioré le stroma de la moelle osseuse (Fouillard et coll., 2003) et induit une récupération rapide et à long terme de l'hématopoïèse (Fouillard et coll., 2007). Une diminution de la toxicité hématopoïétique et une amélioration de la reconstitution hématopoïétique ont été mises en évidence (Fouillard et coll., 2013).

Plusieurs essais compassionnels ont déjà été entrepris pour traiter des patients après irradiation accidentelle. En 2006, un patient chilien ayant subi une brûlure radiologique a été traité avec succès par une association de greffes de peau et de transplantation de CSM. 11 mois de suivi post-transplantation ont permis d'observer une évolution positive de la lésion, sans résurgence de la brûlure. De plus, aucune altération de la fonctionnalité de la zone lésée n'a été notée (Lataillade et coll., 2007). Ce type de protocole a été employé au total chez 7 patients ayant développé des brûlures sévères (nécrose musculo-cutanée) et réfractaires aux traitements conventionnels. Le suivi de ces patients, jusqu'à 9 ans après traitement, a montré une cicatrisation de bonne qualité sans résurgence de la lésion initiale ou d'effets secondaires. Une diminution de la douleur soutenue dans le temps, de 80 à 40% sur l'échelle de douleur numérique (VAS), a été observée (Tamarat et coll., 2012).

Dans le cas du cancer du sein, plusieurs études ont montré le bénéfice de l'injection locale de cellules stromales pour le traitement des complications chroniques des radiothérapies. L'amélioration des lésions a pu être obtenue dans ce cas par l'injection de fraction vasculaire stromale (FVS), contenant pour partie des CSM, obtenue par lipoaspiration (Vinci et coll., 2013). Kursova et al ont montré sur 11 patientes, présentant des lésions pulmonaires suite à une radiothérapie du cancer du sein, que la FVS stabilisait la progression des lésions dans l'année après le traitement. De plus, les paramètres de spirographie, le statut immun, la scintigraphie pulmonaire et les marqueurs

d'inflammation et d'hypoxie étaient améliorés (Kursova et coll., 2009). D'autres études se sont concentrées sur la reconstruction du tissu conjonctif et de la peau, toujours dans le cadre de la radiothérapie du cancer du sein. Rigotti et coll. ont mis en évidence, sur 20 patientes en 2007 (Rigotti et coll., 2007), et 137 en 2010(Rigotti et coll., 2010), la capacité de la FVS à favoriser la régénération tissulaire (impossible auparavant) sans résurgence de cancer, avec un suivi de 8 ans en moyenne. Ces propriétés régénératives ont permis une amélioration de la perfusion ainsi que du remodelage du tissu. Akita et coll. ont obtenu des résultats similaires en 2010 et 2012 (Akita et coll., 2010). Enfin, 72 patientes souffrant de douleurs post-mastectomie ont été traitées par injection de graisse autologue. Une diminution significative de la douleur a été observée après greffe, permettant à 28 patientes de stopper leur traitement analgésique (Caviggioli et coll., 2011, Caviggioli et coll., 2013).

De nombreuses données sont disponibles sur l'utilisation des CSM sur les MICI. Chez des patients atteints de la maladie de Crohn, la transplantation de CSM a produit des effets bénéfiques sur des fistules périanales complexes (Garcia-Olmo et coll., 2005, Garcia-Olmo et coll., 2009, Ciccocioppo et coll., 2011, Guadalajara et coll., 2012, Herreros et coll., 2012). Lors d'une étude de phase I, l'administration de CSM a permis d'obtenir la guérison de 75% des fistules (Garcia-Olmo et coll., 2005). Dans une étude de phase II, 71% des fistules étaient guéries 8 semaines après transplantation de CSM combinée à un traitement à la colle de fibrine, et la qualité de vie des patients était améliorée comme indiqué par les résultats du questionnaire SF-12 (Garcia-Olmo et coll., 2009). 42 mois après transplantation, 7 des 12 patients traités ne présentaient plus de fistules (Guadalajara et coll., 2012). D'après les résultats d'un troisième essai clinique, cet effet est lié à l'augmentation du pourcentage de cellules T régulatrices, à la fois dans la muqueuse rectale et dans le sang (Ciccocioppo et coll., 2011). Dans les pathologies luminales, ce sont les propriétés immunosuppressives des CSM qui sont exploitées. Dans une étude de phase I, quatre patients atteints de maladie de Crohn et trois de colites ulcérantes ont été traités par transplantation de CSM. 5 d'entre eux sont entrés en rémission, dont deux d'entre eux pour 2 ans (Liang et coll., 2012). Dans un essai de phase II, 14 patients souffrant de maladie de Crohn luminale ont été transplantés avec des CSM allogéniques. L'état de douze de ces patients s'est amélioré et huit d'entre eux sont entrés en rémission (Forbes et coll., 2014). La fibrose intestinale est une manifestation fréquente des MICI, en particulier de la maladie de Crohn. Bien que les marqueurs de la fibrose n'aient pas été évalués dans ces études, il est probable que l'inhibition de la fibrogénèse fasse partie des mécanismes induisant l'amélioration du statut clinique de ces patients.

Les premiers succès cliniques de transplantation de CSM en conditions inflammatoires furent obtenus sur des GVHD sévères, notamment pour les atteintes viscérales (Weng et coll., 2010). Entre octobre 2001 et janvier 2007, 55 patients ont été traités par transplantation de CSM lors d'un essai

clinique de phase II pour des GVHD sévères et résistantes aux stéroïdes. Après une injection de CSM, 27 patients ne présentaient plus aucun des symptômes associés à la GVHD. Des autres patients, 16 répondirent au traitement après une à plusieurs injections supplémentaires, et seuls 12 patients ne répondirent pas malgré plusieurs transplantations (Le Blanc et coll., 2008). Dans une autre étude, le traitement par CSM a permis de diminuer significativement la proportion de GVHD de grade II à IV (Bernardo et coll., 2011).

Ces résultats suggèrent la capacité des CSM à reverser les effets secondaires tardifs de la radiothérapie et ont ouvert la voie à de nouvelles études cliniques sur le sujet.

Tableau 6 : résultats de l'utilisation des CSM en clinique pour le traitement des atteintes radio-induites, des pathologies inflammatoires et des MICI

Pathologie	Traitement	Résultats	Références
Brûlure radio-induite accidentelle	Greffe de peau et transplantation de CSM	Cicatrisation après greffe de peau et injection de CSM Pas de résurgence des lésions Diminution de la douleur	Lataillade et coll., 2007 Tamarat et coll., 2012
Complications chroniques des radiothérapies : aplasie médullaire	Transplantation de CSM	Amélioration du stroma de la moelle osseuse Récupération de l'hématopoïèse Diminution de la toxicité hématopoïétique	Fouillard et coll., 2003 Fouillard et coll., 2007 Fouillard et coll., 2013
Complications chroniques des radiothérapies : cancer du sein	Injection de fraction vasculaire stromale ou de graisse autologue	Stabilisation des lésions pulmonaires Amélioration de la fonctionnalité pulmonaire Diminution de l'inflammation Diminution de l'hypoxie Remodelage matriciel Diminution de la douleur	Kursova et coll., 2009 Rigotti et coll., 2007 Rigotti et coll., 2010 Caviggioli et coll., 2011 Caviggioli et coll., 2013
Maladie de Crohn	Transplantation de CSM	Fermeture de fistules périanales complexes Amélioration de la qualité de vie	Rigotti et coll., 2007
GVHD	Transplantation de CSM	Diminution du grade de la GVHD Rémission complète chez certains patients	LeBlanc et coll., 2008 Bernardo et coll., 2011

iii. L'accident d'irradiation d'Épinal

Entre 2001 et 2006, 397 patients ont reçu une surdose d'irradiation d'environ 10% au centre hospitalier d'Épinal, lors d'un protocole de radiothérapie pour le cancer de la prostate (Peiffert et coll., 2007). 24 patients ont reçu une surdose d'irradiation de plus de 20%. Quelques mois plus tard, la plupart de ces patients souffraient de rectites et de cystites invalidantes, nécessitant pour certains de lourdes interventions chirurgicales (Peiffert et coll., 2007, Marchesi et coll., 2009). Plusieurs de ces patients ont subi une colostomie ou une urétérostomie et présentaient des douleurs intenses résistantes aux traitements morphiniques. Sept patients présentaient des lésions de grade III à IV avec colostomie de décharge et des fistules complexes ou recto-vésiculaires. En l'absence de traitements efficaces permettant de soulager ces patients, un essai compassionnel de thérapie par les CSM a été proposé à quatre patients atteints de colites hémorragiques radio-induites. Pour ce traitement, les CSM ont été isolées à partir de la moelle osseuse de donneurs intrafamiliaux. Ces patients ont reçu entre 2,6 et 5.10^6 cellules/kg par voie intraveineuse. La transplantation de CSM a induit un effet analgésique, anti-inflammatoire et a permis de réduire les hémorragies (Chapel et coll., 2013). Ces résultats étaient associés à une réduction de l'activation des lymphocytes T et une hausse du nombre de lymphocytes T régulateurs, soulignant l'importance des effets immunomodulateurs des CSM. La douleur est réapparue chez un de ces patients 6 mois après transplantation, et une nouvelle injection de CSM a été réalisée. Ce deuxième traitement a permis de réduire la douleur de façon significative. La transplantation de CSM a également stoppé la progression d'une fistule chez l'un de ces patients. Chez l'ensemble de ces patients, le cancer de la prostate est resté en rémission stable. Aucune toxicité n'a été observée (Voswinkel et coll., 2013). Les résultats de cet essai sont rapportés dans le Tableau 7. Cet essai compassionnel permet d'envisager de traiter des patients pour les séquelles des radiothérapies abdomino-pelviennes notamment pour les rectites radiques. Il est donc important de déterminer l'effet de cette thérapie sur la fibrose radio-induite. Actuellement, un nouveau Protocole Hospitalier de Recherche Clinique est financé par l'INCa (Institut National du Cancer) en prolongement de l'essai compassionnel d'Épinal. Cet essai thérapeutique de phase II a pour but d'évaluer l'efficacité de l'injection de CSM sur la symptomatologie de complications chroniques sévères des radiothérapies abdomino-pelviennes, après échec des thérapeutiques conventionnelles (Acronyme « PRISME » Numéro de protocole d'étude: P130935 ; EUDRACT 2014-001462-99 ; NCT02814864 https://clinicaltrials.gov/).). Cette étude a pour objectif de mesurer l'efficacité de trois injections intraveineuses de CSM sur la fréquence des rectorragies et des hématuries chez des patients souffrant de PRD.

Tableau 7 : caractéristiques cliniques des patients d'Épinal traités par transplantation de CSM

Patient Dose prescrite Dose reçue	Complications radio-induites	Traitement après radiothérapie	Résultats de la transplantation de CSM
1 78 Gy 93,2 Gy	Écoulements d'urine dans le rectum Pollakiurie Douleurs mictionnelles Saignements Large zone nécrotique Fistule dans la cavité prostatique	Colostomie Cathéter sous-pubien	Disparition de la douleur 10 jours après injection et réapparition 3 semaines plus tard
2 73 Gy 91 Gy	Douleurs chroniques Saignements rectaux permanents Rétraction vésicale Cystite et rectite actives Perte du lien vessie – prostate Fistule recto-prostatique	Colostomie de décharge Application d'une sonde de Foley	Suppression de la douleur et des saignements 4 semaines après injection et rechute 6 semaines après Suite à la deuxième injection de CSM : disparition de la douleur et des saignements et rechute 3 mois après
3 69 Gy 86 Gy	Réduction de la capacité de la vessie due à l'épaississement des parois vésicales Atrophie des glandes séminales Conversion des acides gras suite à l'irradiation de l'épine sacro-iliaque	Colostomie de décharge 20 séances d'oxygénothérapie	Réponse clinique 6 mois après transplantation avec réduction de la thérapie analgésique
4 70 Gy 78 Gy	Rectorragie de grade3 et diarrhées de grade 2 Cystite de grade 1 associée à une pollakiurie de grade 1 Douleur permanente accompagnée de crises de douleurs plus intenses une ou deux fois par semaine	Colostomie de décharge 20 séances d'oxygénothérapie	Réponse clinique 6 mois après transplantation : réduction stable des saignements, diarrhées et douleurs Amélioration de la qualité de vie

B. La fibrose : principale séquelle tardive des radiothérapies

I. La cicatrisation à l'origine de la fibrose

Les lésions tissulaires induisent des dommages aux cellules résidentes, par exemple aux cellules épithéliales et endothéliales. Les cellules mourantes sécrètent différents médiateurs de l'inflammation qui initient une cascade de coagulation antifibrinolytique associée à la congestion vasculaire. Une MEC temporaire est synthétisée pour servir de support au remplacement des cellules mortes. L'activation des plaquettes entraine la libération de divers médiateurs incluant des facteurs vasoactifs (vasodilatation, augmentation de la perméabilité vasculaire et œdème par exsudation plasmatique), des cytokines et chimiokines qui permettent le recrutement des leucocytes. Un caillot de fibrine est formé et sert de matrice pour la migration cellulaire et l'adhésion des plaquettes. La fibrinolyse est ensuite activée et conduit à la dissolution du caillot de fibrine qui laisse place au tissu conjonctif appelé tissu de granulation. La dissolution de la fibrine permet également la libération de plasmine qui active le système du complément, déclenchant ainsi le relargage d'anaphylatoxines chimiotactiques et vasoactives.

Dans une seconde phase, les leucocytes recrutés adhèrent à différentes molécules telles que les sélectines, les intégrines et les immunoglobulines. Les macrophages et les neutrophiles phagocytent les débris cellulaires, les cellules mortes ainsi que les organismes exogènes. Ils produisent également des cytokines et chimiokines participant au recrutement des cellules endothéliales nécessaires à la néovascularisation. L'interaction des fibroblastes, des fibrocytes et d'autres cellules résidentes avec le microenvironnement induit leur différenciation en myofibroblastes qui synthétisent de la MEC et des facteurs de croissance, en particulier le TGF-β1 pro-fibrosant (Figure 12). La sécrétion d'hormones autocrines induit la maturation des myofibroblastes. α-SMA (α-Smooth Muscle Actin) et la vimentine exprimées par les myofibroblastes sont responsables de leur activité contractile [9]. Cette contractibilité est requise pour la fermeture de la plaie. La formation de ce tissu de granulation est caractérisée par la présence de nombreux capillaires sanguins nécessaires à l'apport de nutriments, d'hormones et de gaz respiratoires.

Enfin, la migration et la maturation des cellules épithéliales et endothéliales permet la formation du tissu cicatriciel et la néovascularisation. La MEC provisoire est dégradée par les métalloprotéinases matricielles (MMP : Matrix MetalloProteinases) une fois le remplacement des

cellules complété. L'équilibre subtil entre les MMP et leurs inhibiteurs, les « tissue inhibitors of metalloproteinases » (TIMP) contrôle l'accumulation et la dégradation de la MEC pendant le processus de réparation. Ainsi, cette balance garantit le remodelage de la MEC en induisant une modification de sa composition. Pour terminer, les myofibroblastes meurent par apoptose, déclenchée par l'établissement d'une boucle d'activation négative signifiant la régénération du tissu lésé (Rieder et coll., 2007).

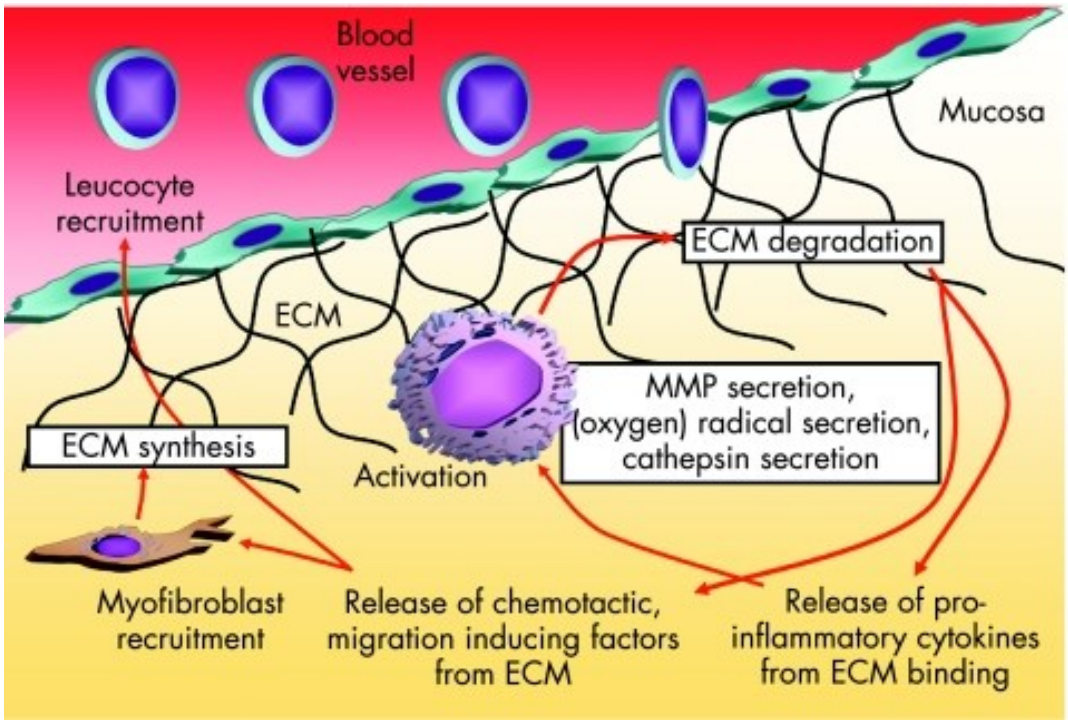


Figure 12 : séquence d'évènements initiant la fibrogénèse au cours de la cicatrisation (D'après Rieder et coll., 2007) (Rieder et coll., 2007)

II. La fibrose radio-induite

Les mécanismes inducteurs de fibrose sont pour la plupart communs à l'ensemble des pathologies fibrotiques, en particulier en ce qui concerne l'inflammation chronique (Figure 13). Il existe néanmoins certains mécanismes spécifiques à la fibrose radio-induite, notamment en raison des effets physico-chimiques des rayonnements. Les caractéristiques cliniques de la fibrose radio-induite sont une diminution de la souplesse, voire une rigidification du tissu, ainsi qu'un épaississement pouvant mener à l'occlusion dans le cas de l'intestin.

La fibrose débute par un processus de régénération tissulaire classique. Les cellules résidentes et recrutées, fibroblastes, fibrocytes et cellules musculaires lisses du côlon-rectum, sont activées en myofibroblastes pour produire la MEC provisoire. Dans le cas de la radiothérapie, l'exposition aux rayonnements ionisants induit la production massive d'espèces réactives de l'oxygène et de l'azote (respectivement ROS et RNS : Reactive Oxygen Species et Reactive Nitrogen Species). L'apoptose des cellules lésées, en particulier des cellules endothéliales, induit l'inflammation et l'ischémie du tissu. Les myofibroblastes activés produisent des chimiokines et recrutent les cellules du système immunitaire (macrophages, lymphocytes B et T, neutrophiles et éosinophiles). De nombreuses cytokines pro-inflammatoires et facteurs de croissance sont produits par les leucocytes recrutés. Notamment, des facteurs pro-fibrosants tels que le TGF-β1 sont sécrétés en grande quantité par les cellules inflammatoires. Ces facteurs participent au recrutement et à la différenciation de nouveaux myofibroblastes.

La production massive de MEC par les myofibroblastes participe à la mort cellulaire et donc à l'installation de l'inflammation chronique et de l'ischémie. Les cellules immunitaires induisent des dommages répétés aux cellules résidentes par la production de ROS supplémentaires, la mise en place de réactions auto-immunes et la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires. Les cellules immunitaires étant les principales productrices de métalloprotéinases, la modification du profile inflammatoire mène à un déséquilibre entre les MMP et les TIMP, empêchant la dégradation de la MEC excédentaire. Les contraintes mécaniques et les signaux pro-inflammatoires perpétuent le recrutement et la différenciation des myofibroblastes et des cellules immunitaires. Une boucle d'activation chronique de myofibroblastes s'installe, menant à l'accumulation progressive de MEC. La matrice pathologique envahit progressivement le tissu, résultant en une cicatrice fibrotique permanente [9].

L'augmentation progressive du volume de MEC au sein du tissu induit des contraintes mécaniques sur les cellules et provoque l'ischémie du tissu. En particulier, on observe une diminution de la vascularisation (Yarnold et Brotons, 2010). Les différentes contraintes imposées par la fibrose entretiennent les phénomènes de mort cellulaire et de remodelage qui participent au développement de la pathologie. La fibrose établie peut conduire à la perte de fonction et/ou l'atrophie du tissu, voire à la nécrose.

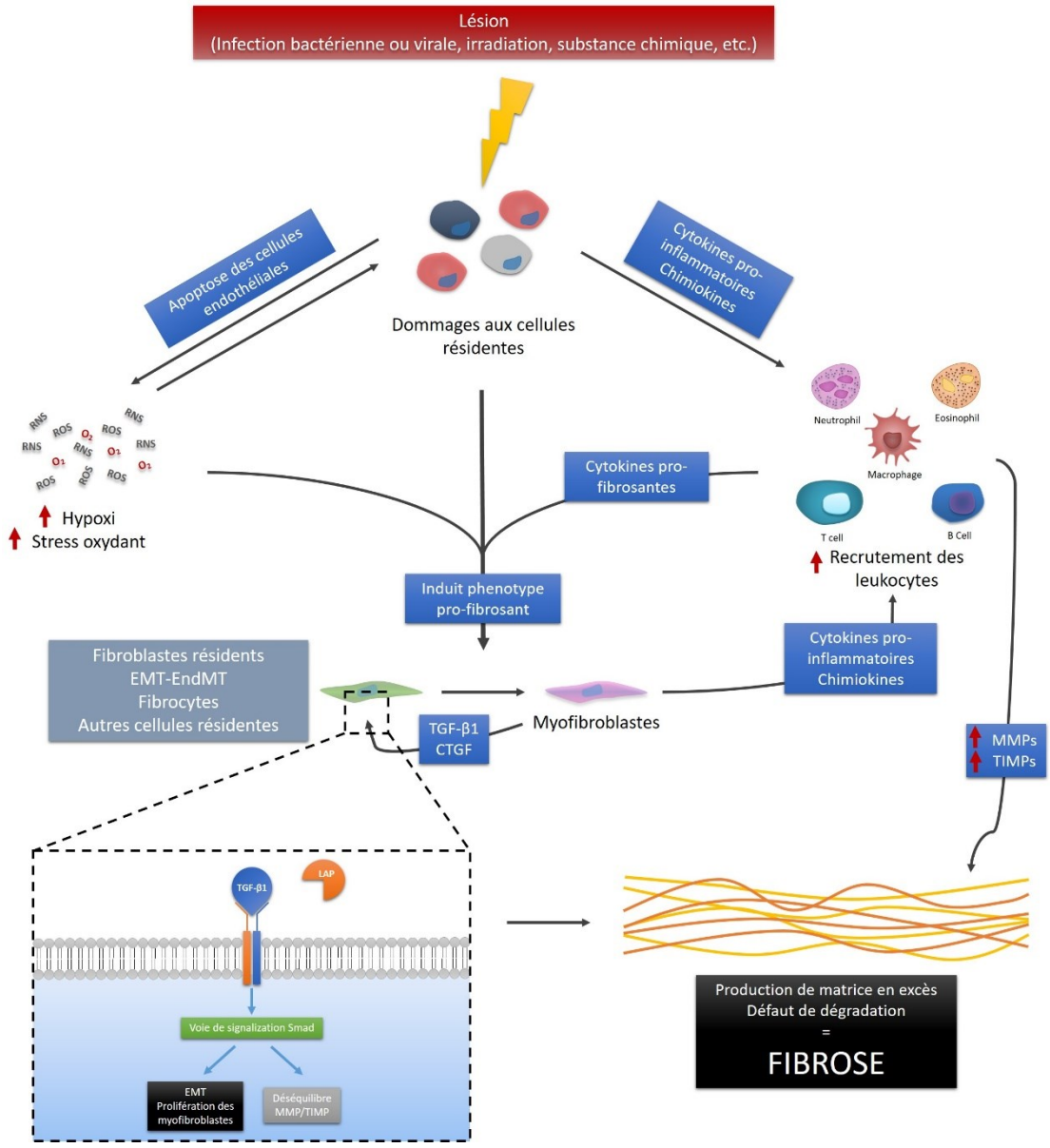


Figure 13 : mécanismes cellulaires et moléculaires de développement de la fibrose

Du point de vue histologique, la fibrose peut être définie selon deux étapes distinctes. La phase de développement correspond à l'initiation de l'accumulation de MEC pendant laquelle seules des zones de fibrose éparses sont visibles. La deuxième phase, la fibrose établie, est caractérisée par des plages diffuses de MEC, parfois sur l'ensemble du tissu. Le remplacement progressif des cellules mortes par la MEC conduit à la perte de fonctionnalité du tissu et induit sa rigidité. D'un point de vue clinique, les symptômes de la fibrose colorectale radio-induite apparaissent lors de la deuxième phase, notamment par occlusion nécessitant la résection du tissu fibrosé.

1. L'initiation de la fibrose

La lésion initialement induite par les rayonnements ionisants provoque une réponse aigüe caractérisée par l'inflammation, le recrutement de fibroblastes et leur activation par la matrice extracellulaire. La production massive de ROS sous l'effet des rayonnements est spécifique des lésions radio-induites et joue un rôle important dans les lésions résultantes. En effet, on estime que les radicaux hydroxyles (-OH) sont responsables de 60 à 70% des dommages radio-induits aux cellules (Zhao et Robbins, 2009). Bien que moins étudiés, les RNS semblent intervenir dans l'apparition des lésions. L'administration d'un inhibiteur de iNOS (inducible Nitric Oxide Synthase) chez des rats irradiés au niveau du poumon réduit les dommages à l'ADN à l'intérieur et à l'extérieur du champ d'irradiation (Khan et coll., 2003). Si les ROS et RNS sont en quantité trop élevée, l'organisme n'est pas en mesure de produire suffisamment d'enzymes pour contrôler le stress oxydant. Les cellules sont alors endommagées par l'interaction des espèces réactives avec l'ADN, les protéines et les lipides (Zhao et Robbins, 2009). Les cellules lésées sécrètent en réponse des chimiokines activant l'inflammation non-spécifique. De plus, il semble que le peroxyde d'hydrogène, issu de la conversion des ROS, active les lymphocytes en bloquant la protéine tyrosine phosphatase (Reth, 2002). Cet effet est amplifié par la « poussée respiratoire » des macrophages pendant laquelle ils produisent du peroxyde d'hydrogène, notamment pour participer à la destruction des pathogènes (Reth, 2002). Les ROS et RNS favorisent l'inflammation en induisant enfin la libération et l'activation de cytokines et facteurs de croissance (TGF-β1 par exemple) présents dans la MEC.

La thrombose et l'ischémie du tissu participent également aux dommages et induisent une sécrétion accrue de cytokines et chimiokines. L'activation du système de coagulation est la première réponse à la majorité des lésions. Les rayonnements ionisants peuvent activer le système de coagulation sans effet direct sur l'architecture vasculaire. La thrombomoduline est une protéine de surface des cellules endothéliales, responsable de l'inhibition de l'activité pro-coagulante de la thrombine. Les ROS peuvent inactiver la thrombomoduline et ainsi induire la coagulation (Abe et coll., 1994). L'irradiation entraine l'apoptose des cellules endothéliales (Paris et coll., 2001) et la modulation de l'expression, de la production et de l'activité de nombreuses protéines. Le facteur tissulaire, ou facteur III, participe, à l'activation de la coagulation. Son expression et son activité sont augmentés après irradiation (Verheij et coll., 1995). L'irradiation de cellules endothéliales humaines induit l'augmentation de l'expression du facteur Von Willebrand, également pro-coagulant (Jahroudi et coll., 1996). L'expression de molécules d'adhésion, telles que ICAM-1 (Intercellular Adhesion Molecule-1) (Hallahan et coll., 2002), PECAM-1 (Platelet endothelial cell adhesion molecule-1) (Quarmby et coll., 1999) ou les sélectines (Hallahan et coll., 1995), est augmentée suite à l'irradiation. La prostacycline

(PGI2) est un inhibiteur de l'agrégation des plaquettes et un vasodilatateur ayant un effet opposé au thromboxane (TXA2). Dans les poumons irradiés chez le rat, la production de ces deux facteurs est augmentée (Ward et coll., 1988). L'enzyme de conversion de l'angiotensine (ACE : Angiotensin Converting Enzyme) convertit l'angiotensine I en angiotensine II possédant une activité vasoconstrictrice. Son activité est diminuée après exposition aux rayonnements ionisants (Ward et coll., 1988). Enfin, l'activité de PLA (Plasminogen Activator ; activateur du plasminogène) est diminuée après irradiation. PLA est responsable de la conversion du plasminogène en plasmine, intervenant dans la dégradation des caillots de fibrine. L'activation de la coagulation induit une augmentation de la formation de thrombine, une protéase à sérine intervenant notamment dans la formation des caillots de fibrine. La thrombine régule la perméabilité endothéliale (DeMichele et Minnear, 1992), le chimiotactisme des neutrophiles (Bizios et coll., 1986) et des monocytes (Bar-Shavit et coll., 1983) ainsi que la production de TGF-β1 (Yamabe et coll., 1997). Elle active la prolifération des cellules musculaires lisses, ainsi que leur migration, et stimule la production de collagène et de fibronectine (Shirato et coll., 2003), probablement par des mécanismes dépendant de TGF-β1 (Noda-Heiny et Sobel, 1995, Ragosta et coll., 1996). Ces modifications phénotypiques peuvent être permanentes et ainsi induire un pouvoir pro-coagulant constant à l'endothélium.

Suite à l'irradiation, l'augmentation de l'expression des molécules d'adhésion et la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires induit l'activation des macrophages résidents et favorise le recrutement, l'extravasation et la transmigration d'autres cellules inflammatoires circulantes vers le tissu. Les neutrophiles sont les premières cellules inflammatoires à être recrutées au site de la lésion (Abreu et coll., 2005). Ce processus est rendu possible par la sécrétion de cytokines et chimiokines pro-inflammatoires par les macrophages (CXCL1, CXCL2, TNF-α et IL-6) (Soehnlein et Lindbom, 2010). Les neutrophiles possèdent des propriétés de phagocytose et antimicrobiennes et ont pour première fonction l'élimination des débris cellulaires. La stimulation des neutrophiles par la MEC (collagènes et fibronectine en particulier), induit la production de cytokines pro-inflammatoires telles que TNF-α, IL-1, IL-6 et TGF-β1 (Rubin et coll., 1995, Okunieff et coll., 1998, Ong et coll., 2010). Ces cytokines contribuent à la production de ROS et au recrutement d'autres cellules inflammatoires. L'augmentation du stress oxydatif est accrue par la sécrétion de myéloperoxydase (MPO) par les neutrophiles (Moussa et coll., 2016). La MPO catalyse la réaction de formation de l'acide hypochloreux, hautement oxydant. La fonction des neutrophiles au cours de la fibrose intestinale radio-induite est encore mal connue. Bien qu'ils soient considérés comme délétères au cours de l'inflammation intestinale, plusieurs études ont montré que la diminution des dommages radio-induits était associée à une augmentation du nombre de neutrophiles au sein du tissu (Flanders et coll., 2008, Blirando et coll., 2011).

Les lymphocytes et monocytes sont ensuite recrutés au site irradié, en particulier grâce aux signaux produits par les neutrophiles. L'interaction des monocytes avec les lymphocytes entraine la différenciation des monocytes en macrophages, puis leur polarisation en macrophages classiquement activés pro-inflammatoires (M1) ou alternativement activés anti-inflammatoires (M2). Les macrophages produisent alors du PDGF qui promeut l'angiogenèse et la migration des fibroblastes localement ou depuis la circulation vers le tissu lésé (Li et coll., 2007). Ils sécrètent également du TGF-β1, fortement impliqué dans la fibrose radio-induite., notamment en stimulant la différenciation des progéniteurs de la moelle en fibroblastes (Rodemann et Bamberg, 1995), ainsi que l'activation de ces derniers en myofibroblastes (Verrecchia et Mauviel, 2007). Les myofibroblastes peuvent également provenir de progéniteurs circulants appelés fibrocytes, ainsi que de cellules épithéliales dans le cadre de l'EMT (Epithelial-to-Mesenchymal Transition) (Hinz et coll., 2007) ou de cellules endothéliales lors de l'EndoMT (Endothelial-to-Mesenchymal Transition) (Zeisberg et coll., 2007). La stimulation des myofibroblastes par TGF-β1 induit la sécrétion de composants de la MEC (collagènes, fibronectine, protéoglycanes…) menant à la fibrose. De plus, TGF-β1 induit une diminution de l'activité des MMP, en particulier MMP-2 et MMP-9, et l'augmentation de l'activité des TIMP (Pardo et Selman, 2006).

2. L'inflammation chronique à l'origine de la fibrose

Le microenvironnement inflammatoire présent à cette étape favorise la différenciation et la maturation des cellules dendritiques, nécessaires à la mise en place de la réponse immunitaire adaptative. La présentation de l'antigène par les cellules dendritiques induit la différenciation des cellules T $CD4^+$ naïves en différents sous-ensembles (Th1, Th2, Th17 ou Treg) possédant des caractéristiques et fonctions différentes (Francois et coll., 2013). Les lymphocytes Th1 sont responsables de l'immunité cellulaire contre les pathogènes intracellulaires, ainsi que de la stimulation des macrophages. Les cellules Th2 sont les effecteurs de la réponse immunitaire contre les parasites extracellulaires. Ils sont également impliqués dans la réponse humorale en activant les cellules B et participent aux réactions allergiques. Les cellules Th17 sont des lymphocytes pro-inflammatoires caractérisés par l'expression d'IL-17. Elles recrutent les neutrophiles et jouent un rôle important dans l'homéostasie des muqueuses ainsi que dans la clairance des pathogènes à leur surface. Enfin, elles sont impliquées dans des pathologies auto-immunes telles que la sclérose en plaques ou la polyarthrite rhumatoïde. Les lymphocytes Treg sont responsables du maintien de l'immunotolérance indispensable dans la prévention de maladies auto-immunes. La balance entre ces différentes populations de lymphocytes permet la mise en place d'une réponse adaptée en cas d'infections, mais est également nécessaire pour éviter l'inflammation chronique et les réactions auto-immunes. Après irradiation, la

proportion de ces différents ensembles de cellules est déséquilibrée, donnant lieu à des réactions délétères. Par exemple, l'irradiation peut induire des réactions auto-immunes. Chez l'Homme, l'exposition de la thyroïde aux rayonnements ionisants induit une augmentation transitoire des auto-anticorps (Brent, 2010). Ce déséquilibre est d'autant plus important que les différentes populations de lymphocytes présentent des radiosensibilités variables. Parmi ceux-ci, les Treg semblent ainsi plus résistants que les cellules Th (Schaue et McBride, 2012). Cet effet semble dû aux différences de capacité proliférative entre les cellules concernées. Les phénomènes de déséquilibre entre les différentes populations de lymphocytes T sont observés chez les patients atteints de MICI. Pour les patients souffrant de la maladie de Crohn, les lymphocytes T s'orientent vers une polarisation Th1, alors qu'un profile Th2 est favorisé lors de la recto-colite hémorragique (Francois et coll., 2013).

La modification du profil inflammatoire au sein du tissu entraine la production accrue de cytokines pro-inflammatoires et pro-fibrosantes. Ces molécules participent à l'activation constante de nouveaux myofibroblastes ainsi qu'aux dommages répétés aux cellules résidentes, induisant la chronicité de la pathologie. Le défaut de dégradation causé par le déséquilibre entre MMP et TIMP est également imputable aux cellules immunitaires. Ainsi l'inflammation, même si elle ne régit pas l'ensemble des étapes de la fibrose, notamment établie, est une composante nécessaire de la fibrogénèse.

a. Réponse des lymphocytes T

Les lymphocytes T auxiliaires, ou « T helper » (Th) peuvent adopter différents états de polarisation (Th1, Th2…). Les lymphocytes Th1 participent à la réponse immunitaire cellulaire, alors que les Th2 sont des lymphocytes auxiliaires de la réponse humorale. Les lymphocytes Th1 produisent la réaction pro-inflammatoire nécessaire notamment à l'élimination des pathogènes. Les Th2 sécrètent un ensemble de cytokines, dont l'interleukine anti-inflammatoire IL-10, associées à l'immunosuppression, à la production d'anticorps et à la promotion du remodelage de la MEC. La réponse Th1 est ainsi considérée comme pro-inflammatoire, à l'inverse de la réponse Th2, anti-inflammatoire. Les lymphocytes Th17 sont caractérisés par la production d'IL-17. Ils ont un rôle important dans les processus d'inflammation chronique, notamment par la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires (IL-17, IL-21, IL-22…) et de chimiokines. Enfin, les Treg inhibent la prolifération et la production de cytokines des lymphocytes T effecteurs et induisent l'immunotolérance.

i. Th1

Les lymphocytes T Th1 sont caractérisés par leur expression de l'IFN-γ. Cette propriété de la réponse Th1 semble être à l'origine de l'effet anti-fibrotique de ces lymphocytes. En effet, l'IFN-γ inhibe la phosphorylation de Smad3 (Small Mother Against Decapentaplegic 3) induite par le TGF-β (Ulloa et coll., 1999). En activant la voie Jak1/Stat1, l'IFN-γ induit l'expression de Smad7, un inhibiteur des effecteurs de la voie TGF-β/Smad. L'activité inhibitrice de l'IFN-γ induit l'inhibition de la production de collagènes par les myofibroblastes. Il inhibe également la différenciation des monocytes du sang périphérique en fibrocytes, induite notamment par les cytokines de la réponse Th2 (IL-4 et IL-13) (Shao et coll., 2008).

ii. Th2

La réponse immunitaire de Th2 semble être un acteur clé dans la progression de la fibrose (Mavalia et coll., 1997, Shi et coll., 1997). Les lymphocytes T sont activés en Th2 par IL-4. Ces cellules expriment alors des cytokines spécifiques de cette réponse, notamment IL-4 et IL-13, qui sont impliquées dans le développement de la fibrose entre autres au niveau hépatique (Chiaramonte et coll., 1999, Reiman et coll., 2006) et cutanée (Ong et coll., 1998). Ces deux cytokines jouent un rôle important dans la polarisation des macrophages, en induisant une polarisation M2a.

IL-13 en particulier est un médiateur majeur du remodelage matriciel pathologique et son implication a été démontrée dans de nombreux modèles, dont des modèles de fibrose radio-induite (Han et coll., 2011) ou de MICI (Heller et coll., 2002). IL-13 peut directement activer TGF-β1 et induire sa production (Lee et coll., 2001). Cet effet est probablement à l'origine d'une augmentation de la transition épithélium-mésenchyme sous l'effet d'IL-13 (et IL-4) dans le poumon (Richter et coll., 2001). La stimulation de l'EMT par IL-4 et IL-13 semble passer par l'augmentation de la production de TGF-β2 (Richter et coll., 2001). Dans un modèle de fibrose hépatique infectieuse chez la souris, la suppression de l'IL-13 induit une diminution significative de la fibrose, associée à une expression constante de TGF-β1, suggérant un effet de l'IL-13 indépendant du TGF-β (Kaviratne et coll., 2004). IL-13 stimule les capacités sécrétoires et prolifératives des fibroblastes, cellules épithéliales et CML et est donc probablement impliquée dans les processus de différenciation myofibroblastique (Doucet et coll., 1998, Jakubzick et coll., 2003, Murray et coll., 2008). Plus précisément, IL-13 induit l'augmentation de l'expression de TGF-β1, CTGF (Connective Tissue Growth Factor), α-SMA, des collagènes de type I et III, MMP-2, MMP-3 et MMP-9 et de TIMP-1 (Kaviratne et coll., 2004, Murray et coll., 2008). Il est intéressant de noter que sur des fibroblastes pulmonaires sains, IL-13 n'a pas d'effet sur l'expression

de TGF-β1 et CTGF à l'inverse des fibroblastes de patients souffrant de fibrose pulmonaire idiopathique (Murray et coll., 2008). Il est donc probable que l'IL-13 ne puisse pas induire la fibrose seul et nécessite un signal initiateur pour exercer son effet.

iii. Th17

Les lymphocytes Th17 entrent en jeu lors des étapes d'initiation de la fibrose par la sécrétion de l'IL-17A. Cette cytokine pro-inflammatoire a été impliquée dans de nombreuses pathologies fibrosantes, telles que la fibrose pulmonaire (Wilson et coll., 2010), la fibrose du myocarde (Feng et coll., 2009) et la fibrose intestinale radio-induite (Bessout et coll., 2015). La réponse Th17 est majoritairement induite par IL-1β et IL-23 (Gasse et coll., 2011).

Dans la majorité des cas, la surexpression de IL-17A est associée à une augmentation significative du recrutement des neutrophiles (Laan et coll., 1999). Or, le recrutement massif de neutrophiles peut conduire au développement de la fibrose en induisant la mort des cellules endothéliales (Zhu et coll., 2011). IL-17A participe également à la fibrose en induisant l'expression de MMP-1 par les fibroblastes (Cortez et coll., 2007).

TGF-β est nécessaire au développement de la réponse Th17 chez la souris et pour le développement de la fibrose induite par IL-17A (Wilson et coll., 2010). Ainsi, la fibrose induite par IL-1β nécessite la coopération de l'IL-17A et du TGF-β. Dans les modèles de fibrose pulmonaire, l'inhibition de l'expression de l'IL-17A favorise la résolution de la pathologie (Wilson et coll., 2010, Mi et coll., 2011).

iv. Treg

Le rôle des lymphocytes T régulateurs au cours de la fibrose est encore mal connu. Ils ont une fonction immunosuppressive vis-à-vis des cellules effectrices de la réponse T en produisant différentes cytokines anti-inflammatoires telles que TGF-β et IL-10. Il a donc été longtemps considéré que l'augmentation de la proportion de Treg limiterait la fibrose en inhibant la réponse inflammatoire. En effet, des études ont montré un lien entre les Treg et l'amélioration de la fibrose au cours de la Fibrose Pulmonaire Idiopathique (Kotsianidis et coll., 2009), la GVHD (Zhang et coll., 2010) et la fibrose hépatique (Claassen et coll., 2010). Néanmoins, la production de TGF-β1 par cette sous-population pourrait expliquer que les Treg induisent la fibrose dans plusieurs modèles (Estes et coll., 2007, Liu et coll., 2010). Enfin, l'une des implications majeures des Treg est la régulation de la proportion des autres

sous-types de cellules T. Ceci pourrait expliquer les effets opposés observés dans différents modèles, les Treg limitant l'induction de la fibrose par les lymphocytes T helper, mais favorisant la fibrose induite par TGF-β1.

b. Influence de la polarisation des macrophages

Les macrophages sont des éléments essentiels de la mise en place de l'immunité innée et de la réponse immunitaire adaptative. Ils sont capables de phagocytose et participent donc à l'élimination des débris cellulaire et des agents exogènes. Leur rôle de cellules présentatrices de l'antigène et leur capacité à l'opsonisation les rend indispensable à l'immunité adaptative. Les cellules dérivées de monocytes (macrophages, cellules dendritiques et fibrocytes) exercent des effets immunomodulateurs, ainsi que sur le remodelage matriciel et la régulation de la différenciation myofibroblastique lors de la fibrose.

Les cytokines telles que l'IFN-γ (Interferon-γ), le TNF-α et le GM-CSF (Granulocyte – Macrophage-Colony Stimulating Factor), ainsi que des motifs microbiens, comme les lipopolysaccharides (LPS) peuvent induire la polarisation M1. L'état M2 est induit par l'IL-4 et l'IL-13 (Gordon, 2003).

A l'instar des cellules T, les macrophages peuvent présenter différents états de polarisation (Figure 14) : classiquement activés (M1) et alternativement activés (M2). La polarisation M1 est impliquée dans la réponse inflammatoire et la réponse immunitaire aux infections. Elle est scindée en deux groupes : M1a, responsable de la lutte contre les pathogènes, et M1b, intervenant lors de lésions sans infection. La polarisation M1a est induite par les PAMP (Pathogen-Associated Molecular Patterns) et les cytokines pro-inflammatoires, notamment TNF-α et IFN-γ. A l'inverse, la polarisation M1b est induite par les signaux de danger endogènes (Fer, histone, ATP…) (Lech et Anders, 2013). Les macrophages polarisés M2 sont divisés en plusieurs sous-groupes différenciés entre autres par leur stimulus inducteur : IL-4 et IL-13 pour les macrophages M2a, LPS et complexes immuns pour les M2b et TGF-β, IL-10 et les glucocorticostéroïdes pour les M2c (Adhyatmika et coll., 2015). Il est intéressant de noter que l'IL-21 et l'IL-33, des cytokines classiquement associées à la polarisation Th2, sont également impliquées dans la polarisation M2 (Pesce et coll., 2006, Kurowska-Stolarska et coll., 2009). La fonction exacte de ces différents sous-groupes de macrophages est encore mal connue.

Les macrophages M1 sont producteurs d'intermédiaires des ROS et RNS et de cytokines pro-inflammatoires (IL-1β, TNF, IL-6). Ils participent à la réponse Th1 en tant qu'inducteurs et effecteurs.

Ils jouent également un rôle dans la résistance aux parasites intracellulaires et aux tumeurs (Mantovani et coll., 2013). Les macrophages alternativement activés produisent des cytokines inflammatoires en fonction du stimulus les ayant activés. Les macrophages M2 sont impliqués dans la réponse Th2, dans la clairance des parasites (Noel et coll., 2004) et l'inhibition de l'inflammation. Ils interviennent également dans l'angiogenèse, la progression tumorale et ont un rôle immunomodulateur (Biswas et Mantovani, 2010). Enfin, ils favorisent le remodelage du tissu (Wynn, 2004).

Les macrophages produisent des cytokines pro-fibrosantes, dont le TGF-β1 et le PDGF, des MMP et des TIMP (Wynn et Barron, 2010). Ils sont donc capables de réguler la fibrogénèse de façon positive ou négative. Leur activité, pro ou anti-fibrosante, dépend de leur état de polarisation : M1, classiquement activé, ou M2, alternativement activé.

Les différents états de polarisation des macrophages peuvent intervenir au cours de phases distinctes de la fibrose, de l'inflammation à la résolution. Au cours de la phase aigüe, les PAMP et DAMP (Damage-Associated Molecular Patterns) produits lors de la lésion sont reconnus par les macrophages qui sont alors préférentiellement activés en M1 (Daley et coll., 2010). Les macrophages M1a sécrètent des quantités élevées de cytokines pro-inflammatoires (IL-1, IL-12, IL-23 et TNF-α) ainsi que des ROS (Mantovani et coll., 2004). Ils possèdent des capacités de phagocytose et d'endocytose accrues, associées à une augmentation de la présentation de l'antigène, pour lutter efficacement contre les infections (Lech et Anders, 2013). Ils participent également à la mise en place des réponses Th1 et Th17 (Cf. Réponse des lymphocytes T) (Galli et coll., 2011). La polarisation M1b apparait dans le cas d'une lésion stérile et présente des caractéristiques similaires en termes de profil d'expression. Ces macrophages sont notamment responsables de la clairance des cellules apoptotiques. Bien que nécessaire à la lutte contre les pathogènes, cet état d'activation peut entrainer des dommages. La production de ROS, par exemple, favorise la mort des pathogènes mais induit également des dommages aux cellules résidentes. De plus, les macrophages M1 favorisent la mise en place de l'inflammation chronique à l'origine de nombreuses pathologies. Ils semblent ainsi impliqués dans diverses pathologies inflammatoires, telles que la maladie de Crohn (Smith et coll., 2009). Les macrophages M1 participent au développement de la fibrose en sécrétant des MMP, notamment MMP-2 et MMP-9, accroissant le remodelage et la prolifération des myofibroblastes par EMT/EndoMT (Cheng et Lovett, 2003, Tan et coll., 2013).

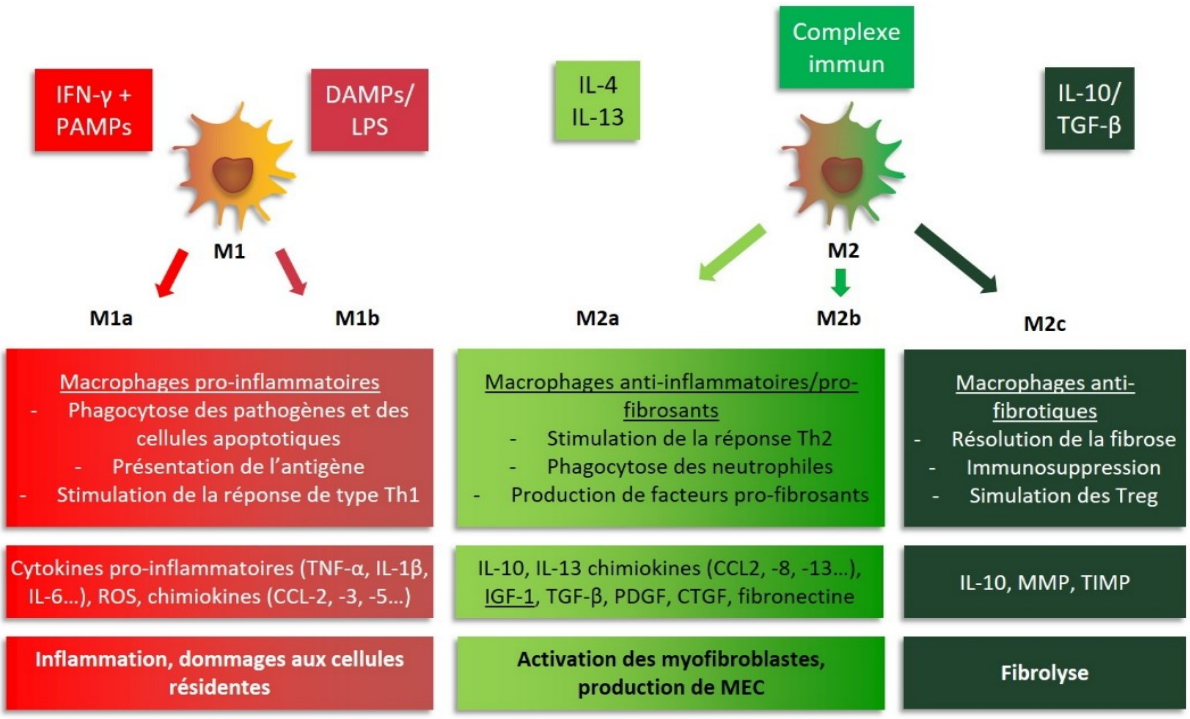


Figure 14 : caractéristiques des différents états de polarisation des macrophages : en haut : stimuli inducteurs ; en bas : activité spécifique (Wynn et Barron, 2010, Duffield et coll., 2013, Lech et Anders, 2013)

La phagocytose des cellules apoptotiques par les macrophages induit leur changement d'un état pro-inflammatoire vers un phénotype anti-inflammatoire (Voll et coll., 1997). Ces macrophages alternativement activés, ou M2, sécrètent des cytokines anti-inflammatoires telles que l'IL-4, l'IL-13, l'IL-10 et le TGF-β1 qui permettent la transition vers le processus de réparation (Buttner et coll., 1997, Voll et coll., 1997, Huynh et coll., 2002). Les cellules M2 pourraient également être impliquées dans la suppression de la réponse Th1 en faveur des lymphocytes Th2 (Mantovani et coll., 2002, Herbert et coll., 2004). A l'inverse, une étude menée sur un modèle de fibrose pulmonaire infectieuse indique que les macrophages M2 exprimant l'arginase suppriment la réponse Th2 en déplétant le milieu en arginine (Pesce et coll., 2009). Cet effet est en accord avec les études montrant le recrutement des lymphocytes Treg par CCL22 (chemokine (C-C motif) ligand 22) synthétisé par les M2 (Curiel et coll., 2004).

Les facteurs sécrétés par les macrophages M2a favorisent l'activation des myofibroblastes et la formation du tissu de granulation. De plus, l'arginase-1 est impliquée dans le contrôle de la synthèse de la proline, un constituant essentiel du collagène, et favorise donc la production de MEC (Li et coll., 2001). Les cellules M2a produisent également des facteurs pro-fibrosants tels que la galectine-3, le PDGF, le FGF-2, IGFBP5 (Insulin-like Growth Factor-Binding Protein 5) et CCL18, capables d'activer la différenciation myofibroblastique (Duffield et coll., 2013). Dans le foie, IL-13, un activateur des M2a,

peut induire la fibrose indépendamment de TGF-β1 (Kaviratne et coll., 2004). IL-13 est une cytokine caractéristique de la réponse Th2, et inductrice de la polarisation M2a. Cette observation suggère que l'axe Th2/M2 serait capable d'entretenir, voire d'induire la fibrose.

Les macrophages M2c, également nommés M régulateurs ou Mreg, sont identifiés comme favorisant la résolution de la fibrose en activant la dégradation de la matrice excédentaire. En particulier, la production de MMP-9 et MMP-13 par les macrophages a été liée à une amélioration significative dans des modèles de fibrose hépatique et pulmonaire (Cabrera et coll., 2007, Fallowfield et coll., 2007). De plus, les Mreg expriment IL-10, un puissant anti-fibrosant dans des modèles de fibrose intestinale ou rénale (Murai et coll., 2009, Anders et Ryu, 2011). IL-10 favorise également le maintien de la réponse T régulatrice.

Ainsi, il apparait que différents états de polarisation des macrophages aient pour fonction de supporter l'organisme au cours des différentes étapes de la prise en charge d'une lésion. L'activation de macrophages pro-inflammatoires lors de la phase aigüe permet la lutte contre les pathogènes et l'élimination des débris cellulaires. Le basculement vers un état anti-inflammatoire prévient l'apparition d'un phénomène d'inflammation chronique. Les macrophages alternativement activés prennent alors en charge la réparation du tissu en activant le système de production de MEC. Il est nécessaire que cette étape soit limitée dans le temps afin d'éviter l'apparition de la fibrose. L'apparition de macrophages régulateurs permettrait de limiter cette étape et de favoriser le retour vers un état physiologique. L'équilibre quantitatif et temporel entre ces différents états d'activation semble indispensable à la résolution non pathologique de la lésion.

3. Les myofibroblastes : principaux acteurs cellulaires de la fibrose

Les myofibroblastes sont des cellules contractiles caractérisées par l'expression de la vimentine et de l'α-SMA et par l'absence d'expression de la desmine. Ils participent à la croissance, le développement et la réparation des tissus ainsi qu'à différentes pathologies telles que le cancer ou la fibrose. La terminologie « myofibroblaste » a été choisie car ce type cellulaire présente des caractéristiques des fibroblastes, notamment en termes de morphologie et d'activité sécrétoire, ainsi que des cellules musculaires lisses, en particulier l'expression de l'actine des muscles lisses. Les myofibroblastes sont responsables de la production de la MEC lors de la formation du tissu de granulation, mais également au cours de la fibrose.

Suite à une lésion, la production de cytokines par les cellules endommagées et les cellules inflammatoires permet le recrutement de « proto-myofibroblastes » dans différents compartiments de l'organisme. Dans un premier temps, les fibroblastes sains proches de la lésion migrent vers la zone endommagée et expriment des faisceaux de microfilaments de β- et γ-actine cytoplasmique (Tomasek et coll., 2002). Dans un même temps, les autres sources de myofibroblastes sont également stimulées (moelle osseuse, sang…). Les cellules nouvellement différenciées produisent les éléments de la MEC formant le tissu de granulation : collagènes de type I et III (Tomasek et coll., 2002)et fibronectine (Brown et coll., 1993). Ils produisent également d'importantes quantités de TIMP-1 afin de bloquer la dégradation de la MEC (Robert et coll., 2016). Deux variants d'épissage de la fibronectine sont sécrétés : EDA (ou EIIIA) et EDB (EIIIB) (Brown et coll., 1993). Le variant EDA de la fibronectine est indispensable à la différenciation des myofibroblastes (Serini et coll., 1998). En effet, en présence d'un anticorps dirigé contre ED-A, les fibroblastes traités par TGF-β1 ne sur-expriment ni α-SMA, ni le collagène de type I. Sous l'action de TGF-β1, les proto-myofibroblastes se différencient en myofibroblastes exprimant l'α-SMA et responsables de la contraction de la blessure (Desmouliere et coll., 1995).La forme latente de TGF-β1 est clivée par des enzymes protéolytiques ainsi que par des effets mécaniques. Les myofibroblastes ayant acquis une activité contractile par l'expression α-SMA exercent des contraintes sur la MEC via les intégrines couplées à leur cytosquelette (Wipff et coll., 2007). Il semble que les forces exercées sur la MEC induisent un changement de conformation du complexe latent contenant TGF-β1 qui est alors libéré (Van De Water et coll., 2013). Cette hypothèse est appuyée par le fait que l'augmentation du stress mécanique au sein du tissu accélère la différenciation des myofibroblastes, alors que la perte de ces forces bloque l'acquisition de l'α-SMA (Hinz et coll., 2001). La rigidification de la MEC, due à l'activité de remodelage des myofibroblastes, participe aussi à la libération de TGF-β1 (Klingberg et coll., 2014). Enfin, les myofibroblastes mettent en place une boucle d'activation autocrine par la production de TGF-β1 latent (Dabiri et coll., 2006).

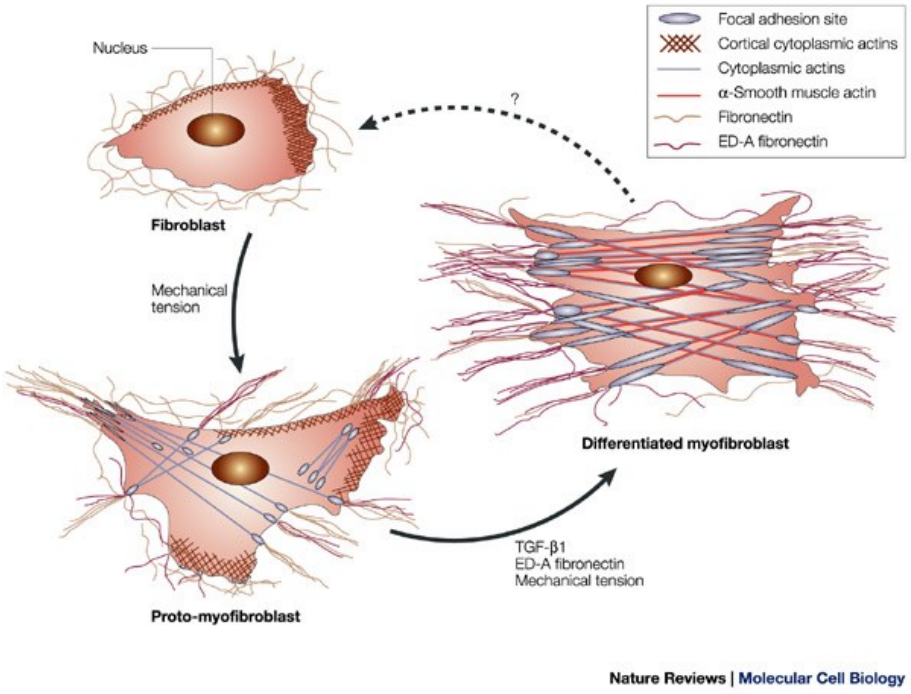


Figure 15 : mécanismes de différenciation des fibroblastes en myofibroblastes : plusieurs paramètres sont nécessaire à l'acquisition des capacités contractiles des myofibroblastes : la présence de contraintes mécaniques au sein du tissu, la disponibilité de TGF-β1 activé et la production du variant d'épissage ED-A de la fibronectine (D'après Tomasek et coll., 2002) (Tomasek et coll., 2002)

Ces processus sont fondamentaux dans la mise en place de la chronicité de la lésion. Après l'activation initiale de la réserve de progéniteurs de proto-myofibroblastes, plusieurs mécanismes sont induits et participent à la libération de TGF-β1 et donc à l'activation de nouvelles cellules pro-fibrosantes. Le stress mécanique résultant de la contraction des myofibroblastes favorise l'ischémie tissulaire, et donc la mort de nouvelles cellules et la poursuite de l'inflammation. Ces processus contribuent à l'activation de nouveaux myofibroblastes et donc au remodelage constant de la MEC et à la continuité de la fibrogénèse (Figure 15).

Des cellules présentant des caractéristiques proches des myofibroblastes sont retrouvées en conditions physiologiques dans quasiment tous les tissus : intestin, stroma de la moelle osseuse, foie (Tomasek et coll., 2002). Les myofibroblastes impliqués dans la fibrose sont pour la plupart issus de cellules résidentes : les cellules étoilées dans le foie (Moreira, 2007), les kératocytes dans l'œil (Torricelli et coll., 2016) et les péricytes dans de nombreux organes (Greenhalgh et coll., 2013).Les myofibroblastes peuvent également provenir de progéniteurs circulants dérivés de la moelle osseuse appelés fibrocytes (Galligan et Fish, 2013), ainsi que de cellules épithéliales dans le cadre de l'EMT (Epithelial-to-Mesenchymal Transition) (Hinz et coll., 2007) ou de cellules endothéliales lors de l'EndoMT (Endothelial-to-Mesenchymal Transition) (Zeisberg et coll., 2007). Enfin, les CSM résidentes

et circulantes constituent des précurseurs majeurs de myofibroblastes dans de nombreux organes et pathologies (Direkze et coll., 2004).

Dans l'intestin, deux types de myofibroblastes sont présents : les cellules interstitielles de Cajal (CIC) et les myofibroblastes subépithéliaux. Les CIC se trouvent dans la sous-muqueuse et la musculaire propre de l'intestin et participent notamment au contrôle de la motilité intestinale (Sanders, 1996). Elles sont classiquement localisées entre les tuniques circulaire et longitudinale de la musculaire propre dans l'estomac, l'intestin grêle et le côlon. Elles ont trois fonctions majeures : (i) elles sont le « pacemaker » des muscles lisses gastro-intestinaux (ii) elles facilitent la propagation des signaux électriques et (iii) elles modulent la neurotransmission (Sanders, 1996).

Les myofibroblastes sub-épithéliaux sont présents le long du tractus gastro-intestinal, de l'œsophage à l'anus, ainsi que dans la vésicule biliaire et le pancréas. Ils forment un syncytium s'étendant le long de la lamina propria de l'intestin, fusionnant avec les péricytes entourant les vaisseaux sanguins (Joyce et coll., 1987). Ils participent à : (i) l'organogénèse de la muqueuse en favorisant la formation des cryptes et des villosités et (ii) la cytodifférenciation des cellules épithéliales en entérocytes, cellules en gobelets, cellules entéroendocrines et cellules de Paneth (Powell et coll., 1999).

La muqueuse intestinale comporte également des fibroblastes sub-épithéliaux dépourvus d'activité contractile. Ces cellules présentent des granules de sécrétion de collagène et se lient à la MEC par des adhésions focales (Eyden et coll., 2011). La culture de fibroblastes coliques dans une matrice reproduisant la rigidité du tissu sténosé au cours de la maladie de Crohn induit une augmentation de leur prolifération et de l'expression de α-SMA, suggérant une implication durant la fibrose (Johnson et coll., 2013).

Dans les pathologies impliquant la fibrose intestinale, telles que la maladie de Crohn, les myofibroblastes ne sont pas les seules cellules incriminées. Les cellules musculaire lisses sont également responsables de la production de MEC (Graham, 1995). Dans la maladie de Crohn, on observe un épaississement de la musculaire muqueuse ainsi qu'une accumulation de collagène autour des cellules musculaires lisses (CML). Des plages de cellules similaires aux CML se développent dans la sous-muqueuse et des plages de MEC s'invaginent dans la musculaire propre. Une augmentation de la quantité de collagène de type III ainsi que de l'expression des pro-collagènes I, III et V se produit (Graham, 1995). IGF-1 (Insulin-like Growth Factor-1) est surexprimé au cours de la maladie de Crohn (Simmons et coll., 2002). Or, IGF-1 stimule l'hyperplasie des CML et pourrait donc être à l'origine de l'épaississement des tuniques musculaires de l'intestin (Lund, 1998).

Ainsi, alors que les cellules productrices de MEC sont relativement bien décrites dans la fibrose de différents organes (cœur, rein, foie…), la question reste encore floue concernant l'intestin. En conditions physiologiques, les CML intestinales expriment l'α-SMA, la desmine et la tropomyosine. Les CML isolées d'intestins de patients souffrant de la maladie de Crohn présentent une expression accrue de l'α-SMA, de l'actine entérique-γ et de la desmine (Graham, 1995). Les myofibroblastes sub-épithéliaux n'expriment pas la desmine *in situ*, mais une étude indique une augmentation de son expression au cours de la maladie de Crohn (Powell et coll., 1999). Les cellules responsables de la fibrose intestinale possèdent des caractéristiques proches des myofibroblastes : une apparence proche des cellules stellaires, des fibres de stress proéminentes et un réticulum endoplasmique dilaté (Powell et coll., 1999). Il est donc possible que l'ensemble de ces cellules, CML, CIC et myofibroblastes sub-épithéliaux soient responsables de la fibrose au niveau intestinal.

a. Migration des myofibroblastes

La migration des myofibroblastes dans et à travers la MEC est une étape indispensable de la régénération tissulaire. Elle cesse en temps normal lorsque le tissu est repeuplé et que les signaux chimioattractants produits par les cellules immunitaires décroit. Néanmoins, plusieurs mécanismes peuvent induire la poursuite de ces phénomènes de migration. Les myofibroblastes subépithéliaux peuvent par exemple stimuler leur propre migration par la production de facteurs autocrines et paracrines, comme indiqué par l'augmentation de leur capacité migratoire sous l'effet de milieu conditionné par d'autres myofibroblastes (Leeb et coll., 2002, Leeb et coll., 2004). De nombreux facteurs de croissance, dont PDGF1, PDGFB, TGF-β1, IGFI et EGF peuvent stimuler la migration des myofibroblastes intestinaux (Leeb et coll., 2002). Il semble cependant que la fibronectine soit nécessaire à l'induction autocrine de la migration des myofibroblastes intestinaux (Leeb et coll., 2004).

Les myofibroblastes sub-épithéliaux de patients souffrant de la maladie de Crohn ou de rectocolite hémorragique présentent une réponse migratoire significativement réduite par rapport aux cellules contrôles (Leeb et coll., 2003). Ce phénomène est classiquement induit par une exposition prolongée au TNF-α ou à l'IFN-γ (Leeb et coll., 2003). L'importance de ce mécanisme dans le développement des MICI est mal connue mais une diminution de la migration des myofibroblastes a été observée dans d'autres organes. Les fibroblastes de patients atteints de mucopolysaccharidose ont une activité migratoire fortement réduite également (Pontz et coll., 1984). Au cours de la fibrose pulmonaire, les fibroblastes issus de tissus fortement fibrosés ont une réponse migratoire accrue vis-à-vis de PDGF par rapport aux fibroblastes de tissus présentant une fibrose jeune (Suganuma et coll.,

1995). Un effet inhibiteur d'IFN-γ a été observé sur la migration des fibroblastes normaux (Adelmann-Grill et coll., 1987). Les myofibroblastes intestinaux sont exposés à de hautes concentrations d'IFN-γ pendant des périodes prolongées lors d'inflammations chroniques de la muqueuse et pourraient donc voir leur potentiel migratoire réduit par ce mécanisme.

b. EMT et EndoMT

L'EMT et l'EndoMT (ou EndMT) sont deux processus par lesquels des cellules de lignées non-mésenchymateuses, en l'occurrence des cellules épithéliales ou endothéliales, changent de phénotype pour acquérir des caractéristiques mésenchymateuses. Ces mécanismes jouent un rôle au cours du développement, de la régénération tissulaire, ainsi que lors de la fibrose et du cancer.

i. EMT

L'EMT et le processus opposé, la MET (Mesenchymal-to-Epithelial Transition) sont cruciaux au cours du développement, notamment lors de la gastrulation. À l'âge adulte, ce mécanisme est en particulier impliqué dans la réponse physiologique aux blessures, en assurant l'apport de nouveaux myofibroblastes lors de la formation du tissu de granulation. De la même façon, l'EMT amplifie la réponse pro-fibrosante en conditions pathologiques.

Au cours de l'EMT, les cellules perdent leurs marqueurs épithéliaux (Figure 16). La E-cadhérine est considérée comme le principal marqueur de cette première étape, étant en partie responsable du maintien de l'adhérence des cellules au tissu et entre elles (Whiteman et coll., 2008, Huang et coll., 2012). L'augmentation de l'expression de la vimentine participe à l'inhibition de la E-cadhérine (Mendez et coll., 2010). La cellule perd alors l'adhérence au tissu par dégradation de la lame basale et gagne des caractéristiques mésenchymateuses : motilité, perte de la polarité du cytosquelette, expression de FSP-1 (Fibroblast-Specific Protein-1), α-SMA et collagène I (Kalluri et Weinberg, 2009, Lin et coll., 2011).

De nombreux facteurs de croissance et cytokines, tels que FGF-2, EGF, TGF-β et IL-1β peuvent induire l'EMT au cours de la régénération physiologique et de la fibrose (Stone et coll., 2016). En particulier, TGF-β est un puissant inducteur de l'EMT, via des voies de signalisation dépendantes ou non de Smad (Stone et coll., 2016). TGF-β est en effet un inhibiteur des marqueurs épithéliaux (E-cadhérine, occludine…) et un activateur des marqueurs mésenchymateux (N-cadhérine, vimentine…) (Vincent et coll., 2009).

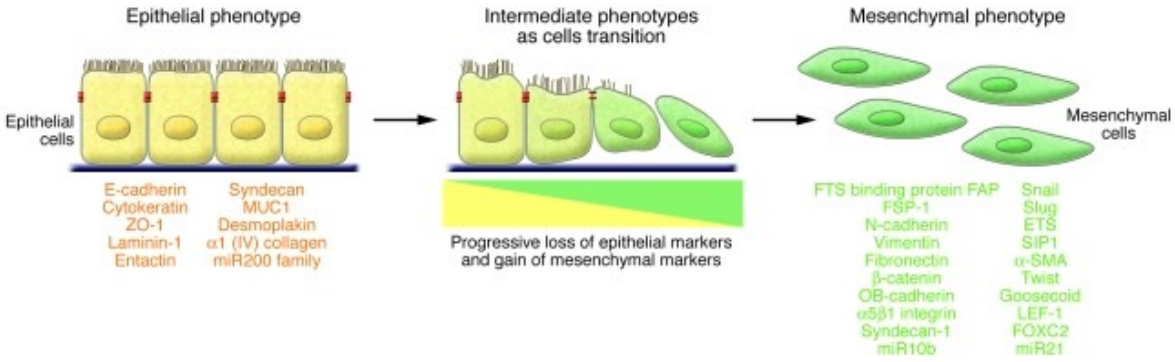


Figure 16 : marqueurs spécifiques de la transition épithélium-mésenchyme (D'après Kalluri et Weinberg, 2009) (Kalluri et Weinberg, 2009)

ii. EndoMT

L'EndoMT a été décrite comme participant à l'angiogenèse (Welch-Reardon et coll., 2014) et au développement du cœur lors de l'embryogénèse (Kovacic et coll., 2012). À l'identique de l'EMT, ce processus est également impliqué dans l'apport de fibroblastes et myofibroblastes au cours de la régénération tissulaire et de la fibrose (Lin et coll., 2012).

Au cours de l'EndoMT, sous l'influence de signaux spécifiques, tels que TGF-β2, les cellules endothéliales opèrent une réorganisation de leur cytosquelette associée à la perte de molécules d'adhésion telles que la VE-cadhérine (Vascular Endothelial-cadhérine). Ce mécanisme permet la perte d'adhérence des cellules endothéliales aux cellules voisines (Crosby et coll., 2005). La perte de l'expression d'autres marqueurs endothéliaux, facteur von Willebrand et CD31, et l'expression de nouvelles protéines (α-SMA, Smooth Muscle 22α, vimentine et N-cadhérine) sont les caractéristiques principales des cellules en transition (Goumans et coll., 2008). Les cellules acquièrent ensuite un phénotype migratoire et sécrétoire (MEC : collagènes et fibronectine) spécifiques des myofibroblastes (Good et coll., 2015).

Les facteurs de croissance de la famille TGF-β sont des inducteurs de l'EndoMT : TGF-β1, TGF-β2, BMP2 (Bone Morphogenic Protein 2), BMP4, BMP6, BMP9 et BMP10 (Medici, 2016). L'activation de l'EndoMT par TGF-β dépend de voies de signalisation Smad-dépendantes et indépendantes (Medici et coll., 2011). D'autres voies sont impliquées dans l'induction de ce mécanisme, en particulier les voies Wnt/β-caténine (Aisagbonhi et coll., 2011) et Notch (Gasperini et coll., 2012).

4. Les acteurs moléculaires de la fibrose

a. TGF-β1

TGF-β1 fait partie de la superfamille TGF-β de facteurs de croissance pléiotropies, comprenant les BMP, les TGF-β et l'activine. Ces cytokines sont impliquées dans de nombreux processus, dont le contrôle de la prolifération, la différenciation et la mort cellulaire. Elles interviennent également dans la régulation de l'inflammation. Enfin, elles ont un rôle majeur dans la régénération tissulaire et la fibrose. Chez les mammifères, trois isoformes (TGF-β1, TGF-β2 et TGF-β3) ont été identifiées. Ces isoformes se lient au récepteur TβR2 (ou TGFβR2 : Tumor Growth Factor-β Receptor 2) qui recrute en conséquence TβR1 pour activer la voie de signalisation correspondante (Xu et coll., 2012). TGF-β est synthétisé sous forme de précurseur, lié à la LAP (Latency Associated Peptide) qui facilite la liaison à la Latent TGF-β Binding Protein (LTBP) (Robertson et coll., 2015). Sous cette forme de complexe TGF-β/LAP/LTBP, appelé LLC (Large Latent Complex) TGF-β est inactif et ne peut pas se lier à ses récepteurs. Ce complexe est retrouvé en quantité importante associé à la MEC. LTBP est capable de se lier à différentes protéines de la MEC, telles que la fibronectine, la vitronectine et la fibrilline (Annes et coll., 2003). Le complexe peut être clivé au niveau de LAP et/ou LTBP par de nombreuses protéases dont la plasmine, les MMP2 et 9, la thrombospondine, certaines intégrines et les espèces réactives de l'oxygène (Annes et coll., 2003). Le clivage de ce complexe permet la libération de TGF-β sous sa forme active. La liaison de TGF-β à ses récepteurs induit l'activation des protéines de la voie Smad, comprenant des facteurs de transcription agissant sur la production de MEC et l'activation des myofibroblastes. L'activation des récepteurs aux TGF-β induit également l'activation d'autres voies de signalisation, telles que la voie MAP kinase (Mitogen-Activated Protein kinases) et de PI3K/Akt/mTOR (Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-kinase-Protein kinase B- mammalian Target Of Rapamycin) (Derynck et Zhang, 2003).

Le TGF-β1 est l'acteur moléculaire central dans le développement de la fibrose. Il intervient dans la régulation de la croissance cellulaire et de l'apoptose, possède des propriétés immunomodulatrices et est responsable de la production de MEC. Le TGF-β1 exerce un pouvoir antiprolifératif sur de nombreux types cellulaires dont les cellules épithéliales et endothéliales. A l'inverse, les fibroblastes mis en présence de TGF-β1 présentent une activité proliférative accrue (Martin et coll., 2000). Il supprime la prolifération des cellules B et T, la cytotoxicité des Natural Killer, la production d'immunoglobuline par les lymphocytes B (Letterio et Bottinger, 1998) et la production de NO par les macrophages (Vodovotz et coll., 1993). Il peut induire l'apoptose de cellules en cultures, dont les hépatocytes (Oberhammer et coll., 1992) et kératinocytes (Benassi et coll., 1997). Il stimule également la production de collagène par les fibroblastes (Stallmach et coll., 1992) et cellules

musculaires lisses de l'intestin (Graham et coll., 1990). TGF-β1 favorise la sécrétion de molécules d'adhésion, par exemple ICAM-1 (Brannigan et coll., 2002), et de facteurs pro-fibrosants, tels que VEGF (Beddy et coll., 2004) et PDGF (Kumagai et coll., 2001). Enfin, il intervient dans la différenciation classique des myofibroblastes, ainsi que dans les processus de transdifférenciation de cellules épithéliales (EMT : Epithelial-to-Mesenchymal Transistion) (Lee et Joo, 1999) et endothéliales (EndoMT : Endothelial-to-Mesenchymal Transition) (Rieder et coll., 2011).

Dans l'intestin de rats irradiés, l'expression et l'immunoréactivité de TGF-β1 sont augmentées moins de 24h après irradiation. L'augmentation est d'autant plus importante que la dose reçue est élevée (Hauer-Jensen et coll., 1998).

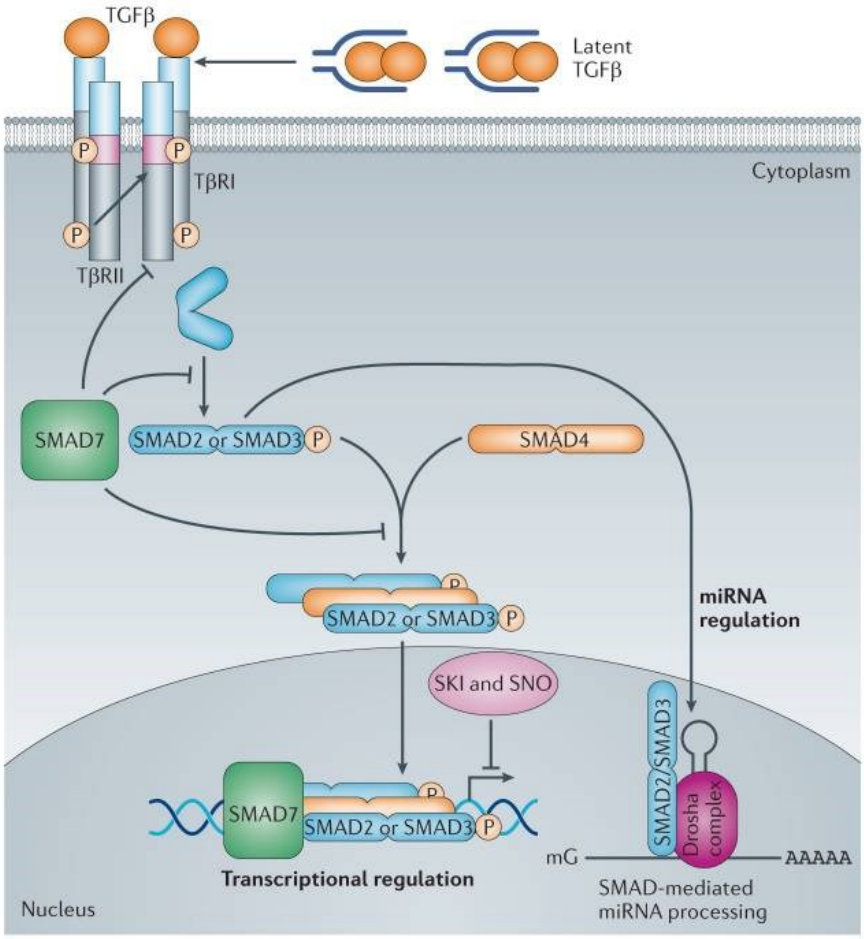


Figure 17 : mécanismes d'activation et d'inhibition de la voie Smad (D'après Akhurst, 2012) (Akhurst et Hata, 2012)

i. Les protéines de la voie Smad

Les Smad sont une famille de 8 protéines effectrices des ligands de la superfamille TGF-β (Figure 17). Les récepteurs de type I reconnaissent et phosphorylent (activent) spécifiquement les R-Smad (Receptor-activated Smad). Cette famille de protéines comprend Smad1, Smad5 et Smad8 (effecteurs des BMP) et Smad2 et Smad3 (effecteurs de TGF-β et de l'activine). Ces protéines sont recrutées vers le TβR1 activé par une protéine cytoplasmique, SARA (Smad Anchor for Receptor Activation), liée à la membrane. Les Smad2 et 3 phosphorylées suite à l'activation de TβR1 par TGF-β1 forment un complexe avec la « Common mediator Smad » (Co-Smad), Smad4. La formation de ce complexe permet la translocation du R-Smad vers le noyau par l'importine. Smad6 et Smad7 sont les Smad inhibiteurs (I-Smad), bloquant la fixation de Smad2 et Smad3 au complexe TβR1/TβR2. La fonction de Smad3 peut être régulée par un grand nombre de co-activateurs (AP-1 : Activator Protein-1, Sp-1 : Specificity Protein-1, CREB : C-AMP Response Element-binding protein…) et de corépresseurs (SnoN = Skil : Ski-like protein, Ski proto-oncogene, Smad nuclear-interacting protein-1…) peuvent se lier aux complexes contenant Smad3 (Meng et coll., 2013) et influencer l'expression de ses gènes cibles.

Smad2, Smad3 et Smad4 ont des fonctions distinctes, voire opposées au cours du développement de la fibrose. Smad3 est le seul de ces éléments à produire un effet transcriptionnel direct en se liant aux promoteurs correspondant. Smad2 et Smad4 agissent comme régulateurs de l'activité de Smad3 (Dennler et coll., 1998, Chen et coll., 1999, Piek et coll., 2001, Yuan et Varga, 2001).

Les gènes cibles de Smad3 ne sont pas tous connus à l'heure actuelle. L'une des premières pistes explorées furent, en raison de l'implication des Smad dans la fibrose, les gènes codant pour les éléments de la MEC. L'activation de la voie Smad par TGF-β induit la surexpression de nombreuses protéines :

- Éléments de la MEC : COL1A1 (chaîne α1 du collagène de type I), COL1A2, COL3A1, COL5A2, COL6A1, COL6A3, COL7A1, fibronectine (Verrecchia et Mauviel, 2002, Zhang et coll., 2011, Akhurst et Hata, 2012)
- Métalloprotéinases matricielles et inhibiteurs : MMP-2, MMP-3, MMP-12, TIMP-1 (Verrecchia et Mauviel, 2002, Qin et coll., 2009, Zhang et coll., 2011)
- Serpines : SERPINE1 (PAI-1 : Plasminogen Activator Inhibitor-1), SERPINEA9, SERPINB3, SERPINA10, SERPINB1, SERPINI1 (Zhang et coll., 2011)
- Smad : SMAD3, SMAD4, SMAD6, SMAD7 (Zhang et coll., 2011)
- TGF-β : TGFB1, TGFB2, TGFBR1, TGFBR2, TGFBR3, TGFB1T1, TGFB1, LTBP2, LTBP3, LTBP4 (Zhang et coll., 2011)

- CTGF (Zhang et coll., 2011)
- JUN, JUNB (Zhang et coll., 2011)
- Intégrines : ITGA3 (InTeGrin subunit α3), ITGAV, ITGB1, ITGB6 (Zhang et coll., 2011)
- α-SMA (Qin et coll., 2009)

La voie Smad est donc au cœur de la fibrogénèse en favorisant l'activation myofibroblastique, la production de MEC et en dérèglant l'équilibre entre MMP et TIMP, accentuant ainsi le défaut de dégradation de la MEC. De plus, la surexpression des protéines de la famille TGF-β ainsi que le CTGF induit une boucle d'activation contribuant au maintien voire à l'augmentation du nombre de myofibroblastes pro-fibrosant au sein du tissu.

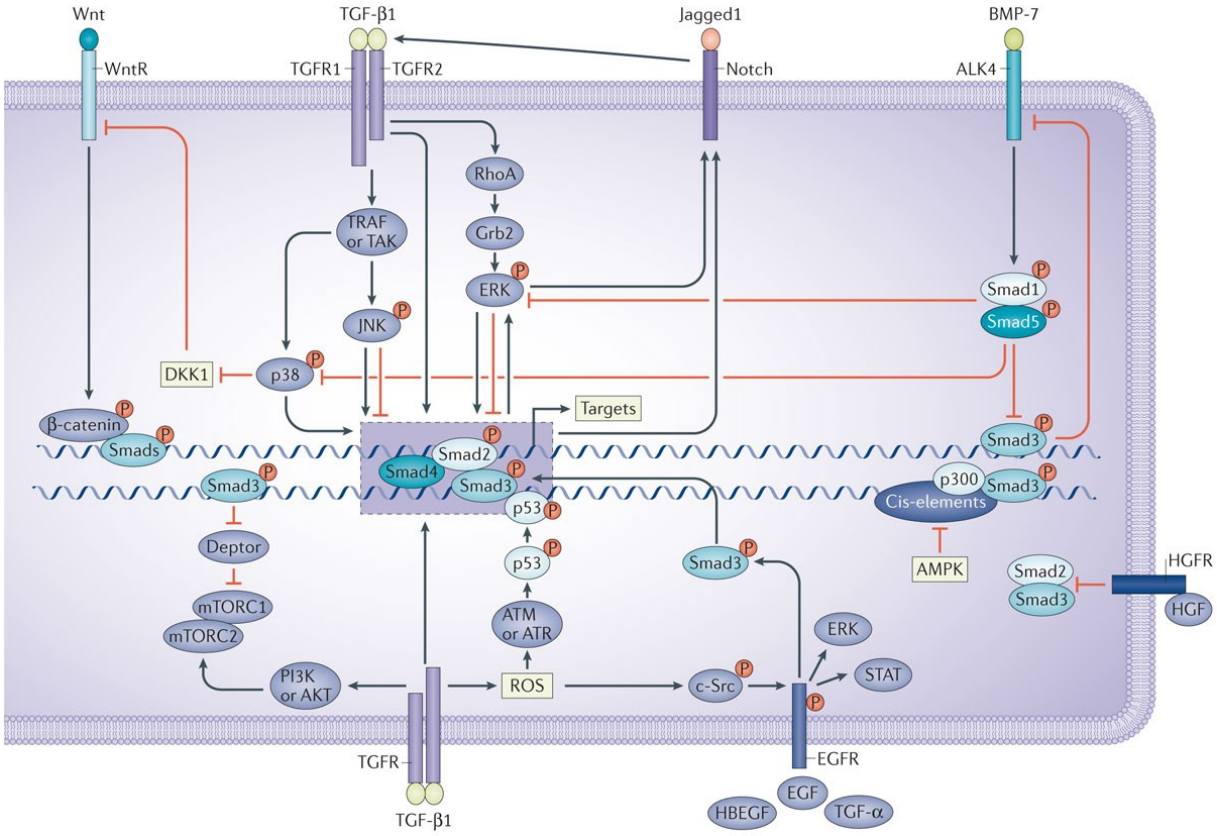


Figure 18 : interactions entre la voie TGF-β/Smad et d'autres voies de signalisation (D'après Meng et coll., 2016) (Meng et coll., 2016)

ii. Autres voies activées par TGF-β

TGF-β exerce un effet pléiotropique en activant de nombreuses voies de signalisation qui lui permettent d'exercer des effets régulateurs sur différents processus cellulaires (Figure 18). Ces

mécanismes permettent notamment d'induire ou d'entretenir la fibrose par des voies indépendantes des protéines Smad.

La voie non-canonique rho/ROCK

Les GTPases (Guanosine TriPhosphatases) de la famille Rho (Ras homologous) sont des molécules régulatrices jouant le rôle de lien entre les récepteurs de surface et le cytosquelette d'actine. Ils interviennent dans la régulation de la motilité cellulaire, du cycle cellulaire, de la survie cellulaire, de la transcription, du trafic membranaire et de la cytodiérèse (Ridley, 2001). L'activation des RhoGTPases (RhoA, RhoB, RhoC, Rac-1 : Ras-related C3 botulinum toxin substrate-1 et CDC-42 : Cell Division Control protein 42 homolog) par TGF-β est appelée voie non-canonique, par opposition à la voie Smad, canonique. Les effets des protéines Rho sont produits par différents effecteurs, dont les ROCK (Rho-associated Coiled-coil-containing kinase) après ancrage de Rho sur la membrane cellulaire. Les ROCK activent le facteur MRTF (Myocardin-Related Transcription Factor) qui en retour induit l'expression de α-SMA, PAI-1, Bcl-2 (B cell lymphoma-2) et XIAP (X-linked Inhibitor of APoptosis), deux gènes anti-apoptotiques. Cette voie favorise donc l'activation des myofibroblastes ainsi que leur survie (Riches et coll., 2015). L'induction de CTGF par la voie Rho/ROCK est plus importante qu'à travers la voie des Smad (Yarnold et Brotons, 2010). L'activation de la voie Rho/ROCK induit l'expression de l'endothéline 1, un puissant vasoconstricteur intervenant dans la régulation de la contraction des myofibroblastes (Shimokawa et Yasuda, 2008).

Dans les cellules souches mésenchymateuses, de nombreux stimuli peuvent activer les protéines Rho : facteurs de croissance, ROS, acide lysophosphatidique, molécules d'adhésion, stress mécanique (Haydont et coll., 2007)…

Dans les cellules musculaires lisses intestinales de patients atteints d'entérite radique, l'inhibition de l'activation de Rho induit la diminution de l'expression de CTGF, TGF-β1 et de la chaîne α2 du collagène I (Haydont et coll., 2005). Ce résultat suggère une implication forte de cette voie dans la fibrogénèse.

RhoA est un acteur majoritaire de l'induction de l'EMT par TGF-β. L'activation de cette voie induit la formation de fibres de stress et l'acquisition d'un phénotype mésenchymateux chez les cellules épithéliales et kératinocytes (Bhowmick et coll., 2001, Edlund et coll., 2002). L'utilisation d'un mutant dominant négatif de Smad3 ne bloque pas l'effet de RhoA chez les cellules épithéliales, indiquant une activation indépendante de la Smad2 et Smad3 (Bhowmick et coll., 2001). Le TGF-β régule RhoA selon deux modes lors de l'EMT. Dans un premier temps, RhoA est rapidement activé afin de permettre l'acquisition du phénotype mésenchymateux. Dans un deuxième temps, TGF-β induit

l'activation de Par6 (Partitioning defective 6 homolog alpha), une protéine régulant la polarité des cellules épithéliales. La formation d'un complexe Par6-Smurf1 permet la diminution de la production de RhoA et la dégradation des jonctions serrées, nécessaire à la poursuite de l'EMT (Ozdamar et coll., 2005).

La voie Erk/MAPK

L'activation rapide de Erk (Extracellular signal-regulated kinase) a été observée dans de nombreux types cellulaires, dont les cellules épithéliales (Hartsough et Mulder, 1995) et les fibroblastes (Mucsi et coll., 1996). Cette voie fait intervenir Raf (Rapidly accelerated fibrosarcoma), une Mitogen-Activated Protein kinase kinase kinase (MAP3K), recrutée en réponse à TGF-β et capable d'activer Erk via MEK1 (MAPK/ERK Kinase-1 = MAP2K1) (Yan et coll., 1994). La signalisation par Erk régule l'expression de gènes notamment impliqués dans les interactions cellules-matrice, la motilité cellulaire et l'endocytose (Davies et coll., 2005). En particulier, cette voie induit l'EMT, caractérisée par une augmentation de l'expression de la vimentine et une diminution de l'expression de la E-cadhérine (Davies et coll., 2005). Erk peut également activer les R-Smad, dont Smad1, Smad2 et Smad3, et ainsi réguler leur activité (Kretzschmar et coll., 1997, Funaba et coll., 2002, Matsuura et coll., 2005).

La voie JNK/p38

L'activation de JNK (c-Jun N-terminal Kinase) et p38 MAPK constitue une autre voie de signalisation de TGF-β indépendante de Smad. A l'instar de Erk, JNK et p38 sont activés à travers une cascade de MAPK (Weston et Davis, 2002). MKK4 (Mitogen-activated protein Kinase 4 = MAP2K4) et MKK3/6 sont les activateurs directs respectifs de JNK et p38 (Zhang, 2009). Cette voie intervient dans l'apoptose et l'EMT induites par TGF-β, mais, contrairement à la voie Erk, en coopération avec la voie Smad.

TRAF6 (TNF receptor associated factor 6) et TAK1 (Transforming growth factor beta-Activated Kinase 1) sont nécessaires à l'induction par TGF-β de l'activation de JNK et p38 (Sorrentino et coll., 2008, Yamashita et coll., 2008). L'inhibition de TRAF6 bloque l'effet pro-apoptotique de TGF-β (Asanuma et coll., 2011).De la même manière, les cellules exprimant une forme inactive de la TAK1 sont protégées contre l'apoptose induite par BMP et TGF-β (Edlund et coll., 2003).

Cette voie intervient également dans l'induction de l'EMT par TGF-β. L'inhibition de p38 dans une culture de cellules épithéliales bloque les modifications morphologiques et la réorganisation du cytosquelette d'actine caractéristiques de l'EMT (Bakin et coll., 2002).

La voie PI3K/Akt

L'activation de PI3K par le TGF-β, permet la phosphorylation de son effecteur, Akt (Wilkes et coll., 2005). Cette voie est impliquée dans l'EMT, la prolifération et la différenciation des myofibroblastes, ainsi que dans la régulation de la voie Smad.

L'inhibition par la rapamycine de mTOR, un effecteur de Akt, dans des cellules épithéliales murines, induit une inhibition de l'augmentation de la sécrétion de protéines, du pouvoir migratoire et invasif induits par TGF-β lors de l'EMT (Lamouille et Derynck, 2007).

D'autre part, l'inhibition de c-Abl (Abelson murine leukemia viral oncogene homolog 1), un effecteur de PI3K, réduit la différenciation myofibroblastique (α-SMA et vimentine), l'expression des gènes de la MEC (collagènes, fibronectine) et la prolifération sur des fibroblastes rénaux traités par TGF-β (Wang et coll., 2005).

La voie Wnt/β-caténine

Les Wnt sont des glycoprotéines qui, en se fixant sur les récepteurs Frizzled et LRP5/6 (Lipoprotein Receptor-related Protein 5/6), inhibent la translocation nucléaire de la β-caténine (Tan et coll., 2014). Les cibles transcriptionnelles de la voie Wnt/β-caténine participent à l'organogénèse, l'homéostasie tissulaire et à la progression de nombreuses pathologies, dont le cancer et la fibrose (Liu, 2010). L'activation de la voie Wnt/β-caténine stimule la prolifération, la capacité migratoire et la production de MEC par les fibroblastes (Poon et coll., 2009, Carre et coll., 2010). Elle intervient également dans la régulation de l'EMT au cours du développement et à l'âge adulte, au cours de la régénération tissulaire et de la fibrose (Zhou et coll., 2012, Zhou et coll., 2013, Matheson et coll., 2016).

Il existe une communication entre les voies Wnt/β-caténine et TGF-β/Smad. Au cours de la fibrose pulmonaire, la formation de complexes β-caténine/Smad2 a été observée dans des cellules épithéliales alvéolaires humaines (Kim et coll., 2009). Les protéines Wnt peuvent induire la production de TGF-β par les fibroblastes (Carre et coll., 2010) et TGF-β1 induit l'activation de la β-caténine (Sato,

2006). Au cours de l'EMT, ces deux voies de signalisation agissent en synergie pour réguler l'expression de α-SMA .(Zhou et coll., 2012)

b. CTGF

Le Connective Tissue Growth Factor (CTGF), également appelé CCN2, possède de nombreuses fonctions, dont la stimulation de la prolifération, l'angiogenèse, la migration, la production de MEC (notamment du collagène de type I), la survie et l'apoptose (Blom et coll., 2002). L'expression de CTGF est majoritairement régulée par le TGF-β, entre autres par l'activation de la voie Smad (Zhang et coll., 2011). La voie Rho/ROCK est également impliquée dans ce mécanisme, l'inhibition de la GTPase RhoA induit une diminution significative de l'expression de CTGF induite par le TGF-β1 (Heusinger-Ribeiro et coll., 2001). L'activation de la voie Rho/ROCK a été observée dans l'iléon de patients souffrant d'entérique radique, suggérant un rôle de CTGF dans cette pathologie (Vozenin-Brotons et coll., 2004). En outre, à l'instar de TGF-β1, le CTGF peut activer sa propre expression, induisant une nouvelle boucle d'activation participant à la fibrogénèse (Riser et coll., 2000). Ce mécanisme présente un intérêt particulier car il semble restreint aux cellules pro-fibrosantes.

Le CTGF favorise la fixation de TGF-β sur son récepteur TGF-βR2 et amplifie ainsi l'activation de la voie Smad (Abreu et coll., 2002). L'expression à long terme de CTGF, dans des pathologies comme l'entérique radique (Bourhis et coll., 2006) ou la sclérodermie (Sato et coll., 2000, Leask, 2004), semble indépendante de TGF-β1. En effet, aux temps tardifs, l'expression de TGF-β1 est faible alors que l'expression de CTGF est élevée et corrélée avec la sévérité de ces pathologies (Sato et coll., 2000). Plusieurs explications ont été proposées pour ce phénomène. Les contraintes mécaniques produites par les myofibroblastes et la MEC au cours de la fibrose induisent la production chronique de CTGF par stimulation du « stretch-responsive element » présent dans son promoteur (Schild et Trueb, 2002). Ce mécanisme est dépendant de l'activation de RhoA et de la polymérisation des fibres d'actine, induisant de nouveaux stress mécaniques et une augmentation de l'activation de CTGF (Chaqour et coll., 2006). La fibronectine est surexprimée sous l'action de CTGF au cours de la fibrose (Frazier et coll., 1996). En retour, la fibronectine agit de concert avec CTGF pour activer l'expression de ce dernier (Chen et coll., 2004) et favoriser la polymérisation du collagène (Velling et coll., 2002). De plus, la fibronectine active la voie Rho par sa fixation aux intégrines α5β1 et αvβ3 (Bourdoulous et coll., 1998) et contribue ainsi à la prolifération et à la différenciation des cellules musculaires lisses (Mack et coll., 2001).

5. Les spécificités de la fibrose intestinale

Au sein de l'intestin, l'inflammation chronique se traduit dans un premier temps par la perte des cellules épithéliales de la muqueuse et la dégradation de la MEC de la lamina propria, induisant des ulcérations. Les enzymes et médiateurs sécrétées par les monocytes, macrophages et granulocytes intestinaux sont majoritairement responsables des dommages au tissu. Ces lésions induisent un recrutement constant de médiateurs de l'inflammation, eux-mêmes produisant de nouveaux dommages au tissu. Une boucle d'activation se met alors en place, pouvant mener à la fibrose (Rieder et coll., 2007).

Les espèces réactives interviennent en grande partie dans l'induction de ces dommages. Outre ceux directement formés suite à l'irradiation, les leucocytes infiltrant la muqueuse produisent de grandes quantités d'espèces réactives de l'oxygène (Kruidenier et Verspaget, 2002). L'intestin sain ne contient que peu d'enzymes antioxydantes (Kruidenier et coll., 2003) et ne dispose donc pas d'un système de neutralisation permettant de prendre en charge les ROS néoformés. Ainsi, une augmentation de l'expression de la NADPH (Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate) oxydase a été observée au niveau des macrophages intestinaux en contexte inflammatoire (Chanock et coll., 1994).

Les cellules immunitaires répondent également par la production d'enzymes modifiant et /ou dégradant la MEC (Vaday et Lider, 2000). La modification de la matrice permet l'infiltration de cellules supplémentaires, immunitaires et de remplacement, au sein de la zone enflammée. Deux groupes majoritaires de protéinases sont sécrétées à cette étape : les protéases à sérine, telles que les élastases et collagènases, et les MMP. Les élastases sont stockées sous leur forme active dans les neutrophiles, monocytes et macrophages, contrairement aux MMP qui sont en général sécrétées sous forme inactive (zymogènes) (Vaday et Lider, 2000). Les leucocytes expriment 9 des quelques 23 MMP présentes chez l'Homme. Ces enzymes sont toutes responsables de la dégradation de la MEC. Leur activité est régulée par les TIMP. La balance entre les MMP et les TIMP est l'un des éléments déterminant l'étendue des dommages à l'intestin.

Les cathépsines interviennent également dans les processus de remodelage matriciel en cas d'inflammation (Bosi et coll., 1993). Dans la muqueuse intestinale activée, la cathépsine D est surexprimée (Hausmann et coll., 2004). L'inhibition des cathépsines B, D et L dans un modèle de colite induite par sulfate de dextran induit une amélioration significative des dommages à la muqueuse (Menzel et coll., 2006).

En conditions physiologiques, le processus d'inflammation s'arrête et le tissu entreprend une phase régénérative. Les cellules épithéliales restantes à la marge de la lésion se déplacent le long de la membrane basale jusqu'à rencontrer d'autres cellules et forme de nouvelle jonctions serrées lors d'un processus appelé « restitution » (Silen et Ito, 1985, Komuro, 1990). Ce phénomène fait intervenir de nombreux facteurs de croissance tels que HGF, EGF et FGF-2 (Dignass, 2001).

Dans le cas où les dommages touchent également les tissus sub-épithéliaux, la contraction de la lamina propria permet de diminuer la surface à régénérer. En effet, la fermeture rapide de la lésion est nécessaire afin de limiter la durée pendant laquelle la fonction de barrière de l'intestin n'est plus assurée. Le passage des bactéries de la lumière intestinale vers la muqueuse peut induire des effets délétères sévères (Cho, 2003). Il semble que les myofibroblastes intestinaux participent à la réponse aux infections en exprimant des molécules de reconnaissance aux motifs bactériens : TLR (Toll-Like Receptors), NOD1 (Nucleotide-binding Oligomerization Domain 1) et NOD2 (Otte et coll., 2003). Il est donc possible que le passage de pathogènes dans la muqueuse intestinale induise le recrutement de myofibroblastes qui pourraient participer au développement de la fibrose. De plus, l'infection par des pathogènes induit une augmentation de l'inflammation et amplifie donc les phénomènes inflammatoires déjà en place.

C. Le potentiel de la thérapie cellulaire

Les cellules souches participent au développement des organes et des tissus et au maintien de l'homéostasie tissulaire. L'homéostasie est la capacité d'un système à maintenir son fonctionnement malgré les contraintes. Au niveau tissulaire, ce concept désigne l'équilibre entre les processus de mort, de prolifération, de différenciation et de migration cellulaire. Le maintien de l'homéostasie est contrôlé par des mécanismes complexes au cours du développement et à l'âge adulte et permet la mise en place et la conservation de la fonction des tissus. Il est assuré notamment par les cellules souches, au niveau local et à distance. Les cellules souches servent en particulier de cellules de remplacement aux cellules mortes. En effet, la plupart des tissus sont en renouvellement constant. On distingue alors les tissus à renouvellement rapide, tels que l'épithélium intestinal, des tissus à renouvellement lent, tels que le foie. Différents types de cellules souches sont présents dans l'organisme adulte, avec des processus de renouvellement différents permettant de remplacer l'ensemble des cellules. Certaines de ces cellules souches suivent un modèle pyramidal, c'est-à-dire qu'elles peuvent donner un large éventail de cellules spécialisées. C'est le cas par exemple des cellules souches hématopoïétiques à l'origine de l'ensemble des cellules du sang et de la lymphe. Par opposition, la différenciation en ligne désigne les cellules souches unipotentes, ne pouvant donner qu'un seul type cellulaire spécifique. Les cellules souches des cryptes intestinales font partie de ce dernier groupe. L'équilibre entre ces différents évènements permet de conserver l'intégrité de l'organisme. La découverte des cellules souches et de leurs propriétés régénératives a donné lieu à de nombreuses études concernant la faisabilité de leur utilisation thérapeutique. A l'heure actuelle, le domaine de la thérapie cellulaire est ainsi largement étudié car il présente de nombreux avantages par rapport aux méthodes pharmacologiques conventionnelles.

Les cellules souches sont définies par leur capacité d'auto-renouvellement et de différenciation. L'auto-renouvellement correspond à l'aptitude de ces cellules à se multiplier de façon répétée (théoriquement à l'infini) sans perte de leurs possibilités de différenciation. La capacité de différenciation désigne l'aptitude des cellules souches à se différencier en un ou plusieurs types cellulaire spécialisés et fonctionnels. La division d'une cellule souche produit donc des cellules filles pouvant suivre deux voies distinctes : la conservation de leur caractère « souche » ou la différenciation en un autre type cellulaire.

La principale fonction des cellules souches est de maintenir une réserve de cellules destinées à remplacer ou réparer les tissus endommagés, quelle qu'en soit la cause.

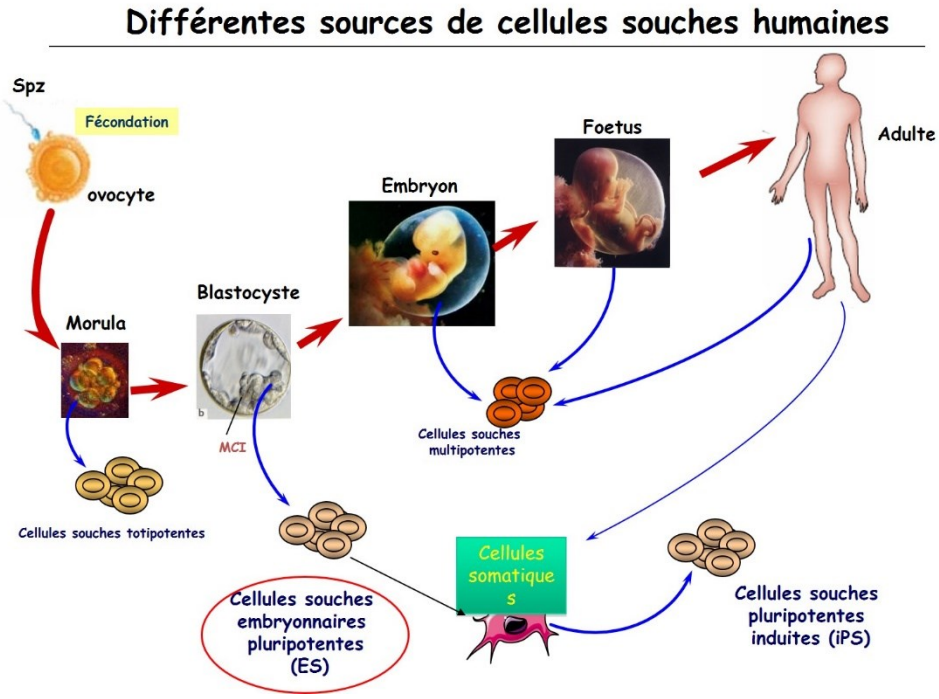


Figure 19 : origine des cellules souches chez l'Homme

I. Fonction des cellules souches

1. Types de cellules souches

Il existe 5 principaux types de cellules souches : embryonnaires, fœtales (issues d'interruptions volontaires de grossesse), adultes, les cellules souches du sang de cordon et les cellules souches pluripotentes induites (iPSc : induced Pluripotent Stem cell). Les iPS, découvertes plus récemment, sont produites en laboratoire par reprogrammation de cellules différenciées adultes. Cette classification est basée sur l'origine de ces cellules dans l'organisme ainsi que sur leur potentiel de différenciation. La classification peut également se faire sur ce potentiel de différenciation. Les cellules souches sont alors réparties selon 4 groupes (Figure 19) :

- Les cellules totipotentes : désigne l'ovocyte fécondé ainsi que les cellules filles (blastomère) produites lors des premières divisions cellulaires. Elles sont capables de se différencier en tous les types cellulaires de l'organisme
- Les cellules pluripotentes : ce terme désigne principalement les cellules souches embryonnaires et les iPSc. Les cellules souches embryonnaires (cellules ES : Embryonic Stem) se trouvent dans la masse cellulaire interne du blastocyste (5ème ou 6ème jour de l'embryogénèse chez l'Homme). Elles peuvent se différencier en cellules des feuillets embryonnaires (ectoderme, mésoderme et endoderme)

- Les cellules multipotentes : elles ont la capacité de se différencier en types cellulaires de la même famille. Par exemple, les cellules souches hématopoïétiques (CSH) se différencient en leucocytes, érythrocytes, plaquettes… Ces cellules sont présentes dans l'organisme à l'âge adulte
- Les cellules unipotentes : elles ne peuvent donner qu'un seul type cellulaire, mais leur capacité d'auto-renouvellement les différencie des cellules non souches (par exemple les cellules souches des cryptes qui se différencient uniquement en entérocytes)

Les cellules souches totipotentes et pluripotentes disparaissent au court du développement, après prolifération et différenciation, permettant l'apparition de l'ensemble des types cellulaires de l'organisme adulte. Les cellules souches embryonnaires peuvent se différencier, sous des conditions spécifiques, en plus 200 types cellulaires différents.

Les cellules souches fœtales sont des cellules primitives présentes dans les tissus fétaux. Des cellules souches de la crête neurale, des cellules souches hématopoïétiques fétales et des progéniteurs des cellules des îlots de Langerhans ont été isolées à partir de fétus humains (Beattie et coll., 1997).

A l'inverse, les cellules souches dites « adultes », sont présentes à partir du stade postnatal et durant toute l'existence de l'individu. Elles constituent une réserve de cellules souches nécessaire au renouvellement et à la réparation des tissus. Les cellules souches multipotentes et unipotentes font partie de cette catégorie. Les cellules souches mésenchymateuses et les cellules souches hématopoïétiques appartiennent à cette catégorie.

Pour assurer leur auto-renouvellement, ces cellules peuvent suivre deux types de division :

- Symétrique, c'est-à-dire aboutissant à la formation de deux cellules filles identiques possédant les mêmes propriétés que la cellule mère.
- Asymétrique : qui donne lieu à la production d'une cellule souche et d'une cellule progénitrice ayant un potentiel de division réduit. Ces cellules progénitrices se différencient en cellules spécialisées matures.

2. Hématopoïèse, niche et quiescence des cellules souches

L'hématopoïèse chez adulte est localisée dans les sites médullaires (Figure 20). Ils sont composés des cellules du réseau vasculaire, cellules endothéliales et cellules de la membrane abluminale, et des adipocytes. A ces deux composantes médullaires sont associés des cellules recouvrant les trabécules osseux, appelées cellules endostéales. L'activité des cellules du

microenvironnement, va conférer à ces cellules un rôle critique dans le développement de l'hématopoïèse. Plus précisément, l''hématopoïèse est localisée au niveau de la « niche hématopoïétique » au sein de laquelle les CSH sont associées à un microenvironnement. Il constitue le support physique de l'hématopoïèse et permet sa régulation locale responsable du maintien, de la prolifération et de la différenciation des CSH en progéniteurs clonogéniques puis en cellules matures. Il est composé de cellules stromales et sécrétant une matrice extracellulaire (MEC), agissant par contacts étroits avec les CSH au moyen de molécules d'adhérence (intégrines), de facteurs solubles (cytokines et chimiokines) et de leurs récepteurs. Le microenvironnement médullaire est constitué de l'ensemble des cellules médullaires non hématopoïétiques. Les CSH sont capables de se différencier dans un des trois types de cellule sanguine : leucocyte, globule rouge ou plaquette.

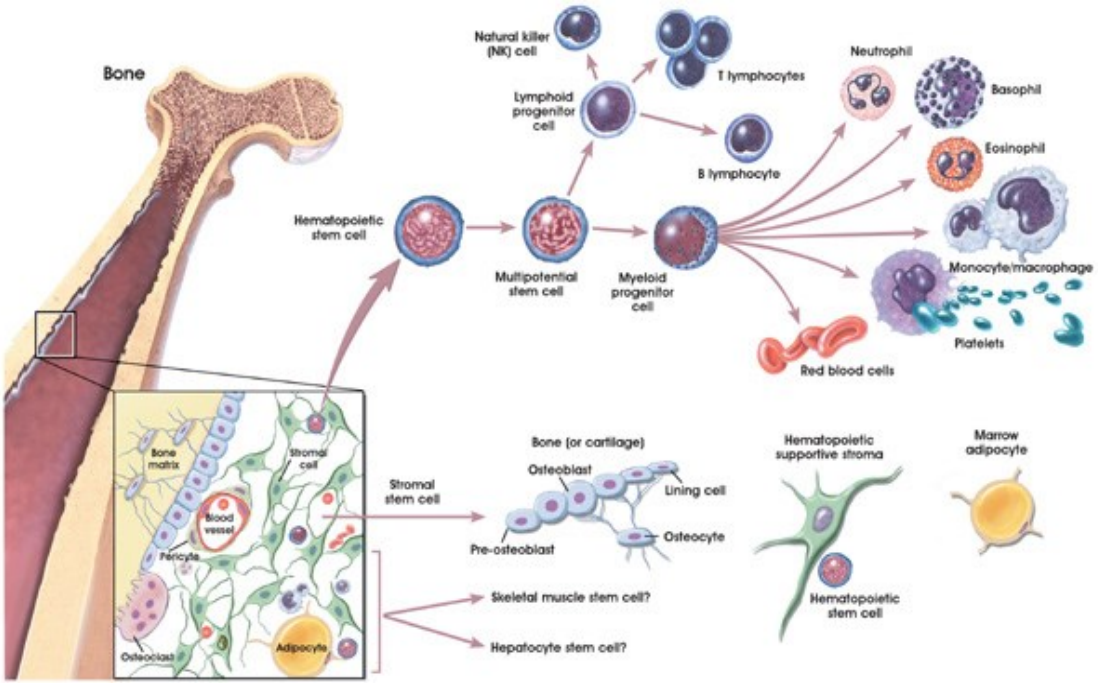


Figure 20 : population cellulaire du système médullaire stromal (D'après Winslow T. et Kibiuk L., 2001)

Afin de maintenir un stock constant de cellules souches, permettant d'assurer l'homéostasie tissulaire tout au long de la vie, une partie des cellules souches doivent demeurer en phase de quiescence. La quiescence est un état de dormance correspondant à l'arrêt en phase G0 du cycle cellulaire et caractérisé par une faible activité métabolique. Cette état est favorisé par l'augmentation du taux intracellulaire de protéines inhibitrices du cycle cellulaire tels que les kinases cycline-dépendantes (p16, p21, p53) (Cheng et coll., 2000). Seule une faible partie des cellules souches sont en prolifération et la régulation de leur capacité à proliférer ou à demeurer quiescentes est contrôlée

par leur niche. Ces mécanismes permettent d'assurer le maintien de la niche et de fournir des progéniteurs des cellules différenciées.

II. La thérapie cellulaire

La thérapie cellulaire consiste à l'utilisation de cellules vivantes, souches ou différenciées, pour prévenir, traiter ou atténuer une maladie. Elle repose sur différents mécanismes, soit de remplacement, soit d'effets paracrines ou endocrines. La thérapie cellulaire de remplacement est la reconstitution d'un tissu par l'incorporation fonctionnelle de cellules dérivées de cellules souches. Par opposition, l'effet « bystander » en thérapie cellulaire comprend les effets trophiques, immunomodulateurs et régénératifs produits par les cellules exogènes introduites dans l'organisme.

Différents paramètres entrent en ligne de compte lors de l'élaboration d'un protocole de thérapie cellulaire :

- Le type de cellules transplantées : notamment cellules souches ou cellules différenciées. Ce choix dépend de l'organe et de la pathologie à traiter, ainsi que de la disponibilité des donneurs et de la facilité d'obtention de ces cellules d'un point de vue technique.
- Le donneur : la greffe peut être autologue lorsque les cellules sont isolées à partir de prélèvements réalisés sur le patient ou allogénique lorsque le donneur est un autre individu que le patient. Ce choix repose essentiellement sur le risque de rejet de greffe inhérent à l'introduction de cellules d'un autre individu dans l'organisme. Dans le cas d'une greffe allogénique, le choix d'un donneur intrafamilial limite le risque de rejet.
- Le nombre de cellules, le nombre d'injections, les co-traitements : différents paramètres devant être optimisés afin d'améliorer l'efficacité du traitement.
- La voie et le mode de délivrance : en intraveineuse ou injection locale, dans un biomatériau ou autre type de matrice 2D ou 3D.

1. Le choix des cellules souches en thérapie cellulaire (ES, IPs, CSH, CSM)

De nombreux types cellulaires ont été utilisés ou suggérés pour une application en thérapie cellulaire. On peut distinguer deux familles de cellules en thérapie cellulaire : les cellules différenciées, spécialisées et spécifiques à un organe, et les cellules souches, non-différenciées. Des questions d'efficacité, d'innocuité et éthiques se posent quant à l'utilisation de ces différents types cellulaires.

a. Les cellules différenciées

L'un des objectifs initiaux de la thérapie cellulaire était de remplacer les cellules mortes ou non fonctionnelles dans les tissus lésés afin de corriger la dysfonction du tissu. La transplantation de cellules spécialisées correspondant à l'organe visé a donc été largement étudiée. On peut citer différents exemples :

- Le traitement du diabète de type I par transplantation d'îlots de Langerhans isolés de pancréas humains. Cette méthode permet en théorie de supprimer les injections d'insuline chez les patients traités. Les îlots transplantés produisent l'insuline nécessaire au rétablissement du métabolisme du glucose. Entre 2007 et 2010, les données recueillies chez 677 patients traités par transplantation d'îlots ont montré que 44% d'entre eux ne prenaient plus d'insuline 3 ans après traitement (Barton et coll., 2012).
- La transplantation de cardiomyocytes améliore la fonction cardiaque après un infarctus du myocarde. En particulier, l'injection de cardiomyocytes a pour objectif la récupération de l'activité contractile du myocarde. Dans différents modèles de dommages au myocarde, il a été démontré que les cardiomyocytes se localisent dans le myocarde, forment un syncytium fonctionnel et améliore la fonction cardiaque proportionnellement à la survie des cellules transplantées (Li et coll., 1996).

D'autres exemples d'utilisation thérapeutique de cellules différenciées existent, pour le foie par exemple. Néanmoins, cette technique présente divers inconvénients. Premièrement, la disponibilité des cellules dont l'isolation est réalisée à partir d'explants de tissus, difficilement obtenus. De plus, la difficulté d'amplifier les cellules *in vitro* sans dérive génétique implique l'obtention d'un grand nombre de cellules directement isolées d'organes donneurs. Enfin, il est souvent impossible de recourir à des greffes autologues en raison de l'état pathologique des cellules du patient. La greffe nécessite donc un traitement immunosuppresseur afin de limiter les rejets. Pour contourner ces obstacles, plusieurs solutions ont été proposées, telles que la greffe xénogénique (porc vers humain pour le cœur) ou la différenciation de cellules pluripotentes (cellules souches embryonnaire, iPSc…).

b. Les cellules souches embryonnaires

Les cellules souches embryonnaires (cellules ES) sont obtenues à partir du stade blastocyste de l'embryon. Elle présente une capacité d'auto-renouvellement théoriquement infinie *in vitro* et

peuvent se différencier en l'ensemble des cellules de l'organisme adulte. Pour répondre strictement à la définition des cellules ES, elles doivent également former des tératomes lorsqu'elles sont implantées *in vivo*. La pluripotence et la capacité de prolifération des cellules souches embryonnaires constituent un avantage certain dans les protocoles de thérapie cellulaire. Elles peuvent être amplifiées *in vitro*, contrairement aux cellules différenciées. Elles sont capables de se différencier en l'ensemble des cellules somatiques et germinales d'un organisme. Les cellules souches embryonnaires sont souvent prédifférenciées avant transplantation, en fonction de l'organe à traiter. Des essais cliniques utilisant ces cellules souches sont en cours :

- Les lésions à la moelle épinière : en 2010, 5 patients ont été traités par injection de progéniteurs d'oligodendrocytes dérivés de cellules souches embryonnaires. Aucune amélioration significative des fonctions moteurs et sensorielles n'a été observée (Ilic et coll., 2015). C'est le premier essai clinique réalisé sur la transplantation de cellules dérivées de cellules souches embryonnaires.
- Dégénérescence maculaire de la rétine : plusieurs essais cliniques utilisant des cellules épithéliales pigmentaires de la rétine dérivées de cellules souches embryonnaires sont en cours (Schwartz et coll., 2012, Schwartz et coll., 2015, Song et coll., 2015). Les résultats préliminaires de ces essais, avec un suivi médian de 22 mois, sont prometteurs, en termes d'amélioration de l'acuité visuelle.
- Infarctus du myocarde : un essai portant sur la transplantation de patchs de fibrine contenant des progéniteurs de cellules cardiaques a débuté en 2014 en France sur un patient. Les résultats définitifs ne sont pas encore connus, mais les symptômes étaient améliorés 3 mois après transplantation, avec une augmentation de la fraction d'éjection du ventricule gauche de 26 à 36% et une augmentation de la contractibilité du myocarde (Menasche et coll., 2015).

D'autres essais sont en cours, pour le traitement du diabète de type I ou l'utilisation des cellules souches embryonnaires comme vecteurs de vaccins anti-cancéreux (Ilic et Ogilvie, 2016). Malgré les résultats obtenus et le potentiel de ce type de thérapie, l'utilisation des cellules souches embryonnaires pose de lourds problèmes éthiques, en plus des risques de rejet de greffe. L'isolation de ces cellules nécessite la destruction de l'embryon et pose donc des questions identiques à celles soulevées par l'IVG. Plusieurs pays, tels que les États-Unis d'Amérique, autorisent la recherche sur ce type de cellules, mais le cas général reste l'interdiction. Ainsi, certaines équipes ont tenté de développer des méthodes non destructrices de l'embryon. Une méthode consiste à récupérer un ou deux blastomères de la phase de segmentation de l'embryon, et de laisser l'embryon restant se développer au stade blastocyste (Klimanskaya et coll., 2007). Enfin, le risque de carcinogénèse associé à la transplantation de cellules souches embryonnaires est un autre obstacle à leur utilisation.

c. Les cellules souches pluripotentes induites (iPSc)

L'apparition des iPSc émerge du désir de s'affranchir des problèmes éthiques liés à l'utilisation des cellules ES. L'obtention des iPSc est basée sur la reprogrammation de cellules différenciées par l'intégration de 4 facteurs de transcription : Oct3/4 (Octamer-binding transcription factor 3 et 4), Sox2 ((Sex determining region Y)-box 2), Klf4 (Kruppel-like factor 4) et c-Myc (v-Myc avian myelocytomatosis viral oncogene homolog). Cette technique a été initialement développée sur des fibroblastes murins et humains par l'équipe du Professeur Yamanaka (Takahashi et Yamanaka, 2006, Takahashi et coll., 2007, Yamanaka, 2007). Les iPSc présentent les caractéristiques biologiques inhérentes aux cellules ES : auto-renouvellement, capacité de différenciation en l'ensemble des cellules des feuillets embryonnaires et formation de tératomes *in vivo*. En plus de contourner les problèmes éthiques, l'utilisation des iPSc accroit la possibilité de greffes autologues car elles peuvent être produites à partir d'un simple explant de peau.

Théoriquement, les iPSc peuvent être utilisées en remplacement de n'importe quel type cellulaire, qu'il s'agisse de cellules souches ou de cellules différenciées. L'utilisation des iPSc lors d'essais clinique est encore limitée, mais de nombreux résultats d'études précliniques émergent depuis leur découverte :

- Anémie falciforme : dans un modèle murin, la transplantation de progéniteurs hématopoïétiques issus d'iPSc corrigés au niveau de l'allèle responsable de la pathologie induit l'amélioration des symptômes (Hanna et coll., 2007). L'utilisation de fibroblastes autologues pour la génération des iPSc a permis de supprimer les risques de rejet de greffe dans cette étude.
- Maladie de Parkinson : la transplantation de neurones dopaminergiques dérivés d'iPSc dans un modèle de maladie de parkinson chez le rat permet de diminuer significativement les défauts moteurs liés à la maladie (Rhee et coll., 2011).

De nombreux autres exemples sont disponibles pour l'infarctus du myocarde (Nelson et coll., 2009), la cirrhose (Liu et coll., 2011), les lésions à la moelle épinière (Nori et coll., 2011)…

La première étude clinique utilisant des iPSc a commencé à recruter des patients au Japon en 2013. La première transplantation de cellules dérivées d'iPSc chez un patient humain a ainsi été réalisée en 2014. La patiente concernée, souffrant de dégénérescence maculaire liée à l'âge, a été traitée par injection de cellules épithéliales pigmentaires de la rétine après résection du tissu fibrotique

sous-rétinien. 6 mois plus tard, l'acuité visuelle de la patiente était stabilisée, sans effets secondaires apparents (http://stemcellassays.com/2015/09/first-ips-cell-clinical-trial-insights/).

Les iPSc semblent donc une alternative viable à l'utilisation des cellules ES en thérapie cellulaire. Néanmoins, le risque de carcinogénèse reste présent, et le maintien du phénotype des iPSc en culture est parfois problématique. Ainsi, le traitement du deuxième patient de l'essai clinique mentionné ci-dessus a dû être interrompu en raison de mutation des cellules.

d. Les cellules souches hématopoïétiques

La transplantation de CSH permet de restaurer les systèmes immunologique et hématologique après myéloablation. La greffe de CSH est un traitement du cancer et des maladies hématologiques. Utilisée depuis plus de 30 ans, elle est l'application principale de la thérapie cellulaire. L'utilisation de greffons cellulaires, enrichis en CSH et appauvris en cellules matures, permet de réduire l'impact de la maladie du greffon contre l'hôte (GVH), par suppression des lymphocytes T alloréactifs, et de réduire le risque de contamination du greffon par des cellules tumorales (Brugger et coll., 1994). L'utilisation de CSH du sang périphérique (CSHP) permet une reprise hématologique plus rapide, réduisant les risques de thrombopénie et les risques d'infection liée à la neutropénie (Champlin et coll., 2000). Cette sécurité plus grande de la greffe de CSH permet leur utilisation pour le traitement des maladies auto-immunes.

III. Les cellules souches mésenchymateuses

Les cellules souches mésenchymateuses, également appelées cellules stromales mésenchymateuses, sont des cellules adhérentes et non-hématopoïétiques présentes dans une niche périvasculaire dans le stroma de la moelle osseuse. Elles possèdent les capacités d'auto-renouvellement et de différenciation nécessaires à l'utilisation du terme « cellules souches ». Friedenstein et coll. furent les premiers, en 1966, à décrire une population de cellules souches présentes dans la fraction stromale de la moelle osseuse, capables de forme des os hétérotopiques et un microenvironnement médullaire après transplantation chez la souris (Friedenstein et coll., 1966). La même équipe a décrit par la suite les « cellules souches ostéogéniques de la moelle osseuse » comme des cellules formant des colonies fibroblastiques et servant de précurseurs communs à l'os et au cartilage (Friedenstein et coll., 1987). Caplan et coll. baptisèrent ces cellules « cellules souches mésenchymateuses », responsables de la formation de l'os et du cartilage ainsi que de la réparation et

du renouvellement tissulaire durant le développement embryonnaire et à l'âge adulte (Caplan, 1991). Le « caractère souche » et l'emploi du terme « mésenchymateux » ont été largement débattus, notamment au vu des différents phénotypes et origines des cellules désignées comme « CSM » (Horwitz et coll., 2005, Bianco et coll., 2013).

1. Origines et différences phénotypiques des CSM

Afin de dissiper les confusions dans la désignation des cellules considérées comme CSM, la société internationale pour la thérapie cellulaire (ISCT : International Society for Cellular Therapy) a défini les critères minimaux d'appartenance à cette famille :

- Les CSM adhèrent sur une plaque de culture en plastique non traité, sous des conditions normales de culture
- Elles expriment simultanément CD105, CD73 et CD90 mais pas CD45, CD34, CD14, CD11b, CD79alpha, CD19 et HLA-DR (Human Leukocyte Antigen – antigen D Related)
- Sous des conditions définies, les CSM peuvent se différentier en ostéoblastes, adipocytes ou chondrocytes *in vitro*

Ainsi, on différenciera les cellules souches mésenchymateuses, présentant la totalité de ces caractéristiques, des cellules stromales mésenchymateuses, qui ne satisfont pas à l'ensemble de ces critères.

Il existe de nombreuses sources de cellules « CSM-like ». Les cellules répondant à l'ensemble des critères des CSM sont isolées à partir de la moelle osseuse et des tissus extra-embryonnaires tels que le placenta (Yang et coll., 2013), la membrane amniotique (Soncini et coll., 2007) ou le cordon ombilical (Xu et coll., 2009). En revanche, des cellules similaires ont été retrouvées dans pratiquement la totalité des tissus : tissu adipeux (Zuk et coll., 2001), pulpe dentaire (Pierdomenico et coll., 2005), muscle (Kuroda et coll., 2006), membrane synoviale (De Bari et coll., 2001), tendon (Salingcarnboriboon et coll., 2003), ligament parodontal (Seo et coll., 2004), périoste (Nakahara et coll., 1991, Nakahara et coll., 1991), cerveau (da Silva Meirelles et coll., 2006), sang (Zvaifler et coll., 2000), poumon (Sabatini et coll., 2005) et peau (Toma et coll., 2001, Zaher et coll., 2014).

Une autre source de CSM a été identifiée récemment. En 2008, Crisan et coll. ont observé que les péricytes présentent les mêmes marqueurs de surface que les CSM (Crisan et coll., 2008). Les péricytes, également appelées cellules de Rouget, encerclent les cellules endothéliales dans les capillaires et microvaisseaux. Crisan et coll. ont isolé ces cellules de nombreux tissus : pancréas, cœur,

peau, poumon, cerveau, yeux… Chacune des populations produites à partir de ces explants présentaient les marqueurs de surface des CSM et étaient capables de se différencier en adipocytes, ostéoblastes et chondrocytes *in vitro* (Crisan et coll., 2008). Ces découvertes ont amené la communauté scientifique à évoquer une possible origine péricytaire de toutes les CSM de l'organisme, ce qui expliquerait leur présence dans de nombreux organes (Caplan, 2008). Néanmoins, Blocki et collègues ont démontré que les CSM de la moelle osseuse n'exprimant pas CD146, un marqueur positif chez les pérycites, ne se différentiaient pas en pérycites et ne possédaient pas les mêmes propriétés pro-angiogéniques. Ils suggèrent donc que les péricytes soient une sous-population de CSM spécialisées dans les processus vasculaires (Blocki et coll., 2013).

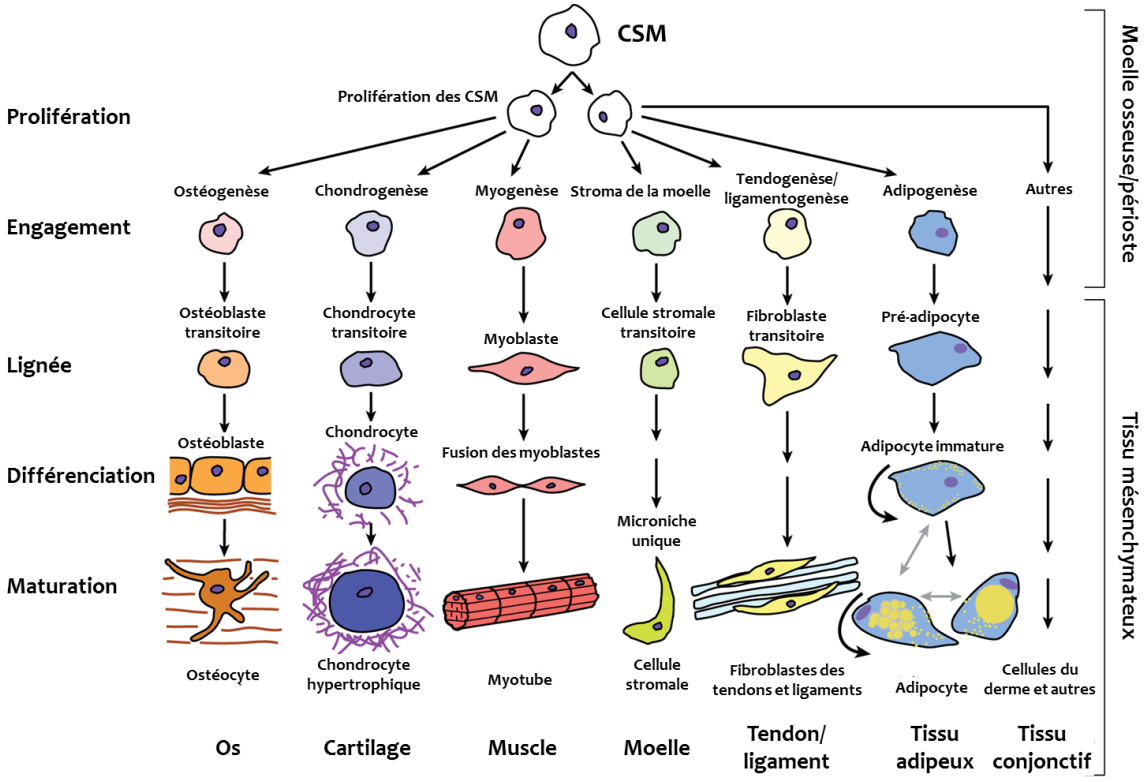


Figure 21 : hypothèse du "mesengenic process" : différenciation des CSM en cellules du mésoderme *in vivo* et *in vitro* (D'après Singer et Caplan, 2011) (Singer et Caplan, 2011)

2. Différenciation des CSM

Les cellules souches de l'organisme, quelles que soit leur capacités de différenciation, constituent un ensemble nécessaire à la production de progéniteurs et de cellules spécialisées permettant le maintien de l'homéostasie tissulaire. Les cellules souches sont programmées pour se différencier en types cellulaires définis sous l'influence de stimuli spécifiques. Les premières études

réalisées sur les CSM ont montré leur capacité à se différencier en lignées des tissus mésenchymateux : os, cartilage, graisse, tendon, muscle et stroma de la moelle (Pittenger et coll., 1999).

Plusieurs études ont depuis démontré la capacité des CSM à la transdifférenciation. Elles peuvent ainsi se différencier en cellules de l'endoderme et de l'ectoderme, contrairement au dogme du « mesengenic process » les limitant à la différenciation en cellules du mésoderme (Figure 21) (Caplan, 1994). Ces types cellulaires comprennent les hépatocytes, les neurones et les cellules épithéliales. (Kopen et coll., 1999, Petersen et coll., 1999, Hung et coll., 2002, Jiang et coll., 2002, Kadivar et coll., 2006).

3. Fonction des CSM

Les CSM ont deux rôles principaux à l'âge adulte :

- Le soutien de l'hématopoïèse
- La réparation des tissus lésés

a. Soutien de l'hématopoïèse

L'implication des CSM dans le soutien de l'hématopoïèse a été mise en évidence dans des modèles *in vitro* de culture de cellules hématopoïétique, dans lesquels la présence de cellules stromales est nécessaire au maintien de la culture à long terme (Dexter et coll., 1977, Sutherland et coll., 1991). Les cellules stromales sécrètent des cytokines et facteurs de croissance nécessaires à la survie, la prolifération et la différenciation des cellules hématopoïétiques (Bennaceur-Griscelli et coll., 2001, Majumdar et coll., 2003). Mourcin et coll. ont démontré un effet anti-apoptotique et pro-prolifératif des CSM sur les cellules hématopoïétiques primitives (Mourcin et coll., 2005). En outre, il a été démontré que les CSM sécrètent un grand nombre de facteurs impliqués dans la différenciation et la prolifération des CSH, ainsi que dans le maintien de la niche hématopoïétique : G-CSF (Granulocyte-Colony Stimulating Factor), M-CSF (Macrophage-Colony Stimulating Factor), GM-CSF, LIF (Leukemia Inhibitory Factor), IL-1, IL-6, IL-11, IL-7, IL-8, IL-11, IL-12, IL-14, IL-15, Flt-3 ligand (FLT3 : Fms-Like Tyrosine kinase 3), thrombopoïétine, TGF-β, osteoprogénine, RANKL (Receptor Activator of NF-B Ligand, SDF-1 (Stromal-Derived Factor-1), TNF-α et VEGF (Haynesworth et coll., 1996, Majumdar et coll., 2000, Di Nicola et coll., 2002, Taichman, 2005). Ces résultats, bien qu'issus pour la plupart d'études *in vitro*, suggère la capacité des CSM à produire ces molécules sous des conditions physiologiques spécifiques.

Les CSM promeuvent également la prise de greffe des CSH et la régénération de la niche hématopoïétique. La co-transplantation de CSH et de CSM humaines résulte en une augmentation du chimérisme et/ou de la reprise hématopoïétique dans des modèles animaux et en clinique (Koc et coll., 2000, Bensidhoum et coll., 2004). Cette notion est supportée par la prise de greffes de CSM humaines dans le stroma de la moelle osseuse de souris NOD/SCID (Muguruma et coll., 2006). Dans cette même étude, la présence de CSM humaines dans la moelle osseuse améliorait la prise de greffes et la fonction des cellules hématopoïétiques primitives humaines. Les CSM transplantées dans ce modèle interagissent avec les CSH par l'expression de N-cadhérine et SDF-1. Ces données ont également été confirmées cliniquement. Chez des patientes traitées par administration de CSH autologues, la co-transplantation de CSM améliore significativement la vitesse de reprise de l'hématopoïèse (Koc et coll., 2000).

b. Régénération

Les CSM produisent des signaux favorisant la régénération tissulaire. Des études chez l'animal et l'Homme ont montré une augmentation de la quantité de CSM circulantes suite à une lésion. Chez des rats soumis à une hypoxie chronique, le nombre de CSM circulantes augmente de 15 fois (Rochefort et coll., 2006). Chez des patients souffrant de brûlures aigües, le nombre de CSM circulantes est augmenté de plus de 40 fois par rapport à des donneurs sains. Le pourcentage de CSM circulantes a été corrélé à la sévérité de la brûlure dans cette étude (Mansilla et coll., 2006). La capacité des CSM à migrer au site de la lésion est également indicatrice de leur fonction régénérative. Sur un modèle d'irradiation localisée chez la souris, les CSM transplantées sont retrouvées en quantités plus élevées au niveau des organes atteints, que ce soit lors d'une irradiation abdominale (intestin, foie et rate) ou de la patte (peau et quadriceps) (Francois et coll., 2006). Cette propriété a été confirmée par de nombreuses études et est l'une des raisons de l'utilisation accrue des CSM en thérapeutique.

La fonction de régénération des CSM endogènes est également suggérée par leur capacité à sécréter un large panel de facteurs solubles produisant des effets :

- anti-apoptotique : permet de limiter les dommages aux cellules indirectement lésées, limite également la production de signaux pro-inflammatoires et permet de réduire l'ischémie due à la mort des cellules endothéliales : VEGF, HGF, IGF-1, Stanniocalcine-1, TGF-β, FGF-2, GM-CSF (Rehman et coll., 2004, Togel et coll., 2007, Block et coll., 2009).
- immunomodulatoire : l'inflammation est nécessaire à la réparation tissulaire. Les cellules du système immunitaire détruisent les pathogènes, éliminent les cellules mortes et débris

cellulaires et produisent de nombreuses cytokines, notamment chimioattractantes, permettant le recrutement des cellules. En revanche, une inflammation chronique produit des effets délétères, notamment par le remodelage constant du tissu, menant éventuellement à la fibrose. Les CSM produisent des cytokines pro et anti-inflammatoires stimulant ou inhibant le processus inflammatoire en fonction de l'état de la lésion : PGE-2 (ProstaGlandine E-2), TGF-β, HGF, mpCCL2 (mp : MMP-processed), IDO (Indoleamine-pyrrole 2,3-DiOxygenase), iNOS, HLA-G5, LIF, IL-6, IL-7, IL-8, IL-11, IL-12, IL-14, IL-15 (Di Nicola et coll., 2002, Meisel et coll., 2004, Kim et coll., 2005, Sotiropoulou et coll., 2006, Nasef et coll., 2007, Nasef et coll., 2007, Sato et coll., 2007, Di Ianni et coll., 2008, Nasef et coll., 2008, Rafei et coll., 2008, Rizzo et coll., 2008).

- anti-fibrosant : la fibrose résulte d'un état inflammatoire prolongé et correspond à une accumulation de matrice extracellulaire. Les CSM sécrètent des cytokines et facteurs de croissance agissant sur la production de matrice extracellulaire : FGF-2, HGF, TSG-6 (Suga et coll., 2009, Choi et coll., 2011).
- de stimulation de la prolifération et différenciation des progéniteurs et cellules souches : SCF (Stem Cell Factor), LIF, IL-6, M-CSF, SDF-1, angiopoïétine-1 (Haynesworth et coll., 1996, Majumdar et coll., 1998, Ohab et coll., 2006, Sugiyama et coll., 2006).
- pro-angiogénique : la formation de nouveaux vaisseaux est nécessaire à l'apport des nutriments et des progéniteurs nécessaires au remplacement des cellules mortes : FGF-2, VEGF, PIGF (PhosphatidylInositol-Glycan biosynthesis class F protein), MCP-1 (Monocyte Chemoattractant Protein-1 = CCL2), IL-6 (Kinnaird et coll., 2004, Hung et coll., 2007, Sorrell et coll., 2009).
- trophiques : permettant le recrutement des cellules immunitaires et des cellules saines destinées au remplacement du tissu lésé : MCP-1, MIP-1α (Macrophage Inflammatory Protein-1α = CCL3), MIP-1β (CCL4), RANTES (Regulated on Activation, Normal T cell Expressed and Secreted = CCL5), MCP-3 (CCL7), MIP-3 α (CCL20), éotaxine-3, factalkine, CXCL5, CXCL11, CXCL1, IL-8, CXCL10, SDF-1 (Ji et coll., 2004, Sordi et coll., 2005, Honczarenko et coll., 2006, Croitoru-Lamoury et coll., 2007, Ponte et coll., 2007).

La production de ces facteurs par les CSM, permet de favoriser la résolution rapide et non-pathologique des lésions tissulaires. Ces résultats proviennent pour la plupart d'expérimentations *in vitro* et de modèles de transplantation de CSM exogènes, chez l'animal. Concernant les CSM endogènes, elles produiraient des signaux analogues dans des conditions de stimulation spécifique, par exemple par des cytokines telles que l'IFN-γ (Krampera et coll., 2006).

c. Immunomodulation

L'impact des CSM sur le système immunitaire a été mis en évidence peu après leur découverte et a suscité un grand intérêt, en premier lieu pour limiter le rejet de greffes et l'apparition de pathologies auto-immunes telles que la maladie du greffon contre l'hôte. L'effet pléiotropique des CSM sur les cellules immunitaires permet une action orchestrée induisant un effet significatif.

L'effet inhibiteur des CSM sur les lymphocytes T semble passer à la fois par des interactions intercellulaires et par un effet paracrine. Les CSM inhibent l'activation, la prolifération et les fonctions effectrices des lymphocytes T, les rendant tolérogènes.

Les monocytes CD14+ sécrètent des facteurs solubles, notamment l'IL-1β, qui activent les CSM qui produisent en réponse des molécules inhibant la prolifération et l'activation des lymphocytes T alloréactifs. Dans un modèle de co-culture de CSM et de lymphocytes T, Groh et coll. ont montré que les CSM activées par les cellules mononuclées du sang produisaient les mêmes effets d'inhibition que le milieu de culture conditionné de ces mêmes cellules activées (Groh et coll., 2005). L'action inhibitrice des CSM disparait dans ce modèle lorsque les CSM ne sont pas activées préalablement. D'autres études ont suggéré que l'expression de HGF, TGF-β et PGE-2 par les CSM induisent un effet similaire (Di Nicola et coll., 2002, Aggarwal et Pittenger, 2005). LIF et HLA-g semblent également participer à l'effet immunosuppresseur des CSM (Nasef et coll., 2007, Nasef et coll., 2008). Une autre hypothèse repose sur la déplétion du tryptophane, dégradé via l'action de IDO, sécrété par les CSM (Meisel et coll., 2004). Cette théorie est néanmoins contrebalancée par le fait que la déplétion en tryptophane devrait résulter en l'apoptose des lymphocytes T, ce qui n'est pas le cas dans ce modèle (Tse et coll., 2003).

Les CSM exercent le même effet inhibiteur sur les cellules T activées par des mitogènes ou des alloantigènes. La prolifération des lymphocytes du sang périphérique activés par le « Phorbol Myristate Acetate » (PMA) est inhibée par l'ajout de CSM (Rasmusson et coll., 2005). Lorsque les lymphocytes sont activés par la phytohémagglutinine (PHA), les CSM induisent une diminution de la production d'IL-2 et de son récepteur. Dans cette même étude, l'ajout d'IL-2 recombinant aux lymphocytes améliore leur prolifération et cet effet est supprimé par les CSM. Le blocage de PGE-2 dans les co-cultures de lymphocytes activés par PHA et de CSM inhibe partiellement l'effet antiprolifératif. La suppression par les CSM de l'activation des cellules T par les mitogènes a été démontrée dans d'autres modèles (Di Nicola et coll., 2002, Le Blanc et coll., 2003) et constitue un autre mécanisme d'action anti-inflammatoire des CSM.

Les CSM diminuent l'expression de TNF-α par les cellules dendritiques de type 1 matures, augmentent la sécrétion de IL-10 par les cellules dendritiques de type 2 matures, diminuent la

sécrétion d'IFN-γ par les cellules Th1 et augmentent la sécrétion de IL-4 par les cellules Th2. Dans la même étude, il a été montré que les CSM augmentent la proportion de cellules T régulatrices (Treg) et diminuent la sécrétion d'IFN-γ par les cellules NK (Aggarwal et Pittenger, 2005). Cet effet est associé à la production de PGE-2 par les CSM, les inhibiteurs de son expression limitant l'action des CSM. Ces résultats suggèrent que les CSM présentent en environnement inflammatoire pourraient induire un changement d'un milieu pro-inflammatoire vers un milieu anti-inflammatoire ou tolérant.

Les CSM bloquent la maturation et l'activation des cellules présentatrices de l'antigène (CPA), nécessaires à l'activation et à la prolifération des lymphocytes T. Beyth et coll. proposent que, par contact cellule-cellule, les CSM convertissent les CPA en cellules inhibitrices des lymphocytes T, en les bloquant dans un état semi-mature ou de « maturation aberrante ». Cet état des CPA est associé à une diminution de l'expression de cytokines pro-inflammatoires (IL-12, TNF-α, Complexe Majeur d'Histocompatibilité de classe II…) et une augmentation de l'expression de la cytokine anti-inflammatoire IL-10 (Beyth et coll., 2005). Les CPA ainsi obtenues sont appelées « régulatrices », anti-inflammatoires. Chez la souris, les cellules dendritiques régulatrices protègent de la GVHD aigüe et limitent la résurgence de la leucémie (Sato et coll., 2003). Ces résultats sont appuyés par les travaux de Zhang et coll., suggérant un effet direct des CSM sur la différenciation, la maturation et la fonction des cellules dendritiques (Zhang et coll., 2004). Dans ce modèle, les CSM, mais pas le milieu conditionné inhibent la différenciation des monocytes en cellules dendritiques. En revanche, les CSM et leur milieu conditionné inhibent la maturation, l'endocytose, la production d'IL-2 et la stimulation de la prolifération des lymphocytes T par les cellules dendritiques. Ces résultats impliquent la nécessité de contacts intercellulaires pour exercer l'effet complet des CSM sur les lymphocytes T (Zhang et coll., 2004, Nasef et coll., 2007).

Les CSM agissent également sur les lymphocytes T au niveau du cycle cellulaire, en particulier sur la phase G1 et la transition G0/G1 induisant l'anergie des lymphocytes T. Glennie et coll. ont observé qu'en présence de CSM, les lymphocytes T sous-expriment la cycline D2 et sur-expriment $p27^{kip1}$, indiquant l'arrêt du cycle cellulaire en phase G1/G1 (Glennie et coll., 2005).

A l'inverse, Krampera et coll. suggèrent la nécessité de contacts entre les CSM et les lymphocytes T pour permettre l'effet inhibiteur des CSM. Dans cette étude, l'ajout de milieu de culture conditionné par les CSM sur une culture de lymphocytes T n'a pas produit l'effet inhibiteur observé lorsque les deux types cellulaires sont au contact (Krampera et coll., 2003).

Les CSM sont aussi capables de moduler la différenciation des lymphocytes T CD4+. Dans les modèles d'arthrite, le TNF-α inhibe les fonctions des Treg $CD4^+$ $CD25^+$ (Valencia et coll., 2006). Étant

donné que les CSM induisent une diminution de l'expression de TNF-α, elles pourraient par ce mécanisme augmenter le nombre de Treg et leur fonction (Gonzalez et coll., 2009). En co-culture avec des CSM, les lymphocytes adoptent une polarisation Th2 en majorité. Batten et coll. ont en effet observé dans ce modèle une diminution des cytokines associées aux cellules Th1 (IL-1, IFN-γ et TNF-α) et une augmentation des cytokines de la réponse Th2 (IL-3, IL-5, IL-10 et IL-13) (Batten et coll., 2006). Dans un modèle de sclérose multiple, l'augmentation de la proportion en Th2 est corrélée à une diminution des cellules Th1 et Th17. L'augmentation du pourcentage de lymphocytes Th2 est liée à une diminution des dommages tissulaires dans ce cas (Bai et coll., 2009). Cette modification de la balance Th1/Th2 est également impliquée dans l'amélioration de l'hypersensibilité de contact par les CSM, via la sécrétion de PGE-2 (Li et coll., 2016). Dans un modèle d'encéphalomyélite auto-immune, les CSM inhibent la réponse Th17. Cet effet paracrine est associé, de façon non-exclusive, à la sécrétion de CCL2 par les CSM, puisque le milieu conditionné des CSM $CCL2^{-/-}$ reproduit en partie l'inhibition des cellules T (Rafei et coll., 2009). Larocca et coll. ont montré une action similaire dans un modèle d'allogreffe de peau (Larocca et coll., 2013). *In vitro*, les CSM inhibent la polarisation Th1 et Th17 des cellules T, comme indiqué par la diminution de l'expression de l'IFN-γ et l'IL-17 (Larocca et coll., 2013). Au cours de cette étude, l'augmentation de l'expression d'IL-10, induite par les CSM, indique une augmentation de la proportion de Treg.

Les lymphocytes B sont responsables de la production des immunoglobulines. Les CSM ont différents effets sur les cellules B, pouvant augmenter ou diminuer la production d'anticorps en fonction du contexte. Krampera et coll. ont montré que l'inhibition de la prolifération des lymphocytes B par les CSM dépend de la stimulation des CSM par IFN-γ, produit par les lymphocytes T et cellules NK mais pas par les cellules B (Krampera et coll., 2006).

Corcione et coll. ont montré à l'inverse un effet indépendant de IFN-γ, mais dépendant de la quantité de CSM (Corcione et coll., 2006). Dans ce modèle, les CSM inhibent la prolifération des cellules B, leur différenciation en cellules productrices d'anticorps et leur chimiotactisme. Cet effet diminue proportionnellement au ratio CSM/cellules B. L'arrêt de la prolifération des lymphocytes B est associé, comme pour les cellules T, à un arrêt en phase G0/G1 du cycle cellulaire. L'inhibition de la prolifération n'est pas observée lorsque les CSM sont remplacées par un milieu de culture conditionné, suggérant la nécessité des communications entre CSM et cellules B. Enfin, l'expression par les lymphocytes B des chimiokines CXCR4, CXCR5 et CCR7 est réduite en présence de CSM et le chimiotactisme des cellules B en réponse à CXCL12 et CXCL13 est diminué (Corcione et coll., 2006). Ces résultats impliquent une diminution du recrutement des lymphocytes B sous l'influence des CSM.

L'activation des cellules B est majoritairement due à l'interaction avec les cellules T $CD4^+$. Dans une culture mixte de lymphocytes, l'absence de cellules T supprime la production d'anticorps (Kunori et Ringden, 1980). L'inhibition des lymphocytes T par les CSM a par conséquent un effet indirect sur l'activation des cellules B. Les CSM induisent la sécrétion d'IgG par les lymphocytes B dans des modèles de co-culture de cellules mononucléées du sang et de la rate (Rasmusson et coll., 2007). Cet effet dépend de facteurs solubles, comme démontré par co-culture en transwells. En revanche, la stimulation des cellules B par les CSM dépend de contacts intercellulaires. Ceci tend à montrer que la présence d'autres cellules mononucléées du sang (cellules T, NK…) est nécessaire pour l'activation sans contact des lymphocytes B. L'action des CSM est associée à une augmentation de la production d'IL-6, requis pour la différenciation et la production d'immunoglobulines par les cellules B (Muraguchi et coll., 1988). Cette voie est dépendante d'IL-2 (Splawski et coll., 1990), dont la production est également inhibée par les CSM.

i. Macrophages

L'effet immunomodulateur des CSM sur la polarisation et la fonction des macrophages a été mis en évidence au cours de diverses études. En 2009, Kim et Hematti furent les premiers à décrire le changement de polarisation des macrophages, en faveur des M2, en co-culture avec les CSM (Kim et Hematti, 2009). Une étude de Nemeth et coll. sur un modèle de septicémie chez la souris a montré une amélioration de la survie après transplantation de CSM. Cet effet était supprimé après la déplétion des macrophages ou prétraitement des souris par un anticorps anti-IL-10 ou dirigé contre le récepteur de l'IL-10. Les auteurs suggèrent que PGE2, sécrété par les CSM, active les macrophages, qui produisent en réponse de l'IL-10, cytokine anti-inflammatoire, participant à la résolution de la pathologie (Nemeth et coll., 2009). Dans un modèle de co-culture de CSM activées par l'IFN-γ et de cellules mononucléées du sang périphérique, les CSM induisent la différenciation des monocytes en macrophages M2 via l'action de l'IDO (Francois et coll., 2012). L'IL-10 produit en réponse par les macrophages M2 participe à la suppression de la prolifération des lymphocytes T. Enfin, les travaux de Melief et coll. sur la co-culture de CSM et de cellules mononucléées du sang ont montré l'importance de l'effet des CSM sur la polarisation des macrophages pour l'augmentation de la proportion de lymphocytes T régulateurs (Melief et coll., 2013). Dans ce modèle, lorsque la culture était déplétée en monocytes, la formation de Treg était abrogée. Cette étude a également montré un effet d'augmentation de la survie des monocytes par les CSM. Enfin, la formation de Treg semble dépendante de l'expression de CCL18 par les macrophages M2 (Melief et coll., 2013).

ii. Cellules NK

Les cellules NK sont une composante importante de l'immunité innée. Elles possèdent une activité cytolytique vis-à-vis des cellules n'exprimant pas le CMH de classe I et sont donc capables de lyser les cellules tumorales, infectées ou présentant d'autres anomalies de manière indépendante de l'antigène. Enfin, leur activité de sécrétion de cytokines contribue à la mise en place de la réponse des lymphocytes B et T.

Les CSM produisent différents effets inhibiteurs sur les cellules NK, notamment vis-à-vis de leur prolifération, activité cytotoxique et de la production de cytokines. La co-culture de CSM et de cellules NK induit l'inhibition de la prolifération des NK induite par IL-2 et IL-15. Cet effet est moindre sur des cellules NK activées que sur des cellules quiescentes (Spaggiari et coll., 2006). Des études complémentaires ont permis de montrer que l'interaction CSM-cellules NK induit une diminution de l'expression des récepteurs d'activation des cellules NK (NKp30, NKp44 et NKG2D), suggérant une diminution de l'activité des NK. Cette hypothèse est confirmée par une réduction de l'activité cytolytique des NK envers plusieurs lignées cellulaires de leucémie, de neuroblastome et de cellules dendritiques immatures. Une inhibition de la production d'IFN-γ par les cellules NK est induite par les CSM. L'utilisation d'inhibiteurs de PGE2 et d'IDO a également mis en évidence l'importance de ces facteurs solubles sécrétés par les CSM. L'inhibition d'IDO, mais pas celle de PGE2, diminue la prolifération des cellules NK. En revanche, l'inhibition des deux facteurs restaure pratiquement intégralement la prolifération de NK (Spaggiari et coll., 2008). A l'inverse, Cui et coll. ont montré une augmentation de la sécrétion d'IFN-γ par les NK sous l'influence des CSM. Cet effet est induit par CCL2 produit par les CSM. Ce mécanisme permet la mise en place d'une boucle d'activation, IFN-γ activant également la production de CCL2 par les CSM. Ces résultats suggèrent la possibilité d'une stimulation de l'activité des NK par les CSM sous certaines conditions (Cui et coll., 2016).

iii. Cellules dendritiques

Les cellules dendritiques ont un rôle primordial dans la mise en place de l'immunité adaptative en tant que premières cellules présentatrices de l'antigène à initier la réponse des cellules T.

Les CSM inhibent la différenciation des monocytes en cellules dendritiques matures. En présence de CSM, les monocytes stimulés par GM-CSF et IL-4 n'acquièrent pas les marqueurs des cellules dendritiques immatures ($CD14^-$, $CD1a^+$) ou matures ($CD80^+$, $CD86^+$, $CD83^+$). L'effet des CSM est par contre supprimé lors de la maturation des cellules dendritiques induite par LPS. L'absence de production d'IL-12 par les cellules dendritiques immatures en présence de CSM est un autre marqueur

de leur effet inhibiteur. De plus les cellules dendritiques inhibées par les CSM ont une capacité de stimulation de la prolifération des cellules T diminuée. La corrélation entre l'inhibition de la différenciation des monocytes et la concentration en PGE2 dans le milieu suggère une importance majeure de ce facteur soluble (Spaggiari et coll., 2009). Jiang et coll. ont produit des données confirmant ces résultats, et suggérant la réversibilité de l'effet des CSM sur les cellules dendritiques (Jiang et coll., 2005).

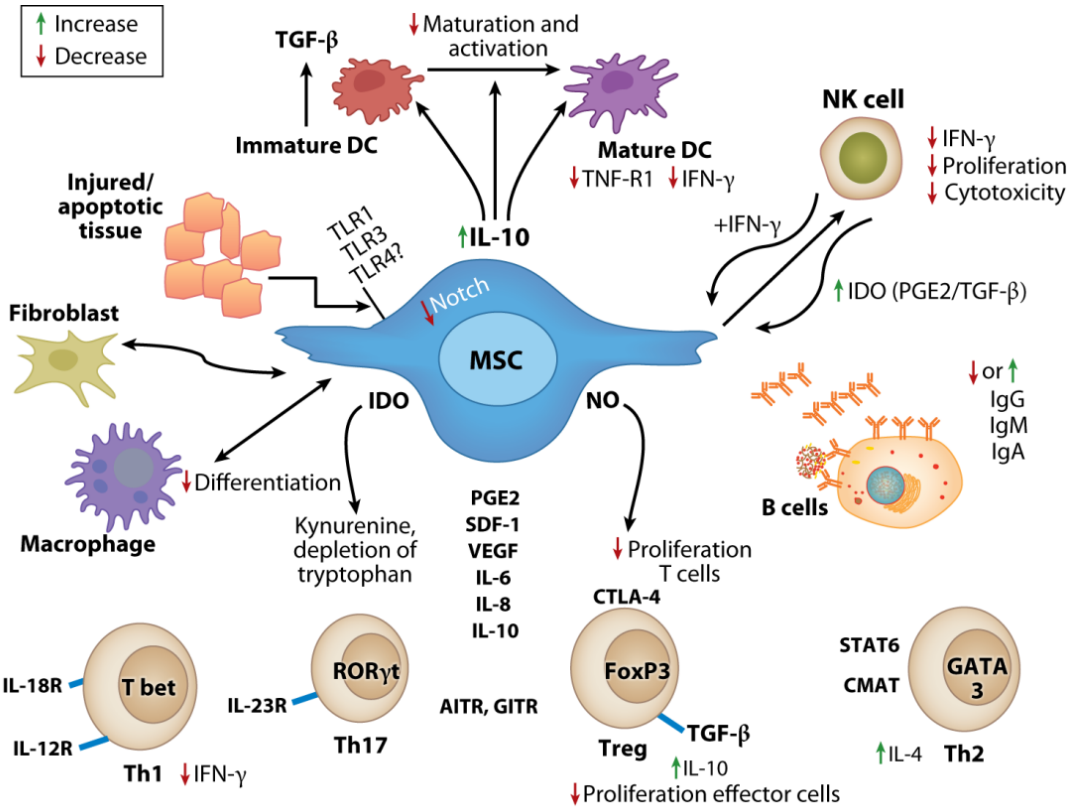


Figure 22 : mécanismes impliqués dans l'immunomodulation par les cellules souches mésenchymateuses (D'après Singer et Caplan, 2011) (Singer et Caplan, 2011)

L'effet immunomodulateur des CSM implique des mécanismes complexes de communication entre les différents acteurs de la réponse immunitaire (Figure 22). Les CSM, en agissant sur l'ensemble des cellules impliquées dans cette réponse, sont capables d'affecter de manière significative les processus d'inflammation et de limiter ainsi la chronicité de ces phénomènes. Elles peuvent inhiber la fonction des cellules B et T, des macrophages, des cellules NK et des cellules dendritiques. Ces effets semblent reposer sur la production de facteurs solubles par les CSM, tels qu'IDO et PGE2. En outre, elles orientent la réponse des cellules T et des macrophages en modifiant leur état de polarisation,

favorisant un état régulateur. Ces caractéristiques sont la principale cause de l'utilisation massive des CSM dans le contexte de maladies auto-immunes et inflammatoires, que ce soit lors d'études précliniques ou d'essais cliniques.

d. Homing des CSM

Une autre caractéristique majeure des CSM exogènes est leur capacité à migrer spécifiquement vers les tissus lésés. En 2003, Chapel et coll. ont démontré cette propriété des CSM sur un modèle murin. Après irradiation corps entier, les animaux ont reçu une co-transplantation de CSM et de CSH. Les CSM ont été retrouvées au sein des tissus lésés (muscle, peau, moelle osseuse et intestin) jusqu'à 83 jours après transplantation. Dans une autre étude, l'irradiation corps entier induisait le homing des CSM transplantées vers le cerveau, le cœur, la moelle osseuse et les muscles. Une irradiation supplémentaire au niveau abdominal augmentait la migration des cellules vers l'intestin, le foie et la rate. De même, l'irradiation de la patte arrière favorisait le homing des cellules dans la peau, le quadriceps et les muscles (Francois et coll., 2006). Dans un modèle de lésion ischémique du cerveau, les CSM migrent également vers la zone lésée (Wang et coll., 2008). Ce phénomène est attribué à l'activation de CXCR4, exprimé à la surface des CSM, par SDF-1α.

L'expression de différents facteurs est à l'origine de cette propriété :

- récepteurs aux chimiokines : CCR1, CCR2, CCR7, CCR9, CXCR1, CXCR2, CXCR4, CXCR5 et CXCR6 (Honczarenko et coll., 2006, Ringe et coll., 2007)
- molécules d'adhésion : intégrines (α1, α2, α3, α5, α6, αvβ3, αvβ5, β1, β3, β4) et molécules d'adhésion intercellulaires (ICAM-1, ICAM-2, VCAM-1) (Conget et Minguell, 1999, Majumdar et coll., 2003). Ces molécules permettent aux CSM de reconnaitre les signaux de recrutement, également propres aux cellules du système immunitaire, et de migrer selon leur provenance. Leur rôle a été largement décrit dans la migration des leucocytes et des CSH :
- migration suite à un stimulus inflammatoire
- migration et adhésion à la matrice extracellulaire et aux cellules endothéliales
- extravasation des cellules de la lumière des vaisseaux vers le tissu

Grâce à l'expression de ces molécules, les CSM peuvent migrer vers les tissus lésés par la circulation sanguine et passer la barrière des vaisseaux afin de se localiser dans le tissu. Cette propriété permet aux CSM de produire un effet spécifique à l'organe et limite donc les risques d'effets non désirés.

e. Sécrétion par les CSM

Les CSM sécrètent de nombreuses protéines dans le milieu extracellulaire afin d'exercer leur fonction. Récemment, de nouveaux modes de sécrétion par les CSM ont été mis en évidence, permettant notamment de transférer du matériel génétique tel que des miRNA (Figure 23).

i. Transfert d'ARN et d'autres molécules par Vésicule Extracellulaire (EV)

Le terme général « vésicule extracellulaire » (EV) se réfère à des vésicules membranaires sécrétées par la plupart des types de cellules somatiques (revu dans (Thery et coll., 2002, Lee et coll., 2012, Raposo et Stoorvogel, 2013)). L'ensemble « EV » inclus les exosomes, les vésicules de membrane plasmique de 30 à 100 nm, les microvésicules, les vésicules de 50 à 1000 nm et les corps apoptotiques, des vésicules de 1-5 µm libérées durant bourgeonnement membranaires des cellules apoptotiques (Lai et coll., 2016).

Les exosomes sont libérés lors du trafic multi vésiculaires et fusionnent avec la membrane cytoplasmique. Les exosomes purifiés à partir des CSM ont suscité un intérêt important dans le domaine de la médecine régénérative en raison sur leur capacité à réduire l'apoptose/nécrose chez les rongeurs après une lésion ischémique du cœur (Lai et coll., 2010, Arslan et coll., 2013), cerveau (Xin et coll., 2013, Xin et coll., 2014), poumon (Lee et coll., 2012), foie (Kanazawa et coll., 2011), ou des reins (Gatti et coll., 2011). La production d'exosomes par les CSM réduit l'inflammation et augmente la prolifération des cellules au cours de la réparation des tissus (Bruno et coll., 2009, Lee et coll., 2012, Zhang et coll., 2014). Tomasoni et coll. (Tomasoni et coll., 2013) ont montré que les CSM, via les exosomes, transfèrent les ARNm codant pour IGF1R et IGF1 aux cellules rénales tubulaires proximales endommagées par le cisplatine. Il en résulte une augmentation de l'expression du récepteur de l'IGF1, ce qui accroit son activité. Le transfert exosomal améliore la survie des cellules rénales et augmente leur prolifération au cours de la réparation après une blessure. Dans de multiples modèles pharmacologiques d'atteinte hépatique, le traitement avec des exosomes de CSM au moment de la blessure augmente le nombre de cellules en prolifération tout en réduisant le nombre des hépatocytes apoptotiques (Tan et coll., 2014). Dans un modèle murin de lésion hépatique, le traitement par les exosomes de CSM dérivés du cordon ombilical humain a permis une réduction de la fibrose du foie (Li et coll., 2013). Après un accident vasculaire cérébral chez le rat, le traitement par des exosomes dérivés des CSM favorisent l'angiogenèse, la neurogenèse et la croissance des neurites par le transfert de miR-133 b (Xin et coll., 2012, Xin et coll., 2013). En plus de délivrer des ARN, les exosomes et microvésicules peuvent fournir un effet paracrine par transfert de peptides/protéines comme des facteurs de

croissance, des cytokines et des hormones. Par exemple, le transfert de Wnt4 par les exosomes issus de CSM humaines provenant du cordon ombilical améliore la réparation des plaies cutanées chez des rats (Zhang et coll., 2015).

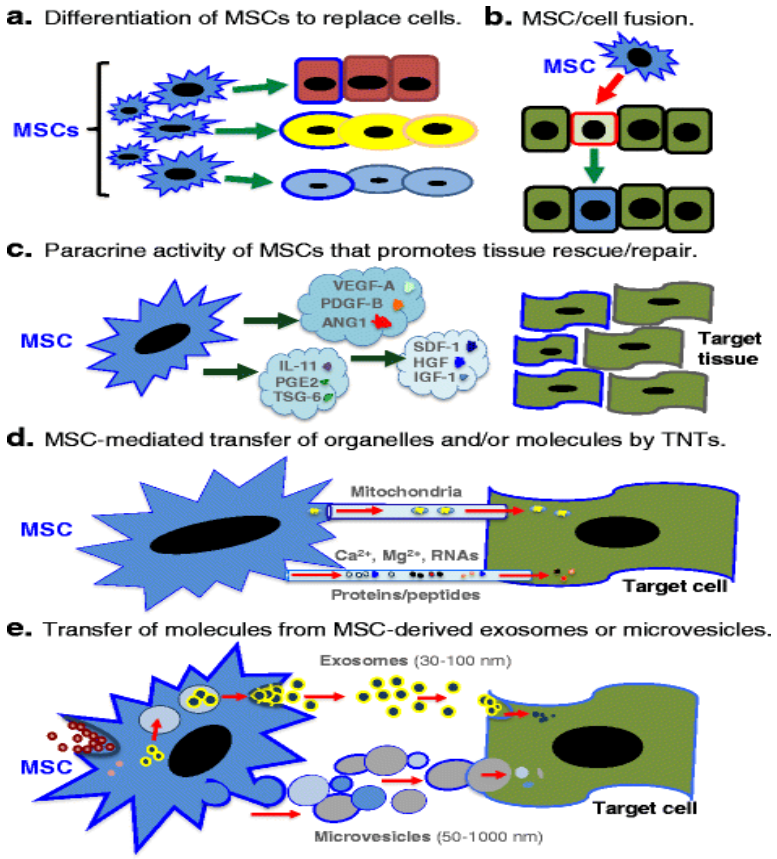


Figure 23 : mécanismes de réparation tissulaire et cellulaire par les CSM (D'après Spees et coll., 2016) (Spees et coll., 2016)

A l'heure actuelle, beaucoup de chercheurs et de cliniciens sont intéressés par le potentiel de produits thérapeutiques dérivés des EV issus de CSM pour la réparation des tissus lésés et le traitement du cancer (Baglio et coll., 2012, Akyurekli et coll., 2015). La plupart des études avec des exosomes sur des tissus et des organes lésés rapportent des résultats positifs. Cependant, les effets pro ou anti-tumoraux des exosomes, microvésicules, et/ou de leurs constituants demeurent controversés. Par exemple, les CSM de la moelle osseuse réduisent la croissance des cellules cancéreuses en transférant miR-127, -197 -222 et-223 à travers des jonctions et des exosomes. Ces miRNA sont connus pour cibler CXCL12 (SDF-1) (Lim et coll., 2011). Lee et coll. (Lee et coll., 2013) ont suggéré que les exosomes de CSM peuvent supprimer l'angiogenèse car ils contiennent miR-16, un miRNA qui cible le VEGF et qui a été montré comme réduisant l'expression de VEGF dans une lignée cellulaire de cancer du sein. En

revanche, Zhu et coll. (Zhu et coll., 2012) ont signalé que les exosomes de CSM humaines favorisaient la croissance tumorale *in vivo* en induisant l'expression du VEGF dans les cellules tumorales. Boelens et coll. (Boelens et coll., 2014) ont rapporté un échange entre les cellules stromales et les cellules de cancer du sein par des exosomes des cellules stromales augmentant ainsi le nombre de cellules de tumorales résistantes aux traitements.

ii. Transfert de mitochondries par nanotubes (TNT) et microvésicules

Rustom et coll. (Rustom et coll., 2004) ont découvert un nouveau système de communication intercellulaire sous forme de filaments fins de 50 à 200 nm de diamètre qui s'étendait entre les cellules. Ces tubes intercellulaire ont été appelés « Tunneling NanoTubes » (TNT). Ils permettent l'échange d'organites comme les mitochondries, de calcium et d'autres molécules.

Découverte du transfert de mitochondries par les CSM *in vitro*

La première preuve du transfert de mitochondries depuis les CSM vers des cellules lésées a été démontrée grâce à une lignée de cellules épithéliales du poumon qui ne disposaient pas de mitochondries fonctionnelles (A549rhocellules) (Spees et coll., 2006). Le groupe de Prockop a montré que les CSM humaines pouvaient rétablir la respiration aérobie des cellules A549rho par le transfert de mitochondries ou d'ADN mitochondrial (ADNmt) (Spees et coll., 2006). Les CSM sont maintenant connues pour transférer des mitochondries à plusieurs types de cellules différentes, y compris les cellules épithéliales, les cellules endothéliales et les myocytes cardiaques (Plotnikov et coll., 2008). Ces transferts sont particulièrement évidents lorsque les cellules cibles sont endommagées ou en état de stress. Par exemple, les CSM empêchent l'apoptose dans les cellules endothéliales en transférant des mitochondries pendant le stress hypoxique/ischémique (Liu et coll., 2014).

Formation de TNT et transfert mitochondrial *in vivo*

La première preuve que les TNT pouvaient jouer un rôle *in vivo* provenait d'études sur l'œil. À l'aide de souris de type sauvage, ou des souris transgéniques chimériquse eGFP (enhanced Green Fluorescent Protein) et Cx3cr1(GFP) et de microscopie confocale, Colignon et coll. (Chinnery et coll., 2008) ont montré la formation de nanotubes des cellules la moelle osseuse MHC classe II(+) avec le

tissu cornéen. Notamment, ils ont observé une augmentation de la fréquence des TNT au cours de l'inflammation et de lésion de la cornée.

Protéines impliqués dans le contrôle du transfert des mitochondries par les CSM après lésion tissulaire

Plusieurs études récentes ont fourni des preuves convaincantes que les CSM peuvent transférer des mitochondries *in vivo* et que le transfert des mitochondries depuis les CSM peut sauver des cellules pulmonaires endommagées et atténuer les lésions pulmonaires. Islam et coll. (Islam et coll., 2012) ont démontré que l'instillation de CSM humaines par les voies aériennes pourrait réduire les dommages pulmonaires induits par le LPS, en partie, par le transfert de mitochondries. À l'aide d'imagerie optique direct, ils ont documenté le transfert de vésicules contenant des mitochondries issues de CSM vers les cellules épithéliales alvéolaires Le résultat est une augmentation des niveaux d'ATP alvéolaires et de la survie des cellules. L'utilisation de CSM génétiquement modifiées pour la connexine 43, les rendant incapable de former des jonctions, ne permettait plus alors de réduire les lésions pulmonaires aigües (Islam et coll., 2012).

Des données récentes d'un modèle de lésion pulmonaire induit par la fumée de cigarette suggèrent que l'âge et la source de CSM peuvent affecter la réparation par le transfert de mitochondries. Li et coll. (Li et coll., 2014) ont constaté que la transplantation de CSM dérivées d'IPs peut accroitre la réparation par rapport à des CSM adultes grâce à un nombre plus grand de TNT et un transfert accru de mitochondries.

En utilisant des approches de perte et de gain de fonction, Ahmad et coll. (Ahmad et coll., 2014) ont démontré que Miro-1 (Mitochondrial Rho GTPase 1), une Rho like GTPase associée à la membrane mitochondriale externe, régule la quantité de mitochondries transférées des CSM aux cellules épithéliales pulmonaires. Une expression accrue de Miro-1 a été montrée comme augmentant le transfert des mitochondries depuis les CSM et le traitement des souris par des CSM sur exprimant Miro-1 réduit les lésions pulmonaires induites par la roténone et l'hyperréactivité bronchique et le remodelage négatif dans plusieurs modèles d'asthme (Ahmad et coll., 2014).

4. Effets secondaires de la thérapie cellulaire par les CSM

a. Immunogénicité

L'un des intérêts majeurs de l'utilisation des CSM en clinique, en particulier chez des patients immunodéprimés ou souffrant de pathologies auto-immunes, est leur faible immunogénicité. Leur capacité à passer outre les systèmes de détection de l'organisme ainsi que leur effet immunosuppresseur (Cf. Immunomodulation), sont à l'origine de cette caractéristique.

Les CSM présentent à leur surface une faible expression du CMH (Complexe Majeur d'Histocompatibilité) de classe I et n'expriment pas le CMH de classe II, ni les molécules co-stimulatrices CD80, CD86 et CD40 nécessaires à l'activation des cellules T. La stimulation des CSM par l'IFN-γ augmente l'expression des deux classes de CMH, sans pour autant augmenter l'immunogénicité des CSM vis-à-vis des cellules T (Le Blanc et coll., 2003, Klyushnenkova et coll., 2005). En l'absence de stimulation l'IFN-γ, la faible expression du CMH de classe I les rend vulnérable aux cellules NK (Spaggiari et coll., 2006). En revanche, les CSM traitées à l'IFN-γ sont moins exposées à la lyse par les NK (Spaggiari et coll., 2006).

Lors d'études cliniques impliquant la transplantation de CSM, peu d'effets secondaires ont été observés. Une méta-analyse a montré que seule une fièvre transitoire pouvait être occasionnellement observée après injection de CSM (Lalu et coll., 2012).

Globalement, la faible immunogénicité des CSM s'explique par leur capacité à inhiber le système immunitaire dans son ensemble et selon un processus de communications intercellulaires. Ces processus sont détaillés dans la partie précédente, portant sur l'aspect immunomodulateur des CSM.

b. Effet pro-fibrosant des CSM

L'un des principaux obstacles à l'utilisation des CSM pour le traitement de la fibrose en clinique est la possibilité qu'elles exercent un effet pro-fibrosant. Différentes causes expliquent cette hypothèse :

- les CSM peuvent produire de nombreux facteurs de croissance, dont le TGF-β1, l'un des acteurs principaux de la fibrose

- Dans certaines situations, les CSM acquièrent des propriétés proches des myofibroblastes, en termes de morphologie et de phénotype. L'expression de l'actine des muscles lisses est parfois observée sur des CSM en culture
- Les cellules responsables de l'accumulation de matrice extracellulaire peuvent être d'origine mésenchymateuse

Ngo et coll. ont comparé le phénotype des CSM de la moelle osseuse en culture et des myofibroblastes cardiaques et ont observé que, bien que les CSM conservent leur pluripotence, elles expriment plusieurs marqueurs des myofibroblastes (α-SMA, vimentine, fibronectine ED-A, collagène type I…) (Ngo et coll., 2014). *In vitro*, il est possible de différencier les CSM en myofibroblastes avec un stimulus adéquat (TGF-β1, co-culture avec une lignée de cellules tumorales…) (Emura et coll., 2000). Dans le cœur de souris âgées, les fibroblastes producteurs de collagène I sont issus de la différenciation de CSM et sont responsables de la fibrose interstitielle (Cieslik et coll., 2013). Plusieurs études ont montré la différenciation des CSM en myofibroblastes sous l'effet du microenvironnement tumoral (Cho et coll., 2011, Chowdhury et coll., 2015, Zhang et coll., 2016). Chez la souris, Humphreys et coll. suggèrent que les myofibroblastes responsables de la fibrose rénale sont d'origine péricytaire (Humphreys et coll., 2010). L'hypothèse posée par Caplan selon laquelle les CSM sont en réalité des péricytes impliquerait donc que les myofibroblastes de la fibrose rénale soient différenciés à partir de CSM (Caplan, 2008). Il existe également des preuves de la différenciation des CSM en myofibroblastes au niveau du foie (Friedman, 2008).

Il existe de nombreuses données indiquant que les cellules souches mésenchymateuses endogènes peuvent se différencier en myofibroblastes en contexte normal ou pathologique. Néanmoins, il est à noter qu'il n'existe à notre connaissance aucune occurrence de transplantation de CSM ayant un effet pro-fibrosant (Cf. CSM et fibrose). De plus, certaines études tendent à montrer que le phénotype myofibroblastique des CSM est réversible. Desai et coll. ont montré que le traitement de cellules souches du tissu adipeux par TGF-β1 induisait leur différenciation en myofibroblastes, reversée en partie par FGF-2 (Desai et coll., 2014). Enfin, il est probable que la différence de phénotype des CSM endogènes et exogènes provienne de la différence dans les stimuli qui les activent, dépendant de l'état de développement de la pathologie, de la niche dont elles proviennent et des facteurs les recrutant.

c. Effet des CSM sur la tumeur

L'une des principales contraintes à l'utilisation des CSM dans le contexte des complications de la radiothérapie est le risque de récidive tumorale ou de potentialisation des cellules tumorales. À

nouveau, la problématique nait de la difficulté à prédire l'effet des CSM transplantées et du large panel de facteurs de croissance produits par les CSM, certains pro-tumoraux.

Chez de nombreux patients atteints de cancer, certaines cellules tumorales sont tolérantes aux traitements conventionnels, notamment à la radiothérapie. Ces cellules persistent pendant des années dans un état indétectable et dormant, après quoi elles peuvent reprendre leur croissance et induire des lésions cancéreuses récurrentes et presque toujours fatales. En tenant compte de ces cellules cancéreuses résiduelles la sécurité demeure un problème majeur à résoudre pour les patients traité par thérapie cellulaire (Pantel et coll., 2009).

Savoir si les CSM répriment ou favorisent le développement tumoral est un élément de controverse au sein de la littérature. De nombreuses études indiquent que les CSM exercent des effets anti-tumoraux et suppriment la croissance tumorale, tandis que d'autres études font état d'effets pro-tumoraux (Prakash et coll., 2016).

Une caractéristique principale des CSM est leur capacité à migrer aux sites tumoraux (Studeny et coll., 2004). Cette propriété est due aux facteurs sécrétés par le microenvironnement tumoral qui seraient impliquées dans le chimiotactisme tumoral des CSM. Par exemple le FGF-2 serait impliqué dans le recrutement des CSM et leur trans-différenciation en Fibroblastes Associés aux Cancer (Yang et coll., 2016). Après homing dans la tumeur, les CSM jouent un rôle important dans le développement et la progression tumorale. Plus précisément, les CSM recrutés sélectivement aux tumeurs se multiplient et contribuent à la formation du stroma associé à la tumeur et régulent la croissance tumorale. Les CSM ont plusieurs fonctions de promotion de la croissance tumorale dans le microenvironnement tumoral, notamment en exprimant des facteurs de croissance, en favorisant la formation de vaisseaux et en créant des niches pour la dissémination des cellules souches tumorales (Roorda et coll., 2009, Jung et coll., 2013), par exemple dans les carcinomes mammaires (Karnoub et coll., 2007).

i. Inhibition tumorale par les CSM

Par opposition, plusieurs études ont montré que les CSM inhibent la croissance de la tumeur dans un modèle murin de gliome par inhibition de l'angiogenèse (Ho et coll., 2013) et dans un modèle de carcinome hépatocellulaire en induisant l'apoptose des cellules tumorales (Abd-Allah et coll., 2014). Les CSM reconnaissent des déterminants des cellules cancéreuses issues du sein. Les CSM seraient «cannibalisées» par ces cellules cancéreuses. Ce processus altère distinctement le phénotype cellulaire

des cellules cancéreuses, supprime la formation de tumeurs et induit la dormance tumorale (Bartosh et coll., 2016).

Un autre mécanisme d'inhibition est produit par la molécule TRAIL (Tumor-necrosis-factor Related Apoptosis Inducing Ligand). TRAIL est sécrétée par les CSM et limite le développement tumoral dans les modèles de sarcome orthotopique de Ewing (Guiho et coll., 2016). Cependant, il existe des controverses sur l'effet inhibiteur des CSM sur la croissance tumorale.

Zipori et coll. ont montré que les CSM inhibent les cellules tumorales de sarcomes *in vitro* (Zipori et coll., 1987), observations confirmées plus tard par la démonstration que les CSM antagonisent significativement la croissance du sarcome de Kaposi *in vivo* (Khakoo et coll., 2006). Des résultats semblables ont été observés dans un modèle expérimental de carcinome pancréatique (Kidd et coll., 2009) et chez la souris SCID porteuse de lymphomes non hodgkiniens disséminés. De vastes zones de nécrose dans la masse de la tumeur ont été observées après injection de CSM dans la tumeur, probablement induit par un effet anti-angiogénique, puisqu'*ex vivo* des expériences ont démontré que les CSM induisaient l'apoptose des cellules endothéliales dans ce modèle (Secchiero et coll., 2010). Les CSM inhibent la croissance du cancer du côlon de rat lorsqu'elles sont injectées conjointement en nombre égal avec les cellules tumorales ou en quantité dix fois supérieure (Ohlsson et coll., 2003). Les CSM fœtales humaines inhibent les lignées cellulaires du cancer du foie humaine, en diminuant leur prolifération et l'expression d'oncogènes *in vitro* et *in vivo* (Qiao et coll., 2008). Le traitement par du milieu conditionné entraîne une diminution des facteurs de survie, tels que la β-caténine, c-Myc et la survivine. Cet effet est induit par un inhibiteur de la β-caténine, le DKK-1 (DicKKopf-related protein-1), qui est sécrété par les CSM. Les effets de DKK-1 ont été supprimés par l'utilisation d'un anticorps neutralisant ou des siRNA (small interfering RNA), éliminant ainsi les effets inhibiteurs induits par les CSM (Qiao et coll., 2008). Différents mécanismes ont été proposés comme un effet indirect des CSM sur l'angiogenèse tumorale et l'activation des MMP ou un effet inhibiteur sur la reconnaissance des cellules tumorales par le système immunitaire. Cousin et coll. ont démontré que les CSM inhibent les tumeurs pancréatiques en altérant le cycle cellulaire *in vitro* avec une augmentation des taux d'arrêt de la phase G1 dans les cellules de cancer du pancréas et également *in vivo*, après injection de CSM suite à une xénogreffe de cancer du pancréas (Cousin et coll., 2009). Dans une approche similaire, les CSM injectées dans un modèle établi de mélanome sous-cutané induisent l'apoptose et bloquent la croissance tumorale (Otsu et coll., 2009). Les CSM jouent un double rôle dans la croissance tumorale *in vitro* et *in vivo*. Une étude montre que les CSM inhibent la prolifération des cellules tumorales du poumon et des cellules tumorales œsophagiennes *in vitro*, mais, qu'*in vivo*, les CSM favorisent la formation de tumeurs et leur croissance (Tian et coll., 2011). Ces controverses peuvent être attribuées

aux différences dans les types de tumeurs ou aux conditions expérimentales. Les modèles animaux utilisés sont basés sur des injections de cellules tumorales issues de lignées d'origine humaine ou animale chez des souris immunodéprimées. Ces cellules sont généralement injectées en même temps que les CSM, ce qui ne permet pas de distinguer l'effet propre des CSM sur la croissance tumorale d'un effet des CSM sur l'implantation des cellules tumorales (effet niche). De plus le recours à des animaux immunotolérants ne permet pas de tenir compte de la composante inflammatoire dans la cancérogénèse notamment au niveau du microenvironnement tumoral.

ii. Conséquences moléculaires et fonctionnelles au cours de l'interaction des CSM avec les cellules tumorales

Le développement et la progression tumorale n'est pas seulement déterminée par les cellules tumorales mais aussi par leur microenvironnement. Cela inclut un réseau orchestré d'interactions cellulaires (cellules immunitaires, cellules endothéliales, fibroblastes et CSM) via la MEC et des facteurs solubles tels que les cytokines, chimiokines, facteurs de croissance et divers métabolites. Les populations de cellules du microenvironnement tumoral peuvent interagir directement et indirectement avec les cellules cancéreuses en altérant mutuellement des propriétés et des fonctions de leurs partenaires. Ces communications intercellulaires jouent un rôle important au cours de la cancérogenèse. Les changements fonctionnels et les conséquences pour les différents types de cellules pourraient entraîner la création d'une niche de cellules souches de carcinome ou la génération de nouvelles populations de cellules de tumeur par fusion cellulaire CSM-tumeurs (Melzer et coll., 2016).

Plusieurs mécanismes directs et/ou indirects d'interaction sur ou par les CSM contribuent à la stimulation de la croissance des cellules cancéreuses dont la signalisation Notch, la formation de nanotubes, les communications intercellulaires ou l'échange de cytokines/chimiokines, les vésicules extracellulaires et les exosomes (Mandel et coll., 2013, Yang et coll., 2015, Yang et coll., 2015). Il est donc important de souligner que ces différents types d'interactions directes et indirectes sont toujours multidirectionnels. Le microenvironnement tumoral contribue à la malignité des cellules de la tumeur primitive, mais aussi leur capacité métastatique (Ungefroren et coll., 2011). Les CSM augmentent la prolifération des cellules cancéreuses dans des modèles de co-culture de CSM avec des populations de différents types de cancer du sein ou de cellules de tumeur ovarienne (Yang et coll., 2015). Plusieurs interactions cellulaires entre les CSM et les cellules cancéreuses du cancer du sein induisent la croissance accrue du cancer du sein tant *in vitro* et *in vivo* (Muehlberg et coll., 2009). L'une des interactions implique l'induction par les CSM de l'expression du CD90 dans les cellules tumorales (Yang et coll., 2015). Il est à noter que la fonctionnalité des CSM peut changer pendant la chimiothérapie

induisant des effets différents sur les cellules cancéreuses du sein (Skolekova et coll., 2016). De même dans les cellules de cancer de l'ovaire, les CSM peuvent induire des marqueurs de surface comme le CD90 et des récepteurs fonctionnels comme le CD73 et le CD105. Ainsi, les cellules de carcinome ovarien hypercalcémique primaire à petites cellules (SCCOHT-1) acquièrent la capacité de métaboliser l'adénosine cyclique 3', 5'-monophosphate cyclique (AMPc) soulignant l'échange moléculaire bidirectionnelle entre cellules tumorales et CSM (Yang et coll., 2015). De plus, la régulation positive de MZT2A et de l'EPGN (EPiGeN) favorisent la capacité de prolifération des cellules de cancer de l'ovaire. En parallèle, la modulation de facteurs de transcription comme TAL1 (T-cell Acute Lymphocytic leukemia protein 1), des facteurs de transcription de FOS et OSF (Osteoblast Specific Factor), HES1 (Hairy and Enhancer of Split 1) et HES5 sont également liés à la promotion du développement du cancer. En outre, des facteurs de croissance de la famille de protéines morphogénétiques osseuses sont acquis par les cellules de cancer de l'ovaire en présence de CSM (Yang et coll., 2015) et contribuent au développement de certains adénocarcinomes. L'induction de gènes lors de la co-culture de CSM et cellules tumorales démontrent que les CSM soutiennent la capacité de prolifération de cellules de cancer de l'ovaire, mais aussi induisent des propriétés pro-métastatiques des cellules de cancer de l'ovaire. Réciproquement chez les CSM, une altération fonctionnelle est observée au cours de la co-culture avec des cellules tumorales comprenant des facteurs de transcription des gènes des cellules souches (Lis et coll., 2014). Les CSM expriment des niveaux croissants de facteurs de transcriptions spécifiques des cellules épithéliales dont un groupe de gènes de la famille des KRT (KeRaTin), qui interviennent dans la production de kératine pour soutenir la structure des cellules épithéliales. Aussi, certains gènes liés aux interactions cellule-cellule, le gène de jonction intercellulaire (DSP), les gènes liés à adhérence de cellules (MPZL2 : Myelin Protein Zero Like 2 ; SCEL : SCiELlin) et le gène de glycoprotéine d'adhérence dépendante du calcium cellules (CDH1 : CaDHérine-1) sont tous positivement régulés dans les CSM après co-culture avec des cellules de cancer de l'ovaire. À l'inverse, des ARNm codant pour des cytokines telles que G-CSF, IL1A, CCL20, TNF, CXCL1, CXCL2, CXCL3 et CXCL12 sont diminués dans les CSM en présence de cellules de cancer de l'ovaire (Yang et coll., 2015). L'expression et la production de la molécule d'adhérence de cellules épithéliales (ECAM), normalement indétectable dans les CSM, augmente considérablement après co-culture avec des lignées cellulaires de cancer de l'ovaire telles que SK-OV-3 ou NIH:OVCAR-3 (Yang et coll., 2015). L'ensemble de ces résultats corroborent le fait que les CSM acquièrent certaines fonctionnalités de cellules épithéliales lors de l'interaction avec les cellules de cancer de l'ovaire. Les CSM peuvent donc développer un phénotype aberrant associé aux tumeurs. Des travaux antérieurs montrent que les cellules tumorales initiatrices (Tumor Initiating Cell) dans le carcinome mammaire, aussi appelées les cellules souches du cancer (CSC : Cancer Stem Cell), présentent une augmentation de l'expression de marqueurs caractéristiques des cellules mésenchymateuses dont la vimentine, la fibronectine et la N-

cadhérine au lieu de E-cadhérine (Mani et coll., 2008). D'autres études dans les tumeurs mammaires ont révélé que l'IL6 produite par les cellules cancéreuses interagit avec son récepteur sur les cellules mésenchymateuses positives à l'aldéhyde déshydrogénase 1. Cet IL6 pourrait faciliter le recrutement de CSM supplémentaires dans le microenvironnement tumoral et l'induction de la production de CXCL7 par ces cellules. Inversement, le facteur CXCL7 (issu des CSM) stimule les cellules cancéreuses *via* l'activation du récepteur CXCR2 et induit la synthèse de cytokines supplémentaires telles que l'IL6 et l'IL8 pour générer une boucle de rétroaction positive qui contribue à augmenter l'attraction des CSM et à améliorer les interactions avec les cellules tumorales (Liu et coll., 2011). Suite à une interaction continue au sein du microenvironnement de la tumeur, les cytokines et en particulier l'IL1 libérées par les cellules tumorales peuvent stimuler le métabolisme de l'acide arachidonique et la production de PGE2 par les CSM. Inversement, les cytokines libérées et le PGE2 ensemble peuvent induire la voie de signalisation des β-caténine dans les cellules néoplasiques et contribuer ainsi au développement de cellules souches immatures (Li et coll., 2012). Au cours de ces interactions, des caractéristiques d'un phénotype mésenchymateux sont progressivement acquises par les cellules cancéreuses (Yang et coll., 2015) qui peut inclure l'EMT dans les cellules cancéreuses. Ceci suggère un processus de rétro-différenciation des cellules cancéreuses vers un phénotype de cellules souches (Hass, 2009, Li et coll., 2012) induit par l'interaction des CSM avec les cellules cancéreuses. Alternativement, au cours des interactions cellulaires ou des reprogrammations, les CSM peuvent acquérir des propriétés fonctionnelles de cellules cancéreuses. Cette reprogrammation oncogénique peut transformer les CSM en cellules de sarcome agressif (Eid et Garcia, 2015) et peut également jouer un rôle dans les tumeurs mésenchymateuses caractéristiques telles que les tumeurs desmoïdes (Wu et coll., 2010). Suite à l'EMT et aux interactions avec les CSM, les nouvelles populations de cellules cancéreuses ont une plasticité phénotypique, un potentiel métastatique et une sensibilité/résistance aux approches thérapeutiques modifiés.

Les CSM peuvent altérer la confluence et la migration des cellules de cancer du sein SKBR3, augmenter la formation de mammosphères, induire l'EMT et modifier la morphologie des cellules tumorales (Kucerova et coll., 2013). Les cellules de carcinome du nasopharynx (NPC) présentent une plus grande capacité de prolifération et de migration après adsorption des exosomes dérivés de CSM. De plus, les marqueurs de l'EMT, y compris la E-cadhérine et l'up-régulation de la vimentine et de la N-cadhérine, ont été largement modifiés après adsorption des exosomes. Cette communication indirecte entre les exosomes dérivés de CSM et des cellules de cancer induites en EMT, favorise la croissance tumorale *in vitro* et *in vivo* et la propagation des métastases (Shi et coll., 2016).

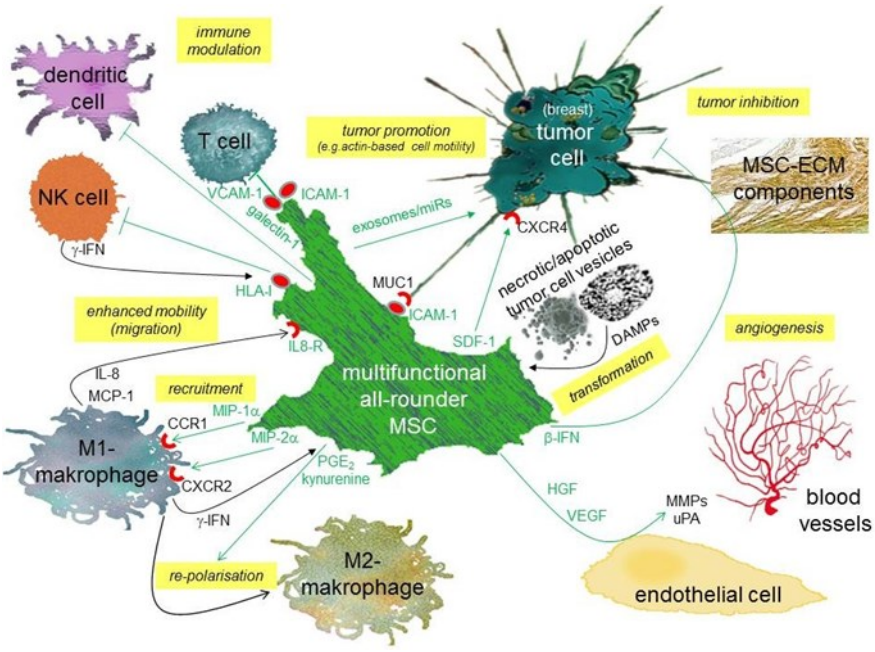


Figure 24 : interaction des CSM avec le microenvironnement tumoral (D'après Hass, 2012) (Hass et Otte, 2012)

iii. Les CSM et le cancer colorectal

Les CSM augmentent la croissance des cellules de cancer du côlon, des lymphomes et des mélanomes *in vivo* (Klopp et coll., 2011). Les CSM injectées conjointement avec les cellules cancéreuses du côlon dans un modèle murin de xénogreffe (Zhu et coll., 2006), induisent une augmentation de l'incidence des tumeurs avec une vascularisation et une nécrose accrue. Néanmoins, les CSM inhibent la croissance du cancer du côlon de rat lorsqu'elles sont injectées conjointement avec une quantité égale de CSM et de cellules tumorales (Ohlsson et coll., 2003). Récemment, il a été démontré que les cellules de cancer du côlon ont une expression accrue des facteurs de transcription de l'EMT comme Zeb1/2, Slug, Snail et Twist qui est accompagnée d'une down-régulation de l'expression de la E-cadhérine. De plus, ces cellules de cancer du côlon ont acquis l'expression des gènes de cellules souches y compris Oct4 et Sox2 après co-culture avec les CSM. La morphologie des cellules cancéreuses du côlon a été changée en forme de cellules allongées, comme des fibroblastes qui sous-tendent la conversion à un phénotype mésenchymateuse. Inversement, les cellules cancéreuses du côlon ont été capables d'induire la sécrétion de cytokines (TNFα, IL10, IFNγ) et de facteurs métastatiques (VEGFC, TERT : TElomerase Reverse Transcriptase) dans les CSM via l'activation de la voie Wnt. L'inhibition de la signalisation Wnt réduit le pouvoir invasif et la tumorigénicité des cellules cancéreuses *in vitro* et *in vivo* (Chen et coll., 2015). Des études approfondies sont nécessaires à la compréhension des mécanismes directs et indirects des CSM et des cellules cancéreuses conduisant à l'induction de l'EMT,

altérant ainsi la structure cellulaire et la morphologie des cellules du cancer vers un phénotype mésenchymateux pro-métastatique (So et coll., 2015).

iv. Double fonction des CSM sur la tumeur

En réaction à des stimuli discrets, les CSM peuvent changer leur phénotype pour influencer la transition entre une condition pré-néoplasique et néoplasique ou, à l'inverse, maintenir un microenvironnement qui entrave la croissance tumorale. Théoriquement, les CSM peuvent ainsi avoir un effet pro ou anti-tumorigène. Cet effet dynamique est induit selon les différentes réactions aux types de cellules tumorales ou par le contact avec leurs microenvironnements spécifiques. Les effets variables des CSM sur la croissance tumorale pourraient être attribués à des différences dans les modèles de tumeur, l'hétérogénéité des CSM, la dose ou les modalités d'injection de CSM, le type d'animal utilisé (par exemple souris immunotolérante ou immunocompétente) ou d'autres facteurs qui n'ont pas encore été appréciés (D'Souza et coll., 2013). Par exemple, Zipori et coll. ont démontré une action bimodale de CSM murines et humaines contre plusieurs lignées de cellules tumorales (Cf. Inhibition tumorale par les CSM) (Zipori et coll., 1987). Néanmoins, des considérations expérimentales des études cliniques sur des patients atteints de cancer fournissent certaines données contradictoires quant à l'effet médié par les CSM sur la progression du cancer. Des rapports indépendants ont indiqué que les CSM n'affectent pas la progression du cancer du sein ou des hémopathies malignes (Lazarus et coll., 2005). En revanche, une cohorte de patients souffrant d'hémopathies malignes qui ont été traités par chimiothérapie puis co-transplantés avec des CSM et des CSH a montré une plus grande incidence de rechute de la maladie comparé à ceux recevant des CSH seules (Ning et coll., 2008). Cependant dans une plus grande cohorte de plus de 200 patients traités par des CSM pour des applications différentes de médecine régénérative (Centeno et coll., 2010), aucune augmentation du risque de néoplasie n'a été signalée. De plus une méta-analyse a montré que seule une fièvre transitoire pouvait être occasionnellement observée après injection de CSM [428]. Néanmoins, nous ne pouvons pas totalement exclure une incidence néfaste du traitement par les CSM et une investigation préclinique supplémentaire est nécessaire pour assurer l'utilisation des CSM sans risques. Les CSM sont connues pour sécréter des exosomes et microparticules, qui peuvent influer la signalisation dans le microenvironnement tumoral (Lai et coll., 2010, Zhu et coll., 2012). Introduisant de nouveaux paradigmes, Roodhart et coll. ont récemment fait remarquer que le traitement d'un modèle animal de cancer avec des CSM pourrait entraîner une résistance à la chimiothérapie au platine (Roodhart et coll., 2011). La double nature des CSM en ce qui concerne les interactions avec la tumeur, est d'une

importance capitale dans des modèles expérimentaux visant à clarifier la relation entre une tumeur et de son milieu.

5. Reprogrammation des CSM

Suite à une infection, un dommage ou à la destruction d'un tissu, les molécules exprimées par les pathogènes ou associées aux dommages sont reconnues par les Toll-Like Receptors (TLR) présents sur les cellules effectrices de l'immunité innée. Les TLR sont une famille de récepteurs (13 découverts chez l'Homme à ce jour) activés par des signaux de dangers sécrétés au cours de la plupart des pathologies (Matzinger, 2002). Les signaux exogènes, comme les endotoxines et les lipopolysaccharides sont en général sécrétés lors d'une infection microbienne. Les signaux de danger endogènes sont sécrétés par des cellules anormales ou endommagées sous forme de composants intracellulaires tels que les protéines de choc thermique ou HSP (Heat Shock Proteins) ou des ARN. Ces signaux de danger activent les TLR sur les cellules sentinelles de l'immunité innée, par exemple les cellules dendritiques afin d'activer une réponse appropriée et de ré-établir l'homéostasie tissulaire (Kaisho et Akira, 2001). Plusieurs équipes ont établi un lien entre l'activation des TLR et l'activité immunomodulatoire et migratoire des CSM (Hwa Cho et coll., 2006, Pevsner-Fischer et coll., 2007, Tomchuck et coll., 2008).

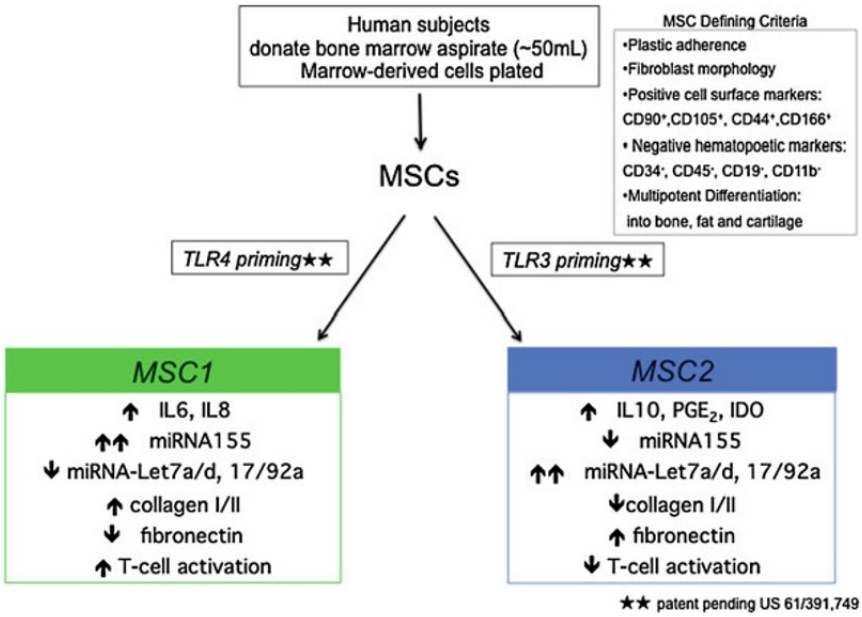


Figure 25 : reprogrammation des CSM par activation des TLR : l'activation des CSM via des récepteurs différents induit une modification de leur phénotype (D'après Bétancourt, 2013) (Betancourt, 2013)

En particulier, la stimulation de TLR3 ou TLR4 sur les CSM induit un changement de polarisation. Ainsi, les CSM activées via TLR3 ont un profile immunosuppressif alors que l'activation de TLR4 induit la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires. Ces deux états de polarisation ont été nommés par Waterman et coll. CSM1, pro-inflammatoire, et CSM2, anti-inflammatoire (Waterman et coll., 2010). Ce nouveau paradigme est basé sur des différentes constantes entre ces deux populations : profile de sécrétion de cytokines et chimiokines, capacités de différenciation, sécrétion de MEC, voie de signalisation TGF-β et expression de Jagged, IDO et PGE-2 (Figure 25) (Waterman et coll., 2010).

L'un des effets majeurs de cette polarisation porte sur l'effet des CSM sur l'activation des cellules T. Dans une expérience de co-culture de cellules mononucléées du sang et de CSM, les CSM non traitées induisaient une diminution de l'activation des cellules T d'environ 90%. Les CSM1, activées via TLR4, n'avaient pas d'effet significatif sur le pourcentage de cellules T activées. En revanche, les CSM2 induisaient un effet similaire aux CSM non traitées (Waterman et coll., 2010).

L'incubation des CSM pendant 1 heure avec des ligands de TLR3 (poly(I :C)) ou TLR4 (LPS) augmente leur pouvoir migratoire. Par contraste, il est nécessaire d'incuber les cellules 24 heures avec TNF-α ou CCL5 pour obtenir un effet similaire (Tomchuck et coll., 2008). Les auteurs de cette étude suggèrent qu'une activation à court terme des CSM par les ligands des TLR est proche de ce qui est observé *in vivo* suite à une infection ou 'une lésion (Betancourt, 2013).

Suivant le protocole expérimental, les TLR induisent ou non une variation du potentiel de différenciation des CSM. Liotta et coll. n'ont observé aucun changement dans les différenciations adipogénique, ostéogénique et chondrogénique après stimulation des TLR (Liotta et coll., 2008). En revanche, Lombardo et coll. suggèrent une augmentation de la différenciation ostéogénique après activation de TLR3 ou TLR4 (Lombardo et coll., 2009). Enfin, une étude de Waterman et coll. a montré que l'activation de TLR3 inhibe la différenciation en ostéoblastes et adipocytes, alors que l'activation de TLR4 favorise la différenciation ostéogénique et inhibe la différenciation adipogénique (Waterman et coll., 2010).

La polarisation CSM1/CSM2 affecte également le profil sécrétoire des CSM. Les CSM1 sécrètent davantage d'IL-6 et IL-8 alors que les CSM2 produisent IL-4, CXCL10, RANTES et IL-1RA en quantité plus importante. Les CSM stimulées via TLR3 sécrètent également moins de TGF-β1 et TGF-β3 que les cellules non activées ou activées par TLR4. L'activation de TLR4 induit la production de collagène I et III par les CSM, alors que les CSM1 sécrètent plus de fibronectine. Cet effet peut être expliqué par une surexpression et sur-activation de Smad3 par les CSM1, alors que Smad7, un

inhibiteur de la voie Smad, est surexprimé chez les CSM2. Enfin, les CSM2 sur-expriment IDO et PGE2 (Waterman et coll., 2010).

L'état de polarisation des CSM influe sur leur effet *in vitro* et *in vivo*. La reconnaissance de motifs microbiens par les CSM induit un profil pro-inflammatoire alors que les molécules associées aux autres types de lésions induisent un profil anti-inflammatoire. Ainsi, cette observation pourrait expliquer la majorité d'occurrences d'effet immunosuppresseur des CSM dans la littérature. En effet, il est probable que l'état par défaut des CSM soit immunosuppressif afin d'éviter des dommages, notamment à la niche hématopoïétique. Un stimulus spécifique serait alors nécessaire pour induire un changement vers un phénotype pro-inflammatoire indispensable aux premières étapes de la régénération tissulaire. L'orientation de la polarisation des CSM pourrait être primordiale dans le traitement de cancers ou de maladies auto-immunes et inflammatoires. Waterman et coll. ont montré une inhibition de la croissance tumorale sous l'effet des CSM1 dans un modèle de tumeurs ovariennes chez la souris. A l'inverse, la co-culture de CSM2 avec des sphéroïdes de tumeurs ovariennes favorisait la croissance tumorale (Waterman et coll., 2012). L'effet anti-inflammatoire des CSM2 est certainement à l'origine de cette observation, l'inhibition du système immunitaire limitant la capacité de l'organisme à lutter contre la tumeur. De façon prévisible, l'utilisation de CSM2, anti-inflammatoires, est préférable dans les pathologies inflammatoires, telles que la neuropathie diabétique périphérique (Waterman et coll., 2012).

6. Isolement, amplification et caracterisation des CSM

Les CSM sont obtenues chez l'homme par un procédé très simple. Après ponction médullaire ou liposuccion, les cellules sont mises en suspension et ensemencées dans des boîtes de culture dans un milieu liquide additionné de sérum (humain ou bovin), sélectionné pour obtenir la croissance optimale des cellules adhérentes. Mises en culture dans un milieu nutritif de base (Minimal Essential Medium alpha) supplémenté en SVF (sérum de veau fœtal) ou en lysat plaquettaire, les CSM adhèrent rapidement au support et peuvent être séparées des cellules hématopoïétiques par des changements de milieu répétés. Il a été démontré dans les années 1970 par l'équipe de Friedenstein que les CSM sont des cellules facilement amplifiables *in vitro* (Friedenstein et coll., 1968, Friedenstein et coll., 1976). En fonction du temps et des conditions de culture, les CSM peuvent présenter des morphotypes et des antigènes différents. Dans des conditions de culture adaptées, des colonies distinctes se forment, chacune dérivant d'une cellule précurseur unique : la CFU-F (Colony Forming Unit Fibroblast). De nombreux travaux ont caractérisé le phénotype des CSM au fil des passages. Ces études ont montré que les CSM sont une population de cellules adhérentes distincte des populations hématopoïétiques

ou endothéliales. Cependant, aucune de ces caractéristiques ne peut être considérée comme spécifique des CSM, ni ne sont suffisantes pour définir la population en l'absence des critères fonctionnels de différenciation en précurseurs adipocytaires, ostéogéniques et chondrogéniques.

Les marqueurs CD73, CD90 (antigène Thy-1), CD105 (endogline), CD146 (melanoma cell adhesion molecule, MCAM ou glycoprotéine MUC18) et CD200 présents sur les CSM natives permettent leur enrichissement (Tableau 8) (Dominici et coll., 2006). Cet enrichissement sera d'autant plus efficace que, par sélection négative, les cellules hématopoïétiques CD45+ auront été éliminées.

Il est nécessaire d'inclure des critères fonctionnels pour l'identification d'une population cellulaire en tant que CSM. L'identification des CSM nécessite de démontrer que ces cellules peuvent se différencier en précurseurs adipocytaires, ostéogéniques et chondrogéniques. Les cellules sont cultivées en présence d'inducteurs. La différenciation est mise en évidence par des méthodes histochimiques (colorations spécifiques) et par l'expression de facteurs de transcription clés des différentes voies (Peroxisome proliferator-activated receptor gamma [PPARG] pour A, RUNX2 pour O et SOX9 pour C)

Tableau 8 : résumé des critères miminum pour identifier les CSM in vitro (D'après Dominici et al., 2006) (Dominici et coll., 2006)

1	Adherence to plastic in standard culture conditions		
2	Phenotype	Positive (≥ 95% +)	Negative (≤ 2% +)
		CD105	CD45
		CD73	CD34
		CD90	CD14 or CD11b
			CD79α or CD19
			HLA-DR
3	*In vitro* differentiation: osteoblasts, adipocytes, chondroblasts (demonstrated by staining of *in vitro* cell culture)		

La différence dans l'obtention de CSM à partir d'autres tissus que la moelle, est la nécessité de digérer le tissu par des enzymes protéolytiques. Le tissu adipeux, étant donné sa facilité de prélèvement en grande quantité par liposuccion, semble une alternative prometteuse. L'isolement à partir de tissu adipeux de précurseurs capables de se différencier en adipocytes a été décrit dès les années 1960 (Gimble et coll., 2007). Ces cellules sont depuis appelées ASC pour adipose-derived stromal/stem cells. La digestion est une étape importante pour libérer les cellules de la matrice extracellulaire (Figure 26) mais elle induit de grandes différences dans les populations obtenues en fonction du protocole et des enzymes protéolytiques utilisées. L'isolement de populations cellulaires

distinctes dues à l'utilisation de protocoles différents peut expliquer des résultats expérimentaux variables. Après digestion, les adipocytes qui, remplis de lipides, flottent dans la suspension cellulaire sont éliminés de la fraction dite stromale-vasculaire du tissu. Cette fraction correspond à une population cellulaire hétérogène qui contient, entre autres, des cellules hématopoïétiques, des cellules endothéliales et des cellules immatures. La mise en culture de cette fraction permet aux CSM d'adhérer et d'être sélectionnées par cette capacité.

Figure 26 : méthodes d'obtention des CSM et des ASC. *La partie gauche de la figure illustre l'obtention des ASC; noter l'importance de l'étape de digestion. La partie droite de la figure illustre l'obtention des CSM; noter que l'étape de séparation des cellules mononucléées n'est pas indispensable (voir texte).*

La fréquence des CSM dans le tissu adipeux est 100 à 500 fois supérieure à celle des CSM dans la moelle osseuse. Il existe plusieurs différences. La première d'entre elles est que les CSM issu du tissu adipeux expriment la protéine CD34 en début de culture, contrairement aux CSM de moelle osseuse. Elles sont capables de se différencier en adipocytes, ostéoblastes, chondrocytes et cellules vasculaires musculaires lisses. Elles ont un potentiel angiogénique supérieur. Des résultats comparables ont été obtenus pour des cellules de type CSM d'autres tissus (Jansen et coll., 2010).

7. Application des CSM en clinique

Les propriétés régénératives des CSM les font émerger comme une alternative prometteuse dans le traitement de nombreuses pathologies pour lesquelles les thérapies pharmacologiques traditionnelles sont inefficaces. Comme indiqué précédemment, les pathologies auto-immunes telles que la GVHD ou la maladie de Crohn font l'objet de nombreuses études cliniques impliquant la transplantation de CSM. Le potentiel thérapeutique des CSM a également été démontré sur d'autres maladies : infarctus du myocarde, cirrhose, asthme et diabète (Heldring et coll., 2015).

a. Régénération osseuse

La régénération du tissu osseux est nécessaire dans un grand nombre de pathologies, telles que les défauts non-jointifs de l'os apparaissant après retrait d'une tumeur ou à l'issue d'une fracture complexe. Chez 60 patients présentant des fractures non-jointives, l'injection de cellules mononucléées du sang, contenant des CSM, a conduit à la jointure de l'os chez 88,3% des individus. Chez les 6 patients pour lesquels le traitement était inefficace, le nombre de CFU-f en culture était faible, indiquant une quantité inférieure de CSM et de cellules progénitrices, suggérant donc leur importance au cours du traitement (Hernigou et coll., 2005). 12 patients souffrant d'arthrose ont été traités par injection intra-articulaire de CSM lors d'une étude pilote récente. Une amélioration rapide de la fonctionnalité des articulations et de la qualité du cartilage a été observée chez 11 de ces patients (Orozco et coll., 2013). Des effets bénéfiques ont également été observés lors du traitement de l'ostéonécrose de la tête fémorale (Gangji et coll., 2004, Kawate et coll., 2006).

b. Régénération du myocarde

Le myocarde possède une capacité de régénération limitée. Après un infarctus du myocarde, la régénération conduit généralement à la formation de tissu fibrotique, diminuant la contractibilité du myocarde. L'injection de CSM chez 32 patients souffrant d'insuffisance cardiaque chronique a induit une amélioration de la fonctionnalité du ventricule gauche (Diederichsen et coll., 2010). Un autre essai clinique, contre placebo, portant sur la transplantation de CSM autologues dans les 12 heures suivant l'infarctus du myocarde, a été conduit sur 69 patients. 3 mois après traitement, les patients ayant reçu des CSM présentaient une fonctionnalité cardiaque accrue comparé au groupe contrôle (Chen et coll., 2004).

Depuis la découverte des CSM en 1991, de nombreuses études ont démontré leur importance dans le maintien de l'homéostasie tissulaire, que ce soit dans le soutien de l'hématopoïèse ou pour la régénération des tissus lésés. Ces propriétés ont rapidement suscité l'intérêt de la communauté scientifique, du point de vue de leur utilité en contexte thérapeutique. Alors que l'hypothèse originelle reposait sur le remplacement des cellules endommagées par les CSM exogènes, il s'avère que l'intérêt de ce type de thérapie repose davantage sur la capacité des CSM à produire un panel de facteurs agissant sur l'inflammation, l'angiogenèse, l'apoptose… La disponibilité, la faible immunogénicité et la capacité des CSM à migrer vers la lésion sont des caractéristiques avantageuses par rapport aux autres types cellulaires employées en thérapie. La compréhension accrue des mécanismes régissant le phénotype des CSM, ainsi que le nombre croissant d'essais cliniques sur cette thématique, rendent leur utilisation de plus en plus incontournable, en particulier dans le cadre de pathologies complexes pour lesquelles les traitements pharmacologiques sont inefficaces. Le traitement par les CSM des atteintes viscérales de la GVHD, des MICI et des irradiations est traité dans le paragraphe Thérapie cellulaire par les CSM pour le traitement des atteintes radio-induites au côlon-rectum.

D. Les CSM : la réponse recherchée ?

Les atteintes secondaires tardives des radiothérapies, notamment la fibrose, sont extrêmement impactantes pour la qualité de vie des patients. En particulier, les séquelles au tractus gastro-intestinal induisent des symptômes sévères. Il n'existe pas à l'heure actuelle de protocole efficace de prise en charge de ces patients. Dans cette partie, nous détaillons les résultats obtenus suite à la transplantation de CSM sur différents modèles de fibrose afin d'évaluer le potentiel de cette thérapeutique sur la fibrose colorectale radio-induite.

I. Traitements anti-fibrosants actuels

Les traitements contre la fibrose ont un effet palliatif, les CSM sont une alternative thérapeutique qui a déjà démontré son efficacité dans de nombreuses pathologies. Les résultats des études précliniques et cliniques mettent en évidence de nombreux mécanismes d'action par les CSM : (i) immunosuppression (ii) action anti-oxydante (iii) remodelage et (iv) régénération tissulaire. L'avantage de ce traitement réside donc dans la capacité des CSM à agir sur plusieurs mécanismes impliqués dans les pathologies à traiter. De nombreuses drogues anti-fibrosantes sont actuellement utilisées ou à l'étude et il est important de comparer l'efficacité de ces traitements à celle de la transplantation de CSM.

Les protocoles thérapeutiques anti-fibrosants sont des traitements symptomatiques. Pour exemple, les patients atteints de Fibrose Pulmonaire Idiopathique (FPI) sont souvent traité par des séances d'oxygénothérapie, visant à faciliter la respiration, sans résultats démontrés La vaccination contre les pathogènes des voies respiratoires est fortement recommandée, lorsqu'elle est disponible. Il en est de même pour la fibrose hépatique d'origine virale, les efforts se concentrant ici sur la lutte contre le virus. L'amélioration de l'hygiène de vie est également indispensable : l'arrêt de l'alcool pour les fibroses hépatiques ou du tabac pour la fibrose pulmonaire.

Les médicaments évalués ou approuvés à ce jour agissent sur deux mécanismes majeurs de l'induction de la fibrose : l'inflammation et le stress oxydant. De nombreux anti-inflammatoires et antioxydants ont été testés sans démontrer d'efficacité réelle : corticostéroïdes, statines, IFN-γ (Rafii et coll., 2013)… La transplantation d'organe est souvent nécessaire à plus ou moins long terme pour assurer la survie du patient.

La pirfénidone est le premier exemple d'agent anti-fibrosant utilisé en clinique. Elle possède des propriétés anti-inflammatoires, antioxydantes et d'inhibition du TGFβ1 (Salazar-Montes et coll., 2008). De plus, la pirfénidone altère directement l'expression, la synthèse et l'accumulation de

collagène en inhibant le recrutement et la prolifération des cellules productrices de MEC (Carter, 2011). Elle a été approuvée pour le traitement de la FPI en Europe, au Canada, en Corée du Sud et au Japon. Les études précliniques montrent sa capacité à bloquer l'expression de TGF-β1 et à réduire significativement sa concentration dans le fluide de lavage bronchoalvéolaire dans les modèles de fibrose pulmonaire (Iyer et coll., 1999). La pirfénidone est également efficace sur les modèles animaux de fibrose du cœur (Mirkovic et coll., 2002), du rein (Takakuta et coll., 2010), du foie (Di Sario et coll., 2004) et de fibrose radio-induite (Simone et coll., 2007). Cependant, la Food Drug Administration (FDA) n'a pas approuvé la pirfénidone en raison d'un manque d'efficacité et de bénéfice sur la survie dans les essais cliniques de longue durée (2010). De plus, une méta-analyse des résultats d'études cliniques montre que la pirfénidone induit des effets secondaires sévères au niveau gastro-intestinal, neurologique et dermatologique (Jiang et coll., 2012).

L'imatinib est un inhibiteur des tyrosines kinase ayant démontré son efficacité sur des modèles animaux de fibrose du rein (Wang et coll., 2005), du poumon (Daniels et coll., 2004), du foie (Yoshiji et coll., 2005) et de la peau (Distler et coll., 2007). L'imatinib inhibe c-Abl, bloquant ainsi des effecteurs de la voie TGF-β, et inhibe simultanément PDGF. Il a été extensivement utilisé dans le traitement de cancers tels que la leucémie myéloïde chronique. Sur 5 essais cliniques sur des patients atteints de sclérose systémique sévère, 3 ont produit des résultats encourageants pour l'imatinib (Bournia et coll., 2013). Récemment, un essai sur des patients atteints de FPI n'a pas produit les résultats escomptés avec un effet bénéfique léger sur la survie et la fonction pulmonaire (Iwamoto et coll., 2011). Une partie significative des patients inclus dans des essais pour l'imatinib se sont retirés en raison des effets secondaires.

D'autres drogues anti-fibrosantes sont testées à l'heure actuelle (revues dans (Wynn et Ramalingam, 2012, Rosenbloom et coll., 2013)). Ces agents pharmacologiques sont principalement des anti-inflammatoires et des inhibiteurs de la voie de signalisation TGF-β1. Malgré le fait que certains de ces composés ont montré un effet anti-fibrosant sur les modèles animaux, le manque de données cliniques ne permet pas leur approbation.

Les effets secondaires liés à l'utilisation des drogues anti-fibrosantes peuvent être sévères. En outre, ces effets secondaires sont aggravés par le manque de spécificité de ces composés, tant en termes d'organe visé que de cible cellulaire. La capacité des CSM à migrer vers le site de la lésion et à se reprogrammer en fonction du microenvironnement local en sécrétant de façon transitoire des facteurs spécifiques fait de la thérapie cellulaire un candidat prometteur. Il est à présent nécessaire de réunir des données précliniques et cliniques sur ce type de traitements.

II. CSM et fibrose

1. Études précliniques

Les propriétés immunomodulatrices et régénératives des CSM ont été largement décrites. Néanmoins, les effets des CSM sur la fibrose et les mécanismes qui les sous-tendent sont encore mal connus. Dans cette partie seront exposés les résultats d'études portant sur la transplantation de CSM sur des modèles animaux de fibrose. Différents organes (foie, poumon, rein…) et espèces (souris, rat, cochon…) seront cités afin de dresser un bilan le plus exhaustif possible des connaissances actuelles sur cette thématique.

a. Immunomodulation

Les propriétés immunorégulatrices des CSM ont été utilisées pour le traitement des pathologies à inflammation chronique, telles que la fibrose (Figure 27) (Singer et Caplan, 2011, Mok et coll., 2013). L'aspect immunosuppresseur des CSM est largement documenté. Les CSM agissent sur les lymphocytes B et T en bloquant leur cycle en phase G0/G1, inhibant ainsi la production d'immunoglobulines (IgA, IgG et IgM) et la différenciation des lymphocytes B. Elles induisent le changement de polarité des lymphocytes T d'un état Th1 pro-inflammatoire vers une polarité Th2 anti-inflammatoire (Corcione et coll., 2006, Keating, 2008). Les CSM agissent sur la différenciation et la maturation des cellules dendritiques pour les rendre tolérogènes (Bifari et coll., 2008). Elles inhibent l'activité cytotoxique des cellules natural killers sur les cellules HLA-I négatives. Plusieurs études ont montré la capacité des CSM à induire le changement de polarité des macrophages d'un état classiquement activé M1, pro-inflammatoire, vers un état alternativement activé M2, considéré comme favorisant la régénération du tissu (Prockop, 2013). Cet effet semble en partie induit par la production par les CSM de TSG-6, une cytokine anti-inflammatoire. Enfin, elles inhibent la production de cytokines telles que TNF-α, IFN-γ et IL-10 (Sotiropoulou et coll., 2006). Ainsi, la thérapie cellulaire par les CSM est un candidat majeur pour le traitement des maladies auto-immunes ou avec une forte composante inflammatoire.

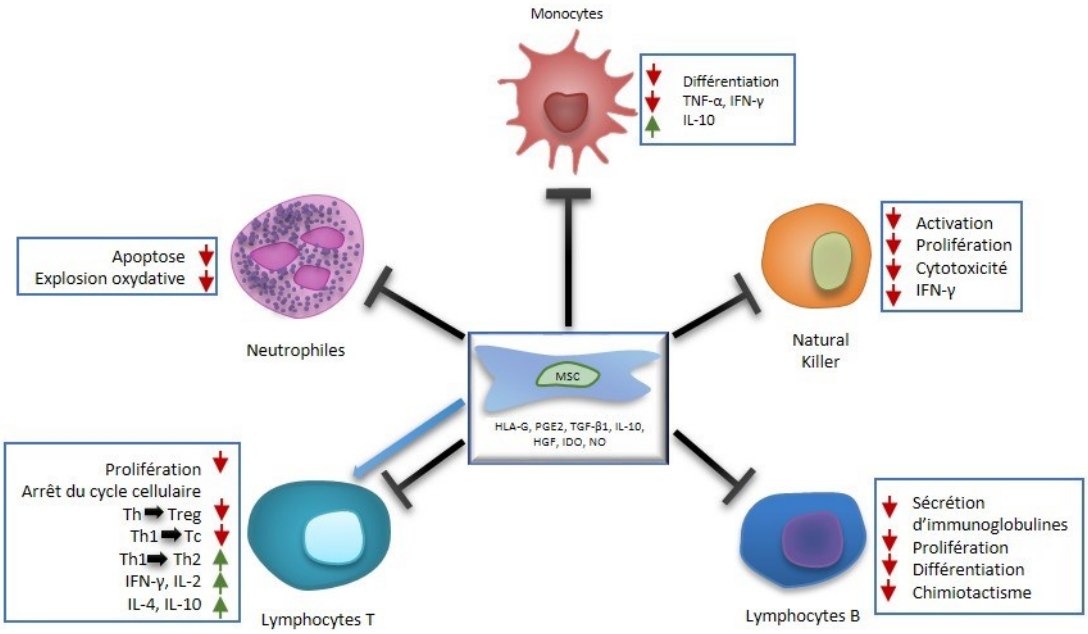


Figure 27 : effet des CSM sur les cellules du système immunitaire

De nombreuses études ont mis en évidence les bénéfices inhérents aux propriétés immunomodulatrices des CSM pour le traitement de la fibrose. L'inhibition par les CSM de l'expression des TLR (Toll-Like Receptor) suggère leur capacité à limiter l'inflammation chronique (Linard et coll., 2013). Les TLR sont impliqués dans la réponse immunitaire innée et reconnaissent des motifs moléculaires conservés chez la plupart des pathogènes. Dans plusieurs modèles, la transplantation de CSM a permis de limiter l'infiltration des monocytes/macrophages, des neutrophiles et des lymphocytes au niveau du tissu lésé (Lee et coll., 2010, Linard et coll., 2013, Ueno et coll., 2013, Zhou et coll., 2013, Choi et coll., 2014). Ce phénomène peut en partie être expliqué par la diminution de l'expression de MCP-1, une chimiokine impliquée dans le recrutement des monocytes, lymphocytes et basophiles (Zhou et coll., 2013). La sous-expression de VCAM-1 et ICAM-1, impliquées dans les interactions entre cellules endothéliales et leucocytes, est également responsable de la réduction de l'infiltrat inflammatoire (Zhou et coll., 2013). Dans un modèle de fibrose cutanée radio-induite, la transition des macrophages d'un état M1 à M2 a été observée suite à l'injection de CSM (Horton et coll., 2013). La diminution de l'expression de iNOS suite à la transplantation de CSM dans un modèle de rectite radio-induite suggère une réduction de l'activité des macrophages M1 (Linard et coll., 2013). Une augmentation de la proportion de macrophages M2 a été observée dans des modèles de fibrose du cœur (Ishikane et coll., 2013) et du rectum (Linard et coll., 2013). Dans le poumon, les microvésicules purifiées du milieu conditionné par les CSM, bien qu'induisant une diminution

significative du nombre de cellules immunitaires, a produit des effets moindres que la transplantation de CSM (Choi et coll., 2014).

Les CSM inhibent l'expression de l'IFN-γ, qui possède une activité pro-inflammatoire en induisant la surexpression de l'IL-6 et du TNF-α (Moodley et coll., 2009). Une diminution de l'expression et de la concentration de TNF-α a été observée dans différents modèles après transplantation (Moodley et coll., 2009, Semedo et coll., 2009, Lee et coll., 2010, Asanuma et coll., 2011, Qiao et coll., 2011, Bai et coll., 2013, Horton et coll., 2013, Linard et coll., 2013, Zhou et coll., 2013, Qi et coll., 2014). IL-1α (Horton et coll., 2013), IL-1β (Lee et coll., 2010, Horton et coll., 2013) et IL-6 (Semedo et coll., 2009, Lee et coll., 2010, Franquesa et coll., 2012, Linard et coll., 2013, Zhou et coll., 2013) sont sous-exprimés sous l'influence des CSM dans plusieurs modèles. L'augmentation de l'expression de l'IL-4 et l'IL-10 par les CSM suggère la transition des lymphocytes T vers un profil Th2 (Semedo et coll., 2009). L'augmentation de la concentration de l'IL-10 a été rapportée dans des modèles de fibrose cutanée et rectale (Horton et coll., 2013, Linard et coll., 2013).

L'effet anti-apoptotique des CSM participe également à la diminution de l'inflammation. Dans plusieurs modèles de fibrose, une diminution du nombre de cellules apoptotiques a été notée suite à la transplantation de CSM (Semedo et coll., 2009, Zhang et coll., 2011, Mohammadi Gorji et coll., 2012, Song et coll., 2013). Les CSM semblent donc protéger les cellules résidantes, limitant ainsi la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires et améliorant la fonctionnalité du tissu.

Ces résultats suggèrent la capacité des CSM à inhiber les processus physiopathologiques associés à la fibrose. Ces effets sont en partie induits par la réduction de l'inflammation chronique. Les résultats présentés ici suggèrent que les CSM agissent par différentes voies : (i) modification de la polarisation des cellules immunitaires (ii) diminution de l'expression des cytokines pro-inflammatoires (iii) augmentation de l'expression des cytokines anti-inflammatoires (iv) protection des cellules résidantes vis-à-vis de l'apoptose. Ces phénomènes contribuent à la modification du microenvironnement. Ces modifications permettent de diminuer la fibrose et de favoriser la régénération tissulaire.

b. La voie TGF-β1

Le TGF-β1 est considéré comme l'un des acteurs majeurs de la fibrogénèse (Cf. TGF-β1). L'activation de ses récepteurs induit l'activation d'une cascade de signalisation menant à la prolifération et l'activation des cellules pro-fibrosantes telles que les myofibroblastes. En particulier,

TGF-β1 induit l'EMT et l'EndMT, en partie responsables de l'accumulation de cellules productrices de MEC. La voie de signalisation TGF-β1 est l'une des principales cibles des thérapies anti-fibrosantes et l'influence des CSM sur son activation a donc été largement étudiée. Dans de nombreuses études, la transplantation de CSM induit la réduction de l'expression et de la concentration de TGF-β1 (Fang et coll., 2004, Zhao et coll., 2008, Moodley et coll., 2009, Semedo et coll., 2009, Tsai et coll., 2009, Lee et coll., 2010, Bai et coll., 2013, Horton et coll., 2013, Linard et coll., 2013, Ueno et coll., 2013, Zhou et coll., 2013, Jang et coll., 2014, Wu et coll., 2014). Le même effet a été obtenu en injectant des exosomes isolés de milieu de culture conditionné par les CSM (Li et coll., 2013). Dans un modèle de co-culture de CSM et de cellules mésothéliales péritonéales, une étude a mis en évidence l'inhibition de la surexpression de TGF-β1 induite par le glucose (Ueno et coll., 2013). Cet effet était associé à la diminution de la phosphorylation de Smad2, également observée après injection d'exosomes dans un autre modèle (Li et coll., 2013, Ueno et coll., 2013). Dans le foie, la diminution de l'expression de TGF-β1 est corrélée à la diminution de la concentration en Smad3 phosphorylée, indiquant une réduction de l'activation des récepteurs à TGF-β1 (Jang et coll., 2014). La diminution de l'expression de α-SMA (Mias et coll., 2009, Semedo et coll., 2009, Rabani et coll., 2010, Asanuma et coll., 2011, Pan et coll., 2011, Ali et coll., 2012, Bai et coll., 2013, Ueno et coll., 2013, da Silva et coll., 2015, Li et coll., 2015) et du nombre de cellules positives à α-SMA (Tsai et coll., 2009, Zhang et coll., 2011, Alfarano et coll., 2012, Wang et coll., 2012, Zhou et coll., 2013, Baulier et coll., 2014, Wu et coll., 2014, da Silva et coll., 2015) suggère l'inhibition de la prolifération des myofibroblastes et, dans une moindre mesure, de l'EMT et l'EndMT induites par TGF-β1. *In vitro*, la réduction de la concentration de α-SMA dans un modèle de co-culture de CSM et de cellules rénales humaines prétraitées au TGF-β1, montre un effet direct des CSM sur les changements phénotypiques menant à l'accumulation de cellules pro-fibrosantes (Alfarano et coll., 2012). L'inhibition de l'expression et de la production de CTGF dans plusieurs modèles contribue également à cette propriété (Franquesa et coll., 2012, Linard et coll., 2013).

Il est intéressant de noter que diverses études ont montré l'importance de HGF, sécrété par les CSM et responsable d'une partie significative de leur effet anti-fibrosant (Mias et coll., 2009, Li et coll., 2013, Ueno et coll., 2013). Les CSM sur-exprimant HGF via un vecteur d'expression sont plus efficaces que les cellules non transfectées dans des modèles de fibrose pulmonaire et hépatique (Gazdhar et coll., 2013, Seo et coll., 2014, Lai et coll., 2016). L'ajout de HGF recombinant a permis de reproduire partiellement les effets des CSM dans un modèle de co-culture de CSM et de cellules épithéliales tubulaires proximales traitées à l'albumine (Wu et coll., 2014). L'inhibition de l'expression de TGF-β1 par HGF et sa capacité à améliorer la dégradation du collagène via l'augmentation de la concentration en MMP-1 souligne également l'intérêt de ce facteur de croissance (Taniyama et coll.,

2002). En outre, l'augmentation de l'expression de p-Met, la forme phosphorylée de c-Met, le récepteur à HGF, révèle une augmentation de l'activation de ce récepteur (Tsai et coll., 2009).

Récemment, Qi et coll. ont mis en évidence l'importance de TSG-6 dans l'effet anti-fibrosant des CSM. En plus de supprimer la sécrétion de TNF-α par les macrophages activés, cette protéine induit des modifications de la balance TGF-β1/TGF-β3, d'un ratio élevé pro-fibrosant vers un ratio faible anti-fibrosant (Qi et coll., 2014). Ces résultats ont été confirmés dans un modèle *in vitro* dans lequel du TSG-6 recombinant a permis de reproduire partiellement les effets des CSM (Wu et coll., 2014). Dans cette même étude, l'ajout d'un anticorps anti-HGF dans la co-culture a abolit en partie les effets des CSM.

L'impact des CSM sur la voie de signalisation TGF-β1 est un mécanisme important de leur effet anti-fibrosant. Notamment, l'inhibition de cette voie diminue l'activation et l'accumulation des cellules pro-fibrosantes. Les mécanismes à l'origine de cet effet sont mal connus mais des études ont permis de montrer deux voies d'inhibition, par HGF et TSG-6.

c. Hypoxie/stress oxydant

L'accumulation de MEC dans le tissu, la mort des cellules endothéliales et l'augmentation de la quantité de ROS et de RNS induisent des dommages accrus aux cellules résidantes lors de la fibrose. Ces phénomènes entrainent l'augmentation de l'apoptose au sein du tissu et l'activation de la réserve de TGF-β1 latent. L'amélioration de la vascularisation du tissu et une neutralisation accrue des radicaux libres sont ainsi des cibles privilégiées des thérapies anti-fibrosantes.

La capacité des CSM à diminuer le stress oxydant a été mise en évidence dans plusieurs travaux. Premièrement, elles semblent augmenter l'expression et la concentration des enzymes de neutralisation des radicaux libres, tels que NQO1 (NADPH Quinone Oxidoreductase 1), Gr (Glutathione reductase), GPx (Glutathione Peroxidase) et HO-1 (Heme Oxygenase 1) (Chen et coll., 2011, Sun et coll., 2011). L'activation de Nrf2 (Nuclear factor (erythroid-derived 2)-like 2) protège du stress oxydant et induit la production de SOD (Superoxide Dismutase) responsable de la neutralisation des ROS. Dans le foie, la transplantation de CSM induit l'augmentation de la concentration en Nrf2 et SOD (SuperOxide Dismutase) et diminue ainsi la quantité de ROS (Francois et coll., 2014, Ewida et coll., 2016). Dans un modèle de co-culture, une augmentation de la survie des neurones cérébelleux a été corrélée à la sécrétion de SOD3 par les CSM (Kemp et coll., 2010).

Les CSM favorisent également l'angiogenèse. Elles peuvent sécréter une large gamme de facteurs pro-angiogéniques, tels que VEGF, FGF-2 et MCP-1 (Kinnaird et coll., 2004, Hung et coll., 2007, Niu et coll., 2008). Certaines études suggèrent la capacité des CSM à promouvoir la prolifération des cellules endothéliales (Kinnaird et coll., 2004, Rehman et coll., 2004). Après transplantation de CSM sur un modèle de fibrose pulmonaire, une amélioration de la microcirculation, associée à la diminution de l'expression de VEGF, a été observée (Wang et coll., 2012). Une autre étude a montré la stimulation de l'angiogenèse par les CSM (Mias et coll., 2009). La pose de feuilles de CSM sur le myocarde lésé a favorisé la néovascularisation dans un modèle d'infarctus du myocarde (Ishikane et coll., 2013). Les auteurs ont mis en évidence la capacité des CSM à se différencier pour participer à la formation de nouveaux vaisseaux dans ce modèle.

Inversement, l'augmentation de l'expression de VEGF après transplantation, concomitante à la surexpression de HIF-1α (Hypoxia-Inducible Factor-1α), a été montrée dans le rein, indiquant une élévation de l'hypoxie (Ebrahimi et coll., 2013). HIF-1α stimule l'expression de VEGF en conditions hypoxiques. De la même manière, dans un modèle de rectite radio-induite, la surexpression de VEGF était accompagnée d'une diminution de l'expression de l'angiopoïétine et de PDGF (Linard et coll., 2013). Il semble que le défaut d'angiogenèse dans ces modèles soit à l'origine des variations observées. Ces profils d'expression génique sont probablement le reflet des signaux pro-angiogéniques produits par les CSM. L'évaluation de la vascularisation du tissu fibrosé permettrait de mieux caractériser l'effet des CSM sur l'angiogenèse dans ces modèles.

Les CSM sont donc susceptibles d'agir par différentes voies sur l'hypoxie et le stress oxydant : (i) en améliorant la vascularisation (ii) en augmentant l'inactivation des ROS et RNS. Cette dernière propriété contribue également à l'inhibition de l'activation de TGF-β1, dont la forme latente peut être clivée par les ROS.

d. Remodelage matriciel

La production excessive et le défaut de dégradation de la MEC sont les causes principales de la fibrose. En cas de fibrose l'objectif est de restaurer un processus de régénération non-pathologique en inhibant la production de MEC et en activant les systèmes de dégradation. En effet, le déséquilibre entre MMP (Matrix Metalloproteinases), responsables de la dégradation de la MEC, et TIMP (Tissue Inhibitors of Metalloproteinases), leurs inhibiteurs, résulte en un remodelage anormal de la matrice, empêchant ainsi le retour à une matrice non-pathologique.

Une diminution de l'expression et de la concentration en collagène a été observée dans de nombreux modèles de fibrose après transplantation de CSM (Ortiz et coll., 2003, Fang et coll., 2004, Li et coll., 2008, Zhao et coll., 2008, Chang et coll., 2009, Mias et coll., 2009, Moodley et coll., 2009, Semedo et coll., 2009, Tsai et coll., 2009, Rabani et coll., 2010, Asanuma et coll., 2011, Pan et coll., 2011, Qiao et coll., 2011, Zhang et coll., 2011, Alfarano et coll., 2012, Ali et coll., 2012, Wang et coll., 2012, Horton et coll., 2013, Ishikane et coll., 2013, Nasir et coll., 2013, Song et coll., 2013, Ueno et coll., 2013, Baulier et coll., 2014, da Silva et coll., 2015, Moghadasali et coll., 2015). Le même effet est obtenu par transplantation de microvésicules ou d'exosomes issus de cultures de CSM, ce qui suggère une action paracrine sur le remodelage matriciel (Li et coll., 2013, Choi et coll., 2014). Dans le foie, une étude a montré que cet effet est lié à l'activation de l'autophagie, probablement au niveau des myofibroblastes, par les CSM (Park et coll., 2015).

Des changements d'expression et de concentration des MMP et TIMP ont également été observés. Après transplantation, une augmentation de l'expression de MMP-2, MMP-9, MMP-13 et MMP-14 est induite *in vivo* (Semedo et coll., 2009, Rabani et coll., 2010, Wu et coll., 2014). L'ajout de milieu de culture conditionné par les CSM dans une culture de fibroblastes cardiaques induit l'augmentation de l'activité de MMP-2 et MMP-9 (Mias et coll., 2009). A l'opposé, plusieurs travaux ont montré une réduction de l'expression, de la concentration et de l'activité des MMP. Dans un modèle d'ischémie-reperfusion, la transplantation de CSM a entrainé une diminution de l'activité de MMP-2 (Alfarano et coll., 2012). D'autres études ont montré une diminution de l'expression et de la concentration de MMP-2, MMP-9 and MMP-13 (Ortiz et coll., 2003, Li et coll., 2008, Ebrahimi et coll., 2013). Cependant, ces variations semblent aboutir à un retour à des niveaux proches de ceux observés chez les animaux sains.

Il semble que les CSM aient un effet inhibiteur sur l'expression des TIMP, en particulier TIMP-1 (Semedo et coll., 2009, Ali et coll., 2012). Dans une autre étude, la production de l'ensemble des TIMP, 1 à 4, étaient réduite après traitement (Moodley et coll., 2009). Dans un modèle *in vitro,* l'ajout de milieu conditionné par les CSM sur une culture de myofibroblastes cardiaques a induit la diminution de l'expression de TIMP-2 (Mias et coll., 2009). Enfin, le calcul du ratio "collagen-to-MMP-to-TIMP", indicateur de la tendance à l'accumulation/dégradation, a permis de démontrer une tendance à la dégradation suite à la transplantation de CSM dans un modèle d'irradiation rectale (Linard et coll., 2013).

L'expression des MMP et des TIMP est déséquilibrée au cours de la fibrose. La diminution de l'expression des TIMP est généralement associée à la résolution de la fibrose. Dans le cas d'un arrêt cardiaque, une augmentation de l'expression des MMP a été observée dans les phases initiales et

finales (Reinhardt et coll., 2002, Vanhoutte et coll., 2006). Dans le rein, l'augmentation de l'activité de MMP-2 est associée au remodelage pathologique de la matrice (Cheng et coll., 2006).La diminution de l'activité de MMP-2 après transplantation de CSM suggère donc une transition vers un état non-pathologique. A l'inverse, MMP-2 est impliquée dans la régénération alvéolaire, ce qui expliquerait qu'une augmentation de son activité dans le poumon soit associée à un pronostic favorable (Yaguchi et coll., 1998). En outre, étant donné que certaines MMP participent au clivage de la forme latent de TGF-β1, la diminution de la concentration de ces enzymes pourrait limiter l'activation des myofibroblastes. Enfin, les macrophages étant les principaux producteurs de MMP et TIMP, une modification de leur polarisation sous l'influence des CSM expliquerait les variations exposées ci-dessus.

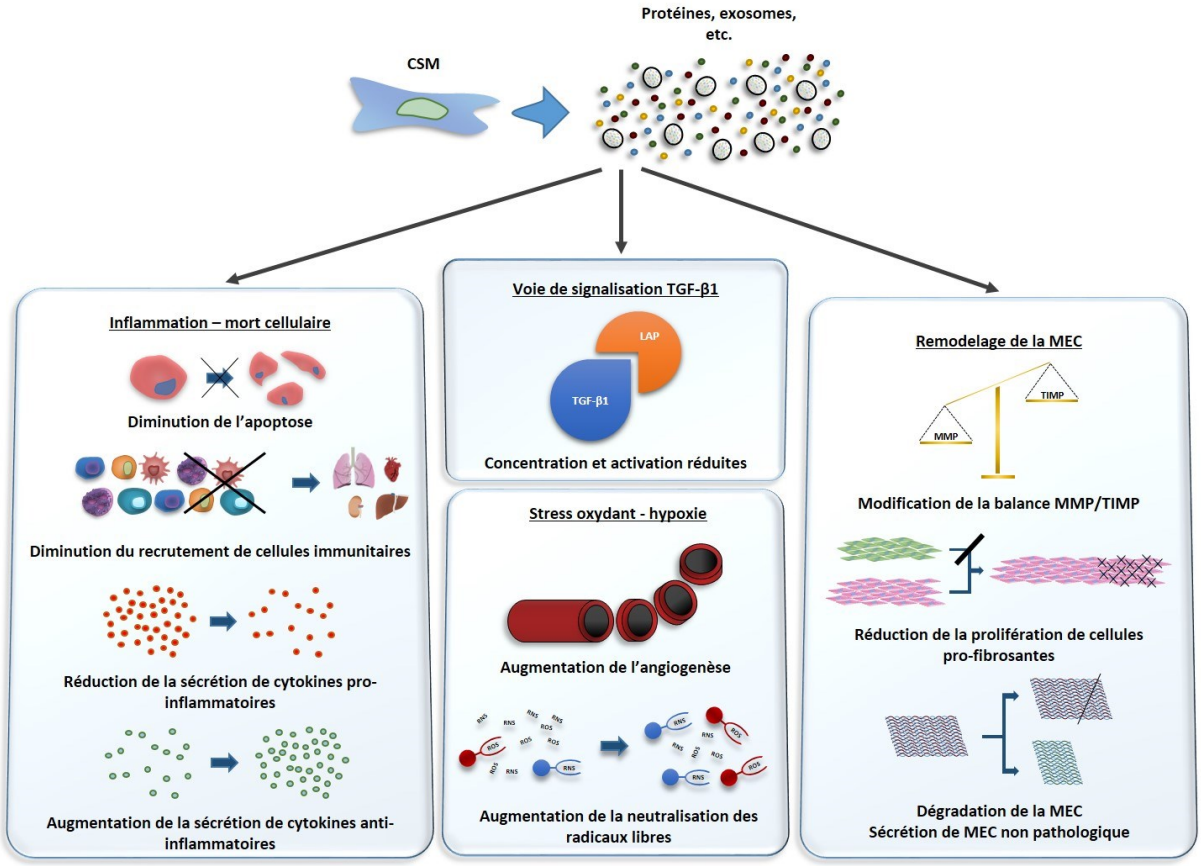


Figure 28 : mécanismes d'action des CSM sur les modèles précliniques de fibrose

La modulation du système MMP/TIMP, associée à la diminution de la surface de fibrose et de la production de composants de MEC (collagènes, fibronectine…) indiquent une modification de la composition de la matrice. Il semble que la matrice nouvellement formée soit de composition proche

de celle observée au sein du tissu non lésé. Ainsi, les CSM améliorent la qualité de la MEC et favorisent la mise en place d'un microenvironnement propice à la régénération du tissu.

e. Modalités de traitement par les CSM

Bien que la transplantation de CSM permette de limiter la fibrose, il n'existe à l'heure actuelle que très peu d'études montrant une réversion complète de la pathologie. Des études ont donc été entreprises pour potentialiser l'effet des CSM selon différentes méthodes :

- La source de CSM
- Le timing d'injection
- La méthode et la voie d'administration
- Le prétraitement des CSM
- Le co-traitement avec une drogue anti-fibrosante
- La transplantation de CSM génétiquement modifiées

Dans le cœur, la transplantation de CSM issues de la membrane fœtale ou de la moelle osseuse a produit les mêmes résultats sur un modèle d'infarctus du myocarde (Ishikane et coll., 2013). Dans des modèles de fibrose pulmonaire ou de sclérose systémique, les CSM isolées de la moelle osseuse et du tissu adipeux ont également induit des résultats similaires (Fikry et coll., 2015, Maria et coll., 2016). Certaines procédures de prélèvement de tissu pour produire les CSM sont très invasives. Le prélèvement de moelle osseuse, par exemple, est une procédure douloureuse. L'utilisation de cellules d'origines différentes, telles que les cellules souches du tissu adipeux, améliore la disponibilité des cellules ainsi que l'impact sur la qualité de vie du donneur. Il est donc primordial de comparer l'efficacité de ces différentes sources. Il semble au vu de ces résultats que l'origine des CSM transplantées n'impacte pas le résultat du traitement. Ces données ont permis aux cliniciens de se tourner notamment vers le tissu adipeux pour ce type de procédures.

L'état d'évolution de la fibrose au moment de la transplantation est également un facteur important à prendre en compte. Plusieurs études ont ainsi eu pour objet de comparer les effets des CSM en fonction du timing d'injection. Dans un modèle d'ischémie-reperfusion, la transplantation de CSM 7 jours après la lésion initiale est plus efficace sur le dépôt de MEC, la prolifération des myofibroblastes et l'activité des MMP que lorsqu'elle est réalisée 14 jours après (Alfarano et coll., 2012). De même, les CSM exercent un effet plus important sur la fibrose pulmonaire lorsqu'elles sont transplantées précocement (Ortiz et coll., 2003).

Récemment, de nouvelles méthodes d'administration ont été proposées afin d'améliorer l'efficacité des CSM en augmentant le nombre de cellules recrutées au niveau de la lésion et la durée de séjour de ces cellules dans le tissu. Des CSM cultivées en feuillets bicouches et transplantées directement sur le tissue lésé dans un modèle d'infarctus du myocarde sont retrouvées 28 jours après transplantation. Certaines de ces cellules présentaient des signes de différenciation et participaient ainsi à la néovascularisation (Ishikane et coll., 2013). En général, la localisation des CSM au niveau de la lésion est transitoire et les cellules sont rarement retrouvées au-delà d'une semaine après transplantation. L'utilisation de biomatériaux ou de matrices permettant le maintien des CSM au site de transplantation améliore, de la même manière, leur efficacité (Le Visage et coll., 2012, Ceccaldi et coll., 2014). La microencapsulation des CSM est un autre procédé favorisant le maintien des cellules dans le tissu fibrosé. Au niveau du rein, des cellules ont été retrouvées jusqu'à 6 mois après transplantation grâce à cette méthode (Meier et coll., 2015).

Le prétraitement des CSM avant transplantation vise à augmenter la survie et l'efficacité des cellules, mais peut également servir à leur pré-différenciation vers un type cellulaire choisi en fonction de l'organe à traiter. Il a été montré que la mélatonine permet d'augmenter la survie des CSM après transplantation et d'améliorer leur effet pro-angiogénique (Mias et coll., 2008, Yip et coll., 2013). Les CSM traitées à la mélatonine produisaient de meilleurs effets que les cellules non traitées, comme le montrent la diminution du dépôt de MEC et de l'inflammation (Mias et coll., 2009, Yip et coll., 2013). Dans un modèle de fibrose hépatique, la pré-différenciation des CSM en hépatocytes par la baicaline offre une meilleure efficacité en termes de réduction de l'inflammation et du stress oxydant (Qiao et coll., 2011). Enfin, le pré-conditionnement des CSM en atmosphère hypoxique a permis d'augmenter l'efficacité des CSM dans un modèle pulmonaire (Lan et coll., 2015).

Des méthodes de co-traitement associant CSM et drogues anti-fibrosantes ont été proposées lors d'études *in vivo*. L'administration d'atorvastatine, utilisé habituellement en prévention des infarctus du myocarde, en plus de la transplantation de CSM, dans un modèle d'infarctus aigu du myocarde, augmente la survie des CSM ainsi que leur efficacité (Song et coll., 2013). Deux études, portant sur des modèles de fibrose rénale et des voies respiratoires, ont montré l'intérêt d'un co-traitement avec la serelaxine, actuellement à l'essai comme médicament vasodilatateur. Cette thérapie a permis de diminuer davantage l'infiltrat inflammatoire et l'étendue du dépôt de MEC. De plus, il a été observé que la serelaxine accroit la prolifération des CSM *in vitro*, ce qui pourrait favoriser la localisation d'un nombre de cellules plus élevé au niveau de la lésion (Huuskes et coll., 2015, Royce et coll., 2015). Enfin, l'administration de lisinopril, un antihypertenseur, potentialise l'effet des CSM dans un modèle de fibrose rénale. L'association des deux traitements a permis de diminuer l'infiltrat

de macrophages et l'apoptose au sein du tissu (Gregorini et coll., 2016). L'exploitation de ces effets de synergie permet d'agir sur une gamme plus large de facteurs pro-fibrosant, et donc d'offrir une meilleure prise en charge des patients.

Enfin, l'utilisation de CSM génétiquement modifiées permet d'augmenter la sécrétion de certains facteurs anti-fibrosant. La transplantation de CSM sur-exprimant HGF induit une diminution plus importante du dépôt de MEC que les CSM non modifiées dans un modèle de fibrose hépatique (Seo et coll., 2014). Il en est de même lorsque des CSM sur-exprimant IGF-1, un facteur de croissance connu pour ses propriétés régénératives. Dans cette étude, les cellules modifiées ont produit un meilleur effet en terme de diminution du dépôt de matrice et de prolifération des myofibroblastes, et ce notamment par l'induction de la production de HGF au sein du tissu (Fiore et coll., 2015). Des CSM modifiées pour exprimer la thiorédoxine-1, une enzyme antioxydante, permettent de réduire davantage le dépôt de MEC et d'améliorer la fonction cardiaque dans un modèle d'infarctus du myocarde (Suresh et coll., 2015).

L'utilisation de la thérapie cellulaire a ouvert de nombreuses questions techniques qu'il est nécessaire de traiter. En particulier, l'optimisation de l'effet du traitement permettrait de réduire les coûts d'hospitalisation en limitant la durée des séjours par la diminution du nombre d'injections de CSM. De plus, il est à l'heure actuelle rare d'observer une réversion du processus de fibrose, notamment dans ses phases les plus avancées. Les connaissances acquises sur le traitement médicamenteux de la fibrose ont permis de proposer des associations de thérapeutiques potentialisant l'effet des CSM. La localisation des CSM en nombre plus important et sur une plus longue durée au niveau du tissu fibrosé améliore leur effet. L'emploi de biomatériaux ou de microcapsules suscite donc un intérêt croissant. Ainsi, de nombreux paramètres, en plus de la quantité de cellules et du nombre d'injections, doivent être pris en compte lors de la mise en place d'un protocole de thérapie cellulaire.

Tableau 9 : voies d'action des CSM sur les modèles de fibrose précliniques

Mode d'action	Mécanisme	Références
Immunomodulation	Diminution de l'infiltrat inflammatoire Changement de polarité des macrophages : M1 -> M2 Diminution de l'expression et de la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires (TNF-α, IL-1, IL-6…) Diminution de l'apoptose	Linard et coll., 2013 Zhou et coll., 2013 Semedo et coll., 2009 Horton et coll., 2013
Inhibition de la voie TGF-β1	Diminution de l'expression et de la sécrétion de TGF-β1 Diminution de l'activation de la voie Smad Diminution du nombre de myofibroblastes	Ueno et coll., 2013 Wu et coll., 2014 Jang et coll., 2014 Li et coll., 2013
Pro-angiogénique/anti-oxydant	Augmentation de l'expression et de la sécrétion des enzymes antioxydantes (NQO1, HO-1, SOD…) Effet pro-angiogénique : augmentation de VEGF et FGF-2 Augmentation de la prolifération des cellules endothéliales	Chen et coll., 2011 Kinnaird et coll., 2004 Niu et coll., 2008 Kinnaird et coll., 2004
Remodelage matriciel	Diminution de l'expression et de la production des composants de la MEC Rééquilibrage de la balance MMP/TIMP	Moodley et coll., 2009 Mias et coll., 2009 Ebrahimi et coll., 2013

f. HGF et TSG-6 participent à l'effet anti-fibrosant des CSM

Les CSM produisent une large gamme de facteurs solubles responsables de leurs effets. L'étude de la littérature concernant l'effet des CSM sur la fibrose nous a permis d'identifier deux facteurs solubles participant à ces effets : HGF et TSG-6.

i. HGF

HGF est un facteur pléiotropique paracrine sécrété par les cellules mésenchymateuses, en particulier les hépatocytes, sous forme inactive (pro-HGF). Elle est activée par clivage protéolytique par différentes protéases : HGFA (HGF Activator), uPA (urokinase-type Plasminogen Activator), la kallikreine plasmatique, les facteurs de coagulation XI et XXI, TMPRSS13 (transmembrane protease serine S1 member 13), la matriptase et l'hepsine.

Le récepteur à HGF, c-Met, est exprimé par les cellules épithéliales et endothéliales (Panganiban et Day). HGF active sa propre expression de manière autocrine (Liu, 2004). La transduction du signal HGF induit diverses réponses biologiques incluant la migration, la prolifération et la

morphogénèse (Rubin et coll., 1993). Chez l'adulte, la fonction principale de HGF est la régénération tissulaire (Matsumoto et Nakamura, 1993). La voie HGF-Met permet la protection et la régénération dans différents tissus : rénal, pulmonaire, nerveux, cardiovasculaire, cutané et gastro-intestinal. L'activation de cette voie prévient l'inflammation et le développement de la fibrose dans le tissu (Nakamura et coll.).

L'expression de HGF est augmentée dans de nombreuses pathologies, notamment inflammatoires. Chez les patients souffrant de MICI, une concentration élevée de HGF est observée dans le sérum, associée à une augmentation de l'expression de HGF et c-Met dans la muqueuse (Srivastava et coll., 2001). L'administration de HGF exerce un effet bénéfique sur des modèles animaux de rectocolite hémorragique (Tahara et coll., 2003, Numata et coll., 2005). Cette amélioration est caractérisée par une régénération épithéliale accrue permettant de limiter la perte de poids associée à cette pathologie. Il semble que les propriétés immunosuppressives de HGF soient à l'origine de ses effets anti-fibrosantes et régénératifs. L'expression faible de HGF au cours de la fibrose dans de nombreux tissus (poumon, rein, cœur…) pourrait expliquer en partie l'impossibilité de régénérer le tissu (Taniyama et coll., 2000, Yang et coll., 2002, Marchand-Adam et coll., 2003).

Effet immunosuppresseur

La voie HGF/c-Met est impliquée dans l'hématopoïèse et l'immunité. HGF exerce une action immunomodulatrice en diminuant l'infiltration des cellules inflammatoires et en inhibant l'expression de plusieurs cytokines pro-inflammatoires (TNF-α, IFN-γ, MCP-1 et IL-12β). Le fait que l'expression de HGF soit augmentée par les cytokines pro-inflammatoires IL-1α, IL-1β, TNF-α et IFN-γ supporte ce rôle anti-inflammatoire (Matsumoto et coll., 1992). De même, l'expression de HGF est inhibée par les composés anti-inflammatoires, tels que la dexaméthasone et le TGF-β1 (Takai et coll., 1997).

Dans le compartiment hématopoïétique, c-Met est exprimé par les cellules B, monocytes/macrophages et cellules dendritiques, ainsi que par leurs progéniteurs (Molnarfi et coll., 2015). Ainsi, l'axe HGF/c-Met est notamment impliqué dans l'activation des monocytes/macrophages, le homing des lymphocytes B et la modulation de la fonction des cellules dendritiques.

Monocytes/macrophages

HGF intervient dans la régulation de la fonction des monocytes/macrophages. Ainsi, une augmentation de l'expression de c-Met a été observée dans les monocytes activés (Beilmann et coll., 1997). La sécrétion de HGF par les macrophages suggère également la possibilité d'un effet autocrine (Yamada et coll., 1998). HGF induit la migration ainsi que la production de cytokines telles que IL-4, IL-1β, M-CSF et GM-CSF par les monocytes (Beilmann et coll., 2000).

HGF semble produire un effet différent selon la polarisation des macrophages. L'activation de c-Met stimule la prolifération des macrophages classiquement activés (Moransard et coll., 2010). En revanche, des études suggèrent l'inhibition de l'activation des macrophages vers la polarisation M1. En effet, HGF supprime l'expression de RANTES induite par NF-κB (Nuclear Factor-kappa B) (Giannopoulou et coll., 2008). Cet effet résulte de la phosphorylation et l'inactivation de GSK-3β (Glycogen Synthase Kinase-3β) induits par l'activation de la voie PI3K/Akt. Giannopoulou et coll. rapportent que cette action est produite au niveau transcriptionnel, aucune différence n'ayant été observée dans la phosphorylation et la dégradation de IκBα, ni dans la phosphorylation et la translocation nucléaire de p65 NF-κB, nécessaires à l'activation des cibles de NF-κB (Giannopoulou et coll., 2008). A l'inverse, Bendinelli et coll. attribuent l'inhibition de la voie NF-κB à une augmentation de l'expression de IκBα, favorisant ainsi le maintien de p65 dans le cytoplasme (Bendinelli et coll., 2010). L'inhibition de RANTES, impliqué notamment dans le recrutement des leucocytes (cellules T, éosinophiles, basophiles), supporte l'effet anti-inflammatoire de HGF. D'autre part, la suppression de l'activation de p65 pourrait limiter l'acquisition de la polarité M1 par les macrophages.

Cellules dendritiques

HGF intervient dans le recrutement et la régulation de la fonction des cellules dendritiques. La suppression de la voie HGF/c-Met inhibe le recrutement des cellules dendritiques dans différents organes (Scarpino et coll., 2000, Baek et coll., 2012). Chez la souris, HGF inhibe l'activation des cellules dendritiques (Singhal et Sen, 2011) ou induit une activité suppressive favorisant la tolérogénicité, notamment par la promotion de la réponse T régulatrice (Benkhoucha et coll., 2010). HGF induit la production de l'IL-10 par les cellules dendritiques et une action autocrine d'inhibition de leurs fonctions (Rutella et coll., 2006). L'activation de la voie PI3K/Akt par HGF participe à la régulation de la fonction des cellules dendritiques (Singhal et coll., 2011) en supprimant l'activation de NF-κB.

Autres cellules immunitaires

L'effet de HGF sur les cellules T est mal connu. Dans une culture de thymus fœtal de souris, HGF induit une augmentation du nombre de lymphocytes T matures (Tamura et coll., 1998). L'expression de c-Met est élevée dans le thymus fœtal de 14 jours et à la naissance et chute à 1 semaine, suggérant un rôle de HGF lors du développement de certains organes lymphoïdes (Tamura et coll., 1998) ainsi que dans l'adhésion et la migration des lymphocytes T mémoire (Adams et coll., 1994). Chez la souris, le traitement du thymus par HGF améliore la maturation des lymphocytes T.

L'implication de HGF dans la régulation de la fonction des cellules B est mise en évidence par l'augmentation de la production d'anticorps dans une culture de splénocytes murins traités par HGF (Delaney et coll., 1993).Il semble que HGF sécrété par les cellules souches folliculaires régule la croissance, la survie et l'adhésion des lymphocytes B ainsi que leurs interactions avec le stroma (Molnarfi et coll., 2015).

HGF augmente la production de ROS chez les neutrophiles (Jiang et coll., 1992). Il stimule l'adhésion des neutrophiles aux cellules endothéliales et leur transmigration par un mécanisme dépendant de la voie PI3K/Akt (Mine et coll., 1998). Les neutrophiles produisent HGF dans un contexte inflammatoire. Ce mécanisme pourrait participer au recrutement de nouveaux neutrophiles et donc à la perpétuation de l'inflammation et/ou à la régénération du tissu.

Il existe peu de données sur le rôle de HGF sur la fonction des cellules NK. Chez le rat, l'administration de HGF réduit l'activité cytotoxique des NK (Francavilla et coll., 1997).

Voie TGF-β1/Smad

Suite à une lésion, l'expression de TGF-β1 et HGF sont induites afin de supporter la réparation et la régénération tissulaire. HGF et TGF-β1 inhibent leur expression respective, suggérant une régulation réciproque nécessaire à la résolution de la lésion.

HGF inhibe l'activation des fibroblastes interstitiels en myofibroblastes en bloquant la translocation de Smad-2/3 activé vers le noyau (Yang et coll., 2003). Dans les cellules mésangiales, il stabilise et induit l'expression du corépresseur transcriptionnel de Smad-2/3, TGIF (Transforming Growth Interacting Factor), qui agit en formant un complexe inactif avec Smad-2/3 et bloque l'expression de α-SMA induite par TGF-β1 (Dai et Liu, 2004). Dans les cellules épithéliales tubulaires, il bloque l'EMT en induisant la surexpression de SnoN, corépresseur transcriptionnel formant un

complexe inactif avec Smad-2/3 (Liu, 2004, Yang et coll., 2005). L'inhibition de la voie TGF-β/Smad permet de limiter l'expression des composants de la MEC, tels que le collagène et la fibronectine (Mizuno et Nakamura, 2004). Cet effet dépend de l'inhibition de l'induction de l'ILK (Integrin-Linked Kinase) par TGF-β1.

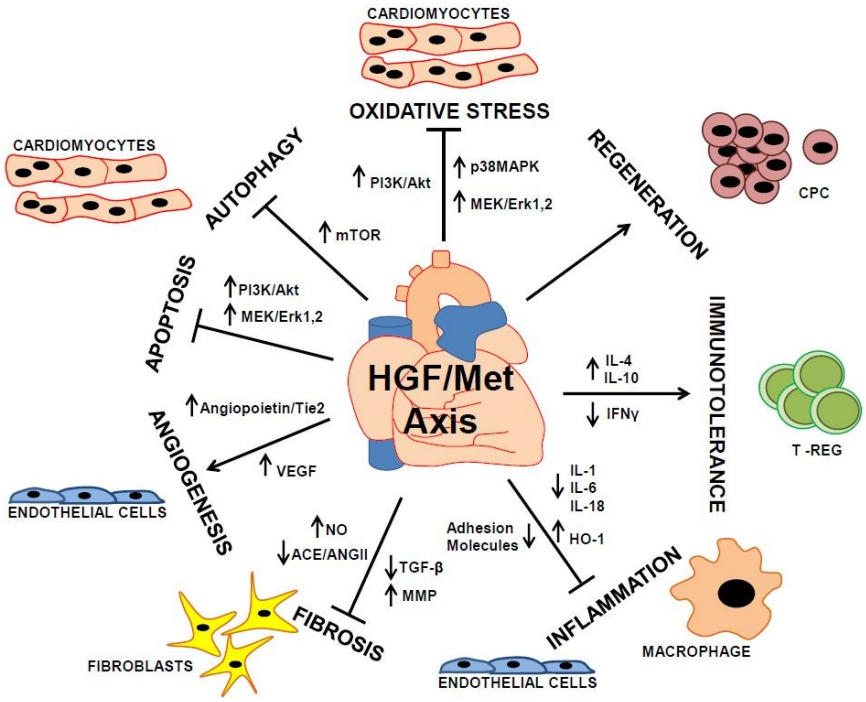


Figure 29 : mécanismes d'action du HGF (D'après Gallo et coll., 2015) (Gallo et coll., 2015)

Effet anti/pro-apoptotique

HGF inhibe l'apoptose dans différents types cellulaires, dont les cellules épithéliales (Liu, 1999) et musculaires (Kitta et coll., 2003). Cet effet dépend de deux mécanismes complémentaires. D'une part, l'activation de la voie PI3K/Akt induit l'inhibition de l'expression du facteur pro-apoptotique BAD (Bcl-2-Associated Death promoter) (Liu, 1999). D'autre part, l'activation de ERK 1/2 induit la phosphorylation de GATA-4, favorisant ainsi l'expression de la protéine anti-apoptotique Bcl-xL (Kitta et coll., 2003).

A l'inverse, HGF peut induire l'apoptose des myofibroblastes par un effet dépendant des MMP. Au cours de la fibrose pulmonaire, l'administration de HGF induit l'augmentation de l'activité de MMP-2 et MMP-9, résultant en une augmentation de la dégradation de la fibronectine et de l'apoptose des myofibroblastes. L'inhibition des MMP induit un effet opposé (Mizuno et coll., 2005). Cet effet est en

accord avec les mécanismes de progression de la fibrose, étant donné la nécessité de l'ancrage à la fibronectine pour la différenciation des myofibroblastes.

ii. TSG-6

Le TSG-6 ou tnfaip6 (TNF-induced protein 6) est une protéine de 35 kDa originellement identifiée dans une culture de fibroblastes humains traités au TNF-α. Il est composé de deux domaines, Link et CUB, possédant des propriétés distinctes. Il est sécrété dans de nombreux tissus en réponse à des médiateurs de l'inflammation, majoritairement le TNF-α. Il est donc détectée dans les cas de pathologies inflammatoires (Wisniewski et Vilcek, 2004).Il est également détecté dans les situations de remodelage de la MEC. Le TSG-6 interagit avec une grande variété de glycosaminoglycanes (GAG) et de ligands protéiques dont la hyaluronane (HA), la chondroïtine-4-sulfate (C4S), l'héparine, IαI (inter-α-inhibitor), la versicane, l'agrécane, la thrombospondine-1 (TSP1) et la pentaxine-3 (PTX3 ou TSG-14) (Milner et coll., 2006). Le TSG-6 n'est pas exprimé en conditions physiologiques à l'âge adulte mais son expression peut être induite dans de nombreux types cellulaires, dont les CSM, par des médiateurs de l'inflammation tels que l'IL-1, le TNF-α, les LPS et le PGE2 (Getting et coll., 2002).

TSG-6 et hyaluronane

Le TSG-6 possède plusieurs activités anti-inflammatoires distinctes, notamment par son interaction avec la HA. La HA possède des propriétés immunomodulatrices différentes en fonction de son poids moléculaire. Les polymères de HA de haut poids moléculaire peuvent par exemple favoriser l'effet suppresseur des cellules T régulatrices (Bollyky et coll., 2007). A l'inverse, la HA de faible poids moléculaire est considérée comme pro-inflammatoire, en particulier par sa capacité à activer CD44, TLR2 et TLR4 (Stern et coll., 2006).

Une autre propriété intéressante de TSG-6 est sa capacité à transférer une chaine lourde de IαI (Inter-α-Inhibitor) sur HA (Sanggaard et coll.). Ce mécanisme confère à la HA de haut poids moléculaire des caractéristiques pro-inflammatoires par la formation de câbles de HA adhérents aux leucocytes (Albeiroti et coll., 2015). Wisniewski et al ont observé une inhibition de la plasmine 100 fois plus importante en présence du complexe TSG-6/IαI qu'avec IαI seul (Wisniewski et coll., 1996). Glant et coll. ont suggéré que l'inhibition de la plasmine et d'autres sérines protéases par TSG-6 permettrait d'inhiber l'activation des MMP (Glant et coll., 2002). Ces interactions entre TSG-6 et HA sont à l'origine de l'augmentation de l'adhésion des leucocytes au niveau des voies aériennes chez les patients

asthmatiques ou dans le fluide synovial au cours de l'arthrite rhumatoïde (Abbadi et coll., 2016). L'exposition aux allergènes augmente l'expression de TSG-6 par les cellules épithéliales des voies aériennes (Lilly et coll., 2005). La présence de HA de haut PM est également due à la capacité de HA à induire la formation d'oligomères de TSG-6 se liant ensuite aux fragments de HA pour les interconnecter et former ainsi un réseau (Baranova et coll.).

Initialement, l'implication de HA dans la fibrose a été suggérée par l'augmentation de sa concentration dans le fluide de lavage bronchoalvéolaire de patients atteints de fibrose pulmonaire idiopathique (Bjermer et coll., 1989). Il a été par la suite démontré que le TGF-β stimule la production de HA dans différentes populations de fibroblastes (peau, poumon…) (Dubaybo et Thet, 1990, Ellis et Schor, 1996). D'autres facteurs pro-fibrosant, dont PDGF, EGF et FGF-2 induisent des effets similaires (Heldin et coll., 1989). D'autre part, après une lésion rénale, l'inhibition de la production de HA réduit significativement la fibrose (Kato et coll., 2011).

TSG-6 et fibrose

Il semble que l'activation de la voie MAPK par le TGF-β soit à l'origine de la surexpression et de l'augmentation de l'activité de la Hyaluronan Synthase (HAS) responsable de la formation de la HA (Stuhlmeier et Pollaschek, 2004). HA promeut la migration et le recrutement des fibroblastes et macrophages par l'activation du récepteur RHAMM (HA-Mediated Motility receptor) (Tolg et coll., 2012), participant ainsi à l'inflammation et à la fibrogénèse. Cet effet est supprimé par le blocage de CD44 (Ito et coll., 2004), suggérant la nécessité de l'interaction de HA avec les deux récepteurs pour activer la migration. HA participe à la stimulation de la différenciation myofibroblastique. L'inhibition de la production de HA entraine la suppression de la surexpression de α-SMA induite par le TGF-β (Kato et coll., 2011). De plus, la concentration en HA semble déterminante dans l'effet du TGF-β sur la prolifération des fibroblastes. Le TGF-β stimule la prolifération des fibroblastes dermiques, qui expriment des niveaux élevés de HA. A l'inverse, il inhibe la prolifération des fibroblastes oraux, produisant de faibles quantités de HA (Meran et coll., 2008). Ce mécanisme dépend de l'expression de CD44 ainsi que de son interaction avec EGFR. L'implication de HA/CD44/EGFR est également nécessaire à la différenciation myofibroblastique des fibroblastes (Midgley et coll., 2013).

Certaines études mettent en évidence un effet opposé de HA. Dans le poumon, Evanko et coll. ont montré que l'inhibition de la synthèse de HA, ou la perturbation des interactions HA-MEC, induisaient une augmentation du dépôt de collagène et de fibronectine ainsi que de l'expression de α-

SMA (Evanko et coll., 2015). D'autre part, en inhibant l'activation des MMP, TSG-6 pourrait favoriser l'augmentation du dépôt de matrice au sein du tissu (Glant et coll., 2002).

Dans un modèle d'inflammation du mésentère chez la souris, Cao et coll. ont observé l'inhibition des interactions entre leucocytes et cellules endothéliales sous l'effet de TSG-6 (Cao et coll., 2004). Plus particulièrement, le module Link de TSG-6 interviendrait en inhibant l'adhésion, le roulement et la diapédèse des leucocytes vis-à-vis de l'endothélium. Cette hypothèse est confortée par l'inhibition de la migration des neutrophiles par le module Link de TSG-6, indépendamment de HA (Getting et coll., 2002).

TSG-6 et macrophages

Choi et coll. ont étudié l'interaction de TSG-6 avec CD44 exprimé par les macrophages dans un modèle de péritonite induite par le zymosane. Les résultats de cette étude indiquent que la fixation de TSG-6 sur CD44 inhibe la voie de signalisation NF-κB induite par l'activation de TLR2 par le zymosane (Figure 30). Cet effet de TSG-6 permet de limiter l'activation des macrophages en M1 au profit de la polarisation M2. La diminution de la concentration TNF-α dans le tissu induit une inhibition de l'activation des cellules mésothéliales qui en retour sous-expriment IL-6, IL-8 et CCL2 (Choi et coll., 2011). A l'inverse, les polymères de HA de faible PM sont capables d'activer NF-κB en stimulant CD44 et TLR2 (Hanabayashi et coll., 2016) et pourrait ainsi favoriser la polarisation M1 des macrophages.

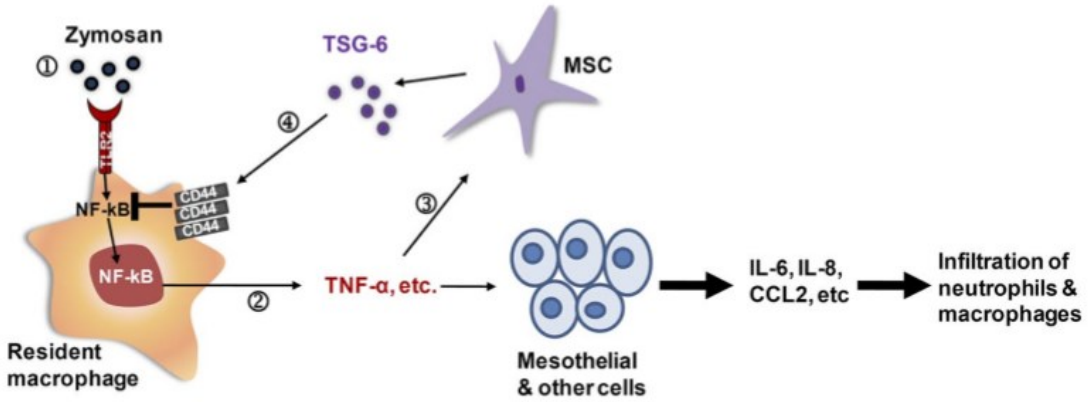


Figure 30 : mécanisme d'action du TSG-6 sur les macrophages (D'après Choi et coll., 2011) (Choi et coll., 2011)

TSG-6 et CSM

Le TSG-6 constitue un candidat intéressant dans les méthodes de thérapie cellulaire par les CSM. Dans un modèle de dommage à la cornée induit par un traitement à l'éthanol absolu et l'excision de l'épithélium de la cornée et du limbe, Roddy et coll. ont montré que les CSM exerçaient un effet anti-inflammatoire matérialisé notamment par la diminution de l'infiltration des neutrophiles et de l'expression de cytokines pro-inflammatoires (IL-1β, CCL2 et CCL3). Un jour et 3 jours après injection, les CSM n'étaient pas détectable dans la cornée des animaux traités, indiquant un effet à distance. L'injection de TSG-6 recombinant a permis d'obtenir un effet proche de celui obtenu avec les CSM et le traitement des CSM par un siRNA contre le TSG-6 a fortement limité leur effet. Ces résultats indiquent que la sécrétion de TSG-6 par les CSM constitue un facteur majeur dans leur effet anti-inflammatoire et leur permet d'agir à distance lorsqu'elles ne sont pas localisées dans le tissu atteint (Roddy et coll., 2011).

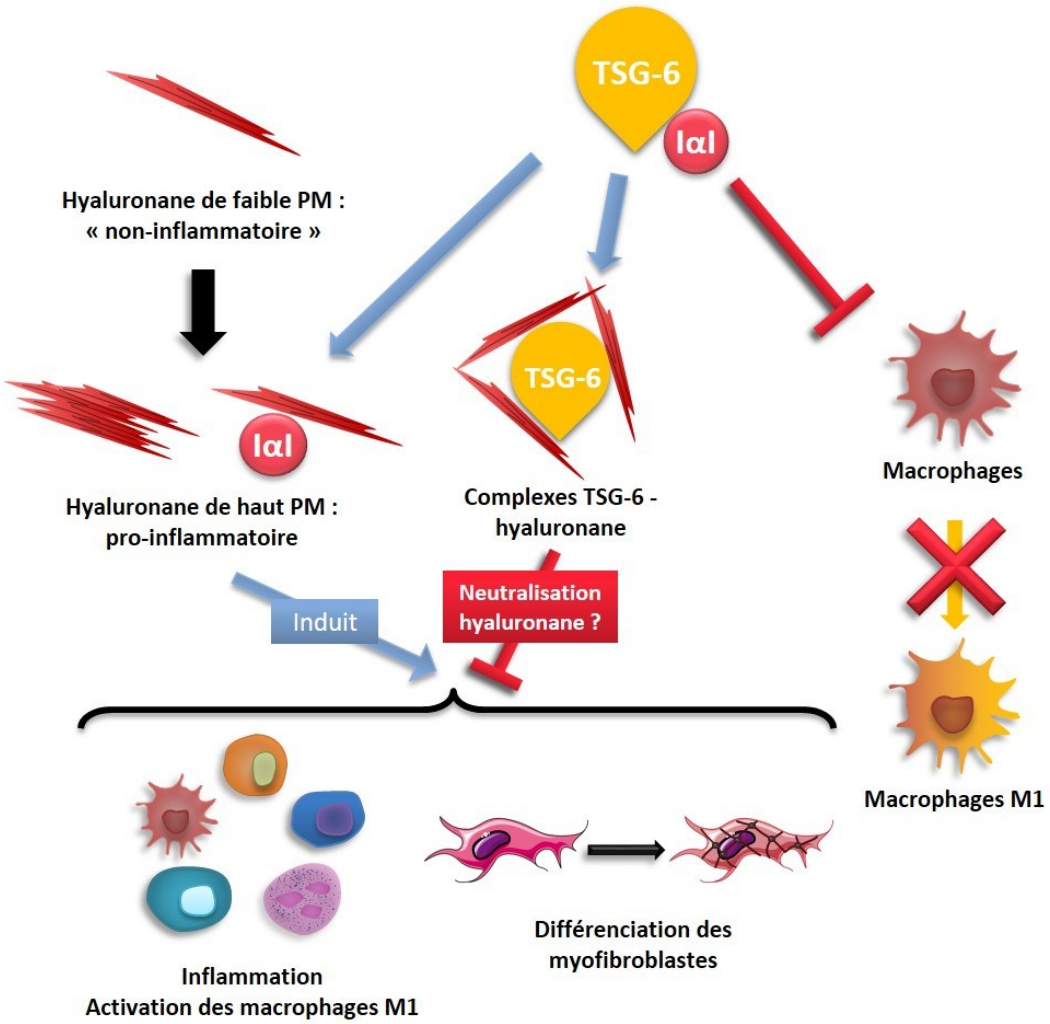


Figure 31 : mécanismes d'action supposés du TSG-6 sur la fibrose

Cependant, les propriétés pro-inflammatoires du HA doivent être prises en considération. En effet, il semble que le TSG-6 ne puisse exercer son action anti-inflammatoire qu'en l'absence de formation de complexe avec IαI et la HA. De tels complexes peuvent en effet induire l'activation de CD44, notamment au niveau des fibroblastes, et activer la différenciation des myofibroblastes. L'état du HA dans le tissu (faible ou haut PM, lié à la MEC ou non) semble donc déterminant dans l'effet de TSG-6.

2. Essais cliniques de traitement de la fibrose par les CSM

Près de 100 essais cliniques sont actuellement enregistrés pour l'évaluation de l'effet des CSM sur la fibrose (http://clinicaltrials.gov). La fibrose du foie et du poumon sont les plus représentées du fait de leur incidence et de la migration préférentielle des CSM vers ces organes. Des essais cliniques sur le rein, le cœur, les cordes vocales, la mucoviscidose, entre autres, sont également en cours. Dans la plupart de ces études, seule la fonctionnalité de l'organe est évaluée et non des marqueurs de la fibrose. Ainsi, il est difficile de déterminer si les effets bénéfiques observés après transplantation de CSM sont dus à la suppression de la fibrose ou à l'amélioration d'autres paramètres.

Les CSM dérivées de moelle osseuse améliorent la fonction hépatique chez les patients atteints de cirrhose, comme démontré lors de plusieurs essais cliniques de phase I (Mohamadnejad et coll., 2007, Kharaziha et coll., 2009, Zhang et coll., 2012). Le score du « Model for End-stage Liver Disease (MELD) » permet d'évaluer le risque de mortalité pour les patients souffrant d'insuffisance hépatique en phase terminale (Kamath et coll., 2001). Les CSM induisent des modifications résultant en la diminution de ce score, comparé au placebo. Dans le cas de la cirrhose décompensée, les CSM améliorent significativement la qualité de vie, comme indiqué par l'augmentation des résultats sur les échelles physiques et mentales (Mohamadnejad et coll., 2007) ainsi que du questionnaire SF-36 sur la qualité de vie (Ware et Sherbourne, 1992). Les CSM prédifférenciées en hépatocytes avant transplantation améliorent la fonction hépatique chez les patients atteints d'insuffisance hépatique (Kharaziha et coll., 2009). Durant un autre essai de phase I, les marqueurs de fibrose ont été mesurés chez 30 patients atteints de cirrhose (Zhang et coll., 2012). La laminine, l'acide hyaluronique et le collagène de type IV étaient significativement réduits 48 semaines après intervention. Chez ces patients, la fonction hépatique était améliorée. Ces résultats peuvent en partie être expliqués par l'augmentation de la concentration en HGF dans le sérum des individus traités.

Un essai de phase I a montré la capacité des CSM à réduire l'allogreffe après transplantation rénale (Reinders et coll., 2013). Cet effet est associé aux propriétés immunomodulatrices des CSM ainsi qu'à leur capacité, dans ce cas, à prévenir l'apparition de fibrose interstitielle. L'absence de placébo lors de cet essai empêche l'identification des effets spécifiques des CSM. Il est donc nécessaire de récolter plus de données sur ce type de thérapie.

La thérapie cellulaire par les CSM est également efficace sur les complications des infarctus aigus du myocarde (Hare et coll., 2009, Hare et coll., 2012). Dans un premier essai, les tests fonctionnels ont montré une amélioration des fonctions cardiaques et pulmonaires. Les signes de remodelage matriciel observés après transplantation lors de cette étude suggèrent l'inhibition de la fibrogénèse par les CSM (Saito et coll., 2010). 6 mois après traitement, les scores symptomatiques globaux étaient significativement meilleurs chez les patients transplantés, comparés au groupe placebo (Hare et coll., 2009). Lors du second essai, les CSM ont induit une diminution des symptômes associés à la cardiomyopathie ischémique. Les signes de remodelage reverse et de diminution de la taille de l'infarctus suggèrent la suppression de la fibrogénèse (Hare et coll., 2012).

Quatre patients sur-irradiés d'Épinal ont bénéficié de transplantations de CSM suite à un accident de radiothérapie du cancer de la prostate. L'administration de CSM a permis de diminuer les saignements, la fréquence des diarrhées et la douleur (Chapel et coll., 2013). Ces résultats soulignent le potentiel des CSM à limiter les effets secondaires des radiothérapies et, possiblement, la fibrose radio-induite.

Les résultats de ces études cliniques démontrent l'innocuité et l'efficacité de la thérapie par les CSM sur les patients atteints de pathologies fibrosantes. Aucun effet secondaire n'a été observé, si ce n'est des fièvres sans gravité. Il est néanmoins nécessaire de réaliser des études cliniques randomisées sur de plus grands effectifs pour démontrer le potentiel anti-fibrosant des CSM. De plus, les mécanismes mis en place par les CSM doivent être élucidés pour permettre leur utilisation en routine.

Problématique et objectifs

Le cancer est l'une des principales causes de mortalité dans le monde, et son incidence a fortement augmenté au cours des 30 dernières années. L'amélioration des méthodes de diagnostic et de traitement des tumeurs a permis d'augmenter la survie des patients de manière significative. Néanmoins, les traitements anti-cancéreux actuels peuvent induire des effets secondaires lourds. En particulier, la radiothérapie provoque des dommages aux tissus sains environnant la tumeur, qui peuvent entrainer des complications jusqu'à plusieurs dizaines d'années après la fin du traitement. La sphère abdomino-pelvienne est le foyer de cancer le plus fréquent, et contient plusieurs organes à risque lors de la radiothérapie. Le côlon et le rectum sont particulièrement radiosensibles et concentrent une part importante des complications des radiothérapies abdomino-pelviennes. La principale séquelle tardive des radiothérapies est la fibrose, pour laquelle il n'existe pas de traitement efficace.

La thérapie cellulaire par transplantation de CSM, cellules aux propriétés immunomodulatrices et régénératives démontrées, semble être une alternative prometteuse aux traitements actuellement proposés aux patients souffrant de complications tardives des radiothérapies. Des études précliniques et cliniques ont permis de montrer l'efficacité des CSM dans le contexte de brûlures radiologiques ou au cours de pathologies fibrotiques. Il reste cependant des interrogations sur l'innocuité de ce type de traitement, en particulier concernant le potentiel CSM à promouvoir la croissance tumorale ainsi que les mécanismes inducteurs des effets secondaires tardifs des radiothérapies. En outre, il existe peu de données sur l'effet des CSM sur la fibrose colorectale radio-induite. Les travaux réalisés au sein de notre laboratoire ont montré un effet bénéfique de la transplantation de CSM sur différents modèles animaux de lésions radio-induites au côlon et au rectum.

Les travaux présentés dans la suite de ce manuscrit se sont articulés selon deux axes principaux :

- L'effet des CSM sur l'évolution de la tumorigénèse colorectale, avant et après radiothérapie et mettre en évidence les mécanismes d'action de ces CSM sur la tumeur dans un modèle de carcinogénèse colorectale chimio-induite chez le rat.
- L'effet des CSM sur les complications tardives des radiothérapies abdomino-pelviennes, en particulier sur la fibrose colorectale sur un modèle d'irradiation colorectale en dose unique, également chez le rat.

Article 1 : Mesenchymal stem cell administration inhibits colorectal cancer progression and promotes survival: mechanism of action and rationale for clinical use

Le nombre de cancer dans le monde atteindra 20 millions en 2025 et 60% seront traité par radiothérapie. Cependant 5% des patients développeront des séquelles tardives graves. Pour ces patients le traitement demeure limité à un management des symptômes, c'est pourquoi de nouvelles alternatives doivent-être proposées. L'administration de CSM a démontré son efficacité dans le traitement des lésions intestinales similaires à celles rencontrées dans les complications chroniques sévères des radiothérapies abdomino-pelviennes. Une méta-analyse sur 36 essais cliniques utilisant des CSM n'a pas montré d'effet secondaire cependant de nombreux essais précliniques ont montré la dualité des CSM qui possèdent à la fois des propriétés pro et anti-tumorales. Ces résultats sont hautement dépendant des modèles utilisés.

Dans le cadre du traitement des complications sévères des radiothérapies pelviennes nous nous sommes intéressés aux effets secondaires que pourraient induire un traitement par les CSM notamment au niveau du cancer colorectal. Afin de répondre à cette question nous avons développé chez le rat un modèle de cancérogénèse colorectale similaire à celle de l'homme et étudié l'influence de la transplantation de CSM sur l'évolution de cette cancérogénèse. Dans un second temps après avoir généré des tumeurs, les animaux ont subi une stérilisation tumorale par radiothérapie. Deux semaines plus tard les animaux ont reçu trois injections de CSM. L'influence des CSM a été étudiée à la fois sur la tumorisation et sur la réparation du tissu sain irradié.

Le traitement local par un agent alkylant (MNNG) induit des lésions de la muqueuse dans les premières semaines suivi de l'apparition d'adénomes à 32 semaines et d'adénocarcinomes à 52 semaines. L'injection de CSM dans les premières semaines permet de diminuer les lésions principalement par une régulation de l'inflammation. La conséquence est une diminution de l'initiation de la cancérogénèse colorectale, cela se traduit par un nombre moins important de tumeur chez les animaux ayant reçu un traitement par les CSM. A des temps plus tardif les CSM inhibent le développement de la cancérogénèse colorectale en modifiant le microenvironnement tumoral au

niveau de la composante inflammatoire. À terme le traitement par les CSM permet d'augmenter la survie des animaux.

Après radiothérapie une diminution du nombre et de la taille des tumeurs est observée Ce phénomène est accrut par l'injection de CSM après irradiation. Une modification immunitaire dans l'environnement tumoral a été observée notamment par une augmentation du phénotype Th1 des lymphocytes CD3+. Au niveau du tissu sain irradié la transplantation de CSM permet une protection du colon impliquant une sécrétion locale d'HGF, VEGF et TFF3. Au final, la transplantation de CSM permet l'accroissement notable de la survie.

Il existe un antagonisme entre la présence très transitoire des CSM exogènes et leur effet durable sur la cancérogénèse colique que ce soit avec ou sans radiothérapie. Ce phénomène pourrait être expliqué par une reprogrammation durable des CSM résidentes et des macrophages endogènes. L'ensemble de ces résultats suggèrent que les CSM modulent durablement l'environnement immunitaire tumoral. La conséquence est une inhibition de la progression du cancer colorectal ainsi qu'une protection du tissu sain des séquelles des radiothérapies.

Cette étude a permis de s'assurer que l'utilisation des CSM pour le traitement des complications chroniques sévères des radiothérapies abdomino-pelviennes est sans effet secondaire en ce qui concerne la tumorisation et est un traitement prometteur des complications chroniques sévères des radiothérapies abdomino-pelviennes.

Reprogramming by Mesenchymal Stem Cells Inhibits Colorectal Cancer Progression and Preserves Tissue Integrity after Radiotherapy

***Sabine François[1,2,3], *Benoit Usunier[1], Marie-Elisabeth Forgue-Lafitte[4,5], Thi Cam Ha Che[5], Bruno L'Homme[1], Sandrine Bouchet[2], Fahd Hached[3,4], Djaber Benaoumeur[3,4], Marc Benderitter[1], Luc Douay[2,3,6], Norbert-Claude Gorin[2,3,6], **Annette K. Larsen[4,5], *Alain Chapel[1,2,3]**

[1]Laboratory of Research on Irradiated Healthy Tissues Regeneration (LR2I), Institute for Radiological Protection and Nuclear Safety (IRSN), F-92260 Fontenay-aux-Roses, France

[2]Proliferation and Differentiation of Stem Cells, Centre de Recherche Saint-Antoine (CRSA), Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM) U938, Paris, France

[3]Université Pierre et Marie Curie (UPMC), Sorbonne Universités, F-75012 Paris, France

[4]Cancer Biology and Therapeutics, Centre de Recherche Saint-Antoine (CRSA), Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM) U938, Paris, France

[4]Institut Universitaire de Cancérologie (IUC), Université Pierre et Marie Curie (UPMC), Sorbonne Universités, F75012 France

[5]Service d'Hématologie Biologique, Hôpital Saint-Antoine/Armand Trousseau, AP-HP, F-75012 Paris, France

[6]Service d'Hématologie Clinique et Thérapie Cellulaire, Hôpital Saint-Antoine, AP-HP, F-75012 Paris, France

* SF and BU should be considered as joint first author

** AKL and AC should be considered as joint last author

Running title

MSC-mediated reprogramming attenuates carcinogenesis

Keywords

Mesenchymal stem cells, colorectal cancer, tumor microenvironment, reprogramming of immune cells, pelvic radiation disease, radiotherapy, cell therapy, tissue integrity.

Contact information:

Lead Contact: Alain Chapel

IRSN, PRP-HOM/SRBE/LR2I

BP-17, 92262 Fontenay-aux-Roses CEDEX, FRANCE

Tel: 33 1 58 35 95 46; Fax: 33 1 58 35 84 67; E-mail: alain.chapel@irsn.fr

Second corresponding author: Annette K Larsen

Centre de Recherche Saint-Antoine (CRSA), 184 rue du Faubourg Saint Antoine

75571 PARIS Cédex 12 France

Tel: 33 1 49 28 46 87; E-mail: Annette.Larsen@upmc.fr

Conflicts of interest

The authors declare no conflict of interest.

Abstract word count: 120 words

Manuscript word count: 8866 words

Characters (including spaces, title, author list, affiliation, summary, main text, experimental procedures, acknowledgments, figure legends, and references): **59001**

Number of figures and tables: 7 figures

SUMMARY

Administration of mesenchymal stem cells (MSCs) to limit tissue damage has proved safe and efficient in cancer patients following radiation overdose. To establish the long-term effects of MSCs on residual tumor cells, we evaluated the influence of MSCs in an immunocompetent rat model of colorectal cancer (CRC) with or without radiotherapy. MSCs alone attenuated tumor progression. Combined with radiotherapy, MSCs limited tumor size and prolonged survival. Importantly, MSCs modified the immune component of the tumor microenvironment with an increase in CD3+ cells with a Th1/Treg phenotype and a decrease in CD68+ macrophages. This effect was mediated by reprogramming of resident MSC and immune cells. Our findings indicate that MSC administration limits radiation damage and attenuates growth of residual tumor cells.

Highlights

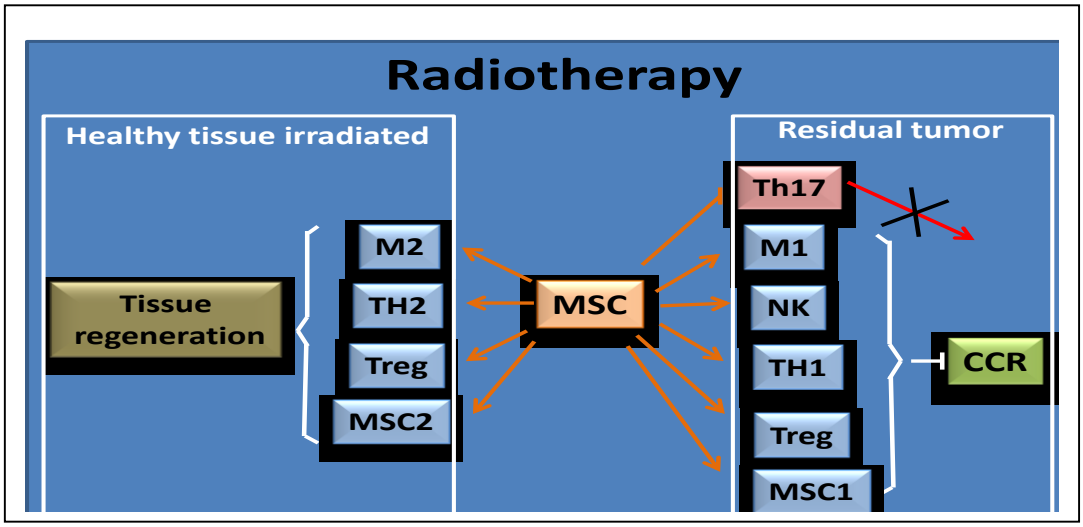
- MSC administration attenuates colorectal carcinogenesis in animal models

- MSC administration attenuates tumor infiltration and is accompanied by sustained alterations of the local immune profile

- MSC administration prevents the deleterious effects of radiation therapy on healthy tissues and reduces the development of residual tumor cells

Significance

Radiotherapy can be accompanied by substantial normal tissue damage. Although mesenchymal stem cells (MSCs) have been used to alleviate radiation damage, uncertainly remains regarding their potential to support growth of residual tumor cells. We here show that administration of MSCs attenuates colorectal cancer progression in immunocompetent animals in the absence or presence of radiotherapy. Although only transiently present in the colon tissue of treated animals, exogenous MSCs were able to modify the immune profile of the tumor microenvironment almost one year after the last MSC administration, most likely due to reprogramming of resident MSCs and immune cells. These results suggest that administration of MSCs would be a safe and innovative therapeutic option to heal normal tissue following cancer radiotherapy.



INTRODUCTION

The worldwide number of cancer patients is expected to increase from 14 million in 2012 to more than 19 million in 2025 (http://www.wcrf.org/cancer_statistics/world_cancer_statistics.php). Sixty percent of all cancer patients receive radiation therapy which is accompanied by detrimental local lesions in about 5% of patients. In particular, pelvic radiation disease (PRD) remains a major side effect (Andreyev et al., 2010). The current treatment is limited to managing the symptoms; therefore new strategies are warranted (Benderitter et al., 2014). No side effects of mesenchymal stem cells (MSCs) were reported in a meta-analysis of 36 clinical trials representing more than 1000 patients (Lalu et al., 2012). However, preclinical tumor models with exogenous administration of MSCs have resulted in conflicting results concerning their ability to support or inhibit tumor development (Lee et al. 2012). Depending on the experiment, it has been suggested that MSCs either inhibit or increase immunity, angiogenesis and apoptosis. Importantly, most of these studies have used mice deficient in T lymphocytes (Zhao et al., 2010) although these cells are important MSC targets for modulation of the tumor microenvironment (Lazennec et al. 2010). In order to evaluate the interest of MSC administration to prevent pelvic radiation disease after cancer radiotherapy, an immunocompetent animal model representative of human cancer development and treatment is needed to address essential questions about mechanism, safety and efficacy.

We here show that MSC administration to immunocompetent rats treated locally with MNNG (methylnitronitrosoguanidine), a potent carcinogen, decreased tumor progression and increased overall survival. At early time points, MSCs reversed local acute inflammation by protecting the mucosal structure and function from MNNG. Furthermore, MSC administration was accompanied by a marked modification of the tumor microenvironment which was still apparent one year after the last MSC administration. When MNNG and MSC were combined with fractionated irradiation, MSCs inhibited residual tumor growth and prolonged animal survival. MSCs protected healthy tissue from radiation damage by increasing the levels of growth factors, decreasing fibrosis and mediating

intestinal recovery. These results suggest that MSCs induce reprogramming of resident MSC and immune cells, thereby counteracting CRC development as well as the detrimental side-effects of radiotherapy on healthy tissues.

RESULTS

The MSC secretome does not protect CRC cells against oxidative stress and DNA damage after acute MNNG exposure

We first characterized the different situations where MSCs might have a direct influence on CRC cells. MNNG is an alkylating agent that produces strong oxidative damage followed by DNA strand breaks, genomic instability, inflammation and proliferation (Figure 1A,B) (Koi et al., 1994). We selected 3 human CRC cell lines with different defects in DNA damage response and DNA repair. HT-29 cells show loss of heterozygosity (LOH) and have mutant p53, HCT-116 cells have defective mismatch repair (MMR) while LS513 cells are intrinsic multidrug resistant (MDR). The influence of the MSC secretome on CRC cell proliferation (Figure 1C), oxidative stress (as measured by the presence of oxidative DNA adducts, Figure 1D) and DNA damage (as measure by DNA strand breaks by the comet assay, Figure 1E) following MNNG exposure was determined. MNNG exposure was accompanied by the formation of oxidative DNA adducts (Figure 1D, red columns), induction of DNA strand breaks (Figure 1E, red columns) and inhibited proliferation (Figure 1C, red curves, compare with the untreated control cells in black) for all three cell lines. Co-exposure with MSCs decreased the amount of oxidative DNA adducts in a non-significant manner (Figure 1D, blue columns) and had no detectable influence on the levels of DNA strand breaks (Figure 1E, blue columns) or cell proliferation (Figure 1C, blue curves). It should be noted, that since a trans-well assay was used in order to be able to separate CRC and MSC cells following co-incubation, the data reflects the influence of the MSC secretome on MNNG-exposed CRC cells, but not potential heterotypic cell-cell interactions.

Transient presence of MSCs in the colon

MSCs were administered twice (by *i.v.* injection), 4 and 6 weeks after the initiation of MNNG treatment (Figure 2 A and B). The presence of exogenous MSCs in the colon was verified using an eGFP tag (Figure 2C, left panel, indicated by white arrows). Amplification of the signal by use of anti-GFP antibodies (Figure 2C, right panel indicated by white arrows) revealed the transient presence of scarce GFP-labeled cells (indicated in red) localized in (a) the *lamina propria*, (b) around the bottom of crypts in the *muscularis mucosae* and (c) in the *sub mucosa*, one week after the second MSC injection, but not at later time points. The transient implantation of eGFP-MSCs was further confirmed by PCR of the *eGFP* gene in extracts from fixed colon tissue (3.4 ± 1.4 copies of *eGFP* per 10 ng of DNA, n=6, data not shown).

MSCs prevent the early events induced by MNNG

MNNG induced an alteration of the mucosal structure (Figure 2D) as indicated by histological alterations of the mucosa, distortion of the crypts and immune infiltration (compare controls (left) with MNNG (middle)), which was attenuated by administration of MSCs (right). The number of crypts per µm, the height of the crypts as well as the number of goblet cells per crypt were significantly reduced by MNNG to 88%, 80% and 73% of control values, respectively (Figure 2E, red columns), whereas MSC administration (blue columns) restored the values to the initial levels (white columns). Ki67 expression (in red), reflecting the proliferation of mucosal cells, is shown in Figure 2F (left image, MNNG; right image, MNNG + MSCs). The analysis of labeled cells as a fraction of the total number of epithelial cells is shown in Figure 2F right. The expression of Ki67 increased significantly in the MNNG mucosa (4.1 ± 0.2 positive cells/µm^2, red column), compared to control animals (3.3 ± 0.2 positive

cells/µm^2, white column) while MSC administration restored Ki67 expression to normal levels (3.0 ± 0.2 positive cells/µm^2, blue column).

MSCs modulate the inflammatory response during the early phase of MNNG-induced carcinogenesis

The inflammatory response after MNNG treatment is believed to play a pivotal role in cancer initiation. At the early phase of the experiment (1 week after the second MSC injection), MNNG induced inflammation and mucosal damage, which was attenuated by MSC administration (data not shown). In addition, MNNG induced a systemic inflammation, as evidenced by the serum concentration of C-reactive protein (CRP) which increased almost 6-fold (Figure 3A, left panel, red column). Locally, the protein levels in the mucosa increased for IL-6 (17-fold), IL-1β (2.1-fold), IL-4 (3.2-fold), TGFβ1 (2-fold), TNFα (4-fold) and IFNγ (1.8-fold) (Figure 3A, red columns). The presence of MSCs restored the concentration of CRP and mucosal IL-6, IL-1β, IL-4, TNFα and IFNγ to basal levels (Figure 3A, blue columns compared to control samples, white columns) while TGFβ increased, clearly indicating an anti-inflammatory activity of the MSCs.

Gene expression analysis of the mucosa of animals treated with MNNG + MSCs compared to mucosa from animals treated with MNNG alone, further confirmed these findings (Figure 3A, upper table). The mRNA of several pro-inflammatory genes including *IL-1β* (0.3-fold), *IL-6* (0.2-fold), *TNF-α* (0.4-fold) and *MIP-2* (0.1-fold) were significantly down-regulated, whereas the mRNA of the anti-inflammatory genes *IL-10* (1.9-fold) *and TGF-β* (1.9-fold) were up-regulated. Immunomodulation of the MSCs was associated with a decrease in the mRNA of *T-Bet* (0.2-fold), *TLR4* (0.4-fold) and an increase in the mRNA of *Arginase-1 (Arg1, 1.7-fold), GATA3* (1.4-fold), *FoxP3* (1.6-fold), and *TLR5* (1.8-fold). These findings suggest that the MSCs predominantly stimulated cells of the Treg (*IL-10*, *FoxP3*), Th2 *(GATA3)* and M2 (*TNF-α, Arg1*, *TLR4*) phenotypes.

In addition, the increase in the expression of *TFF3* (2-fold) indicates that the MSCs restored the functionality of the mucosa in agreement with the histological findings.

MicroRNAs are involved in gene regulation and their aberrant expression has been implicated in various pathologies including cancer. MicroRNA profiling revealed nine microRNAs that were differentially expressed between the mucosa from MNNG and MNNG + MSC animals by 7 weeks, which was confirmed by qRT-PCR (data not shown). This included 7 miRNAs that increased significantly in the mucosa of animals treated with MNNG + MSC, compared to MNNG alone, including miR-150 (4.7-fold), 142.5p (3.9-fold), 7.1 (2.9-fold), 92A (2.1-fold), 17 (1.8-fold), 15b (1.7-fold), 128 (1.7-fold), while 2 miRNAs decreased significantly including (miR19b 0.3-fold,) and miR191 (0.2-fold) (Figure 3A, lower table). The increase in *IL-10*, miR-92a and miR-17 as well as the decrease in *TLR4* and *IL-6* transcripts suggest a polarization of resident MSCs into the MSC2 phenotype.

In order to clarify the interaction between MSCs, cancer cells and inflammatory cells, a co-culture model was used to characterize the alterations in miRNA expression in the cancer cells without ambiguity (Figure 3B). As experimental model system, we chose the classical CC531 cell line, originally established from a DMH (dimethylhydrazine)-induced rat colon adenocarcinoma which is a widely used model to study different aspects of tumor growth. Peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) were used as inflammatory cells. The presence of MSCs resulted in increased levels of miR150 (4.2-fold ± 0.2) and miR7.1 (2.7-fold ± 0.2) in CC531 cells compared to CC531 alone. The presence of both MSCs and PBMCs, increased the levels of miR150 (5.1-fold ± 0.3), miR142.5 (4.2 fold ± 0.2), miR7.1 (3.1-fold ± 0.2) and miR128 (2.5-fold ± 0.2) compared to CC531 cells alone. Therefore, the presence of MSCs or MSCs + PMBCs had a significant influence on the expression of miRNA in surrounding CRC cells. Interestingly, the results also suggest that the cross-talk between MSCs and immune cells can influence the tumor cells since neither MSCs nor PMBCs by themselves had any influence on the expression of miRNA 142.5 and 128 while their expression was increased when MSCs and PBMCs were together.

MSC administration modifies the phenotype of immune cells in the tumor microenvironment

One year after the initial MNNG exposure, the tumor microenvironment of animals treated with MNNG alone was very different from that of animals exposed to MNNG + MSCs. In particular, in the tumor, the density of cells expressing the T-cell marker CD3 was 0.69% ± 0.03 compared with 1.0% ± 0.05 for MNNG and MNNG + MSCs tumors, respectively. Therefore, the number of CD3+ cells was 30% higher in the tumors of MSCs-treated rats (Figure 4A upper panels). In contrast, the density of cells expressing the macrophage marker CD68 was 50% lower in tumors from animals treated with MNNG + MSCs (0.8% ± 0.1) compared to the tumors of animals treated with MNNG alone (1.6% ± 0.1) (Figure 4B left panels).

The expression of cytokines and transcription factors (Figure 4A, bottom left) showed highly significant differences between tumors from animals treated with MNNG or with MNNG + MSCs. The MSC-mediated increase in mRNA expression levels was particularly prominent for *IFN-γ* (3.1-fold ± 0.3), *IL-12a* (3.4-fold ± 0.3), *IL-12b* (2.1-fold ± 0.2), *T-bet* (1.9 fold ±0.2), *IL-1β* (2.5 fold ± 0.1), *IL-7* (1.8-fold ± 0.05) and *Notch1* (2.1-fold ± 0.2) (Figure 4A, bottom left). In contrast, MSC administration decreased the mRNA levels for *IL-4* (0.18-fold ± 0.03) and *STAT6* (0.55-fold ± 0.01), whereas *GATA3* levels were slightly increased (1.5-fold ± 0.07). The ratio between *IL-4/ IFN-γ* was reduced by a factor of 6.6 while the ratio between *T-bet/GATA3* was increased by a factor of 2.4 (Figure 4A lower right). These findings suggest a predominance of the Th1 phenotype in MNNG + MSCs tumors.

The expression of other genes involved in the regulation of the tumor microenvironment is shown in Figure 4C. MSC administration was accompanied by a significant decrease in the mRNA levels of *TGF-β1* (0.5-fold ± 0.02), *IL6* (0.4-fold ± 0.02), *STAT3* (0.3-fold ± 0.01) and *IL-17a* (0.39-fold ± 0.04), suggesting a low activity of differentiated Th17 cells. The expression of genes typical of Treg cells showed that MSC treatment increased the mRNA levels of *Foxp3* (2.4-fold ± 0.1), *IL-10* (3.8-fold ± 0.4)

and *IL-2* (2.0-fold ± 0.3). The higher levels of *IL-2* expression in MSC-treated tumors are coherent with a stimulation of Treg cells. In addition, the expression of M1 macrophage-related genes including *iNOS* (3.9-fold ± 0.08), *Arg1 (*0.5-fold ± 0.03), *TLR2* (1.4-fold ± 0.07) and *TLR4* (1.5-fold ± 0.04) increased, whereas the expressions of *IL-8* (0.67-fold ± 0.02) and *TNFα* (0.64-fold ± 0.05) decreased (Figure 4C).

MSC administration limits the number and the growth of colon tumors following carcinogen treatment

The appearance of the tumors in control animals (without MNNG), in MNNG-treated animals and in animals treated with MNNG + MSCs by 52 weeks is shown in Figure 5A. Quantitative analysis (Figure 5B) shows that the number of tumors per rat was significantly reduced in animals treated with MSCs at both 32 and 52 weeks. In addition, there were significantly more tumor-free rats in the MNNG + MSC group indicating that the administration of MSCs attenuated tumor initiation, thereby decreasing the number of tumors per rat (data not shown).

The average size of tumors by 52 weeks (Figure 5C) was 3-times less in animals injected with MSCs (34 mm^2) compared to animals treated with MNNG alone (106 mm^2). Similarly, at 52 weeks, the expression of Ki67 mRNA as measured by qRT-PCR was lower (0.76-fold ± 0.04) in tumors from the MNNG + MSCs group than for the MNNG group, suggesting a long-term effect of the MSCs on tumor proliferation.

At 52 weeks, the invasion of tumor cells was limited to the sub-mucosa. In reference to the TNM nomenclature for human tumors, only Tis Nx M0 and T1 Nx M0 (Figure 5C) tumors were observed at this stage. MSC treatment resulted in a non-significant decrease in tumor grade.

MSC administration significantly increased the survival of MNNG-treated animals

The influence of MSC administration on the overall survival is shown in Figure 5D. MNNG treatment significantly reduced the life span of rats (Figure 5E, red line, median survival 55 weeks), compared to the untreated control animals (black line, 165 weeks). In clear contrast, the injection of MSCs significantly increased the survival of MNNG-treated animals (blue line, median survival 95 weeks).

After fractioned irradiation, MSC administration significantly decreased the size of colon tumors and increased survival

Our experimental protocol was based on a clinical case where patients undergoing radiotherapy for prostate cancer by accident received more than 70 Gy on the rectum. One year after radiation, colonoscopy revealed the presence of congested mucosa, telangiectasia and large area of fibrosis. These patients were subsequently treated successfully by intravenous injection of MSCs.

To characterize the influence of MSCs on residual tumors after radiotherapy as well as their effect on healthy tissue, we used three groups of MNNG-treated rats as outlined in Figure 6A. Thirtytwo weeks later, when adenoma had occurred, two groups were irradiated with 75 Gy. One week after the last irradiation, one group of animals received three intravenous injections of MSCs. At the time fibrosis had developed (26 weeks after irradiation and 60 weeks after the first MNNG treatment) tumors were removed for histological and molecular characterization while the remaining animals were used to determine the influence of the different treatments on the overall survival (Figure 6B).

Fractionated irradiation reduced the size of the tumors four-fold (20 mm^2 ± 2) compared to the non-irradiated control group (82 mm^2 ± 20). Importantly, MSC administration further decreased the size of the tumors more than 2-fold (9 mm^2 ± 3), compared to irradiation alone (Figure 6C).

MSC treatment significantly increased the life span of rats after irradiation (Figure 6D, blue line, median survival 65 weeks after irradiation) as compared with irradiation alone (red line, median survival 40 weeks after irradiation).

MSC administration decreased fibrosis and prevented tissue degradation after fractioned irradiation

Chronic radiation damage is characterized by an aberrantly repair process associated with chronic inflammation, excessive collagen accumulation and vascular disorganization resulting in fibrosis, which may lead to organ dysfunction and occlusion (Andreyev et al., 2010). Accordingly, fractionated irradiation alone induced an alteration of the mucosal structure as indicated by distortion of the crypts, sub-mucosal edema and immune infiltration and accumulation of components of the extracellular matrix (Figure 6E, compare irradiated tissue (middle panels) with non-irradiated normal tissue (left panels)). These changes were attenuated following MSC exposure (right panels).

Morphometric analysis showed that the height of the crypts per µm (348 crypts/ µm in average vs 268 crypts/ µm) as well as the number of goblet cells per crypt (24/ crypt vs 18/ crypt in average) were significantly increased in irradiated colons (Figure 6F, red columns) compared to non-irradiated controls (white columns) while MSC administration restored basal levels to 288 crypts/ µm and the goblet cells to 18/ crypt in average (blue columns). The crypt number per 300 µm was significantly decreased after irradiation (4.1 crypts/ 300 µm in average, red column) compared to non-irradiated controls (mean 5.2 crypts/ 300 µm in average, white column) without any detectable effects of the MSCs on the irradiated group (4.2 crypts/ 300 µm in average).

Fractioned irradiation promoted fibrosis (Figure 6G, red column, 14% in average) whereas MSC administration significantly decreased fibrosis (blue column, 7.1% in average) to similar levels as the non-irradiated controls (white column, 6.8% in average). Therefore, MSC administration limited

fibrosis and prevented mucosal damage clearly suggesting an anti-fibrosis and mucosa-protective effect of the MSCs against tissue damage induced by fractionated irradiation.

On the molecular level, fractioned irradiation increased the protein levels of TGFβ (2.1-fold) and TIMP1 (2.2-fold) while the protein levels of VEGF in the mucosa decreased (Figure 7A). MSC treatment normalized both TGFβ and TIMP1 but increased the concentration of VEGF 4.1-fold ($p<0.01$), compared to basal levels, coherent with the influence of MSCs on fibrosis.

Gene expression analysis did not show any significant influence of MSC treatment on the expression levels of the pro-inflammatory genes IL-1β, IFN-γ and TNF-α following irradiation (Figure 7B). In contrast, the expression of TGFβ decreased 1.8-fold while the expression increased for TFF3 (1.6-fold), HGF (2-fold) and VEGF (1.6-fold). These findings indicate that the MSCs restored the functionality of the mucosa while limiting fibrosis, in agreement with the histological findings.

DISCUSSION

Radiotherapy is an essential part of cancer treatment for a wide range of tumor types. However, a fraction of patients develop toxic side effects due to normal tissue damage. In particular, pelvic radiation disease (PRD) remains a major problem which is only treated symptomatically (Andreyev et al., 2010). The digestive symptoms of pelvic radiation disease are similar to those observed in the so-called Bowel Disease as well as for the visceral disorders associated with Graft Versus Host Disease (GVHD) where administration of mesenchymal stem cells (MSCs) emerge as a promising approach to alleviate the gastrointestinal syndromes (Moussa et al., 2016). Although MSC administration is also able to alleviate tissue damage in irradiated animal models, conflicting data exist concerning their potential influence on residual tumor cells (Voswinkel et al., 2013). Most reported studies have been carried out in immunodeficient mouse models which would not be able to reproduce the immunomodulatory effects of MSCs on resident immune cells. In addition, most studies have focused on orthotopic tumor xenografts rather than on endogenous tumor development. We here evaluate the influence of MSCs on tumor growth in an immunocompetent rat model following local exposure to a chemical carcinogen in the presence or absence of fractionated radiotherapy and describe the underlying molecular mechanisms. Specifically, we evaluate the impact of MSCs on tumor development, the inflammatory/immune response and the tumor microenvironment from CRC initiation to its complete development over an entire year. The results show for the first time that intravenous administration of MSCs increase the life span of carcinogen-exposed rats which was correlated with a smaller number of tumors (tumor initiation) as well as a decrease in tumor size (tumor progression) indicating that the exogenous MSCs durably inhibited both CRC initiation and progression (Katsuno et al., 2013).

To mimic human colon carcinogenesis, which is a long-term process, we selected an immunocompetent MNNG-induced CRC rat model. The MNNG model is relevant for human carcinogenesis since rectal deposits of MNNG mimic the detrimental action of alimentary nitroso-

compounds (Li et al. 2016) that are closely associated with the induction of colorectal cancer (Narisawa et al., 1971). Furthermore, intra-rectal deposits of MNNG act only on the colon mucosa (Reddy et al., 1974), in contrast to carcinogenesis induced by 1,2 Dimethylhydrazine (DMH) or azoxymethane (AOM) which also induce tumors in other tissues (Schmahl et al., 1976).

The prominent early effect of MNNG is the induction of inflammation which has been closely linked to tumor initiation (Che et al., 2010). Inflammation is accompanied by mucosal lesions as evidenced by a decrease in the number of mucus-secreting cells as well as a decrease in crypt number, crypt height and the number of goblet mucus-secreting cells which may result in colon dysfunction. Administration of MSCs seems to decrease CRC initiation via an effect on the immune system rather than by a direct activity toward the tumor cells. Specifically, MSCs had only marginal effect on MNNG-mediated oxidative stress, DNA damage and cell proliferation in isolated CRC cells. MSCs modulate the MNNG-induced inflammation, at least in part, by lowering the local IL-6 concentration, since IL-6 has been implicated in tumor initiation in inflammatory bowel disease (Grivennikov et al., 2009). Furthermore, MSC treatment protected the structure of the colon epithelium by reducing the ulcerations caused by MNNG (Che et al., 2010) in agreement with previous reports (Sémont et al., 2013). These early effects of MSCs, which counteract the deleterious action of MNNG, are likely associated with TGFβ- and/or TFF3-dependent tissue repair in agreement with the results presented here. Indeed, these two regulatory peptides can stimulate the restitution on the basolateral (TGFβ) and apical (TFF) sides of the colon mucosa, via independent pathways (Sturm et al., 2010). Finally, the administration of MSCs restored gut morphology and function in agreement with previous findings (Semont et al., 2006, 2010).

We then characterized the expression of miRNAs that have been implicated in modulating tumor initiation. The microRNA expression profile identified 9 microRNAs that were differentially expressed. To clarify the interplay between tumor cells, MSCs and immune cells, an *in vitro* model was used. The results show that the presence of MSCs increased the levels of miR150 and miR7.1 in the tumor cells.

Interestingly, the joint presence of MSCs and inflammatory cells specifically increased tumor cell expression of miR142.5 and miR128 pointing to the importance of cross-talk between MSCs and inflammatory cells. The inhibition of MNNG-induced inflammation by the MSCs was reflected by an increase in miR150 and miR7.1 which are known to inhibit inflammation in sepsis (miR150) and gastritis (miR7.1), and a decrease in miR19b, which has been described to increase inflammation in rheumatoid arthritis (Gantier et al., 2012). Similarly, MSCs induced an increase in anti-oncogenic miRNA (miRs 150, 142-5p, 7.1, 15b, 128 and 17) and a decrease in pro-oncogenic miRNA (miRs 19b and 191). Interestingly, miR-17 is produced by MSC2s and negatively regulates expression of Smurf1 (Liu et al., 2011), a potential oncogene that has been implicated in CRC (Xie et al., 2014). Taken together, the results indicate that MSCs inhibited tumor initiation by preventing MNNG-mediated inflammation thereby protecting the colon and decreasing the number of tumors. The inhibition of tumor initiation by MSCs is in agreement with a previous report in a rat model treated with a different carcinogen (Katsuno et al., 2013), although the exact events cannot be compared directly since the cited study did not include a characterization of the local inflammation or epithelial function (Nasuno et al., 2014).

Next, we characterized the long-term influence of MSCs on the tumor microenvironment since the microenvironment is known to influence tumor evolution (Bissell et al., 2011) and the composition of tumor-infiltrating immune cells might represent a valuable prognostic tool (Tosolini et al., 2011). Indeed, a comparison of tumors induced by MNNG alone with those developed after treatment with both MNNG and MSCs showed important differences in terms of microenvironment, tumor cytokines and transcription factors almost one year after the initial administration of MSCs.

By 52 weeks, MNNG + MSCs tumors were infiltrated with more CD3+ lymphocytes compared to MNNG tumors. MSCs directed the lymphocyte response toward a Th1/Treg. The increased expression of *IL-10, TGF-β, Foxp3* and *IL-1β* suggests an important Treg population activated by the high level of IL-2 in the microenvironment. FoxP3+ Tregs have been associated with a better prognosis in CRC while the Th1 response has been shown to be anti-carcinogenic in CRC (Salama et al., 2009). Decrease

expression of *IL-17a* suggested a decrease of Th17 cell activity. This result is in agreement with Yoshida et al. who suggested that a decreased of Th17 expression may improve the survival of patients with CRC (Yoshida et al., 2016). Human colon carcinoma tumors infiltrated with more CD3+ cells, presenting a high Th1 adaptive cluster have a better prognosis. Similarly, patients with high levels of T-Bet and FoxP3 showed better survival while no correlation was found between prognosis and the Th2 gene cluster (Salama et al., 2009).

In comparison, the number of infiltrating CD68+ macrophages decreased in MNNG + MSCs tumors. High levels of TAMs (tumor-associated macrophages) are generally correlated with a non-favorable outcome in various cancers including CRC (Peddareddigari et al., 2010). The lower levels of CD68-positive cells may explain the decreased expression of *IL-8* mRNA (which is implicated in the carcinogenic process) (Waugh et al., 2008). It is generally accepted that macrophages may be activated into M1 (classical) or M2 (alternative) subtypes. A switch from M1 to M2 macrophages has been described during tumor progression (Schmieder et al., 2012). We found an increase in *iNOs, TLR2* and *TLR4* expression in MNNG+MSCs tumors, suggesting a differentiation toward the M1 subtype (Lowel et al., 2010). In agreement, MNNG + MSCs tumors exhibited low levels of *STAT6, Arg1* and *IL-4* suggesting a low degree of M2 differentiation (Gordon et al., 2010). Furthermore, the inhibition of tumor growth observed in MNNG + MSCs-treated animals was associated with an increased expression of *perforin* (secreted by NK and cytotoxic T cells), *FasL* and *iNOs* (which contribute to tumor cell killing). Expression levels of *IL-6* and *STAT3* were low in MNNG + MSCs tumors. A Systematic review and meta-analysis have shown that STAT3 may have oncogenic activities (Ji et al., 2016). In addition, high levels of STAT3 and IL-6 have been associated with CRC progression (De Simone et al., 2015). Therefore, our results are in agreement with the current understanding of the IL-6/STAT3 pathway.

The pelvic radiation syndrome is characterized by the severity of gastrointestinal disorders. In this study we selected a rat model of fractionated γ-irradiation (Gremy et al., 2008) which is considered to be representative of the colonic irradiation damage observed in patients (Bessout et al., 2015).

Importantly, administration of MSCs after radiotherapy decreased the size of residual tumors and protected colon integrity, thereby improving animal survival. This model of colorectal irradiation generates histopathological lesions similar to those observed clinically during the severe chronic phase. Our results highlights a dynamic progression of extracellular matrix remodeling with a balance towards fibrogenesis in irradiated tissues which is counteracted by MSC administration coherent with previous findings in rat (Bessout et al., 2014) and pig (Linard et al., 2013) models. The regenerative capacity of MSCs was, at least in part, mediated by secretion of HGF and VEGF. Taken together, these data support the capacity of MSCs to establish a normal microenvironment after irradiation by acting on endogenous tissue cells.

Importantly, the presence of exogenous MSCs was only observed at early time points after injection. Therefore, the strong and durable antitumor effects of the MSCs observed in this study is likely explained by "reprogramming" of resident cells by the MSCs, for example by epigenetic mechanisms, in agreement with the "hit and run" mechanism suggested by Von Bahr et al. (2012). The results presented here suggest that at early time points, MSCs promotes an anti-inflammatory response via polarization of resident MSCs into anti-inflammatory MSC2s as well as tissue repair thereby protecting tissue integrity and decreasing tumor initiation. At later time points, we observed a long-lasting polarization of resident macrophages into the M1 subtype in agreement with the findings of Eggershoffer et al. (2014) who reported that MSCs are able to induce M1 polarization of resident macrophages, even after being phagocytosed, thereby inducing a microenvironment unfavorable to tumor progression.

Taken together, the results presented here show for the first time that administration of MSCs increase the life span of carcinogen-exposed rats by durably attenuating both CRC initiation and progression. Considering the transient presence of the MSCs this is likely mediated by reprogramming of resident cells which in turn interferes with tumor growth. After fractionated irradiation, MSCs inhibited residual tumor growth, protected healthy tissue and prolonged animal survival. These

findings support the use of MSC administration for treatment and, possibly, prevention of, severe radiation damage in patients.

EXPERIMENTAL PROCEDURES

Isolation and culture of MSC and CRC cells

HCT116, HT29 and LS513 human colorectal cancer cells were purchased from European Collection of Cell Cultures (ECACC, Salisbury, UK). Bone marrows were obtained from seven week old rats as previously described (Rochefort et al., 2006). First, CRC cells were incubated with MNNG (50 nM) for 2 hours. Then, MSCs and tumor cells were plated in the upper and lower chambers, respectively, of trans-well plates (0.4 mm pore size, Corning) and co-incubated for 24 hours followed by collection of cells and culture media. The protocol is further detailed in Figure 1A.

Oxidative stress

Formation of 8-Hydroxy-2'-deoxyguanosine (8-OHdG) DNA adducts was used to estimate oxidative stress using the Oxidative DNA Damage OxiSelect™ ELISA Kit (Cell Biolabs inc).

DNA fragmentation

MNNG is genotoxic toward human CRC cells as shown by single cell electrophoresis under alkaline conditions (the alkaline comet assay). This method permits the detection of DNA strand breaks and alkali-labile sites in individual cells with the percentage of DNA in the comet tail being proportional to the induction of DNA strand breaks (Soares et al., 2007).Genotoxic activity was determined using a

comet assay kit (Trevigen® 4253-096-K). Data are expressed as the % of DNA in the tail compared to the total DNA).

Animals

All experiments were performed in compliance with institutional guidelines as well as with French laws for animal experimentation and approved by an Ethics Committee for Animal Experimentation. MSCs were isolated from transgenic rats ("green rat CZ-C04 Tg Act eGFP") obtained by IRSN from Pr. Otabe (Japan). Sprague-Dawley rats (Janvier Labs), aged eight weeks at the beginning of the experiment, were divided into three groups (Figure 2A). 36 untreated animals were used as control group; 75 rats were injected with MNNG alone while 75 rats received MNNG + MSCs.

Alternatively, animals were divided into 3 groups of 30 rats each as shown (Figure 6A). All groups were exposed to MNNG. Two groups also received local fractioned irradiation while one group received MSCs in addition.

Carcinogenesis and MSC treatment

MNNG was administered by 4 intra-rectal deposits of a 5 mg/ml solution (0.5 ml per dose) over two weeks as described (Maurin et al., 2007). At 6 and 8 weeks after the first MNNG treatment, 10^7 MSCs were two injected *i.v.* into the tail vein of anesthetized animals.

The irradiated animals received 3 intravenous injections of MSCs (one per month) at weeks 36, 40 and 44. Survival, modifications of the mucosa and the development of colonic tumors were determined at 7, 10, 32 and 52 weeks after MNNG treatment and at 60 weeks for the irradiated groups.

Tumors collected 52 weeks after MNNG treatment were classified by TNM after examination at necropsy and by histology.

Radiation and MSC treatment

Thirty weeks after the first MMNG administration, when adenomas had appeared, rats were exposed to a γ-ray source (^{60}Co, 1 Gy/min) with a radiation field confined to the colorectum (field size: 2 x 2.5 cm). Radiation was delivered 3 times a week in 5-Gy fractions at a total dose of 75 Gy (Gremy et al., 2008). One week after the last irradiation, 10^7 MSCs were injected intravenously into the tail vein of anesthetized animals. The radiation response, animal survival, modification of the mucosa and the development of colonic tumors were determined 25 days after the last irradiation. The protocol is further detailed in Figure 6 B.

Tissue sampling and analysis

After euthanasia, colons were dissected. Part of the samples (the first 12 centimeters of the colon from the rectum as well as the tumor masses) were frozen in liquid nitrogen followed by protein extraction by tissue disruption in PBS containing protease inhibitors (Complete Mini, Roche) and stored at -80 °C until use. Another part of samples were stored at -80 °C in RNAlater (Qiagen). For histological analysis, tissues were fixed in 70% ethanol or 4% buffered formaldehyde and paraffin-embedded. Tumors were measured using the bi-dimensional method as recommended by WHO. IHC analysis was performed as previously described (Che et al., 2010).

Primary antibodies included: CD3, Rabbit monoclonal antibody (clone SP7; Thermo Scientific). CD68, Anti-rat CD68 mouse MAb (Santa Cruz sc-70760). Ki67, Anti-rat mouse MAb (clone MIB-5, Dako). For GFP detection, slides were incubated for 30 minutes with rabbit anti-GFP polyclonal antibody

(AB3080, Chemicon). Secondary antiserum was Cy3 goat anti-rabbit IgG (Molecular Probes). Quantification was performed by image analysis using Histolab 4.3.6. PCR was used for confirmation of GFP expression in the colons as previously published (Sémont et al., 2006).

miRNA was purified from total RNA prepared from MNNG-treated animals by 7 weeks in comparison with animals treated with MNNG + MSCs. To determine the miRNA expression early after MNNG treatment, miRNA profiles were analyzed by the Affymetrix GeneChip miRNA Array 2.0. The expression of selected miRNAs was confirmed by qRT-PCR (Life Technologies) including mir150 (00473), 142.5 (002248), 7.1 (001338), 92A (000431), 17 (002308), 15b (000390), 128 (000453), 19B (00396), 191 (000490) according to the manufacturer's instructions (Life Technologies).

Statistical analysis

Results were compared between groups by the Mann-Whitney and Fisher exact test with Statview. Survival curves were compared with the Gehan-Breslow-Wilcoxon test. In the figures, results are expressed as mean ± standard error of the mean (SEM), asterisks correspond to $p<0.01$ (***), $p\leq0.025$ (**) and $p\leq0.05$ (*).

AUTHOR CONTRIBUTIONS

AC, AKL and ME F-L conception and design, data collection, data analysis and interpretation, manuscript writing. SB, BLH, BU, TCHC, FH, DB and SF: technical support. SF, BLH, BU, TCHC: animal assistance. SF and BU: study concept. LD and MB: manuscript revision. Final approval of manuscript: all.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors thank Bettina Fabiani (Hôpital Saint-Antoine, Paris, France) for tumor analysis, Christian Gespach (Hôpital Saint-Antoine, Paris, France) for helpful discussions and Pierre P. Levy (Hôpital Tenon, Paris, France) for fruitful discussions on statistical analysis.

GRANT SUPPORT

This work was supported by IRSN, INSERM and by a collaborative research grant from Centre de Recherche Saint-Antoine (CRSA).

REFERENCES

Andreyev H.J., Wotherspoon A;, Denham J.W., Hauer-Jensen M. (2010). Defining pelvic-radiation disease for the survivorship era. Lancet Oncol *11*, 310-2.

Benderitter M., Caviggioli F., Chapel A., Coppes R.P., Guha C., Klinger M*., et al.* (2014). Stem cell therapies for the treatment of radiation-induced normal tissue side effects. Antioxid Redox Signal *21*, 338-55.

Bessout R., Sémont A., Demarquay C., Charcosset A., Benderitter M., Mathieu N. (2014). Mesenchymal stem cell therapy induces glucocorticoid synthesis in colonic mucosa and suppresses radiation-activated T cells: new insights into MSC immunomodulation. Mucosal Immunol. *7*, 656-69.

Bessout R., Demarquay C., Moussa L., René A., Doix B., Benderitter M., Sémont A;, Mathieu N. (2015). TH17 predominant T-cell responses in radiation-induced boweldisease are modulated by treatment with adipose-derived mesenchymal stromal cells. J Pathol. *237*, 435-46..

Che T.C., Francois S., Bouchet S., Chapel A., Forgue-Lafitte M.E. (2010). Early lesions induced in rat colon epithelium by N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine. Tissue Cell *42*, 190-4.

De Simone V., Franzè E., Ronchetti G., Colantoni A., Fantini M.C., Di Fusco D., Sica G.S., Sileri P., MacDonald T.T., Pallone F., Monteleone G., Stolfi C. (2015). Th17-type cytokines, IL-6 and TNF-α synergistically activate STAT3 and NF-kB to promote colorectal cancer cell growth. Oncogene. *34,* 3493-503

Eggenhofer E., Luk F., Dahlke M.H., Hoogduijn M.J. (2014). The life and fate of mesenchymal stem cells. Frontiers in immunology *5*, 148.

Gantier M.P., Stunden H.J., McCoy C.E., Behlke M.A., Wang D., Kaparakis-Liaskos M*., et al.* (2012). A miR-19 regulon that controls NF-kappaB signaling. Nucleic acids research *40*, 8048-58.

Gordon S., Martinez F.O. (2010). Alternative activation of macrophages: mechanism and functions. Immunity *32*, 593-604.

Gremy O., Benderitter M., Linard C. (2008). Acute and persisting Th2-like immune response after fractionated colorectal γ-irradiation. World J Gastroenterol. *14*, 7075-85.

Grivennikov S., Karin E., Terzic J., Mucida D., Yu G.Y., Vallabhapurapu S*., et al.* (2009). IL-6 and Stat3 are required for survival of intestinal epithelial cells and development of colitis-associated cancer. Cancer Cell. *15*, 103-13.

Ji K., Zhang M., Chu Q;, Gan Y., Ren H., Zhang L., Wang L., Li X, Wang W. (2016). The Role of p-STAT3 as a Prognostic and Clinicopathological Marker in Colorectal Cancer: A Systematic Review and Meta-Analysis. PLoS One. *9*, e0160125.

Katsuno T., Ochi M., Tominaga K., Tanaka F., Sogawa M., Tanigawa T*., et al.* (2013). Mesenchymal stem cells administered in the early phase of tumorigenesis inhibit colorectal tumor development in rats. Journal of clinical biochemistry and nutrition *53*, 170-5;

Koi M., Umar A., Chauhan D.P., Cherian S.P., Carethers J.M., Kunkel T.A., Boland. C.R. (1994). Human chromosome 3 corrects mismatch repair deficiency and microsatellite instability and reduces W-methyl-W-nitro-A'-nitrosoguanidine tolerance in colon tumor cells with homozygous hMLHl mutation. Cancer Res. *54*, 4308-12.

Lalu M.M., McIntyre L., Pugliese C., Fergusson D., Winston B.W., Marshall J.C., et al. (2012). Safety of cell therapy with mesenchymal stromal cells (SafeCell): a systematic review and meta-analysis of clinical trials. PLoS One *7*, e47559.

Lazennec G., Richmond A. (2010). Chemokines and chemokine receptors: new insights into cancer-related inflammation. Trends Mol Med. *16*, 133-44

Lee R.H., Yoon N., Reneau J.C., Prockop D.J. (2012). Preactivation of human MSCs with TNF-α enhances tumor-suppressive activity. Cell Stem Cell. 11, 825-35.

Linard C., Busson E., Holler V., Strup-Perrot C., Lacave-Lapalun J.V., Lhomme B., Prat M., Devauchelle P., Sabourin J.C., Simon J.M., Bonneau M., Lataillade J.J., Benderitter M. (2013). Repeated autologous bone marrow-derived mesenchymal stem cell injections improve radiation-induced proctitis in pigs. Stem Cells Transl Med. *2,* 916-27.

Li S.K;, Martin A. (2016). Mismatch Repair and Colon Cancer: Mechanisms and Therapies Explored. Trends Mol Med. *22,* 274-89.

Liu Y., Liu W., Hu C., Xue Z., Wang G., Ding B*., et al.* (2011). MiR-17 modulates osteogenic differentiation through a coherent feed-forward loop in mesenchymal stem cells isolated from periodontal ligaments of patients with periodontitis. Stem Cells *29*, 1804-16.

Lowe E.L., Crother T.R., Rabizadeh S., Hu B., Wang H., Chen S*., et al.* (2010). Toll-like receptor 2 signaling protects mice from tumor development in a mouse model of colitis-induced cancer. PLoS One *5*, e13027.

Maurin N., Forgue-Lafitte M.E., Levy P., Zimber A., Bara J. (2007). Progression of tumors arising from large ACF is associated with the MUC5AC expression during rat colon MNNG carcinogenis. Int J Cancer *120*, 477-83.

Moussa L., Usunier B., demarquay C., Benderitter M,. Tamarat R., Sémont A., Mathieu N. (2016). Bowel radiation injury : complexity of the pathophysiology and promise of cell and tissue engineering. Cell. Transplantation. *25*, 1723-46.

Narisawa T., Sato T., Hayakawa M., Sakuma A., Nakano H. (1971). Carcinoma of the colon and rectum of rats by rectal infusion of N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine. Gann *62*, 231-4.

Nasuno M., Arimura Y., Nagaishi K., Isshiki H., Onodera K., Nakagaki S.*, et al.* (2014). Mesenchymal stem cells cancel azoxymethane-induced tumor initiation. Stem Cells *32*, 913-25.

Peddareddigari V.G., Wang D., Dubois R.N. (2010). The tumor microenvironment in colorectal carcinogenesis. Cancer Microenviron *3*, 149-66.

Reddy B.S., Weisburger J.H., Narisawa T., Wynder E.L. (1974). Colon carcinogenesis in germ-free rats with 1,2-dimethylhydrazine and N-methyl-n'-nitro-N-nitrosoguanidine. Cancer Res *34*, 2368-72.

Rochefort G.Y., Delorme B., Lopez A., Herault O., Bonnet P., Charbord P.*, et al.* (2006). Multipotential mesenchymal stem cells are mobilized into peripheral blood by hypoxia. Stem Cells *24*, 2202-8.

Salama P., Phillips M., Grieu F., Morris M., Zeps N., Joseph D.*, et al.* (2009). Tumor-infiltrating FOXP3+ T regulatory cells show strong prognostic significance in colorectal cancer. J Clin Oncol *27,*186-92.

Schmahl D., Danisman A., Habs M., Diehl B. (1976). Experimental investigations on the influence upon the chemical carcinogenesis. IIIrd communication: studies with 1,2-dimethylhydrazine. Z Krebsforsch Klin Onkol Cancer Res Clin Oncol *86,* 89-94.

Schmieder A., Michel J., Schonhaar K., Goerdt S., Schledzewski K. (2012). Differentiation and gene expression profile of tumor-associated macrophages. Semin Cancer Biol *22,* 289-97.

Sémont A., Francois S., Mouiseddine M., Francois A., Sache A., Frick J.*, et al.* (2006). Mesenchymal stem cells increase self-renewal of small intestinal epithelium and accelerate structural recovery after radiation injury. Adv Exp Med Biol *585*, 19-30.

Sémont A., Mouiseddine M., Francois A., Demarquay C., Mathieu N., Chapel A.*, et al.* (2010). Mesenchymal stem cells improve small intestinal integrity through regulation of endogenous epithelial cell homeostasis. Cell Death Differ *17*, 952-61.

Sémont A., Demarquay C., Bessout R., Durand C., Benderitter M., Mathieu N. (2013). Mesenchymal stem cell therapy stimulates endogenous host progenitor cells to improve colonic epithelial regeneration. PLoS One *8*, e70170.

Soares D.G., Escargueil A.E., Poindessous V., Sarasin A., de Gramont A., Bonatto D., Henriques J.A., Larsen A.K. (2007). Replication and homologous recombination repair regulate DNA double-strand break formation by the antitumor alkylator ecteinascidin 743. Proc Natl Acad Sci U S A. *104*, 13062-7.

Sturm A., Dignass A.U. (2008). Epithelial restitution and wound healing in inflammatory bowel disease. World J Gastroenterol *14*, 348-53.

Tosolini M., Kirilovsky A., Mlecnik B., Fredriksen T., Mauger S., Bindea G.*, et al.* (2011). Clinical impact of different classes of infiltrating T cytotoxic and helper cells (Th1, th2, treg, th17) in patients with colorectal cancer. Cancer Res *71*, 1263-71.

Von Bahr L., Batsis I., Moll G., Hagg M., Szakos A., Sundberg B.*, et al.* (2012). Analysis of tissues following mesenchymal stromal cell therapy in humans indicates limited long-term engraftment and no ectopic tissue formation. Stem Cells *30,* 1575-8.

Voswinkel J., Francois S., Simon J.M., Benderitter M., Gorin N.C., Mohty M. et al. (2013). Use of mesenchymal stem cells (MSC) in chronic inflammatory fistulizing and fibrotic diseases: a comprehensive review. Clin Rev Allergy Immunol. *45*, 180-92.

Waugh D.J., Wilson C. (2008). The interleukin-8 pathway in cancer. Clin Cancer Res *14*, 6735-41.

Xie P., Zhang M., He S., Lu K., Chen Y., Xing G.*, et al.* (2014). The covalent modifier Nedd8 is critical for the activation of Smurf1 ubiquitin ligase in tumorigenesis. Nature communications *5*, 3733.

Yoshida N., Kinugasa T., Miyoshi H., Sato K., Yuge K., Ohchi T., Fujino S., Shiraiwa S., Katagiri M., Akagi Y., Ohshima K. (2016). A High RORγT/CD3 Ratio is a Strong Prognostic Factor for Postoperative Survival in Advanced Colorectal Cancer: Analysis of Helper T Cell Lymphocytes (Th1, Th2, Th17 and Regulatory T Cells). Ann Surg Oncol. *23*, 919-27.

Zhao S., Wehner R., Bornhauser M., Wassmuth R., Bachmann M., Schmitz M. (2010). Immunomodulatory properties of mesenchymal stromal cells and their therapeutic consequences for immune-mediated disorders. Stem Cells Dev *19*, 607-14.

FIGURE LEGENDS

Figure 1. Influence of MSCs on CRC cells. (A) Model illustrating the influence of the alkylating agent MNNG on proliferation, oxidative stress and DNA damage toward neoplastic and normal CRC cells and tissue. (B) CRC cells were incubated in the presence or absence of MNNG (50 mM) for 2 hours, followed by post-incubation in the presence or absence of MSCs in trans-wells for an additional 24 hours. Then, CRC cells were harvested for determination of adduct formation and DNA damage or, alternatively, post-incubated in standard media for 120 hours for determination of proliferation. (C) Proliferation of HT-29, HCT-116 and LS513 cells for the indicated times. (D) Presence of 8-OHdG DNA-adducts caused by oxidative stress in CRC cells exposed to MNNG in the absence (red columns) or presence (blue columns) of MSCs. (E) DNA damage as determined by single cell electrophoresis (the comet assay). Upper panel, representative images are shown for HT-29 cells. Comet tails are indicated with a white arrow (original magnification x40). Lower panel, quantitative analysis of fragmented DNA in CRC cells exposed to MNNG in the absence (red columns) or presence (blue columns) of MSCs. * $p<0.05$; ** $p<0.025$ and *** $p<0.01$ as determined by the Mann-Whitney test.

Figure 2. Early effects of MNNG and MSCs. (A and B) Protocol used for the animal studies. The study was initiated by local MNNG treatments (two times weekly for two weeks) followed by *i.v.* administration of MSCs on weeks 4 and 6. The red stars indicate the times of sampling for data analysis corresponding to 7, 10, 32 and 52 weeks after the start of the experiment. (C) Presence of MSCs in MNNG-treated colon tissue one week after the second injection. Exogenous MSCs are detected by direct GFP fluorescence (left panel, white arrows) or with Cy3-anti-GFP antibodies (right panel, white arrows). The presence of MSCs was observed in a) the *lamina propria* between the crypts, b) the *muscularis mucosae* and c) the sub mucosa. Nuclei are colored by DAPI. Original magnification x40. (D)

Micrographs of the colon mucosa (HE staining) for control animals (left panel) and after treatment with MNNG (middle panel) or with MNNG + MSC (right panel). Original magnification x10. Bars, 100 µm. (E) Morphometry of the mucosa. Left panel, number of crypts per 300 µm. Middle panel, crypt height. Right panel, number of goblet cells per crypt. White columns, normal mucosa. Red columns, MNNG-treatment. Blue columns, MNNG + MSC treatment. (F) Proliferating cells as measure by Ki67 immunofluorescence (red) in mucosa treated with MNNG (left) or with MNNG+MSCs (right). Original magnification x20. * $p<0.05$; ** $p<0.025$ and *** $p<0.01$ as determined by the Mann-Whitney test.

Figure 3. Early inflammatory effects in rats treated with MNNG or with MNNG + MSCs. (A) Histograms of serum C-reactive protein (CRP), an indicator of systemic inflammation, and the local concentrations of IL-6, IL-1β, IL-4, TGFβ, TNF-1α and IFNγ protein one week after the second MSC administration. The columns show the protein content in the mucosa of control animals (white columns), after treatment with MNNG (red columns) or with MNNG + MSCs (blue columns). Right panel, expression of mRNA (top) and miRNA (bottom) in colon mucosa in animals treated with MNNG alone or with MNNG + MSCs one week after the second MSC administration. The ratio indicates the expression of MNNG + MSCs versus MNNG alone ($2^{-\Delta\Delta Ct}$ ± SEM, as determined by the Mann-Whitney test). (B) CC531 CRC cells were incubated with MSCs, with peripheral blood mononuclear cells (PBMC) or with both PBMCs and MSCs in trans-wells for 24 hours followed by harvesting of the CRC cells for determination of miRNA expression. *** $p<0.01$, as determined by the Mann-Whitney test.

Figure 4. Characteristics of the tumor-infiltrating immune cells in animals treated with MNNG or with MNNG + MSCs by 52 weeks. (A) upper panels, CD3-positive tumor-infiltrating T lymphocytes (in green, visualization by immunofluorescence, original magnification x40) in animals treated with MNNG or with MNNG + MSCs. Upper right panel, percentage of CD3-positive infiltrating

cells. Bottom left panel. Influence of MSCs on the expression of cytokines and transcription factors as determined by qRT-PCR. Bottom right panels, the influence of MSC administration on the Th1/Th2 phenotype was determined for animals treated with MNNG alone (white boxes) or with MNNG + MSCs (grey boxes). The initial presence of MSCs reduced the ratios between *IL-4/ IFN-γ* 6.6-fold (p=0.0022) and increased the *T-bet/GATA3* ratio 2.4-fold (p=0.00022). These findings suggest a predominance of the Th1 phenotype in MNNG + MSCs treated tumors. (B) upper panels, CD68-positive tumor-infiltrating macrophages (in green, visualization by immunofluorescence, original magnification x20) in animals treated with MNNG or with MNNG + MSCs. Upper right panel, percentage of CD68-positive infiltrating cells in tumors from MNNG treated animals (circles) compared to animals treated with MNNG + MSCs (triangles)**.** (C) left panel, expression of genes associated with the tumor microenvironment in tumors from MNNG + MSC treated animals compared to animals treated with MNNG alone. Right panel, expression of mRNA in the colon mucosa of animals treated with MNNG or with MNNG + MSCs by 52 weeks. The ratio indicates the expression of MNNG+MSCs versus MNNG ($2^{-\Delta\Delta Ct}$ ± SEM) as determined by the Mann-Whitney test.

Figure 5. Late effects of MNNG and MSCs on the colon. (A) **The a**ppearance of representative colons from untreated control animals and from animals treated with MNNG alone or with MNNG + MSCs by 52 weeks. White arrows, tumor growth. (B) Box plot of the number of tumors by 32 and 52 weeks. White boxes, MNNG alone. Grey boxes, MNNG + MSCs. (C) Analysis of the size of 8 representative tumors per group collected by 52 weeks. Circles, MNNG alone; triangles, MNNG + MSCs. (D) D1 and D2, Adenocarcinomas (magnification x2. Bar, 2,000 µm). D3, Cancer *in situ* (magnification x10). D4, Adenocarcinoma invading the *sub mucosa* (magnification x10. Bar, 500 µm). (E) Kaplan-Meyer survival curves of control animals (black line), animals treated with MNNG (red line) or with MNNG + MSCs (blue line). The median survival was 55 weeks for animals treated with MNNG alone, 95 weeks for animals treated with MNNG + MSCs and 165 weeks for control animals. (F) Model

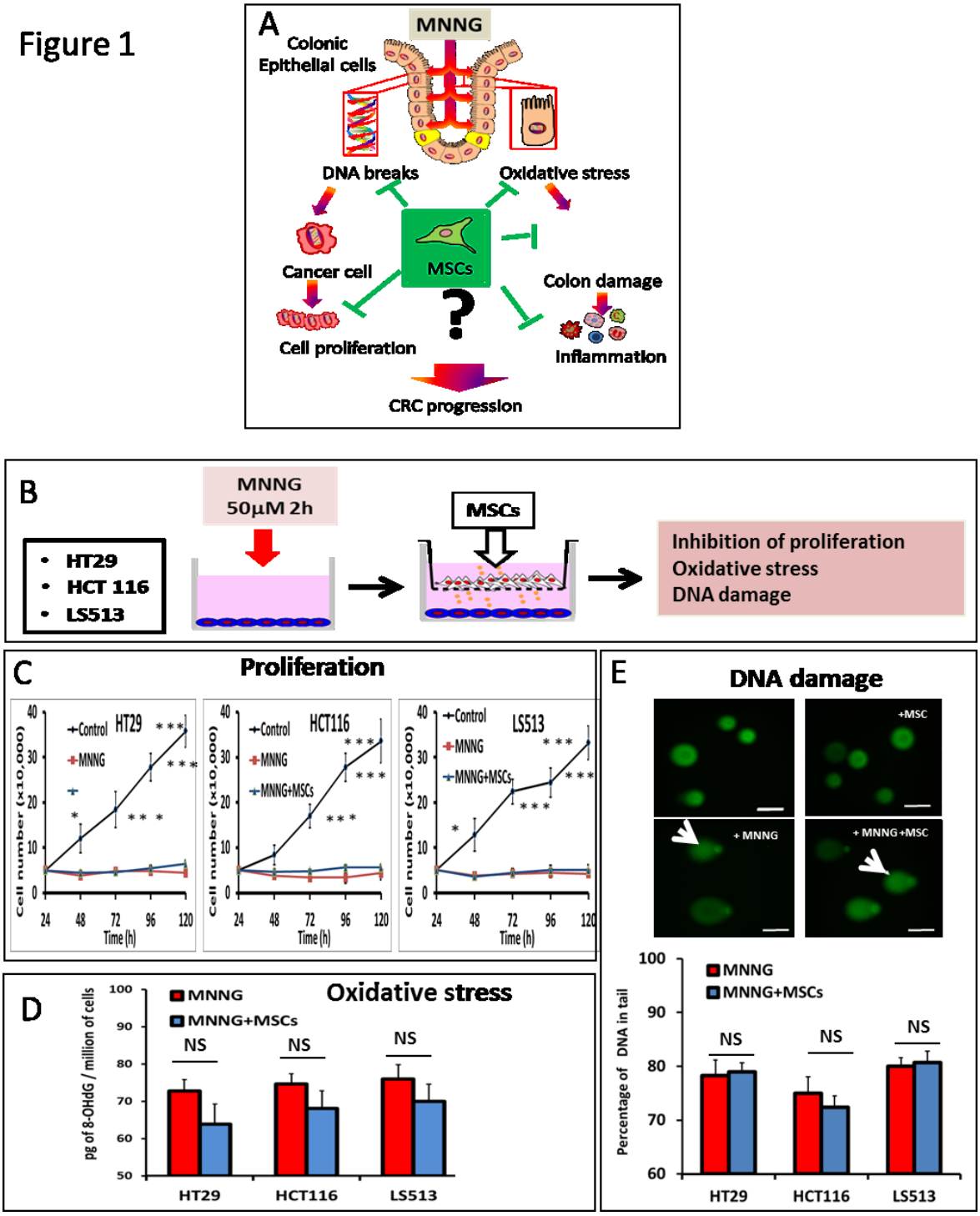
for the long-term effects of exogenous MSCs. 1, Inflammation is induced in the colon mucosa by MNNG. 2, Interaction and reprogramming of resident MSCs and immune cells by the exogenous MSCs. 3, Polarization of resident MSCs in the colon into MSC2 and of macrophages into M2 will counteract the inflammation and preserve tissue integrity. 4, Decreased tumor initiation (plain lines) will result in 5, a lower number of tumors. 6, The protein and gene expression profile suggests a dominant presence of MSC-1 and macrophages of a mixed M1/M2 phenotype in the colons of MSC-treated animals. 7, Reprogramming of resident MSCs and immune cells is accompanied by a decreased tumor volume. 8, The decreased number and size of MNNG-induced tumors is accompanied by increased life span.

Figure 6. Effects of MSCs administered after fractionated irradiation on tumor size, survival and tissue integrity. A) Three groups of animals (30 animals/group) were used to determine the influence of MSC administration on tumor size, tissue integrity and overall survival after radiotherapy. (B) Study Protocol. The red arrows indicate the various time of fractioned irradiation (15 fractions of 5 Gy each, 3 fractions per week delivered by a ^{60}Co source through a 2 x 3 cm window centered on the colorectal region). The green arrows indicate the times of MSCs injection (one injection per month for 3 months, at 36, 40 and 44 weeks after the start of the experiment). The red star indicates the removal of animals (15 animals per group) by 60 weeks for functional and molecular analysis. (C) Tumor size of tumors collected by 60 weeks. (D) Kaplan-Meyer survival curves after irradiation of MNNG-treated (red line) and MNNG-treated plus MSC-treated animals (blue line). (E) Morphometry of the mucosa. Left panels, Magnification x20. Bar 200 µm. Right panels Magnification x40. Bar 100 µm. The colored boxes illustrate the parameters depicted in F. White arrows indicate deposition of extracellular matrix components. (F) Left, crypt height. Middle, number of goblet cells per crypt. Right, number of crypts per 300 µm. Normal mucosa (white columns), MNNG + irradiation (red columns), MNNG + irradiation + MSCs (blue columns). (G) Scaling of fibrosis. Normal mucosa (white columns), MNNG + irradiation

(red columns), MNNG + irradiation + MSCs (blue columns). The number indicates the presence of fibrotic tissue in % of total surface. NS $p>0.05$; *** $p<0.01$ as determined by the Mann-Whitney test.

Figure 7. Influence of MSC administration after fractionated irradiation. (A) Protein content of TGFβ, TIMP1 and VEGF in the colon mucosa of control animals and after irradiation followed or not by MSC administration. (B) Expression of inflammatory and regenerative genes in the colon mucosa after irradiation, followed or not by MSC administration. The data illustrates the expression of the indicated genes and are expressed as the ratio of irradiation or irradiation + MSCs, compared to non-irradiated control tissue ($2^{-\Delta\Delta Ct} \pm SEM$) as determined by the Mann-Whitney test. ** $p<0.025$

Figure 1


A
MNNG
Colonic Epithelial cells
DNA breaks
Oxidative stress
Cancer cell
MSCs
Colon damage
Cell proliferation
Inflammation
CRC progression
B
MNNG 50µM 2h
MSCs
HT29
HCT 116
LS513
Inhibition of proliferation
Oxidative stress
DNA damage
C
Proliferation
Control
MNNG
MNNG+MSCs
HT29
HCT116
LS513
Cell number (x10,000)
Time (h)
D
Oxidative stress
pg of 8-OHdG / million of cells
NS
HT29
HCT116
LS513
E
DNA damage
+MSC
+ MNNG
+ MNNG +MSC
Percentage of DNA in tail

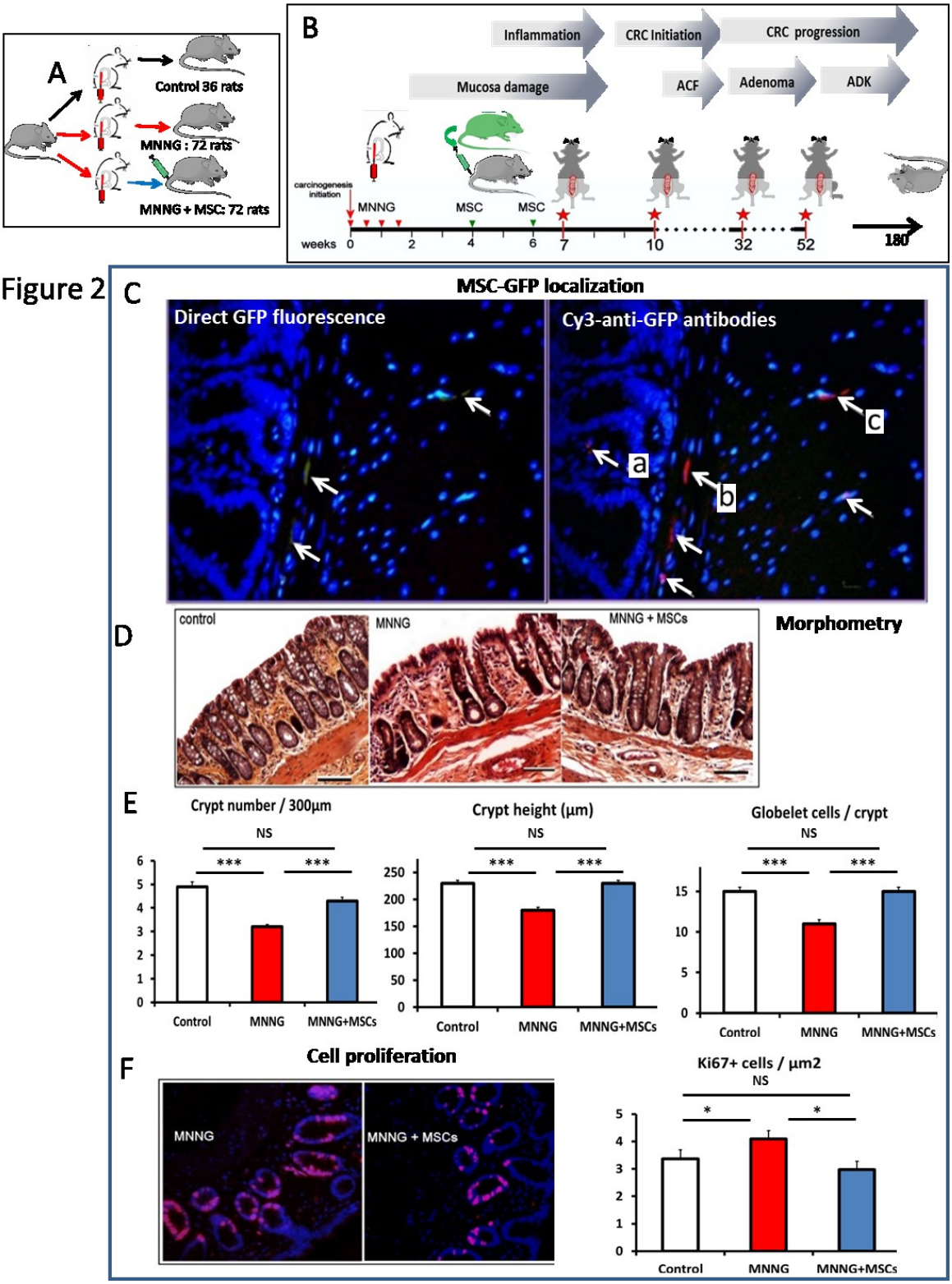
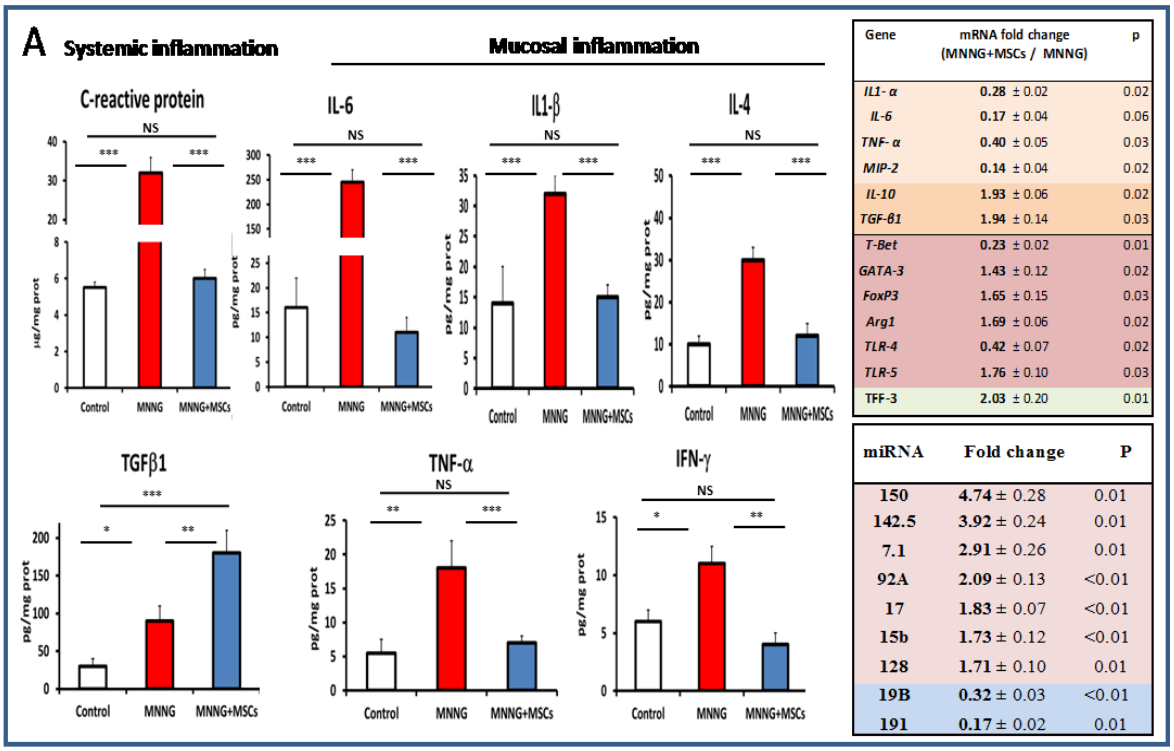

A
Control 36 rats
MNNG : 72 rats
MNNG + MSC: 72 rats
B
Inflammation
CRC Initiation
CRC progression
Mucosa damage
ACF
Adenoma
ADK
carcinogenesis initiation
MNNG
MSC
MSC
weeks 0 2 4 6 7 10 32 52 180
C
MSC-GFP localization
Direct GFP fluorescence
Cy3-anti-GFP antibodies
a
b
c
D
control
MNNG
MNNG + MSCs
Morphometry
E
Crypt number / 300µm
NS
***
***
Control
MNNG
MNNG+MSCs
Crypt height (µm)
Globelet cells / crypt
F
Cell proliferation
MNNG
MNNG + MSCs
Ki67+ cells / µm2
*
*

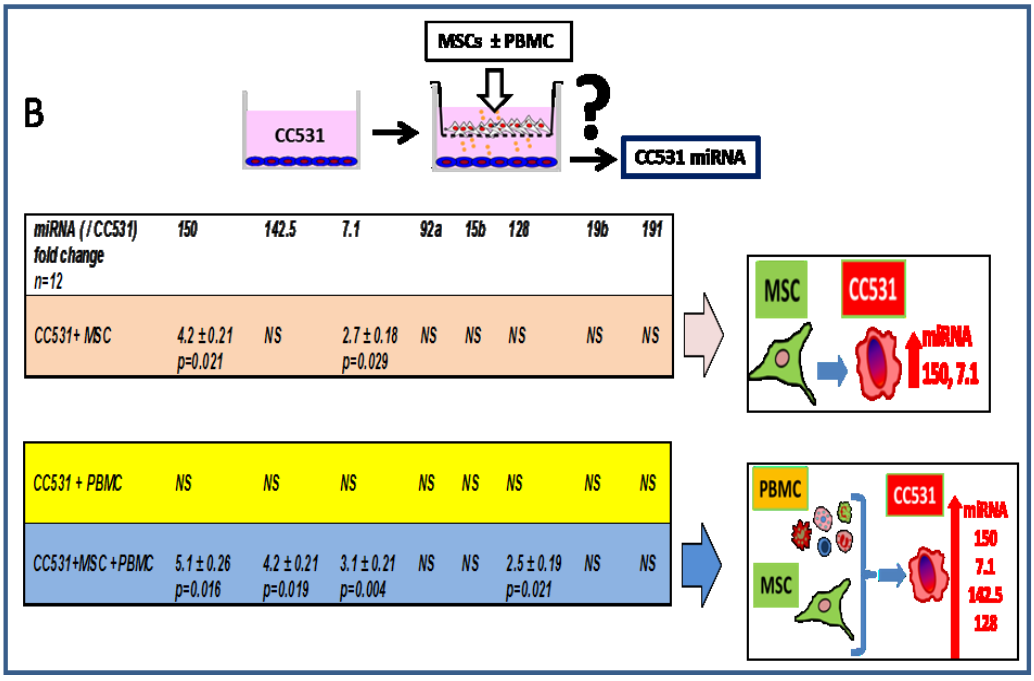
Figure 2

Figure 3



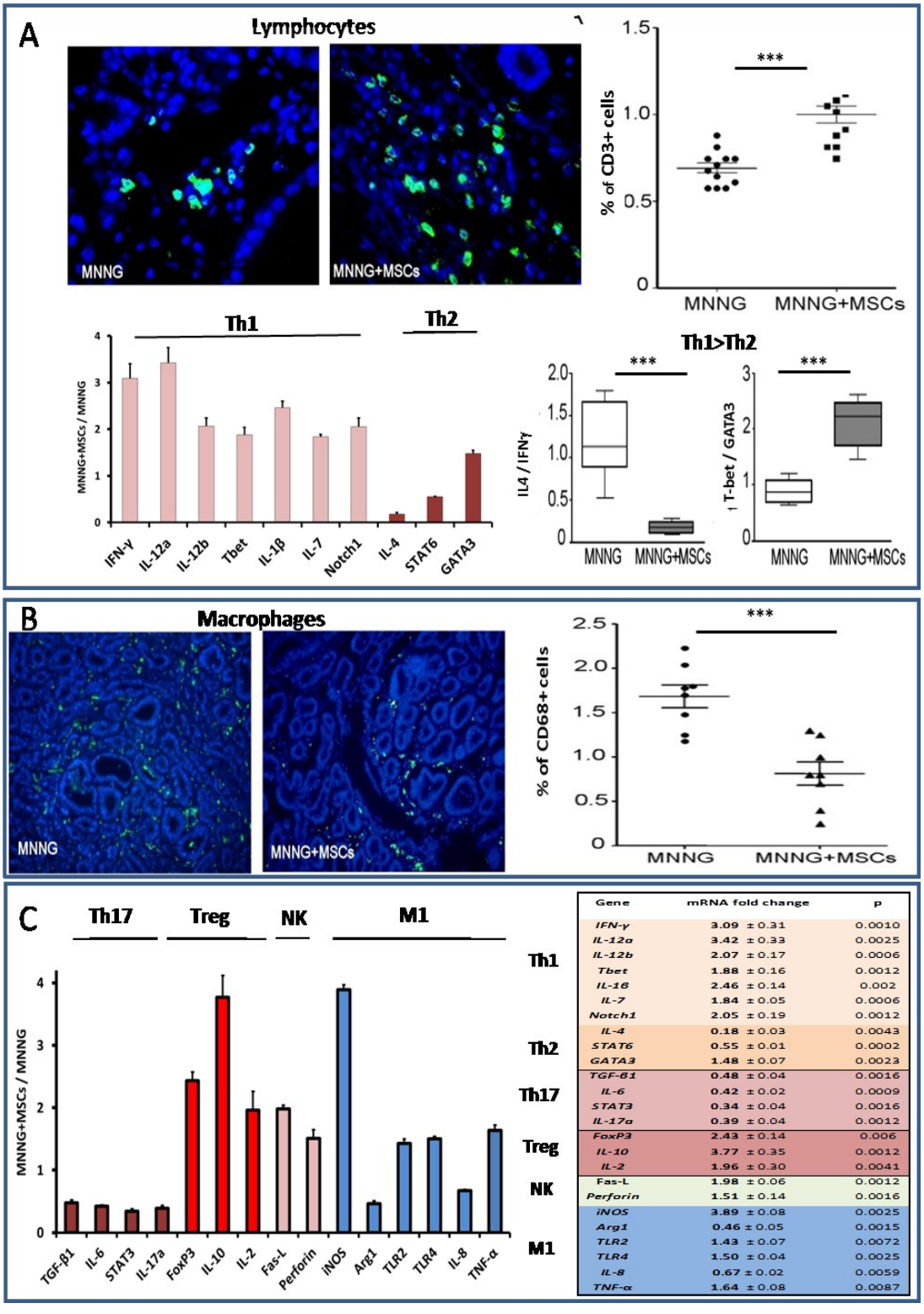
Gene	mRNA fold change (MNNG+MSCs / MNNG)	p
IL1- α	**0.28** ± 0.02	0.02
IL-6	**0.17** ± 0.04	0.06
TNF- α	**0.40** ± 0.05	0.03
MIP-2	**0.14** ± 0.04	0.02
IL-10	**1.93** ± 0.06	0.02
TGF-β1	**1.94** ± 0.14	0.03
T-Bet	**0.23** ± 0.02	0.01
GATA-3	**1.43** ± 0.12	0.02
FoxP3	**1.65** ± 0.15	0.03
Arg1	**1.69** ± 0.06	0.02
TLR-4	**0.42** ± 0.07	0.02
TLR-5	**1.76** ± 0.10	0.03
TFF-3	**2.03** ± 0.20	0.01

miRNA	Fold change	P
150	**4.74** ± 0.28	0.01
142.5	**3.92** ± 0.24	0.01
7.1	**2.91** ± 0.26	0.01
92A	**2.09** ± 0.13	<0.01
17	**1.83** ± 0.07	<0.01
15b	**1.73** ± 0.12	<0.01
128	**1.71** ± 0.10	0.01
19B	**0.32** ± 0.03	<0.01
191	**0.17** ± 0.02	0.01



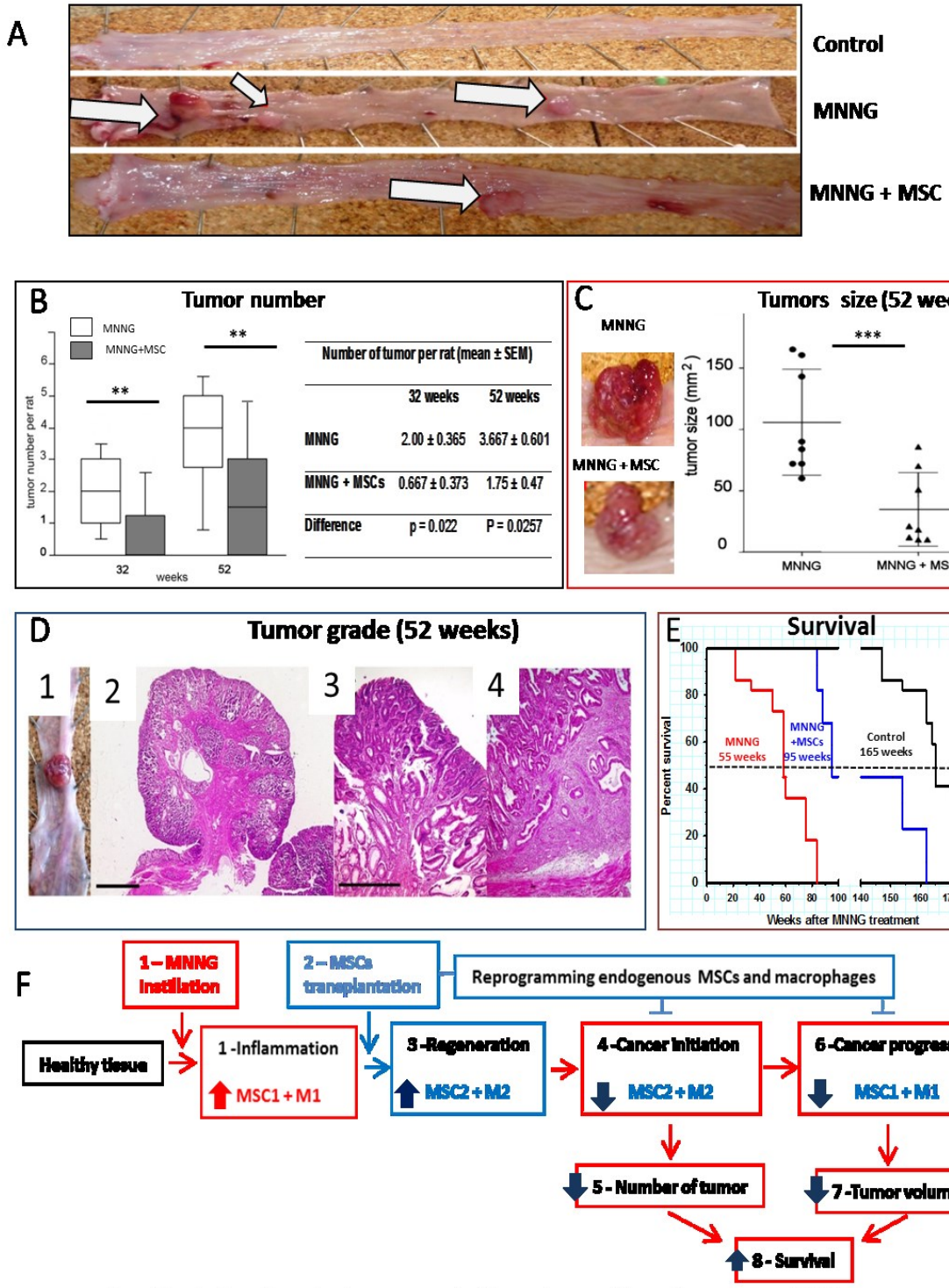
miRNA (/CC531) fold change n=12	*150*	*142.5*	*7.1*	*92a*	*15b*	*128*	*19b*	*191*
CC531+ MSC	*4.2 ± 0.21 p=0.021*	*NS*	*2.7 ± 0.18 p=0.029*	*NS*	*NS*	*NS*	*NS*	*NS*
CC531 + PBMC	*NS*	*NS*	*NS*	*NS*	*NS*	*NS*	*NS*	*NS*
CC531+MSC +PBMC	*5.1 ± 0.26 p=0.016*	*4.2 ± 0.21 p=0.019*	*3.1 ± 0.21 p=0.004*	*NS*	*NS*	*2.5 ± 0.19 p=0.021*	*NS*	*NS*

Figure 4



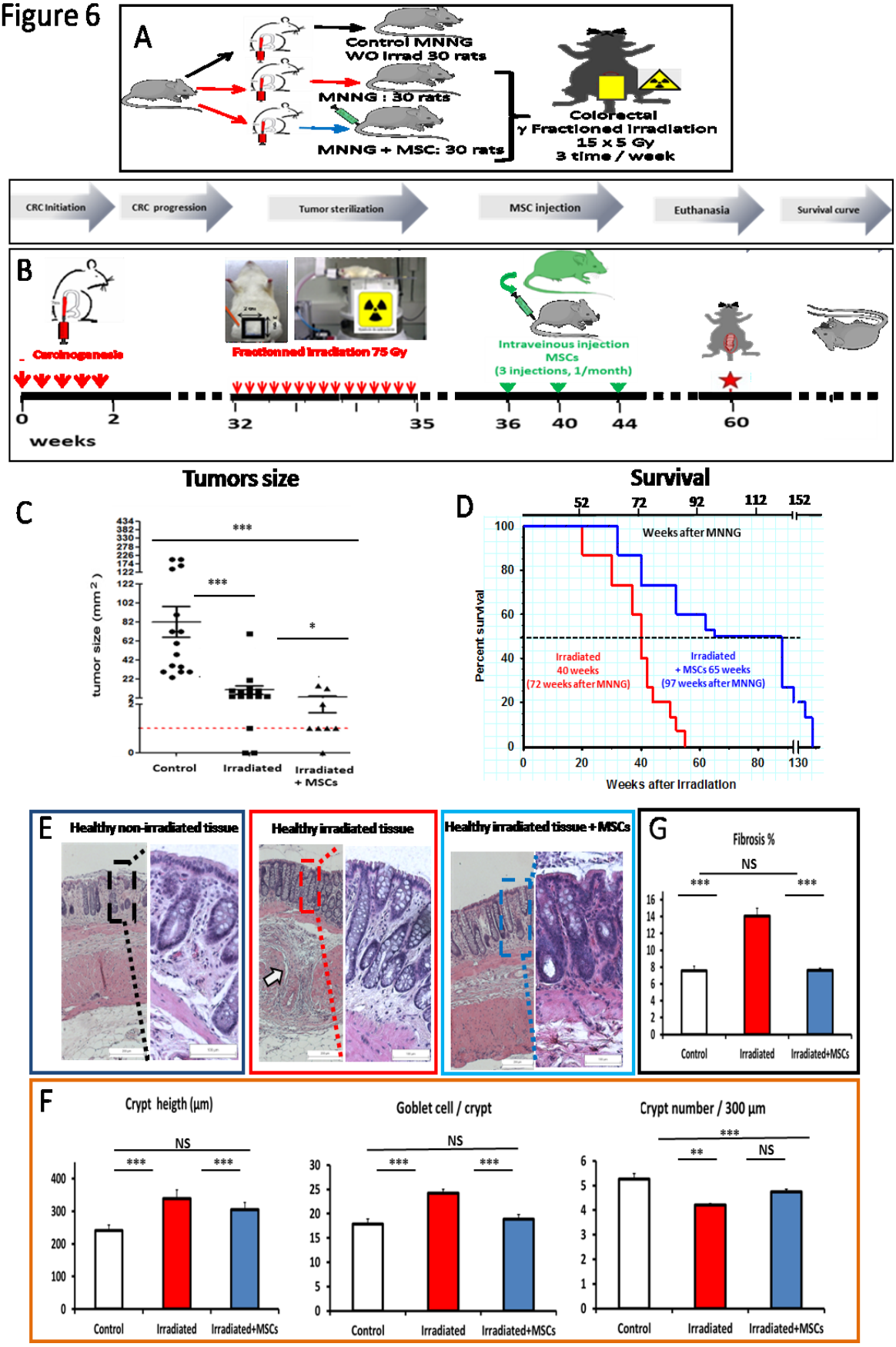
Gene	mRNA fold change	p
IFN-γ	3.09 ± 0.31	0.0010
IL-12a	3.42 ± 0.33	0.0025
IL-12b	2.07 ± 0.17	0.0006
Tbet	1.88 ± 0.16	0.0012
IL-18	2.46 ± 0.14	0.002
IL-7	1.84 ± 0.05	0.0006
Notch1	2.05 ± 0.19	0.0012
IL-4	0.18 ± 0.03	0.0043
STAT6	0.55 ± 0.01	0.0002
GATA3	1.48 ± 0.07	0.0023
TGF-β1	0.48 ± 0.04	0.0016
IL-6	0.42 ± 0.02	0.0009
STAT3	0.34 ± 0.04	0.0016
IL-17a	0.39 ± 0.04	0.0012
FoxP3	2.43 ± 0.14	0.006
IL-10	3.77 ± 0.35	0.0012
IL-2	1.96 ± 0.30	0.0041
Fas-L	1.98 ± 0.06	0.0012
Perforin	1.51 ± 0.14	0.0016
iNOS	3.89 ± 0.08	0.0025
Arg1	0.46 ± 0.05	0.0015
TLR2	1.43 ± 0.07	0.0072
TLR4	1.50 ± 0.04	0.0025
IL-8	0.67 ± 0.02	0.0059
TNF-α	1.64 ± 0.08	0.0087

Figure 5



Hypothesis for a transient presence but long-term action of exogenous MSCs.

Figure 6


A
Control MNNG
WO Irrad 30 rats
MNNG : 30 rats
MNNG + MSC: 30 rats
Colorectal
γ Fractioned Irradiation
15 x 5 Gy
3 time / week
CRC Initiation
CRC progression
Tumor sterilization
MSC injection
Euthanasia
Survival curve
B
Carcinogenesis
Fractionned Irradiation 75 Gy
Intraveinous injection
MSCs
(3 injections, 1/month)
0
2
32
35
36
40
44
60
weeks
Tumors size
C
tumor size (mm²)
Control
Irradiated
Irradiated
+ MSCs
Survival
D
Weeks after MNNG
Percent survival
Irradiated
40 weeks
(72 weeks after MNNG)
Irradiated
+ MSCs 65 weeks
(97 weeks after MNNG)
Weeks after Irradiation
E
Healthy non-irradiated tissue
Healthy irradiated tissue
Healthy irradiated tissue + MSCs
G
Fibrosis %
NS
Control
Irradiated
Irradiated+MSCs
F
Crypt heigth (µm)
Goblet cell / crypt
Crypt number / 300 µm
NS
Control
Irradiated
Irradiated+MSCs

Article 2 : HGF and TSG-6 released by Mesenchymal Stem Cells attenuate radiation-induced colorectal fibrosis by suppressing the pro-fibrotic activity of colonic smooth muscle cells and macrophages

La fibrose colorectale est une affection grave du tube digestif caractérisée par une augmentation progressive du dépôt de matrice extracellulaire (MEC) menant à la rigidification du tissu et à la sténose. C'est une caractéristique de pathologies diverses, dont les maladies inflammatoires chroniques de l'intestin (MICI) et les atteintes chroniques des radiothérapies. Dans les pays développés, le nombre de cas de cancer augmente continuellement. Le traitement des tumeurs est de plus en plus efficace mais l'augmentation des chances de survie pose le problème de la prise en charge des patients. Le côlon-rectum est particulièrement radiosensible et donc susceptible de développer des atteintes secondaires suite à la radiothérapie. De même, le nombre de MICI est en augmentation constante. En l'absence de traitement efficace de ces lésions, la prise en charge est majoritairement palliative. Les Cellules Souches Mésenchymateuses possèdent des propriétés régénératives et anti-fibrosantes démontrées dans divers modèles (GVHD, Crohn…). Il n'existe pour l'instant que peu de données sur leur effet sur les atteintes secondaires des radiothérapies colorectales. Nous avons évalué, au cours des travaux présentés ci-après, l'effet des CSM sur la fibrose colorectale radio-induite.

Dans un modèle d'irradiation colorectale chez le rat, produisant des atteintes proches de celles observées après radiothérapie et lors des MICI, nous avons démontré l'effet anti-fibrosant des CSM. Cet effet est majoritairement supporté par un effet inhibiteur exercé par les CSM sur les cellules productrices de MEC : myofibroblastes, cellules musculaires lisses et macrophages. En particulier, nous avons démontré une stimulation intense de l'activation des macrophages M2, anti-inflammatoires et intervenant dans le remodelage matriciel. *In vitro*, nous avons également démontré un effet paracrine direct des CSM sur les myofibroblastes et cellules musculaires lisses. Nous avons identifié deux effecteurs majeurs de l'effet pro-fibrosant des CSM sur la fibrose : HGF et TSG-6. Ces protéines agissent respectivement en inhibant la voie de signalisation pro-fibrosante de TGF-β et en régulant la polarisation des macrophages. Des expériences *in vitro* de coculture nous ont permis de démontrer un

effet différentiel de HGF et TSG-6 sur chaque type cellulaire. L'amélioration de la lésion induite par les CSM était accompagnée d'une amélioration de la survie.

Nos résultats supportent l'utilisation des CSM après radiothérapie abdomino-pelvienne et dans le cas de la fibrose colorectale associée aux MICI. Ils soulignent également l'intérêt de la réponse orchestrée des CSM, capables de produire de nombreux facteurs solubles, par rapport aux traitements pharmacologiques classiques

HGF and TSG-6 released by Mesenchymal Stem Cells attenuate radiation-induced colorectal fibrosis by suppressing the pro-fibrotic activity of colonic smooth muscle cells and macrophages

Benoît Usunier[a], Bruno L'Homme[a], Valérie Holler[a], Christine Linard[a], Olivier Guipaud[b], Marc Benderitter[c], Alain Chapel[a]

a-Laboratory of Research on Irradiated Healthy Tissues Regeneration (LR2I), Institute for Radiological Protection and Nuclear Safety (IRSN), F-92260 Fontenay-aux-Roses, France.
b-(L3R), Institute for Radiological Protection and Nuclear Safety (IRSN), F-92260 Fontenay-aux-Roses, France.
c-(SRBE), Institute for Radiological Protection and Nuclear Safety (IRSN), F-92260 Fontenay-aux-Roses, France.

Running title

Administration of MSC inhibits colorectal fibrosis after radiotherapy

Keywords

Mesenchymal stem cells, colorectal, radiotherapy, fibrosis, HGF, TSG-6

Corresponding author:

Alain Chapel
IRSN, PRP-HOM/SRBE/LR2I
BP-17, 92262 Fontenay-aux-Roses CEDEX, FRANCE
Tel: 33 1 58 35 95 46; Fax: 33 1 58 35 84 67
E-mail: alain.chapel@irsn.fr

Conflicts of interest

The authors declare no conflict of interest.

Manuscript word count: 7995

Number of figures: 7 figures

Significance

- MSC administration inhibits colorectal fibrosis after irradiation *in vivo*
- HGF and TSG-6 are key effectors of MSC-mediated inhibition of fibrosis, respectively by suppressing TGF-β signaling and regulating the polarization of macrophages.
- MSC administration might prevent the deleterious effects of radiation therapy on healthy tissues and attenuate the development of bowel disorders.

Abstract

The number of patients suffering from inflammatory bowel Diseases (IBDs) and chronic severe damages after pelvic radiotherapy (pelvic radiation disease, PRD) is expanding. Their common feature is fibrosis in the colon and rectum. Treatments are palliative, and the growing numbers of patients urges for alternative strategies. Evidences from preclinical and clinical studies highlight the efficiency of Mesenchymal Stem Cell (MSC) therapy for the treatment of IBDs and radiation-induced bowel toxicity after cancer treatment. The ability of MSCs to reduce radiation-induced fibrosis to the colon-rectum was investigated *in vivo,* in a model of rat receiving a colorectal radiation. This model produced damages analogous to those observed in patients after pelvic radiotherapy. To analyze mechanism of transplanted MSCs on the development of fibrosis, MSCs were injected intravenously after radiation exposure. MSCs limited fibrogenesis, through the inhibition of inflammatory pathways, the reduction of smooth muscle cells and myofibroblast activation in agreement with an increase in survival animals. MSCs inhibited myofibroblast differentiation by reducing the expression of pro-fibrotic IGF-1. MSCs oriented T lymphocytes and macrophages polarization toward an anti-fibrotic profile. HGF and TSG-6 were identified *in vivo* as key effectors secreted by MSCs. These two factors exerted different and complementary effects. These results propose MSC therapy as a first line treatment of colorectal fibrosis in chronic inflammatory intestinal diseases and after pelvic radiotherapy complications such as PRD.

Introduction

Fibrosis is defined as the accumulation of extracellular matrix (ECM) resulting from a pathological repair process. It is a feature of many chronic inflammatory diseases, such as liver cirrhosis, cystic fibrosis and hepatitis. While a lot of attention has been focused on the treatment of fibrotic diseases of the heart, kidneys, liver and lungs, there seems to be a lack of data on therapies for intestinal fibrosis, in particular following radiotherapy. The colon and rectum are susceptible to Inflammatory Bowel Diseases (IBDs), such as Crohn's disease, which often feature fibrosis. Following radiotherapy of the pelvic area (e.g. for prostate or cervix cancer), the distal colon and the rectum, which are particularly radiosensitive due to their fast renewing epithelium, can develop late complications, including fibrosis. These disorders greatly impact the quality of life of patients, induce debilitating symptoms such as chronic pain, hemorrhages and incontinency, and can lead to lethal loss of tissue function.

Although the need for a treatment for IBDs has been extensively highlighted, late side effects of pelvic radiotherapy, known as “Pelvic Radiation Disease” (PRD), have long been neglected [1]. This means that the potential number of patients who will suffer from colorectal fibrosis in the future may have been underestimated. In fact, the number of cancers worldwide has been continuously rising during the past decades and is expected to reach 19.3 million in 2025 [2]. The pelvic area homes some of the most frequent cancers (e.g. prostate, colorectal, cervix, bladder) for which 60% of treatment protocols include radiotherapy. An estimated 20% of patients suffer from late complications 20 years after pelvic radiotherapy [1]. Since the number of patients suffering from IBDs is also growing [3], the prevalence of colorectal fibrosis should progressively climb in future years, pressing the need for new management strategies. Indeed, there is currently no efficient treatment for fibrosis.

Fibrosis appears following injury in almost any tissue. Chronic insults, such as persisting inflammation, prevent proper tissue regeneration and continuously activate repair pathways. In particular, while the production of ECM by “myofibroblasts” is necessary to the formation of granulation tissue, the constant activation of new myofibroblasts leads to the overgrowth of the connective tissue, which can’t be rescued by the host’s ECM-degradation systems. The progressive infiltration of ECM in the organ, replacing functional and structural cells, induces tissue stiffness and loss of functionality. In the colon and-rectum, loss of muscle contractibility and stenosis can lead to a fatal occlusion. Similar to IBDs, radiation-induced colorectal damages involve severe mucosal damages, chronic inflammation and activation of the pro-fibrotic TGF-β/Smad pathway, a major contributor to the fibrogenic process [4]. This leads to the differentiation of resident and recruited myofibroblasts, and the acquisition of a pro-fibrotic phenotype by Smooth Muscle Cells (SMCs) of the muscular layer, which shift from a contractile to a secretory phenotype [5, 6]. The concomitant upregulation of ECM components, ECM degrading enzymes (MMPs: Matrix Metalloproteinases) and their inhibitors (TIMPs: Tissue Inhibitors of Metalloproteinases) causes a defect in ECM turnover [7]. The late phase of colorectal fibrosis is characterized by long spans of ECM, sometimes infiltrating the muscle layers, and a paucicellular microenvironment due to ischemia and mechanical stress [5, 8].

Despite numerous candidate drugs, including mostly anti-inflammatory molecules and compounds targeting TGF-β signaling, no efficient treatment exists yet. Recently, Mesenchymal Stem Cell (MSC) therapy has been used successfully in the treatment of inflammatory diseases, including Crohn’s disease [9, 10] and Graft-Versus-Host-Disease (reviewed in [11]). Moreover, clinical studies show a beneficial effect of the injection of MSCs on radiological burns [12] and on colorectal complications induced by overexposure to ionizing radiations during prostate cancer radiotherapy [13]. Finally, a large number of preclinical and clinical studies suggest the ability of MSCs to inhibit

fibrosis development in various organs, such as the heart, liver, kidneys and gut (reviewed in [14]). Adding to already known regenerative and immunomodulatory properties of MSCs, these data highlight other anti-fibrotic effects, including the inhibition of ECM accumulation, in particular by suppressing TGF-β signaling. Accordingly, studies in our lab have also put forth the regenerative and anti-fibrotic effects of MSCs in models of radiation-induced fibrosis in pigs [15] and rats [16-19]. In these models, MSCs act by modulating immune cells response, as evidenced by changes in T helper cells profiles [17, 18] and macrophage polarization [15]. These results also evidence the inhibition of TGF-β signaling and the promotion of ECM degradation by MSCs [15, 18].

MSCs have been referred to as an "injury drugstore", in regard to their ability to secrete many soluble factors mediating their effects (reviewed in [20]). These molecules allow for multiple effects, ranging from pro-angiogenic to anti-apoptotic [14]. As far as fibrosis is concerned, specific anti-fibrotic proteins secreted by MSCs have been identified. Of note, Hepatocyte Growth Factor (HGF) and Tumor necrosis factor-Stimulated Gene-6 (TSG-6) have proven to be major effectors of the anti-fibrotic effects of MSCs in several models (e.g. skin and kidney fibrosis) [21, 22]. HGF is a pleiotropic growth factor with immunomodulatory properties and the ability to inhibit TGF-β signaling. On the other hand, TSG-6 is involved in the recruitment and differentiation of leucocytes, mainly through its interactions with pro-inflammatory hyaluronan [23, 24]. *In vitro* experiments support these observations, as recombinant HGF or TSG-6 partially reproduced MSCs' effects on pro-fibrotic proximal tubular epithelial cells [22].

Based on these observations, and the need to better manage colorectal fibrosis, we aimed at studying the mechanisms involved in the effect of MSCs on an animal model of pelvic radiotherapy-induced fibrosis. Sprague-Dawley rats were irradiated to the colon-rectum, and injected 2 and 3 weeks later with MSCs. To confirm the implication of HGF and TSG-6 in MSC-mediated effects, two distinct groups of rats were injected with MSCs silenced for either *Hgf* or *Tsg-6* after irradiation, in a separate experiment. We assessed the effects of MSCs on radiation-induced damages to the colon-rectum, inflammation and ECM turnover. *In vitro*, we cocultured MSCs with irradiated myofibroblasts or SMCs to determine whether a direct effect was induced on these cell types.

Material and Methods

Animals

All experiments were performed in compliance with French laws and guidelines for animal experiments (Act no. 92–333 of 2 October 2009) and approved by the Ethics Committee of Animal Experimentation ''CEEA number 810" (Protocol numbers: P09–10). Sprague-Dawley (SD) male rats

(300 g) were purchased from Janvier Labs (LeGenest St Isle, France). eGFP transgenic rats (strain "green rat CZ-C04 Tg Act eGFP") derived from the Sprague-Dawley strain, were obtained by the IRSN from Pr. Otabe (Osaka university, Osaka, Japan) with MTA and subsequently bred in the IRSN's animal housing facility. The progeny of eGFP rats was systematically tested for the expression of the transgene. Transgenic rats were used as the source of GFP-labeled MSCs. The animals were housed in double-decker cages, two or three to a cage, with access to food and water *ad libitum* and light and dark cycles. All efforts were made to minimize suffering and all experiments were performed under gaseous anesthesia with isoflurane (Aerrane, Baxter SA, Lessines, Belgium). Animal behavioral and physiological parameters (e.g. bleeding and diarrhea) were monitored daily and suffering animals were euthanized. Euthanasia was performed in a CO_2 chamber. Sprague-Dawley rats, aged ten weeks (250-300g) at the beginning of the experiment were divided in 2 batches. The control batch consisted in 6 animals neither irradiated nor injected with MSCs ("control" group). The other batch underwent colorectal irradiation, followed or not by the transplantation of MSCs. 18 animals were irradiated without MSC transplantation ("IRR" group) and 18 received wild-type MSC injections ("MSC" group). The protocol is further detailed in Figure 1A. Finally, two groups of 6 animals received GFP-MSCs silenced for either *Hgf* ("MSC-HGF" group) or *Tsg-6* ("MSC-TSG-6" group). The protocol is further detailed in Figure 6A.

In another experiments, 24 rats were irradiated and 26 rats were irradiated and injected with MSCs according to the same protocol as described above, to determine the effect of MSCs on the survival of irradiated rats.

Radiation schedule, MSC treatment and tissue sampling

Rats were exposed to an X-ray source (2.43 Gy/min) and received a single radiation dose of 29 Gy as previously described [18]. The radiation field was confined to a 2x3 cm window localized to the colon-rectum. In groups treated with MSCs, 5.10^6 cells were injected via the tail vein 2 and 3 weeks after irradiation to study the effect of MSC therapy on radiation-induced fibrogenesis. Rats were euthanized 4, 5 and 7 weeks after irradiation. Rats having received MSC-HGF of MSC-TSG-6 were euthanized 7 weeks after irradiation. Colon and rectum were sampled to evaluate the progression of radiation-induced lesions (e.g. mucosal damages and ECM deposition). The protocol is further detailed in figures 1 and 6. Euthanasia was performed under isoflurane anesthesia. After euthanasia, we sampled 3 cm of the colon-rectum included in the radiation field. The colon-rectum was opened lengthwise, and separated in 3 longitudinal sections and processed in view of future experiments. RNALater® (ref: AM7024, Qiagen, Les Ulis, France) was used to preserve samples intended for gene

expression analysis. For protein quantification, samples were rapidly frozen in liquid nitrogen before storage at -80°C with samples intended for RNA extraction. The last sections were immersed in 4% buffered formaldehyde then dehydrated and paraffin-embedded. Results for each group were compared as follows: IRR was compared to control; MSC was compared to control and IRR; MSC-HGF and MSC-TSG-6 ware compared to MSC.

Isolation, characterization and culture of MSCs

GFP-MSCs were extracted from adipose tissue obtained from seven-week-old eGFP transgenic rats as previously described [18]. Briefly, subcutaneous inguinal adipose tissue was removed from eGFP-SD rats, finely minced and enzymatically digested with 0.1% collagenase type I (reference : C0130, Sigma-Aldrich, St Quentin Fallavier, France) at 37°C, then filtered through a 30 µm filter. This process was repeated three times and the remaining collagenase was neutralized with 10% FBS in the extract. Cells were washed with Phosphate Buffered Saline (PBS) and suspended in MEM-α containing 20% FBS, 1% Penicillin/Streptomycin and 1% L-Glutamin. Cells were seeded at 1000 cells/cm² and medium was changed 4 days after. On day 7, the monolayer of adherent cells was trypsinized (Trypsin-0.25% EDTA, Thermo Fisher Scientific), washed three times in PBS and resuspended at 10^7 cells/mL. The phenotype of amplified Ad-MSCs was verified by flow cytometry. Cultures were assessed for the presence of CD90 (clone OX-7; BD Biosciences, Le Pont de Claix, France) and CD73 (clone 5F/B9; BD Biosciences), and the absence of haematopoietic lineage cells was verified with CD34 (clone ICO115; Santa Cruz Biotechnology, Inc., Dallas, USA) and CD45 (clone OX-1; BD Biosciences) markers. Controls were performed using isotype identical antibodies.

***In vitro* experiments**

A coculture system was implemented to investigate the influence of human MSCs on the main cell types responsible for colon fibrosis. Primary human Colonic Smooth Muscle Cells (hCoSMCs, ref: 2940) or human Intestinal Fibroblasts (hIFs, ref: 2920-SC) were obtained from ScienCell (6076 Corte Del Cedro Carlsbad, CA 92011, USA) and cultivated respectively in Smooth muscle Growth Medium-2 (SmGM-2™, ref: CC-3182) and Fibroblasts Growth Medium-2 (FGM-2™, ref: CC-3132) obtained from

Lonza Verviers (Verviers, Belgium). MSCs were cultured in Minimal Essential Medium α containing 20% Fetal Bovine Serum (FBS), 1% Penicillin/Streptomycin and 1% L-Glutamine obtained from Thermo Fisher Scientific (Illkrich, France). Cells were used between passages 2 and 5. Briefly, 6000 MSCs/cm² were seeded on Transwells® with 0.4 µm pores (Corning Life Sciences). On day 4, hIFs or hCoSMCs were seeded on 6 well plates (Falcon) at a respective density of 6000 and 5000 cells/cm². 4 days later, hIFs and hCoSMCs were irradiated with a single 20 Gy dose (2.43 Gy/min) to induce their pro-fibrotic phenotype. 12 hours later, medium was emptied from Transwells® containing the MSCs, which were transferred to hIF and hCoSMC cultures. hIFs and hCoSMCs were collected 12 hours after the transfer and dry cell pellets were stored at -80°C prior to RNA extraction. The protocol is further detailed in Figure 8A.

RNA interference against *Hgf* and *Tsg-6*

HGF and TSG-6 effectors of MSCs, as evidenced both *in vitro* and *in vivo*. *HGF* or *TSG-6* genes were silenced in MSCs for *in vitro* coculture and *in vivo* transplantation experiments. ON-TARGETplus SMARTpools of siRNAs, designed to improve knockdown efficiency, were purchased from GE Healthcare Sa (Vélizy-Villacoublay, France), as were other transfection reagents. siRNAs used during these experiments were specific for the following genes: human *HGF* (reference L-006650-00-0050), rat *Hgf* (reference L-089896-02-0050), human *TSG-6* (ref: L-012379-00-0050) and rat *Tsg-6* (ref: L-108341-00-0050). Transfection of human and rat MSCs was performed as instructed by the manufacturer. Briefly, human or rat MSCs were seeded at a density of $3x10^3$ cells/cm^2. Cells were transfected at 80% confluence with a solution containing 2 µL/mL Dharmafect1 (ref: T-2001-03) and 1 µM of either siRNA in complete MSC growth medium (as described before. A preliminary experiment was performed to assess silencing efficiency. RNA interference against the *GAPD* gene was used as positive control (ON-TARGETplus GAPD Control Pool, ref: D-001830-10-05) and a non-targeting siRNA served as negative control (ref: D-001810-10-05). mRNA was extracted from these cells and the levels of HGF and TSG-6 expression were measured using RT-qPCR. During *in vitro* and *in vivo* experiments, MSCs were used 48 hours after transfection, when silencing was most effective.

RNA isolation, reverse transcription, quantitative real-time PCR, array analysis

The expression of the eGFP gene in GFP-MSCs was assessed by RT-qPCR as previously published (Sémont et al. 2013). Tissue and cell total RNA was extracted using the RNeasy® Mini Kit (ref:

74106, Qiagen) for cell cultures and the RNeasy® Fibrous Tissue Mini Kit (ref: 74704) for colon-rectum samples. Rat samples were first disrupted using TissueRuptor disposable probes (ref: Qiagen). The purity and concentration of RNA extracts was assessed by spectrophotometry before reverse transcription. One µg of mRNA was used to produce cDNAs for each sample using the High Capacity cDNA Reverse Transcription kit (ref: 4368813, Thermo Fisher Scientific). RT-qPCR was performed with TaqMan® Universal PCR Master Mix (ref: 4326708) and TaqMan® Gene Expression Assays (ref: 4331182) purchased from Thermo Fisher Scientic. The QuantStudio™ 12K Flex Real-Time PCR System (ref: 4471090, Thermo Fisher Scientific) was used to evaluate gene expression profiles. Gene expression data analysis was performed with QuantStudio™ 12K Flex Real-Time PCR Software and ExpressionSuite Software 1.1 (Thermo Fisher Scientific). The Relative Quantity (RQ) for each gene was calculated using the $2^{-\Delta\Delta Ct}$ method. During *in vitro* experiments, *GAPDH* served as endogenous control and irradiated cells were selected as the reference group. Gene expression profiles in rats were measured using *Ywhaz* (Tyrosine 3-Monooxygenase/Tryptophan 5-Monooxygenase Activation Protein Zeta) as an endogenous control and non-irradiated animals as the control group.

Protein extraction, quantification and ELISAs

Tissue samples stored at -80°C were thawed and finely minced prior to protein extraction. Proteins were extracted by tissue disruption with the TissueRuptor (Qiagen) in ice-cold PBS containing protease inhibitors (Complete Mini, Roche).After centrifugation, protein concentration was assessed in the supernatant using the Pierce™ BCA Protein Assay Kit (Thermo Fisher Scientific). ELISAs for rat MMP-2 (ref: EK0639, Boster Biological Technology Co., Ltd., Pleasanton, CA, USA), MMP-9 (ref: E-EL-R0624, Elabscience Co., Ltd., Wuhan Shi, China) and TGF-β1 (ref: EK0514, Boster Biological Technology Co., Ltd.) were performed as instructed by their respective manufacturers.

Histology and immunohistochemistry (IHC)

Paraffin-embedded samples were cut into 4 µm sections and stained with hematoxylin-eosin-saffron (HES) or PicroSirius (Direct Red 80, ref: 365548-25G, Sigma-Aldrich®, Lyon, France). Full length longitudinal tissue sections were analyzed for lengths and fibrosis area measurements. ECM areas were automatically measured using Histolab software (Microvision Instruments, Lisses, France) to automatically detect Picrosirius stained surfaces (magnification 40X). The percentage of fibrosis area is obtained by dividing the ECM area by the total surface of tissue in each field, which was manually

measured on Histolab. For immunohistochemical protocols, paraffin-embedded sections were dewaxed and rehydrated, then permeabilized with a solution containing 0.1% Triton (N3020-100ML, Sigma-Aldrich). Staining of α-SMA required an extra step in a methanol solution containing 0.3% H_2O_2 to inhibit endogenous peroxidases. Antigen retrieval was performed by 3x5 minutes microwave cycles in Target Retrieval Solution (ref: S169984-2, Agilent Technologies, Les Ulis, France). Primary antibodies against α-SMA (ref: A2547, Sigma-Aldrich), CD68 (ab125212, Abcam, Paris, France) and CD206 (bs-2664R, Bioss antibodies™, Woburn, USA) were used for myofibroblast and M2 macrophages quantification. We used HRP Horse Anti-Mouse IgG secondary antibody (ref: PI-2000, Vector Laboratories, Inc., Burlingame, USA) and Histogreen (ref: E109, Linaris, Dossenheim, Germany) to reveal α-SMA staining followed by counterstaining with Nuclear Fast Red solution (ref: N3020, Sigma-Aldrich). For co-staining of CD68 and CD206, secondary antibodies conjugated with fluorescent dyes Alexa Fluor 568 (Goat anti-Rabbit, red, ref: A-11011, Thermo Fisher Scientific) or Alexa Fluor 488 (Donkey anti-Rabbit, green, ref: A-21206, Thermo Fisher Scientific) were employed respectively. Fluorescent slides were mounted with Vectashield® HardSet Antifade Mounting Medium with DAPI (ref: H-1500, Vector Laboratories, Inc.), thus showing cell *nuclei* in blue under fluorescence microscopy. We used the Fiji software (Fiji Is Just Imagej, http://imagej.net/Fiji) to make measurements on these slides. Myofibroblasts, M1 and M2 macrophages were numbered on their respective slides, on 5 fields per sample (magnification: 100X), and the total surface of the tissue on each field was measured to calculate cell density. M1 macrophages stained positive for CD68 only (red), while M2 macrophages appeared yellow, being positive for both CD68 (red) and CD206 (green).

Statistical analysis

Statistical analyses were achieved with SigmaPlot v11 (Systat Software GmbH, Erkrath, Germany). Two-group comparison were performed with t-tests, while one-way ANOVAs followed by Bonferroni t-tests were used for multiple group comparison. Survival curves were compared with the log-rank test. Results are expressed as mean ± standard error of the mean (SEM). A value of $p \leq 0.05$ is considered to be statistically significant. In the figures, asterisks correspond to $p<0.001$ (***), $p<0.01$ (**) and $p<0.05$ (*).

LogRank survival analysis was performed using R (R Foundation). The competitive risks methodology was used to discriminate between non radiation-related deaths (during anesthesia or MSC injection) and radiation-induced mortality.

Results

We investigated the ability of MSCs to reduce radiation-induced fibrosis to the colon and rectum. A model of colorectal irradiation in rats, which has been described in our lab, was used. This model produces damages similar to those observed in patients suffering from side effects of radiotherapy. We described the fibrosis-related features of the irradiated colon-rectum of Sprague-Dawley rats. MSCs were injected to a group of irradiated animals to study their effect on fibrogenesis. Comparison between irradiated and irradiated and MSC-treated rats showed a marked reduction in fibrosis following MSC injection. We identified two key mediators secreted by MSCs, HGF and TSG-6, which are necessary to yield MSCs' anti-fibrotic effects.

Pelvic irradiation-induced fibrosis

In order to characterize fibrogenesis in rats after colorectal irradiation, we first described the changes in the expression profile of ECM-related genes (collagens, MMPs, TIMPs…) using real-time quantitative PCR: ECM components (e.g. collagens and fibronectin), MMPs (ECM-degrading enzymes) and TIMPs (MMP inhibitors). Four weeks post-IR, ECM components collagen type III and Sparc were overexpressed when compared to the control group (Figure 1B). Genes coding for MMPs (-2, -9, -12, -13 and -14), TIMPs (-1, -2, -3 and -4) were upregulated at the same time. Since plasmin is a major activator of MMPs, we measured the expression of components of the plasminogen activation system. Serpine-1, the inhibitor of plasminogen activation, was overexpressed 4 weeks post-IR. Since ECM turnover is controlled by the amount of ECM components produced, the degradation of ECM by MMPs and the inhibition of MMPs by TIMPs, we used the collagen-to-MMP-to-TIMP ratio adapted to radiation enteritis [7] :

$$\frac{\text{Fold change of ECM component}}{\left(\frac{\text{Fold change of MMP specific to ECM component}}{\text{Fold change of TIMP specific to MMP}}\right)}$$

Results lower than 1 indicate a tendency toward ECM degradation, whereas values over 1 show ECM accumulation. 4 weeks post-IR in our model, Collagen-to-MMP-to-TIMP ratios showed a strong tendency toward the accumulation of various ECM components (collagen type I, collagen type III, fibronectin and Sparc) (Figure 1C). Chronic inflammation and fibrosis are often associated with specific immune infiltrated. Alternatively activated macrophages markers Arg-1 and Mrc-1 were upregulated 4 weeks post-IR as compared to control rats, as well as Gata3 (T helper 2 cells) (Figure 1D). Moreover, the Gata-3/T-bet ratio, indicative of the Th2/Th1 ratio of T helper cells, showed higher Th2 immune

response. 7 weeks post-IR, irradiated animals showed a significant increase in ECM deposition in the colon and rectum, as compared to control rats (Figure 1E-1G, black arrows). Irradiation induced mucosal ulceration, edema in the *submucosa* prompted by ECM accumulation, and overall thickening of the tissue 7 weeks post-IR (Figure 1F-1H, black arrows). Four weeks after irradiation, overall imbalance in the components regulating ECM turnover (ECM components, MMPs and TIMPs) is responsible for the accumulation of ECM.

MSCs inhibit fibrogenesis following colorectal irradiation

To evaluate the effect of MSCs on radiation-induced colorectal fibrosis, Sprague-Dawley rats were injected with 5.10^6 MSCs one and two weeks after colorectal irradiation as described in figure 1A. Irradiation induced a strong upregulation of ECM-related genes (Figure 2A, red bars), which was prevented by MSCs (Figure 2A, blue bars). Four weeks after irradiation, transplanted rats displayed a significant downregulation of the pro-fibrotic gene *Ctgf* accompanied by the inhibition of collagen I and III, fibronectin and Sparc expression. This effect induced a severe decrease in collagen-to-MMP-to-TIMP ratios (Figure 2B, blue bars), showing a tendency toward less ECM accumulation. 5 weeks after irradiation, MMP-2 concentration in the colon-rectum of MSC-treated rats was significantly increased (Figure 2C, blue bar) when compared to the control group (Figure 2C, white bar) and irradiated animals (Figure 2C, red bar), in favor of ECM degradation. Seven weeks after irradiation, Picrosirius red staining of paraffin-embedded colon tissue showed a significant reduction in ECM deposition in the colon-rectum of MSC-transplanted rats, in particular in the submucosa (Figure 2E, black arrows). This observation was confirmed by measuring the surface of fibrosis in longitudinal tissue sections. 7 weeks after irradiation, ECM deposition, which was dramatically increased in irradiated rats (Figure 2D, red bar), was reduced to control level after MSC injection (Figure 2D, blue bar). These results show the potent inhibitory effect exerted by MSCs on radiation-induced colorectal fibrosis, through the downregulation of ECM components and a more efficient control over ECM turnover.

MSCs limit the proliferation of ECM-producing cells

During fibrosis in the colon and rectum, subepithelial myofibroblasts located in the *mucosa* and Smooth Muscle Cells in the *muscularis mucosa* and the *muscularis propria* are responsible for the production of pathological ECM. To determine whether the inhibition of ECM accumulation by MSCs was linked to a suppressive effect on pro-fibrotic cells, we first evaluated the amount of myofibroblasts

in the *mucosa*. The expression of α-SMA, the main marker of differentiated myofibroblasts, was decreased in the colon-rectum of MSC treated animals four weeks after irradiation (Figure 3A, blue bars), supporting the reduction of myofibroblasts' proliferation. MSCs also suppressed the overexpression of *Igf-1* (Figure 3B, blue bar), a major regulator of SMCs maturation, also regulating their ECM secretory properties. Four and 5 weeks after irradiation, MSC injection significantly reduced the density of α-SMA positive cells in the *mucosa* of the colon-rectum (Figure 3D-E, blue bars) compared to irradiated animals (Figure 3D-E, red bars). Interestingly, while there was a high number of α-SMA positive cells in the *mucosa* (Figure3C), the *submucosa* showed no evidence of myofibroblastic differentiation and α-SMA expression was restricted to blood vessels, despite a marked increase in ECM deposition. MSCs thus seem to reduce ECM production by inhibiting the activation of pro-fibrotic cells after colorectal irradiation.

MSCs ameliorate fibrosis by favoring the Th2/M2 response

Macrophages and T cells are involved in fibrosis development through various mechanisms, potentially favoring or limiting fibrogenesis. In particular, recent discoveries have shown that MSCs could act on fibrosis by orienting the polarization of macrophages and the differentiation of CD4+ T cells. Four weeks after irradiation, we measured a strong increase in the alternatively-activated macrophages (M2) marker arginase-1 in irradiated animals (Figure 4A, red bar), which was further elevated by MSC injection (Figure 4A, blue bar). 5 weeks after irradiation, M2 promotion seemed to persist as the mannose receptor gene *Mrc-1*, expressed by M2 macrophages, was overexpressed in MSC-treated animals (Figure 4B, blue bar) when compared to the non-transplanted irradiated group (Figure 4B, red bar). Since T helper type 2 response supports alternative activation of macrophages, we measured the *Gata3/T-bet* ratio of gene expression and observed a higher ratio after MSC injection, indicating a shift toward Th2 differentiation of T cells (Figure 4C blue bar). Irradiation caused a decrease in the proportion of M2 macrophages, as measured on paraffin-embedded slides stained with fluorescent antibodies against the macrophage marker CD68 and the M2 marker CD206 (Figure 4E, red bar). MSC injection promoted M2 polarization when compared to both the control group and non-transplanted irradiated rats (Figure 4E, blue bar). MSCs seem to promote a strong burst in Th2/M2 cells which appears primordial to the effective degradation of the pathological ECM. These cells have previously been associated with anti-inflammatory and ECM remodeling activity, in particular during fibrosis. MSC-mediated regeneration in the colon-rectum induced a significant improvement in animals' survival (Figure 4F). While 30% of irradiated rats died before 50 days (Figure 4F, red line), there was a 100% survival rate at the same time in the MSC group (Figure 4F, blue line). The reduction

of ECM deposition could thus ameliorate survival, most notably by restoring tissue functionality and preventing occlusion.

Hgf silencing in transplanted-MSCs promote fibrosis through a TGF-β-dependent mechanism

The Hepatocyte Growth Factor (HGF) is a potent anti-fibrotic protein with pleiotropic activities including immunosuppression and the inhibition of TGF-β signaling. As HGF has been identified as mediating part of MSCs' anti-fibrotic effects, we used RNA interference to knockdown the *Hgf* gene in MSCs prior to injection to irradiated rats, as described in figure 5A. The results were obtained 7 weeks after irradiation. Knockdown of *Hgf* in MSCs (MSC-HGF) suppressed the inhibition of TGF-β and ECM-related genes. Seven weeks after radiation exposure, *Tgfb1*, *Tgfb2*, *Tgfb3* and *Ctgf* were upregulated in the colon-rectum of animal transplanted with MSCs silenced for HGF (Figure 5B, blue hatched bars) when compared to irradiated (not shown) and irradiated and MSC-treated rats (Figure 5B, blue bars). Concomitantly, collagens I and III, as well as fibronectin and Sparc were overexpressed (Figure 5B, blue hatched bars) in the MSC-HGF group. Similarly to what was observed in non-treated irradiated animals, the upregulation of Mmp3, Mmp9, Mmp12, Mmp13, Timp1 and Serpine1 (Figure5C, blue hatched bars) induced the increase of collagen-to-MMP-to-TIMP ratios in the colon-rectum after injection of MSC-HGF (Figure 5D, blue hatched bar) compared to MSC-treated colon-rectum (Figure 5D, blue bar). The stimulation of pro-fibrotic mechanisms after MSC-HGF injection resulted in the accumulation of pathological ECM (Figure 5E, blue hatched bar), to a level comparable to non-transplanted irradiated rats (Figure 1F, red bar). Hence, HGF secreted by MSCs seems to act as a safeguard mechanism preventing TGF-β-mediated activation of fibrogenic pathways and consequent fibrosis.

TSG-6 inhibits fibrosis through de regulation of the polarization of macrophages

The Tumor necrosis factor-Stimulated Gene-6 (TSG-6) protein is mostly produced during inflammation. It is mostly involved in hyaluronan-induced leucocyte recruitment. Thus, MSCs' immunomodulatory and anti-fibrotic properties have been previously associated in part to their production of TSG-6. Parallel to MSC-MGF, we induced *Tsg-6* knockdown in MSCs by RNA interference (MSC-TSG-6). The results were obtained 7 weeks after irradiation. MSC-TSG-6 induced the upregulation of IGF-1 and collagens type I and III (Figure 7A, blue dotted bars), in a manner comparable to that observed in irradiated animals. At the same time, Tsg-6 silencing induced a strong increase in collagen-to-MMP-to-TIMP ratios in favor of ECM accumulation (Figure 7B, blue dotted bars). Since the

TSG-6 protein is able to influence macrophage polarization, which is likely involved in our model, we measured the proportion of M2 macrophages after MSC-TSG-6 injection as described above. The group injected with MSCs silenced for *Tsg-6* displayed an important increase in the proportion of M2 macrophages (Figure 7C, blue dotted bar) when compared to the MSC group (Figure 7C, blue bar). Finally, ECM deposition was significantly increased in the colon-rectum of MSC-TSG-6-treated rats (Figure 7D, blue dotted bar), when compared to the control group and MSC treatment (Figure 7D, blue bar). Alike HGF, TSG-6 secretion by MSCs is necessary to produce their anti-fibrotic effects. Furthermore, loss of Tsg-6 expression results in a gross increase in ECM accumulation, similar to this observed after irradiation without MSC injection.

MSCs directly act on fibroblasts and smooth muscle cells to inhibit their pro-fibrotic phenotype

Few transplanted cells are generally found in the pathological tissue soon after injection, despite long-lasting effects, which hinted that exogenous MSCs may act in a paracrine manner. Accordingly, we found no GFP-MSCs in the colon-rectum irradiated rats more than 6 days after transplantation. We tested this hypothesis by adding MSCs in irradiated hIFs and hCoSMCs cultures using a Transwell system allowing molecular exchanges without cell-to-cell contact as described in figure 8A. This allowed to highlight a direct effect of MSCs on both cell types. When cocultured 24 hours with MSCs, hIFs displayed marked reduction in the expression of genes coding for TGF-β1, α-SMA and collagen type III when compared with irradiated cells (Figure 8B, blue bar). Similarly, MSCs downregulated *Tgfb1*, *Col1a2* (collagen type I) and *Fn1* (fibronectin) genes in hCoSMCs (Figure 8C, blue bars). *Tsg-6* silencing in MSCs induced the upregulation of α-SMA, collagen type III and fibronectin in hIFs (Figure 8B, blue dotted bars). Regarding hCoSMCs, HGF secreted by MSCs seemed to yield better anti-fibrotic effects, since knockdown of its gene resulted in the overexpression of collagen type III and fibronectin (Figure 8B, blue hatched bars). Both soluble factors play a part in MSC-mediated inhibition of fibrosis, but these data evidence the involvement of other MSC-secreted molecules in their inhibitory properties over myofibroblasts.

Discussion

Colorectal fibrosis is a feature of many chronic inflammatory disorders, including Crohn's disease and severe chronic complications of pelvic radiotherapy, for which an efficient therapy is yet to be found. MSCs exert anti-fibrotic effects numerous in human and animal models. They have regenerative and anti-inflammatory properties which have been used to treat inflammatory conditions, including GVHD and radiological burns. However, despite proven beneficial effects of MSC therapy on IBDs and radiation enteritis, there is little evidence of their anti-fibrotic effects in these pathologies. Furthermore, the mechanisms underlying these effects are not yet known. In this original research article, we evaluated the effects of MSC transplantation on a rat model of radiation-induced colorectal fibrosis mimicking late severe complications of radiotherapy, such as PRD. This models exhibits histopathological lesions similar to those seen in patients suffering from late complications of radiotherapy and IBDs, characterized in particular by the accumulation of ECM which can lead to lethal loss of tissue function (occlusion in the case of the intestine). We based our treatment procedure on previous reports from preclinical and clinical therapeutic protocols employing exogenous MSCs to treat IBDs or symptoms associated with overdosage of radiotherapy during prostate cancer treatment [13]. Transplantation of MSCs after colorectal X-radiation exposure inhibited fibrosis development, thus resulting in an increase of animal survival. Our results suggest that MSCs, by releasing various soluble factors, limit the activation of pro-fibrotic cells, in particular myofibroblasts, SMCs and macrophages. These results suggest that irradiation induce the recruitment of a specific immune population, responsible for the production of IGF-1, which activates SMCs' pro-fibrotic phenotype. MSCs are able to orient T lymphocytes and macrophages in a pattern inhibiting pro-fibrotic signals such as IGF-1. Furthermore, we evidenced that HGF and TSG-6 released by MSCs act through distinct but complementary mechanisms necessary to yield MSCs' anti-fibrotic effects.

Fibrosis is driven by macrophages in our model. In order to evaluate MSCs' effect on radiation-induced colorectal fibrosis, we set up an irradiation protocol according to previous studies. Sprague-Dawley rats were exposed to a single dose of 29 Gy, delivered to a 2x3 cm colorectal window. This model displays lesions close to those observed in patients suffering from late adverse effects of radiotherapy [8, 16, 18]. We aimed at characterizing the main features of fibrosis development in this model to further evidence the mechanisms by which MSCs act on fibrosis. After colorectal irradiation, acute damages appear within days and are characterized by deep mucosa ulceration and a massive immune cells infiltrate [16-18]. TGF-β1 expression is induced early in radiation enteritis [8], and it

contributes, later with CTGF, in the induction and progression of radiation-induced fibrosis [25]. We described the chronic phase of fibrogenesis in this model as being driven by factors independent of TGF-β1 and CTGF, which displayed low expression throughout the study. Nevertheless, common features of radiation-induced colorectal fibrogenesis were observed during this study. In agreement with *in vivo* studies [7, 15], we found a global increase in the expression of ECM components, MMPs and TIMPs. Consequently, fibrosis is the result of a general ECM production/degradation imbalance, as shown by the collagen-to-MMP-to-TIMP ratio. Moreover, plasminogen activation into plasmin, one of the main activators of MMPs, is most likely inhibited by increased Serpine-1 expression in the colon-rectum of irradiated rats. Various cell types, such as myofibroblasts and macrophages, are responsible for ECM turnover. Alternatively activated macrophages (M2 macrophages) can produce ECM components, mainly fibronectin, and MMPs, thus participating in fibrosis progression and/or resolution [26]. In the colon and rectum, SMCs of the muscle layers and myofibroblasts of the *mucosa* are the main ECM producing cell types [8]. Following irradiation, a dense population of α-SMA positive sub-epithelial myofibroblasts was found, possibly accounting for the ECM deposition in the mucosa. However, the submucosa showed no evidence of α-SMA positive cells proliferation, despite a marked ECM accumulation responsible for the thickening of this layer. This is most likely due to fibrogenic signals from resident SMCs, in *muscularis mucosa* and the *muscularis propria* encasing the submucosa. Evidences from previous studies on patients suffering from radiation enteritis suggest that SMCs are the main cells responsible for radiation-induced fibrosis in the colon-rectum [5, 8]. During fibrosis, the activation of SMCs' secretory phenotype, i.e. their differentiation in ECM producing cells, is accompanied by tissue hypertrophy and hyperplasia, and loss of cell contractibility [5] necessary to the progression of stools. In our model, Bessout et al. have shown a decrease in muscle contractibility following irradiation, suggesting the accumulation of secretory SMCs [18].The thickening of the *muscularis propria*, as well as ECM deposit surrounding muscle fibers, support the involvement of pro-fibrotic SMCs in our study. Similar to fibroblasts, TGF-β1 is the best known inducer of secretory SMCs. Low TGF-β1 expression in this study suggests the contribution of other pro-fibrotic growth factors. IGF-1 has been studied as a candidate drug for the treatment of IBDs (reviewed in [27]). However, IGF-1 has also been associated with the progression of fibrosis during Crohn's disease [28]. IGF-1 seem to induce collagen synthesis by SMCs, suggesting its implication on the acquisition of SMCs' secretory phenotype [28, 29]. We showed a significant overexpression of IGF-1, thus potentially responsible for the continuation of the fibrogenic process. Macrophages can promote fibrosis progression and resolution depending on their polarization state [30]. The increase in macrophage density (***data not shown***), along with the reduction in the M2/M1 ratio, could thus also account for fibrosis in this model. First, M1 macrophages are known to favor inflammation which is considered to initiate fibrogenesis. Secondly, they produce large amounts of ROS which activate TGF-β1 and are responsible for oxidative

stress-induced damages to resident cells [26]. The infiltration of macrophages and overall increase in the number of M1 macrophages is emphasized in our study by a strong overexpression of HIF-1α (data not shown), which is known to be correlated with ROS concentration in the tissue [31]. On the other hand, the increase in M2 markers' expression (Arg1 and Mrc-1) suggests the activation of alternatively activated macrophages. Furthermore, the overexpression of Mrc-1, IL-10 and fibronectin (data not shown) supports the involvement of M2a macrophages, a subset believed to promote fibrosis [26]. They produce fibronectin, required for the differentiation of myofibroblasts [32]. M2a are also IGF-1-producing cells and could therefore participate in the acquisition of SCMs' secretory phenotype. Finally, they are known to stimulate Th2 cells recruitment, in accordance with increased Gata3/T-bet ratio (Th2/Th1) in our model. Colorectal irradiation induced a marked ECM accumulation in rats, similar to what is observed in patients suffering from late complications of radiotherapy. In particular, macrophage polarization appears to play a major role in promoting fibrogenesis, by participating in the upregulation of MMPs and TIMPs, and by producing pro-fibrotic IGF-1.

MSCs limit fibrosis by modulating macrophage polarization. Previous studies have demonstrated MSCs' ability to reduce fibrosis in a wide range of pathologies [14]. Hence, we aimed at highlighting the effect of MSCs on colorectal radiation-induced fibrosis by injecting MSCs to Sprague-Dawley rats 1 and 2 weeks after irradiation. Results from the present study show that MSCs exert a long-lasting inhibitory effect on ECM deposition more than 4 weeks after treatment (7 weeks after irradiation). MSCs are able to inhibit the radiation-induced upregulation of ECM genes (collagen and fibronectin), in accordance with other reports (reviewed in [14]). This effect is responsible for the decrease of collagen-to-mmp-to-timp ratios, which allow the restoration of ECM deposition to its basal value (control group). Moreover, MSCs induced a significant increase in MMP-2 concentration in the colon-rectum, thus facilitating ECM degradation. Colon-rectum of MSC-treated animals exhibited lower CTGF expression. CTGF is believed to perpetuate fibrogenesis in place of TGF-β1 during the chronic stage of radiation-induced fibrosis [25]. Downregulation of CTGF could thus reduce pro-fibrotic signals in the tissue, in particular regarding myofibroblastic differentiation. Indeed, we observed fewer pericryptic α-SMA-positive cells in the mucosa of MSC-treated rats compared to non-transplanted animals. This effect is commonly associated with lesser TGF-β1/CTGF/Smad pathway activity [14], as seems to be the case in our study. Although the number of sub-epithelial myofibroblasts increased in irradiated animals between 4 and 5 weeks after irradiation, MSCs were able to significantly limit myofibroblastic differentiation in our model, which could in part explain lower ECM genes expression. The concomitant reduction of IGF-1 expression corroborates previous assumptions that this growth

factor plays an important role in promoting fibrosis in this model. In a model of liver fibrosis in mice, MSCs overexpressing IGF-1 exerted more efficient anti-fibrotic effects than wild-type MSCs. MSC injection was associated with upregulation of IGF-1 in the tissue, even more so when using IGF-1-MSCs, suggesting the existence of an IGF-1 activation loop. Our results infer that MSCs can induce an opposite loop during colorectal fibrosis, thus inhibiting IGF-1 expression and subsequent shift in SMCs' phenotype. In agreement with these observations, Bessout et al. showed MSCs' ability to restore the contractibility of colonic muscles in rats after irradiation to the control group level [18]. MSCs could therefore inhibit the contractile-to-secretory shift in SMCs by limiting the availability of IGF-1. Restoration of muscle contractibility is essential to preserve the functionality of the gastrointestinal tract, which is impaired by fibrosis. Our *in vitro* results also show a direct effect of MSCs on irradiated human Intestinal Fibroblasts (hIFs) and Colonic Smooth Muscle Cells (hCoSMCs). MSCs directly inhibit TGF-β1 expression by both cell types. In hIFs, they induce the downregulation of α-SMA and collagen type III while they reduce collagen type I and fibronectin expression in CoSMCs. MSCs could then reduce myofibroblastic differentiation by inhibiting TGF-β1 dependent and independent pathways and act directly on fibroblasts and SMCs, as well as other resident and recruited cells, such as macrophages and T cells. Indeed, we found a significant increase in the M2/M1 ratio of macrophage polarization, supported by the modulation of T cell differentiation in favor of the Th2 immune response. Comparable to non-transplanted irradiated rats, MSC-treated animals exhibited high IL-10 and Mrc-1 expression. On the other hand, the downregulation of fibronectin suggests the activation of a different subset of macrophages, M2c or regulatory macrophages [26, 30]. M2c cells have been associated with the resolution of fibrosis, most notably by producing large amounts of MMPs [26, 30]. The strong surge of M2c macrophages may thus help control ECM deposition after MSC transplantation.

ECM deposition, mechanical stress induced by actin-expressing myofibroblasts and loss of tissue contractibility contribute to tissue stiffness and thickening, which are the major reasons for potentially lethal intestinal occlusion, the main cause of death in the case of colorectal fibrosis. MSCs are able to inhibit these features associated with fibrosis and as a result improve survival in our model.

HGF is necessary to maintain low TGF-β signaling after MSC injection. HGF is a potent anti-fibrotic protein with immunosuppressive properties and capable of inhibiting TGF-β-dependent mechanisms. MSCs secrete HGF, which seem to play a major role in their inhibition of fibrogenesis. To evaluate the importance of MSC-derived HGF, we used RNA interference to knowkdown *Hgf* prior to injection. HGF silencing in MSCs resulted in high ECM deposition 4 weeks after transplantation. The most important effect of HGF silencing is a significant upregulation of genes coding for TGF-β, ECM

components, MMP and TIMP. Expectedly, the high level of expression of TGF-β and CTGF resulted in a concomitant overexpression of collagens, fibronectin and Sparc. Although the shift in collagen-to-MMP-to-TIMP ratios doesn't seem to fully account for the increase in ECM deposition between normal MSC treatment and HGF-knockdown cells, higher SERPINE-1 expression in the latter could result in reduced MMP activity. HGF is known to inhibit TGF-β expression while stimulating its own [33, 34], and previous experiments have shown that MSCs overexpressing HGF produced better anti-fibrotic effects on lung and liver fibrosis than wild-type MSCs [35-37]. However, rats injected with MSCs silenced for HGF displayed higher TGF-β signaling that non-transplanted animals, thus most likely an MSC-induced effect. Most reserves on the use of MSC therapy against fibrosis arise from the mesenchymal lineage of myofibroblasts, which could imply the possibility of MSCs differentiating into pro-fibrotic cells. Similar to HGF, TGF-β inhibits the expression of HGF and upregulates its own [38-40]. Hence, HGF expression in MSCs might be necessary as an autocrine control system, limiting TGF-β signaling by MSCs and subsequent differentiation of pro-fibrotic myofibroblasts. Cocultures of irradiated hIFS or hCoSMCs with MSCs silenced for *HGF* resulted in a different effect on each cell type. While these cells yielded the same effects on hIFs as wildtype MSCs, they induced a strong upregulation of collagen III and fibronectin in HCoSMCs. These observations suggest a direct inhibition of the secretory phenotype of SMCs by HGF. Since the expression of TGF-β1 didn't vary between cells cocultured with MSCs or MSCs silenced for *HGF*, the inhibitory effect of HGF on hIFs and HCoSMCs seems independent of TGF-β signaling. To conclude, HGF secreted by MSCs acts via different mechanisms on radiation-induced fibrosis, inhibiting the activation of TGF-β dependent and independent mechanisms, and contributing to the degradation of ECM.

TSG-6 secreted by MSCs participate in the regulation of macrophage activity. The TSG-6 protein is another potent anti-fibrotic protein secreted by MSCs and involved in their immunomodulatory properties. Alike experiments regarding HGF, we suppressed TSG-6 expression in MSCs by RNA interference. TSG-6 silencing in transplanted MSCs resulted in a significant increase in ECM deposition in the colon and rectum, to a level similar to non-treated irradiated animals. Although significant, the increase in collagen expression and collagen-to-MMP-to-TIMP ratio cannot by itself justify the high level of tissue fibrosis in TSG-6 knockdown cells. TSG-6 is an immunomodulatory cytokine found in inflammatory conditions. It is involved in the regulation of pro-inflammatory and pro-fibrotic hyaluronan activity [41, 42]. Additionally, Choi et al. have shown that TSG-6 released by MSCs inhibits M1 macrophage polarization in favor of M2 activation [43]. Accordingly, the increase in the percentage of M2 macrophages in TSG-6 knockdown MSC-treated animals was unexpected.

Nevertheless, TSG-6 has been shown to stimulate inflammation in airway diseases [23]. While it can directly inhibit M1 polarization through CD44, TSG-6 is also able to form hyaluronan polymers which trigger NF-κB activation and subsequent acquisition of the M1 phenotype [44]. Thus, TSG-6 could act as a negative regulator of M2 activity by favoring hyaluronan availability. Since prolonged M2 activity has been previously associated with the worsening of fibrosis [45, 46], newly secreted TSG-6 might be one major regulator of inflammation after MSC transplantation. Furthermore, high IGF-1 expression in animals treated with TSG-6-silenced-MSCs supports the presence of pro-fibrotic macrophages. Finally, the hyaluronan/CD44 axis has a crucial role in the differentiation of myofibroblasts, and the regulation of hyaluronan turnover by TSG-6 may be another inhibitory mechanism exerted by MSCs on ECM production. *In vitro*, TSG-6 silencing in MSCs cocultured with irradiated hIFs and hCoSMCsinduced a strong upregulation of the myofibroblast marker α-SMA, as well as genes coding for collagen III and fibronectin. A mild effect on fibronectin expression was also observed in hCoSMCs cultures. Opposite to HGF, TSG-6 appears to have a selective effect on hIFs, by reducing their shift to a myofibroblast profile. Hyaluronane has a stimulating effect on myofibroblasts' activation and proliferation, which could be impaired by TSG-6 secreted by MSCs. Our results support the involvement of TSG-6 in MSC-mediated immunomodulation, in particular in orienting macrophages' response toward fibrosis resolution, and in inhibiting the proliferation of pro-fibrotic myofibroblasts. HGF and TSG-6 appear to exert different but complementary effects, necessary to the maintenance of MSCs' anti-fibrotic effects during radiation-induced fibrosis.

Conclusion

Inflammatory conditions of the colon and rectum, such as IDBs and radiation-induced damages, are severe pathologies that greatly impact the quality of life of patients and are potentially lethal. Fibrosis is a common feature of these diseases and others, including hepatitis and liver fibrosis. While there are currently only palliative treatments for fibrosis, therapeutic use of Mesenchymal Stem Cells have exhibited a potent anti-fibrotic effect in various models of fibrosis, in the liver, kidneys, heart… We aimed at showing the potential of such treatments on colorectal fibrosis, as displayed in IBDs and radiation enteritis. In a model of radiation-induced colorectal fibrosis in Sprague-Dawley rats, MSC injections reduced ECM deposition by inhibiting the activation of pro-fibrotic cells. This study supports the use of MSC therapy for the treatment of radiation–induced colorectal fibrosis during PRD. While no adverse effect was observed on irradiated animals after MSC injection, the treatment induced a long-lasting effect resulting in a significant reduction of ECM deposition. We describe a new mechanism in which MSCs limit fibrosis by regulating macrophage polarization to favor tissue

regeneration. The impact of HGF and TSG-6 silencing highlights the importance of the secretion of a wide range of factors by therapeutic MSCs. When compared to pharmacological treatments, MSC therapy offers the advantage of providing a pleiotropic response, activating multiple mechanisms instead of acting on a single pathway. Similarities between radiation-induced fibrosis and other pathological conditions of the intestine, e.g. IBDs and Crohn's disease, also imply that mechanisms involved in MSCs' effect on late complications of radiotherapy could apply to these other disorders. MSC injection should thus be considered as a first line treatment for chronic inflammatory intestinal diseases.

Acknowledgments

The authors thank Sache Amandine for her technical support and the Support Group to Animal Testing (GSEA, Groupe de Soutien à l'Experimentation Animale) of the IRSN for their excellent technical assistance

Competing interests:

The authors declare no competing interests.

Funding

This work was supported by IRSN.

Author contributions

B.U. and A.C.: conception, manuscript writing, final approval of manuscript; B.U.: study design, data collection, data analysis, interpretation, animal assistance; B.L.H., C.L., V.H. and O.G: technical support; M.B.: manuscript revision, final approval of manuscript work.

References

1. Andreyev, H.J., et al., *"Pelvic radiation disease": new understanding and new solutions for a new disease in the era of cancer survivorship.* Scand J Gastroenterol, 2011. **46**(4): p. 389-97.
2. Ferlay J, S.I., Ervik M, Dikshit R, Eser S, Mathers C, Rebelo M, Parkin DM, Forman D, Bray, F. *GLOBOCAN 2012 v1.0, Cancer Incidence and Mortality Worldwide: IARC CarcerBase No.11*. 2013 [cited 2016 11/18/2016]; Available from: http://globocan.iarc.fr.
3. Burisch, J. and P. Munkholm, *Inflammatory bowel disease epidemiology.* Curr Opin Gastroenterol, 2013. **29**(4): p. 357-62.
4. Meng, X.M., D.J. Nikolic-Paterson, and H.Y. Lan, *TGF-beta: the master regulator of fibrosis.* Nat Rev Nephrol, 2016. **12**(6): p. 325-38.
5. Haydont, V. and M.C. Vozenin-Brotons, *Maintenance of radiation-induced intestinal fibrosis: cellular and molecular features.* World J Gastroenterol, 2007. **13**(19): p. 2675-83.
6. Graham, M.F., G.R. Bryson, and R.F. Diegelmann, *Transforming growth factor beta 1 selectively augments collagen synthesis by human intestinal smooth muscle cells.* Gastroenterology, 1990. **99**(2): p. 447-53.
7. Strup-Perrot, C., et al., *Global gene expression profiles reveal an increase in mRNA levels of collagens, MMPs, and TIMPs in late radiation enteritis.* Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, 2004. **287**(4): p. G875-85.
8. Francois, A., et al., *Inflammation and immunity in radiation damage to the gut mucosa.* Biomed Res Int, 2013. **2013**: p. 123241.
9. Duijvestein, M., et al., *Autologous bone marrow-derived mesenchymal stromal cell treatment for refractory luminal Crohn's disease: results of a phase I study.* Gut, 2010. **59**(12): p. 1662-9.
10. Ciccocioppo, R., et al., *Long-Term Follow-Up of Crohn Disease Fistulas After Local Injections of Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stem Cells.* Mayo Clin Proc, 2015. **90**(6): p. 747-55.
11. Munneke, J.M., et al., *The Potential of Mesenchymal Stromal Cells as Treatment for Severe Steroid-Refractory Acute Graft-Versus-Host Disease: A Critical Review of the Literature.* Transplantation, 2016. **100**(11): p. 2309-2314.
12. Lataillade, J.J., et al., *New approach to radiation burn treatment by dosimetry-guided surgery combined with autologous mesenchymal stem cell therapy.* Regen Med, 2007. **2**(5): p. 785-94.

13. Chapel, A., et al., *New insights for pelvic radiation disease treatment: Multipotent stromal cell is a promise mainstay treatment for the restoration of abdominopelvic severe chronic damages induced by radiotherapy.* World J Stem Cells, 2013. **5**(4): p. 106-11.
14. Usunier, B., et al., *Management of fibrosis: the mesenchymal stromal cells breakthrough.* Stem Cells Int, 2014. **2014**: p. 340257.
15. Linard, C., et al., *Repeated autologous bone marrow-derived mesenchymal stem cell injections improve radiation-induced proctitis in pigs.* Stem Cells Transl Med, 2013. **2**(11): p. 916-27.
16. Semont, A., et al., *Mesenchymal stem cell therapy stimulates endogenous host progenitor cells to improve colonic epithelial regeneration.* PLoS One, 2013. **8**(7): p. e70170.
17. Bessout, R., et al., *Mesenchymal stem cell therapy induces glucocorticoid synthesis in colonic mucosa and suppresses radiation-activated T cells: new insights into MSC immunomodulation.* Mucosal Immunol, 2014. **7**(3): p. 656-69.
18. Bessout, R., et al., *TH17 predominant T-cell responses in radiation-induced bowel disease are modulated by treatment with adipose-derived mesenchymal stromal cells.* J Pathol, 2015. **237**(4): p. 435-46.
19. Durand, C., et al., *Persistent visceral allodynia in rats exposed to colorectal irradiation is reversed by mesenchymal stromal cell treatment.* Pain, 2015. **156**(8): p. 1465-76.
20. Caplan, A.I. and D. Correa, *The MSC: an injury drugstore.* Cell Stem Cell, 2011. **9**(1): p. 11-5.
21. Qi, Y., et al., *TSG-6 released from intradermally injected mesenchymal stem cells accelerates wound healing and reduces tissue fibrosis in murine full-thickness skin wounds.* J Invest Dermatol, 2014. **134**(2): p. 526-37.
22. Wu, H.J., et al., *Mesenchymal stem cells modulate albumin-induced renal tubular inflammation and fibrosis.* PLoS One, 2014. **9**(3): p. e90883.
23. Abbadi, A., et al., *Hyaluronan Rafts on Airway Epithelial Cells.* J Biol Chem, 2016. **291**(3): p. 1448-55.
24. Albeiroti, S., A. Soroosh, and C.A. de la Motte, *Hyaluronan's Role in Fibrosis: A Pathogenic Factor or a Passive Player?* Biomed Res Int, 2015. **2015**: p. 790203.
25. Vozenin-Brotons, M.C., et al., *Fibrogenic signals in patients with radiation enteritis are associated with increased connective tissue growth factor expression.* Int J Radiat Oncol Biol Phys, 2003. **56**(2): p. 561-72.
26. Lech, M. and H.J. Anders, *Macrophages and fibrosis: How resident and infiltrating mononuclear phagocytes orchestrate all phases of tissue injury and repair.* Biochim Biophys Acta, 2013. **1832**(7): p. 989-97.

27. Zatorski, H., M. Marynowski, and J. Fichna, *Is insulin-like growth factor 1 (IGF-1) system an attractive target inflammatory bowel diseases? Benefits and limitation of potential therapy.* Pharmacol Rep, 2016. **68**(4): p. 809-15.
28. Zimmermann, E.M., et al., *Insulin-like growth factor I and insulin-like growth factor binding protein 5 in Crohn's disease.* Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, 2001. **280**(5): p. G1022-9.
29. Kuemmerle, J.F., *Autocrine regulation of growth in cultured human intestinal muscle by growth factors.* Gastroenterology, 1997. **113**(3): p. 817-24.
30. Duffield, J.S., et al., *Host responses in tissue repair and fibrosis.* Annu Rev Pathol, 2013. **8**: p. 241-76.
31. Jung, S.N., et al., *Reactive oxygen species stabilize hypoxia-inducible factor-1 alpha protein and stimulate transcriptional activity via AMP-activated protein kinase in DU145 human prostate cancer cells.* Carcinogenesis, 2008. **29**(4): p. 713-21.
32. Serini, G., et al., *The fibronectin domain ED-A is crucial for myofibroblastic phenotype induction by transforming growth factor-beta1.* J Cell Biol, 1998. **142**(3): p. 873-81.
33. Yang, J., C. Dai, and Y. Liu, *Hepatocyte growth factor suppresses renal interstitial myofibroblast activation and intercepts Smad signal transduction.* Am J Pathol, 2003. **163**(2): p. 621-32.
34. Taniyama, Y., et al., *Angiogenesis and antifibrotic action by hepatocyte growth factor in cardiomyopathy.* Hypertension, 2002. **40**(1): p. 47-53.
35. Gazdhar, A., et al., *HGF Expressing Stem Cells in Usual Interstitial Pneumonia Originate from the Bone Marrow and Are Antifibrotic.* PLoS One, 2013. **8**(6): p. e65453.
36. Seo, K.W., et al., *Therapeutic effects of hepatocyte growth factor-overexpressing human umbilical cord blood-derived mesenchymal stem cells on liver fibrosis in rats.* Cell Biol Int, 2014. **38**(1): p. 106-16.
37. Lai, L., et al., *Transplantation of MSCs Overexpressing HGF into a Rat Model of Liver Fibrosis.* Mol Imaging Biol, 2016. **18**(1): p. 43-51.
38. Harrison, P., L. Bradley, and A. Bomford, *Mechanism of regulation of HGF/SF gene expression in fibroblasts by TGF-beta1.* Biochem Biophys Res Commun, 2000. **271**(1): p. 203-11.
39. Matsumoto, K., et al., *Negative regulation of hepatocyte growth factor gene expression in human lung fibroblasts and leukemic cells by transforming growth factor-beta 1 and glucocorticoids.* J Biol Chem, 1992. **267**(35): p. 24917-20.
40. Wynn, T.A., *Common and unique mechanisms regulate fibrosis in various fibroproliferative diseases.* J Clin Invest, 2007. **117**(3): p. 524-9.
41. Sanggaard, K.W., et al., *The TSG-6/HC2-mediated transfer is a dynamic process shuffling heavy chains between glycosaminoglycans.* J Biol Chem, 2010. **285**(29): p. 21988-93.

42. Tolg, C., et al., *A RHAMM mimetic peptide blocks hyaluronan signaling and reduces inflammation and fibrogenesis in excisional skin wounds.* Am J Pathol, 2012. **181**(4): p. 1250-70.
43. Choi, H., et al., *Anti-inflammatory protein TSG-6 secreted by activated MSCs attenuates zymosan-induced mouse peritonitis by decreasing TLR2/NF-kappaB signaling in resident macrophages.* Blood, 2011. **118**(2): p. 330-8.
44. Hanabayashi, M., et al., *Hyaluronan Oligosaccharides Induce MMP-1 and -3 via Transcriptional Activation of NF-kappaB and p38 MAPK in Rheumatoid Synovial Fibroblasts.* PLoS One, 2016. **11**(8): p. e0161875.
45. Wojtan, P., et al., *Macrophage polarization in interstitial lung diseases.* Cent Eur J Immunol, 2016. **41**(2): p. 159-64.
46. Carlson, S., et al., *Cardiac macrophages adopt profibrotic/M2 phenotype in infarcted hearts: Role of urokinase plasminogen activator.* J Mol Cell Cardiol, 2016.

Legends

Figure 1: Features of the radiation-induced colorectal fibrosis model in Sprague-Dawley rats. (A) Timeline of the irradiation and MSC transplantation protocol. (B) mRNA fold changes of genes 4 weeks after irradiation, normalized to *Ywhaz* and standardized against control. ECM components, MMPs, SERPINs and TIMPs were upregulated in the colon-rectum of irradiated rats. (C) Collagen-to-MMP-to-TIMP genes ratios indicating the tendency toward ECM accumulation 4 weeks after irradiation. (D) mRNA fold changes of macrophage and T cell response show the stimulation of the M2/Th2 type response. (E) Representative images of the colon of control and irradiated rats showing the ECM (red) stained with Picrosirius red (origin magnification: 40X). 7 weeks after irradiation, animals display edema in the *submucosa* caused by the accumulation of ECM. (F) Representative images of the colon of control and irradiated rats stained with HES 7 weeks after irradiation (original magnification: 40X). (G) Fibrosis deposition in the colon-rectum of control and irradiated animals 7 weeks after irradiation. Percentage of fibrosis area quantified on Picroirius red stained slides showing a significant increase of ECM deposition after irradiation (H) Irradiation induces a significant thickening of the tissue in particular in the *submucosa* and *muscularis propria*, 7 weeks after irradiation. Results are expressed as mean ± SEM. ***: $p<0.05$; **: $p<0.01$; ***: $p\leq0.001$.

Figure 2: Effect of MSC transplantation on radiation-induced Extracellular Matrix (ECM) remodeling. (A) mRNA fold changes of genes 4 weeks after irradiation and 1 week after MSC injection, normalized to *Ywhaz* and standardized against control. mRNA fold changes of genes coding for CTGF and ECM components indicate the suppression of pro-fibrotic signals by MSCs. (B) Collagen-to-MMP-to-TIMP genes ratios indicating the inhibition of ECM accumulation induced by MSCs 4 weeks after irradiation. (C) 5 weeks after irradiation: MSCs stimulate the secretion of MMP-2 in the irradiated colon-rectum. (D) Percentage of fibrosis area quantified on Picroirius red stained slides. MSC significantly inhibit ECM deposition in the colon-rectum of irradiated animals, as observed 7 weeks after irradiation. (E) Representative images showing the ECM (red) stained with Picrosirius red (origin magnification: 40X). Fibrosis deposition in the colon-rectum of control (left), irradiated (middle) and irradiated + MSC-treated (right) animals 7 weeks after irradiation (original magnification: 40X). Results are expressed as mean ± SEM. ***: $p<0.05$; **: $p<0.01$; ***: $p\leq0.001$.

Figure 3: involvement of myofibroblasts and Smooth Muscle Cells (SMCs) in radiation-induced fibrosis and anti-fibrotic effects of MSCs. (A,B) mRNA fold changes of α-SMA 4 weeks after irradiation and 1 week after MSC injection, normalized to *Ywhaz* and standardized against control. (A) MSCs inhibit the activation of α-SMA-positive myofibroblasts. (B) MSCs suppress the expression of *Igf-1*, a potent activator of SMCs' pro-fibrotic phenotype. (C) Representative images of paraffin-embedded slides of colon-rectum samples stained for α-SMA: 4 weeks and 5 weeks after irradiation (irradiated: left; irradiated + MSCs: right; original magnification: 100X). (D, E) Quantification of α-SMA-positive cells in the *mucosa* of the colon-rectum of irradiated of rats with or without MSC therapy. MSCs significantly reduce the amount of α-SMA-positive cells in the mucosa of irradiated rats 4 weeks (a) and 5 weeks (b) after irradiation. Results are expressed as mean ± SEM. ***: $p<0.05$; **: $p<0.01$; ***: $p\leq0.001$.

Figure 4: Effect of MSC transplantation on macrophage polarization in the irradiated colon-rectum. (A, B) mRNA fold changes of the M2 markers Arginase-1 and Mannose receptor-1, normalized to *Ywhaz* and standardized against control. (C) MSCs invert the Th2/Th1 balance in favor of Th2 cells, 5 weeks after irradiation, as shown by increased Gata3/T-bet ratio gene expressions. (D) M2 polarization was identified by costaining paraffin-embedded tissue slide with DAPI (cell *nuclei*, blue), CD68 antibody (red) and CD206 antibody (green). M2 macrophages are shown in yellow (merge) (original magnification: 100X). MSC injection induced a strong M2 polarization of macrophages 4 weeks after irradiation. (E) MSCs favor M2 polarization compared to control and irradiated animals. (F) Survival curve of animals irradiated (red line) and irradiated and transplanted with MSCs (blue line). Risk comparison analysis showed a significant increase in survival after MSC transplantation ($p=0.048$). Results are expressed as mean ± SEM. ***: $p<0.05$; **: $p<0.01$; ***: $p\leq0.001$.

Figure 5: *Hgf* silencing in transplanted MSCs induces pro-fibrotic signals in irradiated rats, and stimulate Extracellular Matrix (ECM) production (7 weeks after irradiation) (A) Protocol: two distinct groups of rats were injected with MSCs silenced respectively for *HGF* and *TSG-6* genes. (B, C) mRNA fold changes of genes 4 weeks after irradiation, normalized to *Ywhaz* and standardized against control. MSCs silenced for *Hgf* induce a strong remodeling in the colon-rectum of irradiated rats, mainly by activating TGF-β signaling (B) mRNA fold changes of genes coding for proteins of the TGF-β family and ECM components (C) mRNA fold changes of genes coding for MMPs, TIMP-1 and Serpine-1. (D) Collagen-to-MMP-to-TIMP genes ratios indicating the tendency toward ECM accumulation after injection of MSCs silenced for *Hgf*. (E) Percentage of fibrosis area quantified on Picrosirius red stained

paraffin-embedded slides showing a significant increase of ECM deposition after transplantation of MSCs silenced for *Hgf*. Results are expressed as mean ± SEM. ***: p<0.05; **: p<0.01; ***: p≤0.001.

Figure 6: *Tsg-6* silencing in transplanted MSCs induces pro-fibrotic signals in irradiated rats, and stimulates Extracellular Matrix (ECM) production (7 weeks after irradiation). (A) mRNA fold changes of fibrosis-related genes 4 weeks after irradiation, normalized to *Ywhaz* and standardized against control. MSCs silenced for *Tsg-6* induce a strong remodeling in the colon-rectum of irradiated rats, mainly by collagen produced by SMCs activated by IGF-1. (B) Collagen-to-MMP-to-TIMP genes ratios indicating the tendency toward ECM accumulation after injection of MSCs silenced for *Tsg-6*. (C) Percentage of M2 macrophages 7 weeks after irradiation (4 weeks after MSC injection), identified by CD68-CD206 co-staining. MSCs silenced for *Tsg-6* stimulate the chronic activation of pro-fibrotic M2 macrophages. (D) Percentage of fibrosis area quantified on Picrosirius red stained paraffin-embedded slides showing a significant increase of ECM deposition after transplantation of MSCs silenced for *Tsg-6*. Results are expressed as mean ± SEM. ***: p<0.05; **: p<0.01; ***: p≤0.001.

Figure 7: *In vitro* experiments show a direct effect of MSCs and their effectors, HGF and TSG-6 on the pro-fibrotic activity of human Intestinal Fibroblasts (hIFs) and Colonic Smooth Muscle Cells (hCoSMCs). (A) hIFs and hCoSMCs were irradiated with a single 20 Gy dose, and wild-type AdMSCs, or MSCs silenced for *Hgf* or *Tsg-6* were added in Transwells chambers 12 hours after irradiation. (B, C) mRNA fold changes of fibrosis-related genes 24 hours after MSCs addition, normalized to *Gapdh* and standardized against control. (B) MSCs strongly reduce the common features of pro-fibrotic myofibroblasts and the silencing of *Tsg-6* counteracts their effect on α-SMA, collagen III and fibronectin. (C) While MSCs inhibit the common features of pro-fibrotic SMCs, the silencing of *Hgf* counteracts their effect on collagen III and fibronectin. Results are expressed as mean ± SEM. ***: p<0.05; **: p<0.01; ***: p≤0.001.

Figure 1

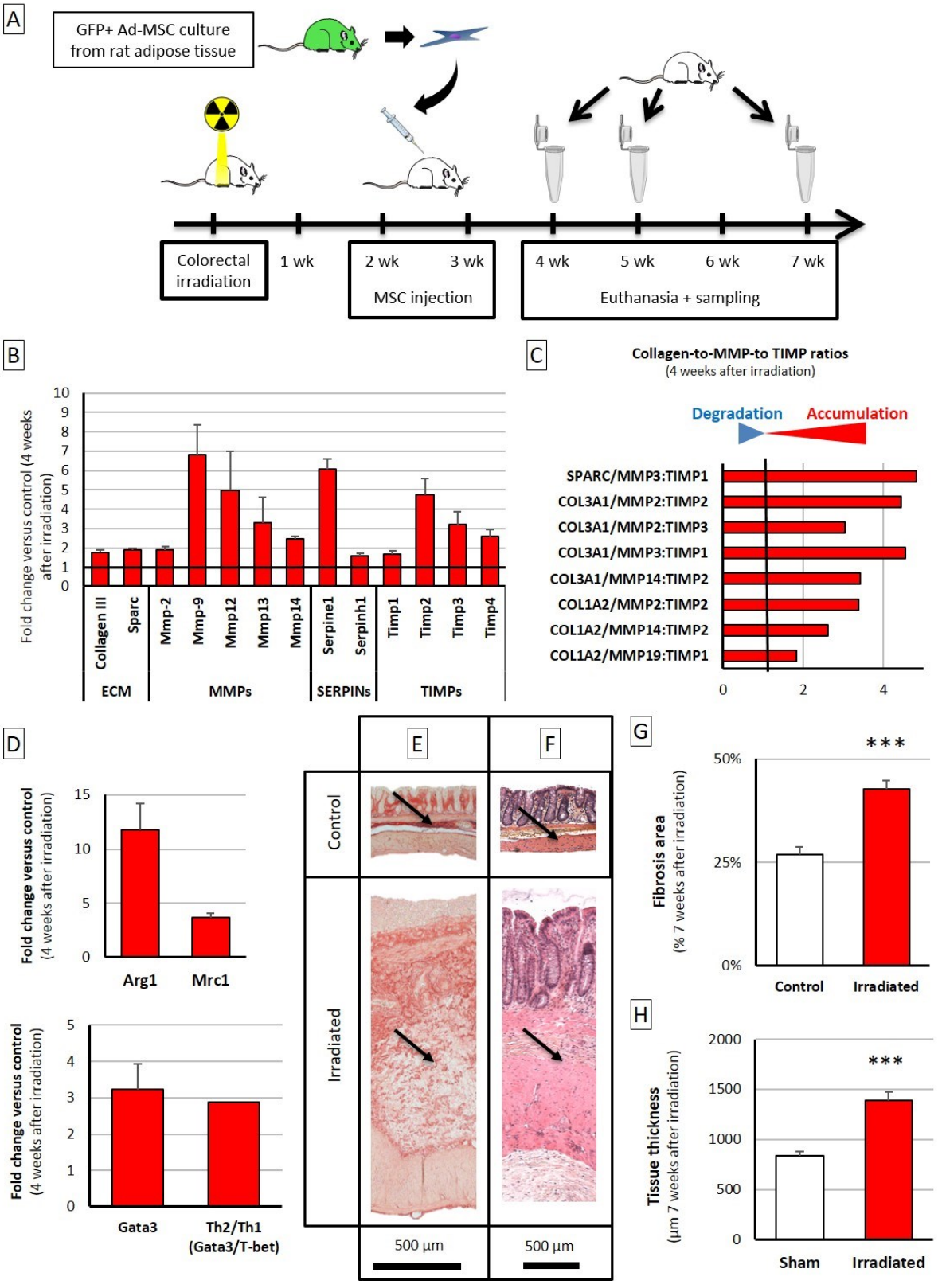

A
GFP+ Ad-MSC culture from rat adipose tissue
Colorectal irradiation
1 wk
2 wk
3 wk
MSC injection
4 wk
5 wk
6 wk
7 wk
Euthanasia + sampling
B
Fold change versus control (4 weeks after irradiation)
Collagen III
Sparc
Mmp-2
Mmp-9
Mmp12
Mmp13
Mmp14
Serpine1
Serpinh1
Timp1
Timp2
Timp3
Timp4
ECM
MMPs
SERPINs
TIMPs
C
Collagen-to-MMP-to TIMP ratios
(4 weeks after irradiation)
Degradation
Accumulation
SPARC/MMP3:TIMP1
COL3A1/MMP2:TIMP2
COL3A1/MMP2:TIMP3
COL3A1/MMP3:TIMP1
COL3A1/MMP14:TIMP2
COL1A2/MMP2:TIMP2
COL1A2/MMP14:TIMP2
COL1A2/MMP19:TIMP1
D
Fold change versus control (4 weeks after irradiation)
Arg1
Mrc1
Gata3
Th2/Th1 (Gata3/T-bet)
E
F
Control
Irradiated
500 µm
500 µm
G
Fibrosis area (% 7 weeks after irradiation)
***
Control
Irradiated
H
Tissue thickness (µm 7 weeks after irradiation)
***
Sham
Irradiated

Figure 2

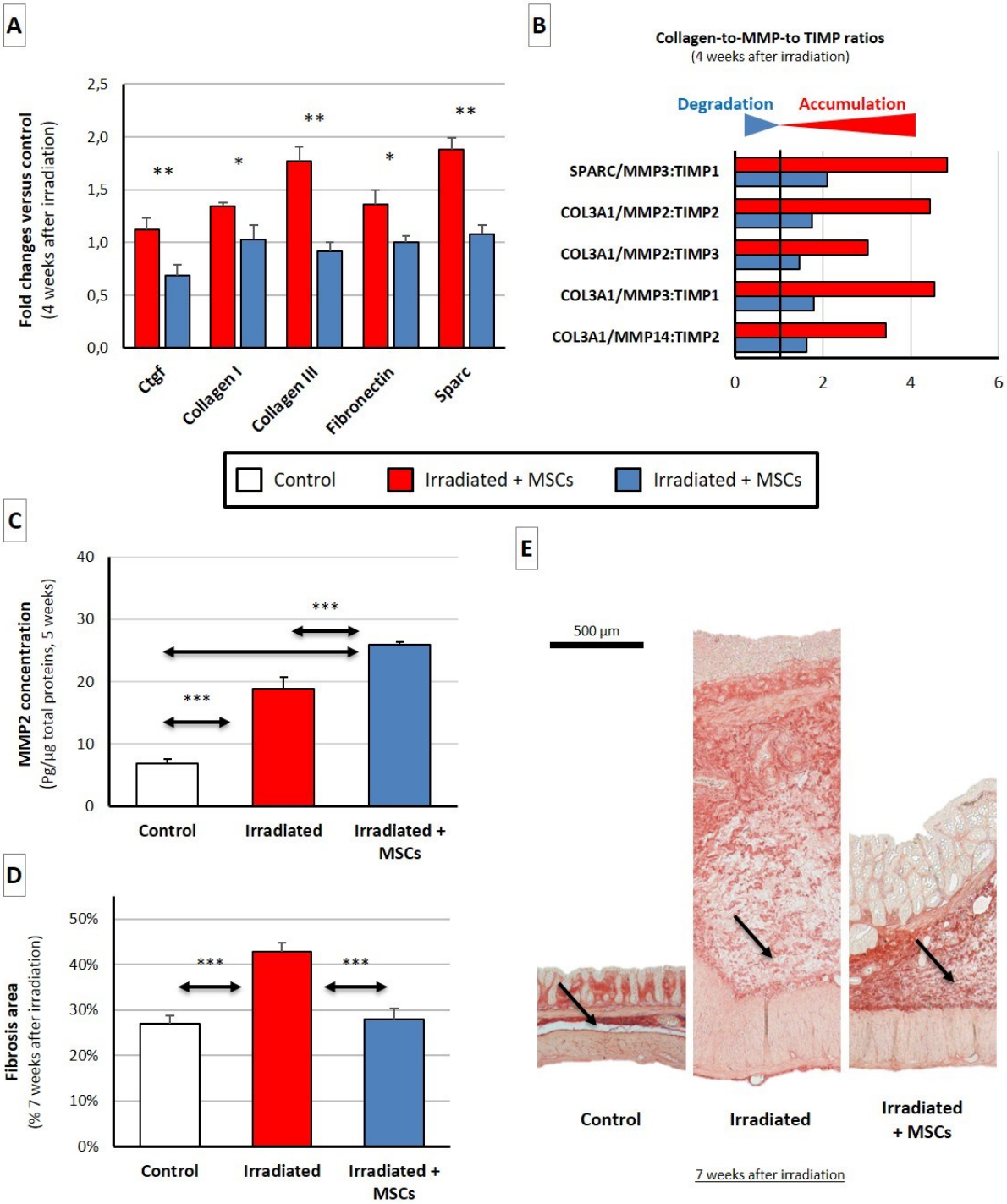

A
Fold changes versus control
(4 weeks after irradiation)
2,5
2,0
1,5
1,0
0,5
0,0
**
*
**
*
**
Ctgf
Collagen I
Collagen III
Fibronectin
Sparc
B
Collagen-to-MMP-to TIMP ratios
(4 weeks after irradiation)
Degradation
Accumulation
SPARC/MMP3:TIMP1
COL3A1/MMP2:TIMP2
COL3A1/MMP2:TIMP3
COL3A1/MMP3:TIMP1
COL3A1/MMP14:TIMP2
0
2
4
6
Control
Irradiated + MSCs
Irradiated + MSCs
C
MMP2 concentration
(Pg/µg total proteins, 5 weeks)
40
30
20
10
0
***
***
Control
Irradiated
Irradiated + MSCs
D
Fibrosis area
(% 7 weeks after irradiation)
50%
40%
30%
20%
10%
0%
***
***
Control
Irradiated
Irradiated + MSCs
E
500 µm
Control
Irradiated
Irradiated + MSCs
7 weeks after irradiation

Figure 3

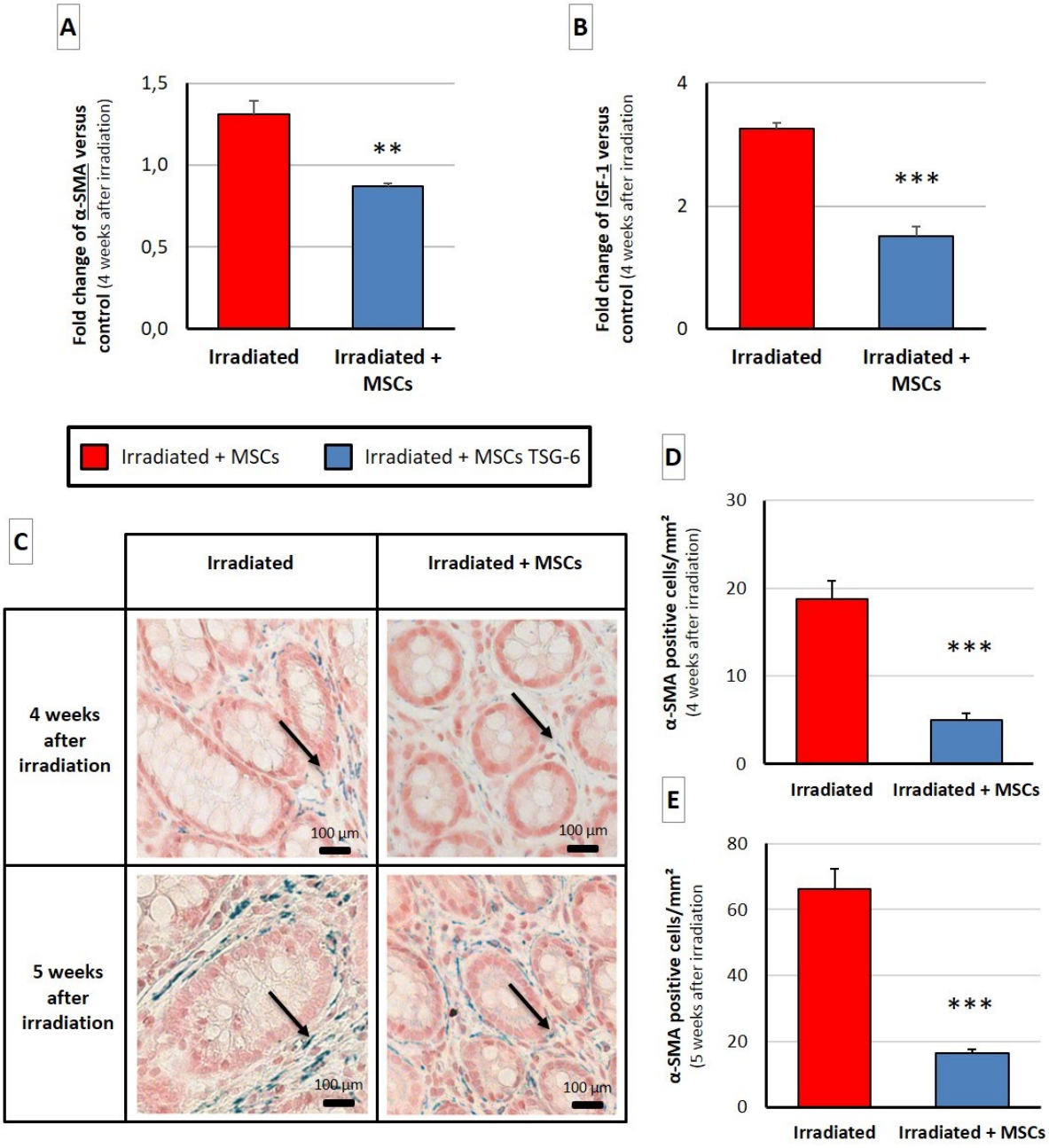

A
Fold change of α-SMA versus control (4 weeks after irradiation)
1,5
1,0
0,5
0,0
**
Irradiated
Irradiated + MSCs
B
Fold change of IGF-1 versus control (4 weeks after irradiation
4
2
0
***
Irradiated
Irradiated + MSCs
Irradiated + MSCs
Irradiated + MSCs TSG-6
C
Irradiated
Irradiated + MSCs
4 weeks after irradiation
5 weeks after irradiation
100 µm
D
α-SMA positive cells/mm²
(4 weeks after irradiation)
30
20
10
0
***
Irradiated
Irradiated + MSCs
E
α-SMA positive cells/mm²
(5 weeks after irradiation
80
60
40
20
0
***
Irradiated
Irradiated + MSCs

Figure 4

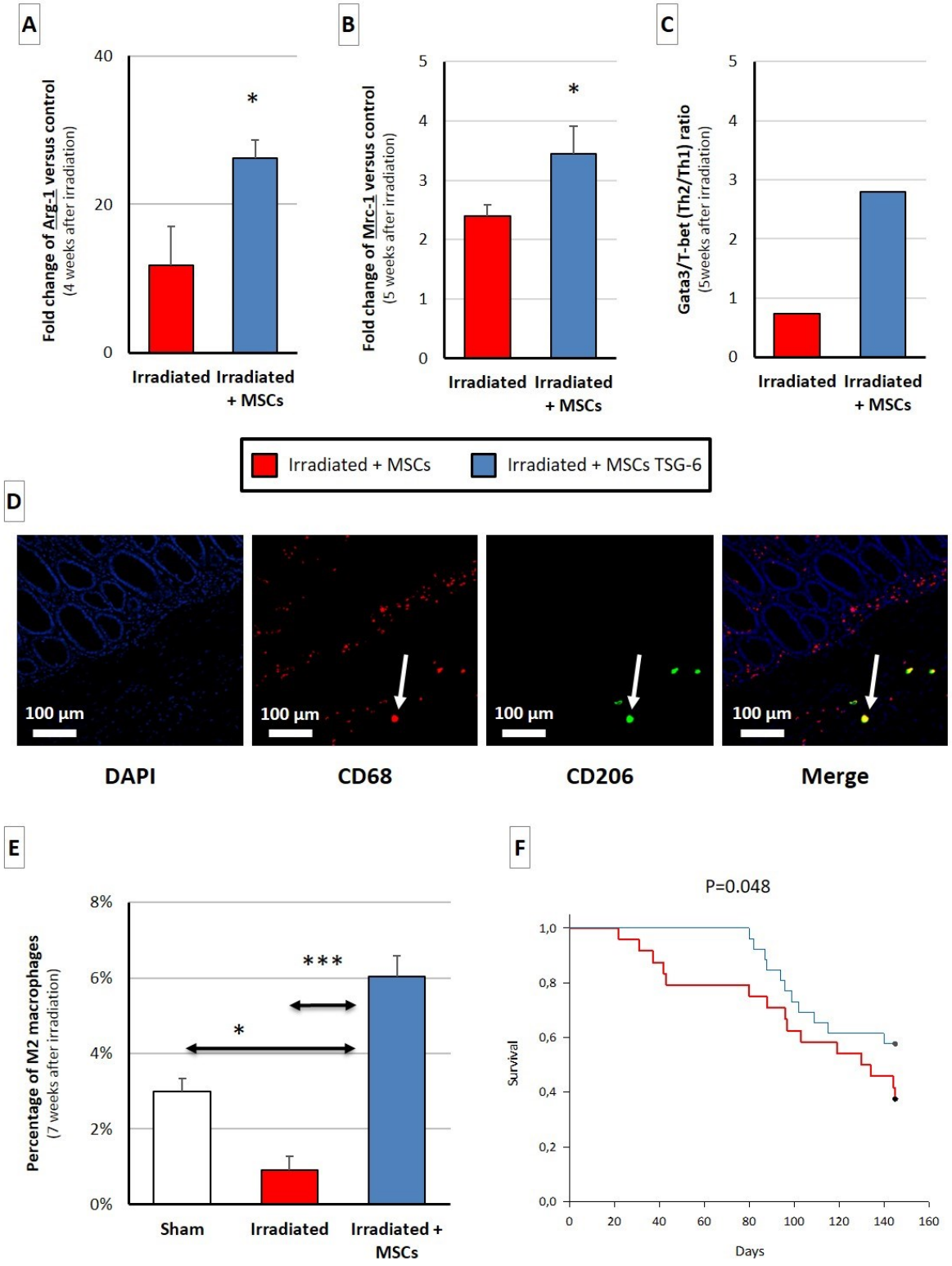

A
Fold change of Arg-1 versus control
(4 weeks after irradiation)
40
20
0
*
Irradiated
Irradiated + MSCs
B
Fold change of Mrc-1 versus control
(5 weeks after irradiation)
5
4
3
2
1
0
*
Irradiated
Irradiated + MSCs
C
Gata3/T-bet (Th2/Th1) ratio
(5weeks after irradiation)
5
4
3
2
1
0
Irradiated
Irradiated + MSCs
Irradiated + MSCs
Irradiated + MSCs TSG-6
D
100 µm
100 µm
100 µm
100 µm
DAPI
CD68
CD206
Merge
E
Percentage of M2 macrophages
(7 weeks after irradiation)
8%
6%
4%
2%
0%
***
*
Sham
Irradiated
Irradiated + MSCs
F
P=0.048
Survival
1,0
0,8
0,6
0,4
0,2
0,0
0
20
40
60
80
100
120
140
160
Days

Figure 5

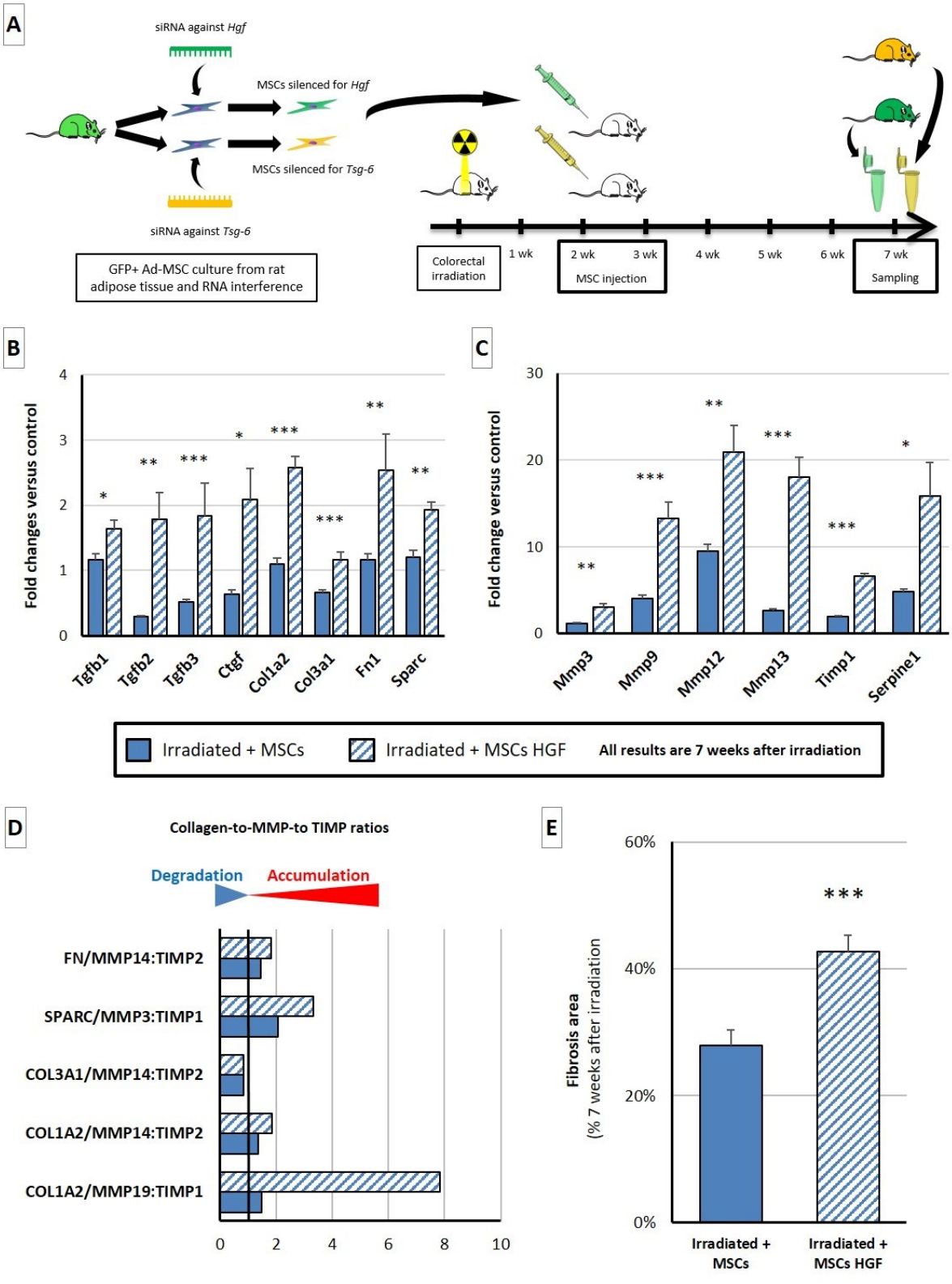

A
siRNA against Hgf
MSCs silenced for Hgf
MSCs silenced for Tsg-6
siRNA against Tsg-6
GFP+ Ad-MSC culture from rat adipose tissue and RNA interference
Colorectal irradiation
1 wk
2 wk
3 wk
MSC injection
4 wk
5 wk
6 wk
7 wk
Sampling
B
Fold changes versus control
Tgfb1
Tgfb2
Tgfb3
Ctgf
Col1a2
Col3a1
Fn1
Sparc
C
Fold change versus control
Mmp3
Mmp9
Mmp12
Mmp13
Timp1
Serpine1
Irradiated + MSCs
Irradiated + MSCs HGF
All results are 7 weeks after irradiation
D
Collagen-to-MMP-to TIMP ratios
Degradation
Accumulation
FN/MMP14:TIMP2
SPARC/MMP3:TIMP1
COL3A1/MMP14:TIMP2
COL1A2/MMP14:TIMP2
COL1A2/MMP19:TIMP1
E
Fibrosis area
(% 7 weeks after irradiation
Irradiated + MSCs
Irradiated + MSCs HGF

Figure 6

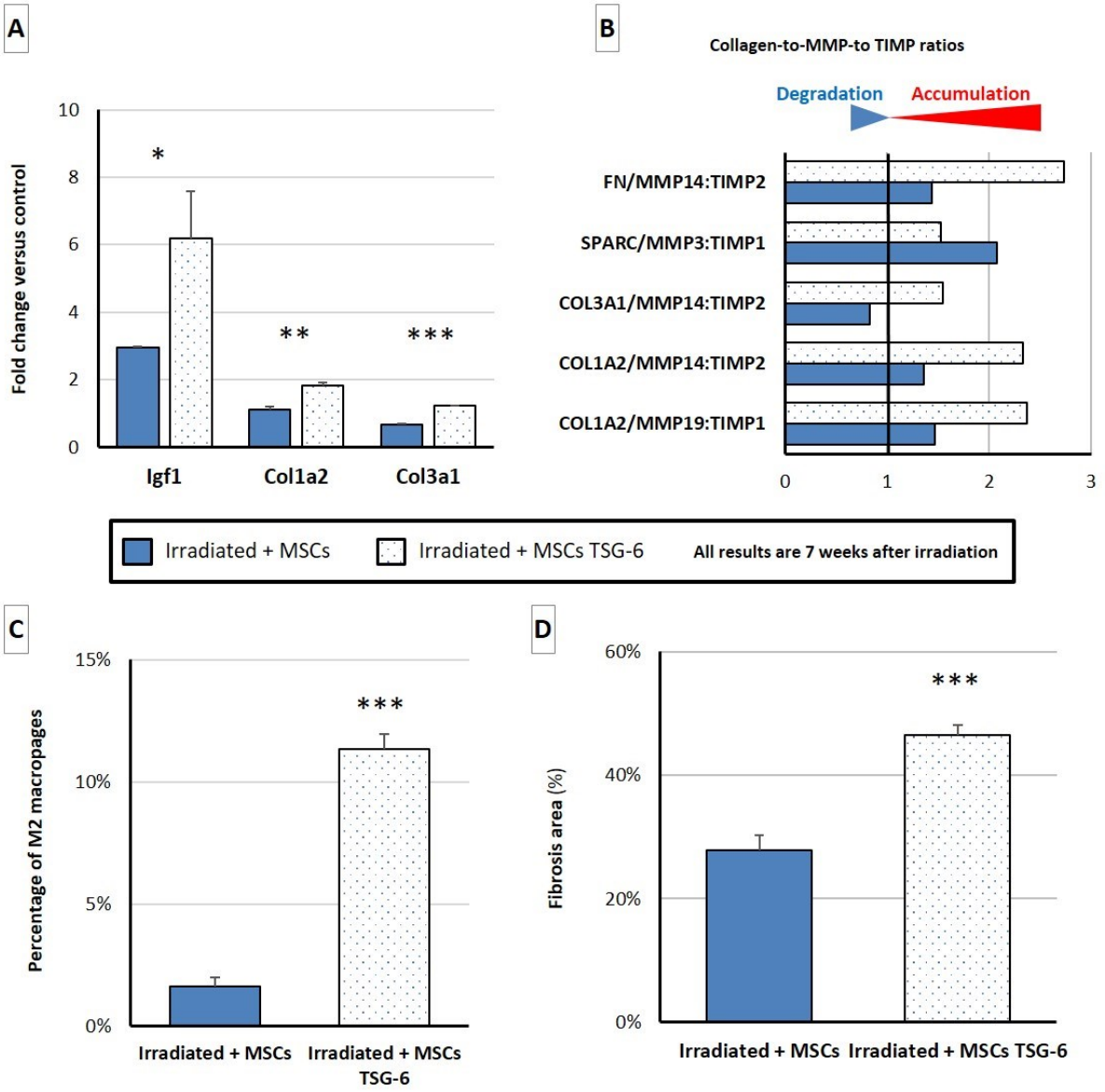
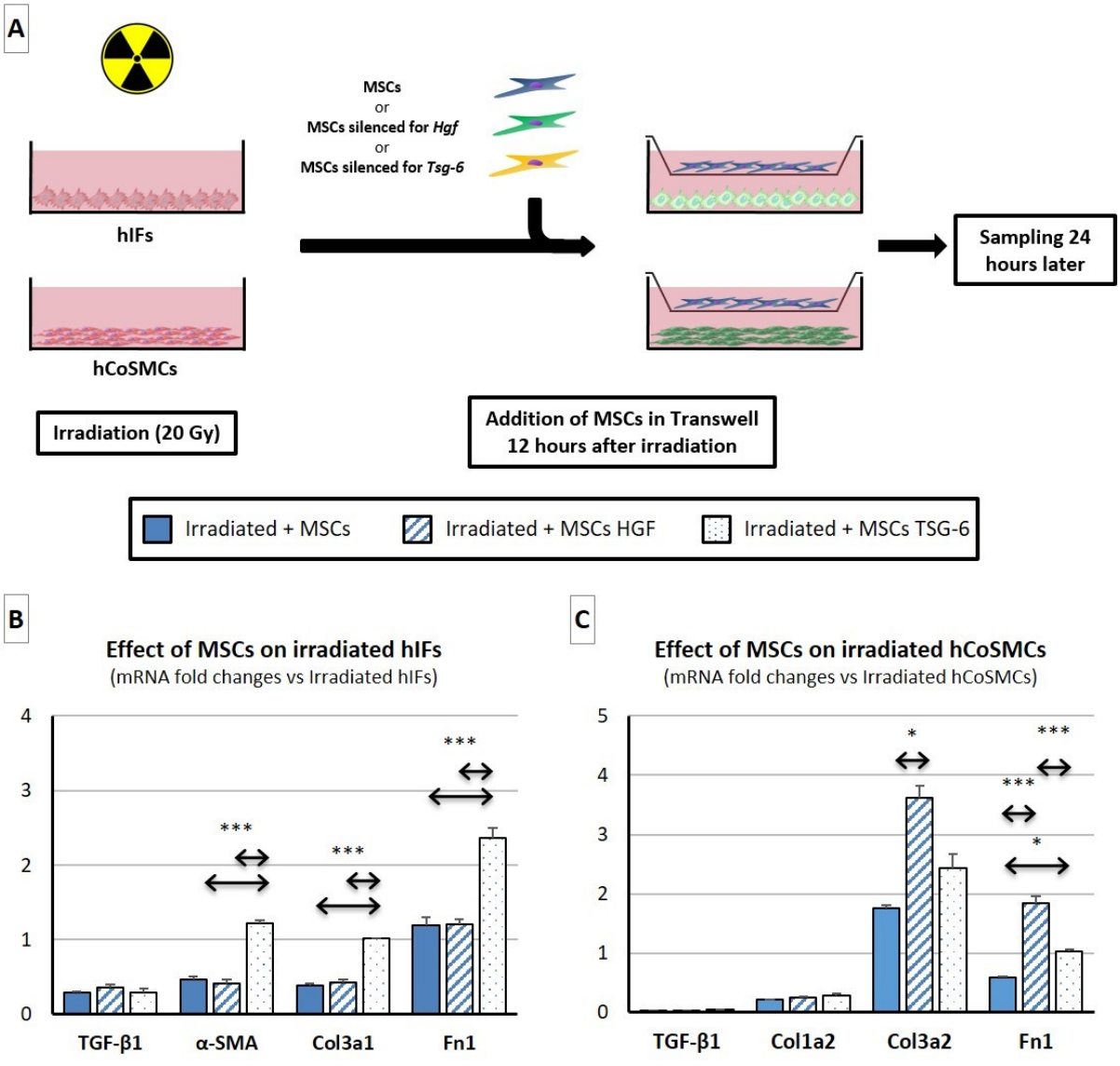

A
Fold change versus control
10
8
6
4
2
0
*
**
***
Igf1
Col1a2
Col3a1
B
Collagen-to-MMP-to TIMP ratios
Degradation
Accumulation
FN/MMP14:TIMP2
SPARC/MMP3:TIMP1
COL3A1/MMP14:TIMP2
COL1A2/MMP14:TIMP2
COL1A2/MMP19:TIMP1
0
1
2
3
Irradiated + MSCs
Irradiated + MSCs TSG-6
All results are 7 weeks after irradiation
C
Percentage of M2 macropages
15%
10%
5%
0%
***
Irradiated + MSCs
Irradiated + MSCs TSG-6
D
Fibrosis area (%)
60%
40%
20%
0%
***
Irradiated + MSCs
Irradiated + MSCs TSG-6

Figure 7


A
MSCs
or
MSCs silenced for Hgf
or
MSCs silenced for Tsg-6
hIFs
hCoSMCs
Irradiation (20 Gy)
Addition of MSCs in Transwell
12 hours after irradiation
Sampling 24
hours later
Irradiated + MSCs
Irradiated + MSCs HGF
Irradiated + MSCs TSG-6
B
Effect of MSCs on irradiated hIFs
(mRNA fold changes vs Irradiated hIFs)
TGF-β1
α-SMA
Col3a1
Fn1
C
Effect of MSCs on irradiated hCoSMCs
(mRNA fold changes vs Irradiated hCoSMCs)
TGF-β1
Col1a2
Col3a2
Fn1

Discussion et perspectives

L'objectif de cette thèse est d'évaluer les potentiels effets secondaires et le bénéfice thérapeutique de la transplantation de CSM pour le traitement des complications tardives sévères des radiothérapies. La fibrose est la complication chronique majeure des radiothérapies. Cette pathologie est invalidante et peut conduire au décès des patients. La persistance de l'inflammation du tissu sain dans le champ d'irradiation est responsable du développement de cette pathologie. A l'heure actuelle, les traitements sont palliatifs. Il est donc nécessaire de proposer de nouvelles approches thérapeutiques. Les pathologies inflammatoires sévères telles que la maladie du greffon contre l'hôte ou les MICI engendrent des dommages tissulaires similaires aux séquelles chroniques des radiothérapies pelviennes (PRD). De nombreux essais cliniques ont utilisés les CSM avec succès dans ces maladies. De plus l'efficacité thérapeutique des CSM sur des tissus sains irradiés a été démontrée dans le cadre d'essais compassionnels de traitement de brûlures radiologiques sévères. Les CSM semblent donc une alternative prometteuse de traitement des fibroses induites par la radiothérapie. Néanmoins, le manque de données sur les mécanismes sous-tendant l'action des CSM ne permet pas à l'heure actuelle d'assurer l'innocuité de ce type de traitement chez les patients ayant subi une radiothérapie. D'une part, la capacité des CSM à produire une large gamme de facteurs de croissance pourrait favoriser la croissance de cellules tumorales résiduelles après radiothérapie. De plus, la capacité des CSM à se différencier en cellules productrices de MEC, responsables de la fibrose, pose la problématique d'un possible effet pro-fibrosant des CSM transplantées. Cette étude a donc été développée selon trois axes principaux :

(i) Évaluer l'effet des CSM sur la progression tumorale avant et après radiothérapie

(ii) Évaluer l'effet des CSM sur les séquelles chroniques sévères des radiothérapies, en particulier vis-à-vis de la fibrose

(iii) Mettre en évidence les mécanismes par lesquels les CSM agissent sur la tumorigénèse et la fibrogénèse colorectales

Afin d'évaluer l'effet des CSM sur la progression tumorale avant et après radiothérapie, un modèle de tumorigénèse colorectale chimio-induite a été développé chez le rat Sprague-Dawley. Ce modèle présente l'avantage de développer une cancérogénèse colorectale proche de celle de l'homme. Dans ce modèle nous avons vérifié que la transplantation de CSM ne favorisait pas la croissance tumorale. Après induction de la cancérogénèse colorectale, les rats ont reçu une radiothérapie abdomino-pelvienne, puis ont reçu un traitement par CSM. Nous avons mis en évidence

l'effet anti-tumoral des CSM, après radiothérapie. Cette action a été associée à une amélioration de la survie des animaux transplantés.

Afin d'étudier l'effet des CSM sur la fibrose colorectale radio-induite, nous avons utilisé un modèle d'irradiation colorectale à dose unique, également chez le rat Sprague-Dawley, suivi d'un traitement par les CSM au cours du développement de la fibrose. Nous avons ainsi montré que l'injection des CSM limitait le développement de la fibrose dans le contexte de la radiothérapie abdomino-pelvienne.

Les mécanismes par lesquels les CSM agissent sur la tumorigénèse et la fibrogénèse colorectales mettent en évidence dans les deux cas une action des CSM sur l'inflammation. Deux médiateurs en partie responsable de cette action ont été identifiés : HGF et TSG-6.

A. Mesenchymal stem cell administration inhibits colorectal cancer progression and promotes survival: mechanism of action and rationale for clinical use

I. Description du modèle

1. Le modèle de cancérogène colorectale

Dans l'objectif d'étudier l'innocuité des CSM sur le développement localisé de tumeurs solides, nous avons fait le choix de la MNNG (N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine : agent alkylant) comme carcinogène sur le côlon du rat. L'instillation intrarectale de MNNG permet l'action directe au site de dépôt sur les cellules épithéliales coliques. En effet, contrairement à d'autres carcinogènes comme l'AOM (AzOxyMethane) et la DMH (DiMéthylHydrazine), l'action cancérigène de la MNNG ne nécessite pas de métabolisation. Il n'y a pas de tumeurs dans d'autres organes suite à l'instillation intra-rectale de MNNG, et les rats gardent longtemps un bon état général. L'action de la MNNG est directe sur l'épithélium colique après instillation. Le mode d'action de la MNNG cible l'ADN sur lequel elle induit des cassures double brin ainsi que des mutations. Par ailleurs la MNNG induit une élévation du stress oxydatif et de l'inflammation locale (Narisawa et coll., 1974).

Pour étudier l'effet des CSM sur le développement des lésions précancéreuses et cancéreuses induites par la MNNG, nous avons établi le protocole suivant: les rats sont traités par instillations intra-rectales de MNNG. Un temps de latence de 2 semaines est ensuite observé afin que la MNNG résiduelle soit éliminée des organes du rat. Après ces deux semaines, deux injections intraveineuses de CSM-GFP

sont effectuées. La cancérogénèse colorectale a été étudiée depuis les étapes très précoces des lésions coliques induit par la MNNG, l'initiation du cancer et jusqu'au développement des adénocarcinomes. Nous avons observé chez les rats traités à la MNNG des lésions adénomateuses et adénocarcinomateuses tout à fait similaires à celles observées chez l'homme. Le microenvironnement tumoral est conditionné par la composition en cytokines et chimiokines produites par les cellules immunitaires du stroma tumoral (cellule T, NKT, NK et macrophages). Nous avons analysé les composantes inflammatoires et angiogéniques dans les côlons macroscopiquement sains et les tumeurs des rats traités injectés ou non avec des CSM.

2. Le modèle de stérilisation tumorale par irradiation fractionnée

Les études s'intéressant à la radiothérapie et aux cancers colorectaux combinent une anastomose et une irradiation (à des doses moins élevées, 22-25 Gy chez le rat) sans induire préalablement de cancer colorectaux. Leur but est de se focaliser sur la réparation tissulaire (Biert et coll., 1996, Kuzu et coll., 1999) Notre objectif était d'analyser l'effet des CSM sur les tumeurs résiduelles et sur le tissu sain après irradiation fractionnée, ce qui justifie notre protocole.

Nous avons vérifié par coloscopie la présence de tumeurs dans la partie la plus distale du côlon et ségrégé les animaux en deux groupes identiques avant radiothérapie. Ce résultat nous a permis d'utiliser une fenêtre d'irradiation n'incluant pas l'intestin grêle. Cette localisation est obtenue systématiquement avec l'instillation intra-rectale de MNNG alors que plus de 50% des tumeurs sont décelées dans le côlon plus proximal avec le traitement par DMH (Decaens et coll., 1989).

Notre protocole d'irradiation fractionnée est basé sur les travaux de Gremy et coll (Gremy et coll., 2008), à partir desquels une gamme de dose a été effectuée de 55 à 85 Gy. La dose de 75 Gy a été retenue car elle induit des lésions similaires à celles observées chez l'homme après radiothérapie du cancer de la prostate (Beckendorf et coll., 2002, Peiffert et coll., 2007). Dans ce modèle nous avons montré que l'irradiation fractionnée réduit significativement la taille des tumeurs par rapport aux animaux non irradiés.

II. Effet des CSM

1. Évolution de la cancérogénèse colorectale après traitement par les CSM

Une implantation précoce (après une semaine) et transitoire des CSM au niveau du côlon a été observé dans notre modèle. La localisation des CSM-GFP révèle à 7 jours après la dernière injection la présence de cellules positives pour la GFP dans le compartiment conjonctif du colon. Quelques cellules sont mises en évidence au niveau de la base des cryptes coliques. Les CSM ont un effet trophique sur le côlon au niveau de l'épithélium colique. Ces résultats sont en accord avec Sémont et coll. qui retrouvent des CSM-GFP dans la sous muqueuse et dans le mésentère près des vaisseaux jusqu'à une semaine après injection (Semont et coll., 2013). Le traitement par le carcinogène induit des dommages au niveau du côlon qui se traduisent par une diminution du nombre de cryptes, de la hauteur des cryptes ainsi que du nombre de cellules en gobelet et de la prolifération cellulaire au niveau de la muqueuse colique. En revanche, les CSM restaurent ces valeurs au niveau du contrôle. Ce processus est médié en partie par une inhibition de l'inflammation. Le traitement à la MNNG induit au niveau systémique un niveau élevé de CRP et au niveau du côlon une augmentation des facteurs pro-inflammatoire comme l'IL-1β, 6, TGF-β, TNF-α et IFN-γ. La présence de CSM restaure ces concentrations au niveau des contrôles et une augmentation de facteurs anti-inflammatoire associés à une polarisation de macrophages de type 2, de lymphocytes Th2, de CSM résidentes de type 2 et de T régulateurs comme décrit par Linard et coll. chez le cochon (Linard et coll., 2013). Cet effet est également associé à la production de 9 miRNA connus pour leur action anti-inflammatoire ou anti-tumorale. Lors des étapes précoces de la cancérogénèse les CSM favorisent la réparation de la muqueuse colique comme cela a été montré sur l'intestin grêle et le côlon (Semont et coll., 2010) et dans le traitement de la maladie de Crohn (Ringden et coll., 2007). Les CSM inhibent la phase initiale de la cancérogénèse par action sur l'inflammation plutôt que par un effet direct sur les cellules tumorales. Comme le confirment *in vitro* les co-cultures de CSM avec des lignées de cellules de cancer colorectaux. En présence de CSM la prolifération de ces lignées n'est pas modifiée suite à un traitement à la MNNG. Le rôle des CSM *in vitro* et *in vivo* est analogue.

Chez les rats traités avec des CSM, cette inhibition de la phase d'initiation du cancer-colorectal se traduit par un moins grand nombre de tumeurs. Ces résultats sont en opposition aux effets pro tumoraux décrits préalablement dans la littérature (Roorda et coll., 2009) Cependant les effets pro tumoraux des CSM ont été montrés dans des modèles de co-injections de CSM et de greffe ectopique de tumeurs en modèle immunotolérant. Ces modèles ne tiennent pas compte de la composante

inflammatoire et immunitaire qui sont essentielles dans l'action des CSM sur l'initiation de la cancérogénèse colorectale (Hass et Otte, 2012).

Dans les phases tardives à 32 et 52 semaines après instillation de la MNNG, lors du développement des adénomes puis des adénocarcinomes, le traitement par les CSM ralenti la progression tumorale. Bien que présentes très transitoirement après leur injection, les CSM agissent de manière durable sur la progression tumorale, plus d'un an après avoir disparu. Ce phénomène passe par une modification immunitaire du microenvironnement tumoral. Le microenvironnement tumorale est un élément essentiel de la cancérogénèse en produisant un effet anti-inflammatoire (Fessler et coll., 2013, Quail et Joyce, 2013).

Les études antérieures décrivent les propriétés immunosuppressives des CSM au niveau du microenvironnement, favorisant la croissance tumorale. En effet, *in vitro*, les CSM sont immunosuppressives sur les cultures de cellules T au sein d'une réaction mixte lymphocytaire (Nasef et coll., 2007, Nasef et coll., 2007, Nasef et coll., 2008), les lymphocytes B (Corcione et coll., 2006) et les cellules dendritiques (Ramasamy et coll., 2007).

Dans un modèle de cancérogénèse colorectale similaire au nôtre, un résultat opposé est observé. Une infiltration accrue par les cellules immunitaires (CD3+) de phénotype Th1, Treg, Th17, des lymphocytes NK et une diminution du nombre de macrophages M1 au niveau des adénocarcinomes sont observées chez les rats qui ont été injectés avec des CSM. Ces résultats démontrent que les CSM reversent le microenvironnement tumoral depuis un état anti vers un état pro-inflammatoire. Cet environnement pro-inflammatoire est particulièrement défavorable à la croissance tumorale qui se traduit par une réduction de la taille des tumeurs chez les rats traités par administration de CSM.

Pour résumer l'action des effets anti-tumoraux des CSM sur la progression de la cancérogénèse colique peuvent être attribués à :

- une modification précoce du microenvironnement de la muqueuse colique par sécrétion de facteurs trophiques par les CSM, comme cela a été décrit dans de nombreux processus de cicatrisation (Semont et coll., 2013, Bessout et coll., 2015). La conséquence est l'inhibition de l'initiation du cancer, ce qui se traduit par un moins grand nombre de tumeurs après transplantation de CSM.
- un effet anti tumoral direct lors du développement des tumeurs par la modification du microenvironnement tumoral. La conséquence est une l'inhibition du développement

de la cancérogénèse. Le résultat est une taille des tumeurs plus petite pour les rats traités par les CSM.

- une survie accrue des animaux traités par injection de CSM.

2. Évolution de la cancérogénèse colorectale et des tissus sains irradiés après radiothérapie puis traitement par les CSM

Les résultats majeurs de cette étude sont que le traitement par les CSM diminue la taille des tumeurs après irradiation fractionnée de manière accrue par rapport aux animaux qui n'ont pas reçu de CSM, et protège le tissu sain des effets délétères de l'irradiation. De plus le traitement par les CSM accroit notablement la survie des animaux.

Au niveau du côlon sain irradié, un processus de réparation aberrant est observé, associé à une inflammation chronique, une accumulation excessive de matrice et une désorganisation vasculaire aboutissant à une fibrose comme décrit par Bessout et coll. chez le rat (Bessout et coll., 2014) et Linard et coll. chez le cochon (Linard et coll., 2013). La désorganisation de la muqueuse colique et la fibrose sont corrigées par l'injection de CSM. L'irradiation fractionnée induit une augmentation du TGF-β et de TIMP-1, tandis que l'injection de CSM restaure un niveau similaire au témoin non irradié et augmente la production de VEGF. Au niveau moléculaire, l'injection de CSM ne modifie pas les facteurs pro-inflammatoires par rapport aux animaux irradiés mais diminue les ARNm du TGF-β et augmente les ARNm de TFF3 (TreFoil Factor 3), HGF et VEGF montrant un effet trophique des CSM sur le colon irradié en accord avec les résultats publiés par Bessout et coll chez le rat et Linard et coll. chez le cochon (Linard et coll., 2013, Bessout et coll., 2015).

III. Conclusion

En conclusion l'ensemble de ces résultats montrent pour la première fois que l'administration de CSM augmente la survie des animaux exposés à un carcinogène en diminuant l'initiation et la progression du cancer colorectal. Après irradiation fractionné les CSM inhibent les tumeurs résiduelles et protègent le tissu sain de l'irradiation, prolongeant ainsi la survie des animaux. Ces résultats sont en faveur de l'utilisation des CSM pour le traitement des complications sévères des radiothérapies pelvienne sous réserve que les CSM ne favorisent pas la fibrogénèse radio-induite.

B. Article 2 : Mesenchymal Stromal Cells attenuate radiotherapy-induced colorectal fibrosis through the release of HGF and TSG-6

I. Le modèle d'irradiation à 29 Gy en dose unique

1. Le choix du modèle

Depuis les prémices de la recherche sur les effets des radiothérapies, de nombreux modèles d'étude des effets de l'irradiation abdomino-pelvienne ont été mis en place. Nous avons choisi le modèle d'ulcération colorectale radio-induite chez le rat Sprague-Dawley, développé au sein de notre Institut (Jullien et coll., 2009). Le protocole consiste à irradier une fenêtre colorectale de 2 par 3cm à une dose unique de 29 Gy délivrée par un accélérateur médical à rayonnements X (2,43 $Gy.min^{-1}$). L'irradiation est réalisée sous anesthésie gazeuse à l'isoflurane, sur des animaux de 250 à 300 g.

Les protocoles de radiothérapie sont la plupart du temps échelonnés par fractions de dose (2 Gy en général), la pertinence d'un modèle dose unique peut être remise en cause. Le fractionnement des doses permet d'améliorer l'efficacité de la radiothérapie, en exploitant la plus grande radiorésistance des cellules saines comparées aux cellules cancéreuses. Cependant, la plus grande radiorésistance des rongeurs et le temps nécessaire à l'application d'un protocole de radiothérapie fractionnée induisant la fibrose chez le rat ont rendu nécessaire le développement de nouveaux modèles. Plusieurs études ont ainsi montré que l'application d'une dose unique élevée de rayonnements ionisants produit des lésions plus proches de celles observées chez l'Homme (Gremy et coll., 2008, Francois et coll., 2013, Semont et coll., 2013).

Le modèle d'irradiation colorectale à 27 Gy produit des dommages sévères et irréversibles similaires à ceux observés chez des patients ayant été traité par irradiation fractionnée. Ces lésions sont principalement caractérisées par l'ulcération de la muqueuse colique et la mise en place d'un processus inflammatoire chronique participant à l'établissement de la fibrose (Francois et coll., 2013, Semont et coll., 2013). Chez le rat, le côlon est constitué d'un seul segment longitudinal peu mobile, à l'inverse de l'humain, permettant la reproductibilité de l'irradiation entre chaque animal. Les irradiations sont réalisées exclusivement sur des rats mâles afin de s'affranchir des incertitudes liées au cycle menstruel. La fenêtre d'irradiation est localisée entre les testicules de l'animal et l'intestin grêle. En effet, au-delà du risque d'erreur sur le modèle en lui-même, l'irradiation de ces organes, en particulier de l'intestin grêle, induit une mortalité élevée dans les jours suivant l'irradiation.

Au cours de cette étude, nous avons utilisé un irradiateur médical à rayons X, différent de l'irradiateur au ^{60}Co (rayons γ) employé à l'origine dans ce modèle. La caractérisation des lésions produites sur le nouvel irradiateur au sein de notre laboratoire a mis en évidence des dommages moins sévères que ceux observés après irradiation au ^{60}Co. Une gamme de doses croissantes a été appliquée à des rats selon le protocole d'irradiation classique et nous a permis de déterminer qu'une irradiation à 29 Gy produisait des atteintes identiques à celles observées précédemment. Cette dose a donc été utilisée au cours de notre étude.

2. Transplantation de CSM

Les animaux ont été traités par deux injections de CSM issu du tissu adipeux de rats GFP. Les animaux ont reçu 5 millions de CSM par voie intraveineuse à deux et trois semaines après irradiation. Pour l'étude de l'impact de HGF et TSG-6 dans l'effet des CSM, nous avons réalisé la transfection des siRNA au 5ème jour de culture puis la transplantation 2 jours après. Les injections ont été réalisées selon le même protocole, et les animaux ont été euthanasiés 1, 2 et 4 semaines après transplantation, afin d'évaluer la cinétique d'évolution de la lésion.

II. Description de la lésion

Le modèle d'irradiation colorectale dose unique à 29 Gy induit des lésions aigües entre 7 et 14 jours, caractérisées notamment par l'ulcération de la muqueuse. Les lésions évoluent par la suite vers la fibrose, dont le développement est observable 7 à 8 semaines après irradiation. A 3 jours, l'analyse histologique du tissu irradié permet d'observer une augmentation de l'infiltrat leucocytaire. L'ulcération du tissu est maximale autour de 7 jours, avec une dénudation complète de l'épithélium. On observe la perte de l'architecture normale des cryptes après J7. L'infiltrat inflammatoire est maximal à J14, avec une forte densité de neutrophiles, de macrophages, de mastocytes et de lymphocytes T activés (Bessout et coll., 2014). On observe une régénération partielle de la muqueuse à partir de J21, laissant toutefois apparaitre de longues plages d'ulcération, parfois profondes (Bessout, 2012, Bessout et coll., 2014). L'impossibilité de régénérer le tissu, entre autres en raison d'une inflammation latente, produit la fibrose observable 7 semaines après irradiation. La fibrose est associée à un épaississement du tissu, caractérisé par une hyperplasie des zones de muqueuse en régénération ainsi que de la musculaire propre, un épaississement de la sous-muqueuse résultant de l'augmentation du dépôt de matrice, une sténose des vaisseaux et une accumulation de matrice dans les tuniques musculaires.

Dans les semaines suivant l'irradiation, de fréquentes diarrhées sont observables chez les animaux. Cela est notamment dû à l'ulcération de la muqueuse et au défaut de perméabilité en résultant, entrainant une mauvaise absorption des éléments du bol alimentaire. La fibrose envahissant notamment la musculaire propre, est probablement en partie à l'origine de l'occlusion intestinale observée à des temps plus tardifs (6 à 10 semaines environ) et responsable dans la majorité des cas du décès de l'animal. Il semble en effet que la fibrose participerait, avec l'altération de la fonctionnalité du système nerveux entérique, à limiter la contractibilité des muscles du côlon-rectum et donc à empêcher l'avancée du bol alimentaire (Bessout et coll., 2015). L'épaississement du tissu contribue également à ce phénomène par la sténose de l'intestin. L'autopsie des animaux permet d'observer dans le cas d'une occlusion une augmentation de la surface de la lumière intestinale, associée à un épaississement conséquent (jusqu'à dix fois l'épaisseur du côlon des animaux non irradiés) et parfois à une nécrose de la muqueuse.

1. Évolution de la lésion tardive

Dès 4 semaines, on observe une augmentation du dépôt de matrice extracellulaire au sein du tissu, notamment dans la sous-muqueuse. Nous avons étudié l'évolution de la fibrogénèse à partir de ce temps et nous concentrerons donc sur cette période au cours de la discussion.

a. Remodelage matriciel

Dès 4 semaines, l'irradiation provoque un phénomène de remodelage matriciel conséquent, matérialisé par une augmentation du dépôt de matrice au sein du tissu, ainsi qu'une augmentation de l'expression de gènes codant pour :

- des éléments de la MEC : collagène I, collagène III, fibronectine, Sparc
- des métalloprotéinases : MMP-2, MMP-9, MMP-12, MMP-13, MMP-14
- les inhibiteurs de métalloprotéinases : TIMP-1, TIMP-2, TIMP-3 et TIMP-4
- les éléments du système du plasminogène : plasminogène, tPA (tissue-type Plasminogen Activator), PAI-1

L'augmentation de l'expression de ces gènes est en accord avec des observations réalisées auparavant sur des modèles *in vivo* ainsi que chez des patients souffrant d'entérite radique. Après une irradiation abdominale à 10 Gy chez le rat, Strup-Perrot et coll. ont noté une augmentation de l'expression de plusieurs MMP (-2, -3, -9 et -14) (Strup-Perrot et coll., 2006). Sur le même modèle, l'augmentation de l'expression des TIMP-1 et -2 a également été démontrée (Strup-Perrot et coll., 2005). Des résultats similaires ont été obtenus sur des biopsies de patients atteints d'entérite radique

et présentant une augmentation de l'expression des MMP (-1, -2,-18, -19, -14 et -3), TIMP (-1 et -2) et collagènes (type I et type III) (Strup-Perrot et coll., 2004). Le système du plasminogène joue également un rôle important dans le développement des lésions radiques et de la fibrose. La plasmine est une des principales enzymes responsables de l'activation des MMP et exerce une activité directe de dégradation de la matrice extracellulaire (sur la fibronectine, la laminine, le collagène IV) (Deryugina et Quigley, 2012). D'autre part, PAI-1 est un inhibiteur indirect de l'activation des MMP en inhibant le clivage du plasminogène, et sa surexpression est classiquement retrouvée au cours de l'entérite radique (Vozenin-Brotons et coll., 2004, Milliat et coll., 2008). Le calcul des ratios d'accumulation/dégradation de MEC (CMP : collagen-to-MMP-to-TIMP : collagène sur MMP sur TIMP) (Sandler et coll., 2003) indique une forte tendance à l'accumulation de MEC, précédemment observée au cours de l'entérite radique (Strup-Perrot et coll., 2004) et dans des modèles animaux chez le cochon (Linard et coll., 2013) et le rat (Bessout et coll., 2015).

Il semble donc, en accord avec les hypothèses formulées au cours d'études précédentes, que l'accumulation de MEC soit due à un dysfonctionnement du système de production/dégradation, plutôt qu'à une sous-expression des MMP au profit des éléments de la MEC et des TIMP. De plus, malgré l'augmentation de l'expression du plasminogène, PAI-1 pourrait inhiber son activation et le clivage des Pro-MMP par la plasmine. Ainsi, une diminution de l'activité des MMP serait responsable du défaut de dégradation de la MEC.

L'augmentation de l'activation de la voie TGF-β/Smad est généralement associée au développement de la fibrose. Nos résultats suggèrent une faible implication des protéines de la voie TGF-β/Smad au cours de la fibrogénèse, à partir de 4 semaines. TGF-β1 et –β3 sont légèrement surexprimés dès 4 semaines, alors que TGF-β2 est sous-exprimé. De plus, le dosage du TGF-β1 total au sein du tissu indique une diminution de sa concentration chez les animaux irradiés dès 4 semaines, devenant significative à 7 semaines. En revanche, la diminution de l'expression des inhibiteurs de la voie Smad (Skil, TGIF1, Smad 6 et Smad 7) pourrait conduire à une perte d'inhibition des Co-Smad et donc à une augmentation de la transcription de leurs gènes cible (Figure 32). Cela pourrait notamment impliquer l'augmentation de l'expression des gènes impliqués dans la production/dégradation de MEC (collagènes, MMP, TIMP, marqueurs des myofibroblastes…).

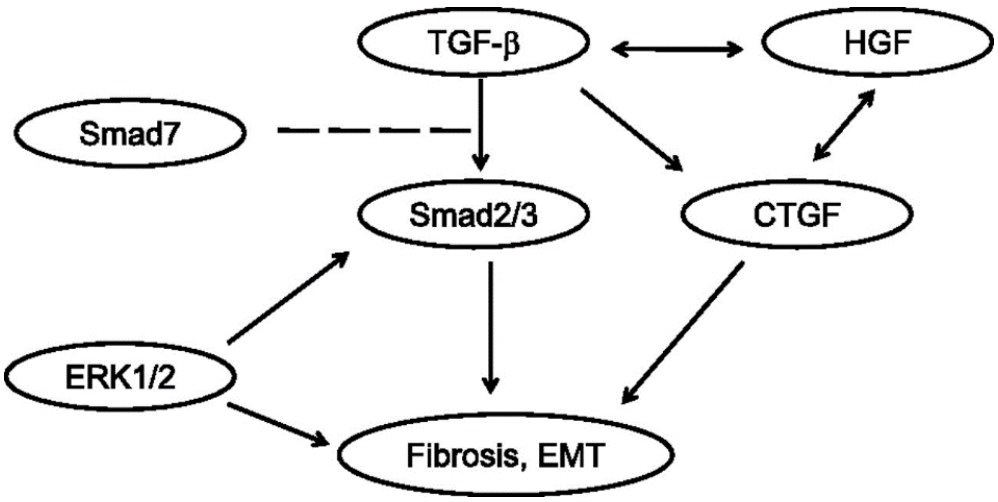


Figure 32 : voies d'activation et de répression du signal TGF-β pendant la fibrose.

Ce résultat n'a à notre connaissance pas encore été décrit dans la littérature. L'augmentation de l'expression de TGF-β1 est un évènement précoce observé lors de l'entérite radique (Francois et coll., 2013) ainsi que dans les modèles animaux (Martin et coll., 2000). Dans l'intestin grêle de rats, la concentration en TGF-β1 est augmentée dès le premier jour et jusqu'à plus de 26 jours après irradiation (Langberg et coll., 1994). Néanmoins, dans la peau irradiée chez le cochon (Martin et coll., 1997) et chez la souris (Randall et Coggle, 1995), l'expression de TGF-β1 revient à son état basal entre 24 et 48 heures après irradiation.

Ces résultats suggèrent que la surexpression de TGF-β1 est précoce, transitoire et suffisante pour induire la fibrose dans notre modèle. Cependant, l'activité de TGF-β1 est aussi régulée par la disponibilité de sa forme active dans le microenvironnement. TGF-β1 peut être activé par différents facteurs : MMP-2 et -9, la thrombospondine, certaines intégrines et les ROS. Dès 4 semaines, nous avons observé une augmentation de l'expression de la thrombospondine, de MMP-2 et -9 et de nombreuses intégrines. La concentration de MMP-2 était significativement augmentée chez les animaux irradiés au cours de notre étude. Ces résultats suggèrent l'augmentation de la disponibilité en agents activateurs de TGF-β1 et pourraient impliquer l'accroissement de son activité.

Le CTGF amplifie l'effet de TGF-β au cours de la fibrose en favorisant sa fixation à son récepteur TGF-βR2. Son expression est élevée au cours de la fibrose intestinale radio-induite (Vozenin-Brotons et coll., 2003). Lors de la phase tardive de l'entérite radique, une expression élevée de CTGF est observée, associée à une concentration faible de TGF-β1 (Vozenin-Brotons et coll., 2003). L'augmentation élevée de CTGF permettrait ainsi d'entretenir la fibrose en l'absence de TGF-β1. Au cours de notre étude, nous avons observé un niveau d'expression identique de CTGF chez les animaux

irradiés, comparé aux non-irradiés. Ces résultats suggèrent que la fibrogénèse est entretenue par des mécanismes indépendants de la voie TGF-β/Smad dans ce modèle.

b. Cellules pro-fibrosantes

Les myofibroblastes sont les principales cellules responsables de la production de MEC au cours de la fibrose. Ils sont activés par différentes voies, la principale étant la voie canonique TGF-β/Smad. Le côlon-rectum comprend trois principaux types cellulaires résidents pouvant produire la MEC : les fibroblastes sub-épithéliaux, les myofibroblastes (sub-épithéliaux et CIC) et les CML. Nous avons souhaité évaluer l'évolution phénotypique de ces cellules au sein du côlon-rectum des rats irradiés.

i. Myofibroblastes et fibroblastes

Chez les patients atteints de fibrose intestinale radio-induite, une augmentation du nombre de myofibroblastes a été observée dans la muqueuse et la sous-muqueuse intestinales (Vozenin-Brotons et coll., 2003). Nous avons également noté une quantité élevée de cellules positives à α-SMA au sein de la muqueuse, pouvant en partie expliquer le dépôt matriciel dans ce compartiment. L'activation et la prolifération des myofibroblastes dans ce modèle sont soutenues par la surexpression de facteurs de croissance et cytokines pro-fibrosantes : Akt1, Ilk, IL-1α, IL-1β, EGF et FGF-2. Ces facteurs favorisent la prolifération des fibroblastes et myofibroblastes, et induisent l'EMT. En particulier, IL-1β est capable d'induire l'activation des myofibroblastes en favorisant la réponse Th17 par un mécanisme indépendant de TGF-β1, soutenant davantage l'implication de mécanismes indépendants de cette voie (Ghoreschi et coll., 2010).

A l'inverse, un nombre négligeable de cellules α-SMA$^+$ était présent dans la sous-muqueuse, à l'exception des cellules musculaires lisses vasculaires. L'activation des cellules musculaires lisses de la musculaire muqueuse et du musculaire propre, serait à l'origine de l'épaississement de la sous-muqueuse due à la surproduction de MEC, apparent dès 4 semaines et non pas au recrutement de myofibroblastes au sein de la sous muqueuse.

ii. Cellules musculaires lisses (CML)

La stimulation de CML intestinales isolées de fibroses radiques par TGF-β1 induit une faible activation de Smad3 et Smad4 (Haydont et coll., 2005). Il semble en effet que le signal de TGF-β1 soit préférentiellement transmis par la voie Rho/ROCK au cours de la phase chronique de la fibrose radique.

Les CSM productrices de MEC issues de patients souffrant de fibrose intestinale radio-induite présentent un phénotype immature, caractérisé par une diminution du ratio γ-SMA/α-SMA et une activité élevée de RhoA (Haydont et Vozenin-Brotons, 2007). FGF-2 et PDGF-BB sont capables d'activer la voie Rho/ROCK et de bloquer ainsi la maturation des CML. Au cours de notre étude, nous avons observé une surexpression de ces deux facteurs de croissance 4 et 5 semaines après irradiation. Ceci pourrait expliquer l'augmentation de la production de MEC par la promotion du phénotype pro-fibrosant des CML.

Néanmoins, nous avons observé une légère augmentation du ratio γ-SMA/α-SMA 4 semaines après irradiation, suivie d'un retour à un état basal à 5 semaines. La maturation des CML est fortement stimulée par l'activation, entre autres, de PI3K et Akt par IGF-1 (Lim et coll., 2007). Dans notre modèle, une forte expression de IGF-1 et Akt1 est observable jusqu'à 7 semaines et pourraient expliquer un ratio γ-SMA/α-SMA proche de l'état basal. À l'inverse, la fixation de l'IGF-1 à son récepteur induit une cascade d'activation de la voie Rho/ROCK et pourrait donc activer le phénotype sécrétoire des CML, comme il a notamment été montré dans des cultures de CML coliques (Simmons et coll., 2002). Chen et coll. ont montré que l'expression de l'IL-1β était nécessaire pour l'activation par PDGF-BB, à travers la voie PI3K/Akt, du phénotype sécrétoire des CML aortiques (Chen et coll., 2006). Il existe des interconnexions entre les voies Rho/ROCK et la voie PI3K/Akt (Yang et coll., 2012), qui pourraient être à l'origine d'une amplification du phénomène d'activation des CML au cours de la fibrose.

Un autre effet notable induit par l'irradiation colorectale dans notre modèle est l'épaississement du tissu, et plus spécifiquement de la musculaire propre. Cette caractéristique est observée au cours de la maladie de Crohn (Graham, 1995) et de l'entérite radique (Haydont et Vozenin-Brotons, 2007). IGF-1 peut induire l'hyperplasie des CML du côlon et pourrait donc être responsable de l'épaississement de la musculaire propre et de la sténose du tissu menant à l'occlusion chez la majorité des animaux irradiés. Cette donnée tend à valider l'activation des CML par IGF-1.

Les CML expriment α-SMA de manière constitutive, ce qui leur confère leur contractibilité. Néanmoins, le phénotype immature des CML se caractérise par une activité contractile réduite au profit de la sécrétion de diverses molécules, en particulier des composants de la MEC (Brittingham et coll., 1998). Cette modification phénotypique des CML est illustrée par la perte de mobilité dans l'intestin après irradiation (Husebye et coll., 1994), qui a également été observée au cours d'une précédente étude sur le modèle que nous avons utilisé (Bessout et coll., 2015). La perte de contractibilité de la musculaire propre, dont les deux couches perpendiculaires assurent les mouvements péristaltiques du côlon, pourrait participer à la survenue de l'occlusion.

c. Inflammation

Nous avons souligné précédemment l'importance de la composante inflammatoire lors du développement de la fibrose. La lésion initiale induit la mise en place d'une réaction inflammatoire prolongée, voire chronique par différents mécanismes, en particulier par la destruction directe (effets à l'ADN) ou indirecte (production de ROS) des cellules résidentes. Nous avons souhaité mettre en évidence l'impact de cette composante dans le modèle d'irradiation colorectale dose unique.

i. Apoptose/prolifération dans la muqueuse

L'apparition d'ulcères conséquente à l'apoptose des cellules épithéliales est l'un des premiers évènements survenant suite à l'irradiation. Les précédentes études sur notre modèle ont montré l'apparition de plages de régénération de l'épithélium à partir de la 3ème semaine. À partir de la 4ème semaine, nous avons observé une augmentation de la surface positive pour PCNA (Proliferating Cell Nuclear Antigen) au sein de la muqueuse des animaux irradiés. Cette stimulation de la prolifération a été maintenue à un niveau supérieur à celui des animaux non-irradiés jusqu'à la fin de l'étude. FGF-2 et EGF, deux facteurs de croissance activateurs de la prolifération des cellules épithéliales étaient surexprimés 4 et 5 semaines après irradiation. La production prolongée de ces facteurs de croissance pourrait expliquer la forte prolifération observée au sein de la muqueuse, et participe au remaniement constant de l'architecture du tissu.

En accord avec les descriptions précédentes de ce modèle, nous avons démontré une augmentation de l'apoptose au sein de la muqueuse, maximale 5 semaines après irradiation. 7 semaines après irradiation, la muqueuse présentait un niveau d'apoptose similaire à celui des animaux non irradiés. L'apoptose des cellules résidentes est l'un des éléments déclencheurs et d'entretien de l'inflammation au cours de la fibrose.

ii. Profil inflammatoire

L'augmentation de l'apoptose induite par l'irradiation entraine une forte inflammation au sein des tissus sains. Le système immunitaire est initialement activé par la reconnaissance des motifs associés aux dommages cellulaires (DAMP) et aux pathogènes (PAMP) d'une part, et, d'autre part, par l'induction de la production de chimiokines par les cellules endommagées, puis les leucocytes (Francois et coll., 2013). Dans le tractus gastro-intestinal, l'épithélium de surface à une fonction de protection à

l'entrée des pathogènes dans l'organisme. La forte radiosensibilité de cet épithélium augmente le risque d'infection causé par d'ulcération radio-induite et donc l'activation des leucocytes. Ces signaux initiaux de la lésion, avec les cytokines produites par les cellules résidentes puis recrutées, orientent la réponse inflammatoire afin d'organiser au mieux la réparation du tissu.

Les animaux irradiés au cours de nos travaux présentaient à 4 semaines un profil d'expression fortement inflammatoire, s'atténuant à 5 semaines pour rejoindre à 7 semaines un état proche des animaux sains. Nous avons observé la surexpression de gènes codant pour :

- des chimiokines et récepteurs de chimiokines : CCL2 et son récepteur CCR2, CCL3, CCL11, CXCR4
- des cytokines pro-inflammatoires : IL-1α, IL-1β, IL-6
- des cytokines anti-inflammatoires : IL-10, HMOX1 (HeMe Oxygenase 1)
- des marqueurs de la différenciation des lymphocytes T : Foxp3 (Foxhead box P3), Gata3, Ror-γ (RAR-related orphan receptor gamma), T-bet (TBX21 : T-BoX transcription factor 21)
- des marqueurs des macrophages : Arg1 (Arginase 1), Mrc1 (Mannose Receptor C type 1), iNOS.

De nombreuses cellules immunitaires sont recrutées lors de la phase initiale de la lésion radio-induite : neutrophiles, lymphocytes et monocytes. La surexpression de chimiokines par les cellules résidentes (cellules endommagées et macrophages) est à l'origine de la mobilisation des éléments du système immunitaire.

Réponse T

Lors de la réponse immunitaire adaptative, l'infiltration des lymphocytes T est une réponse classique des irradiations localisées aux tissus sains, notamment lors de la phase chronique de l'inflammation (Francois et coll., 2013). La présentation de l'antigène par les CPA induit la différenciation des lymphocytes T $CD4^+$ en différents sous-groupes possédant des orientations immunitaires distinctes : Th1, Th2, Th17 et Treg.

Dans le côlon-rectum, Grémy et coll. ont montré l'apparition d'une réponse Th2 prononcée après irradiation et maintenue jusqu'à 6 mois, accompagnée d'une suppression de la réponse Th1 (Gremy et coll., 2008). Dans notre modèle, les réponses Th1 et Th2, caractérisées respectivement par l'expression de T-bet et Gata3 (Gremy et coll., 2008), sontt modifiées à 4 et 5 semaines. Le ratio T-

bet/Gata-3 indiquait une forte réponse de type Th2 à 4 semaines. À 5 semaines, il semble que la réponse soit inversée en faveur d'une réponse Th1, pour retourner à un état basal à 7 semaines avec une faible surexpression de Gata3. Dans un modèle infectieux, par un effet de rétrocontrol, iNOS réprime la réponse Th1 au profit de la réponse Th2 (Lawrence et coll., 2000). La forte expression d'iNOS à 4 semaines, puis da répression à 5 semaines pourrait expliquer la levée de la répression des Th1.

L'augmentation des Treg, qui semble être caractéristique de la réponse intestinale à l'irradiation, est caractérisée dans notre modèle par une surexpression persistante de l'IL-10 associée à l'augmentation à 4 et 5 semaines de l'expression de Foxp3, le facteur de transcription majoritairement exprimé par les Treg. L'expression de l'IL-10 est maintenue à 7 semaines, sans surexpression de Foxp3, suggérant ainsi une autre source de cette cytokine, telle que les macrophages M2. Bessout et coll. ont montré une augmentation de la proportion de lymphocytes Treg et Th17 dans le modèle d'irradiation colorectale (Bessout et coll., 2015). Lors de cette étude, la réponse T régulatrice semblait défective, l'expression de l'IL-10, caractéristique des Treg, n'étant pas corrélée à l'augmentation du nombre de cellules. Dans l'intestin grêle, bien que l'infiltration de Treg soit élevé, ces cellules présentent un défaut de leurs fonctions immunosuppressives observé jusqu'à 90 jours après irradiation (Billiard et coll., 2011). Dans cette dernière étude, il a été démontré que les Treg maintenaient un niveau d'expression élevé de l'IL-10.

La réponse Th17 est induite par l'IL-1β et caractérisée par la production de quantités élevées de TGF-β1 et d'IL-17. Les lymphocytes Th17 ont été associés au développement de la fibrose dans plusieurs organes, et notamment dans le côlon-rectum après irradiation (Cf. Th17). Malgré l'expression forte de l'IL-1β, TGF-β1 reste marginalement surexprimé, voire sous-exprimé au cours de l'étude. Dans un modèle de GVHD chez la souris, le blocage du récepteur à l'IL-1β inhibe la différenciation des cellules T en Th17 (Park et coll., 2015). Il pourrait donc exister un système d'inhibition de la réponse Th17 agissant directement sur la signalisation de l'IL-1β. Malgré ces observations, l'expression de RORC, impliquée dans la différenciation des cellules T $CD4^+$ en Th17, reste augmentée pendant l'étude.

Le profil d'expression des marqueurs de différenciation des lymphocytes T suggère la présence d'un fort infiltrat immunitaire 4 semaines après irradiation, suivi par une diminution progressive jusqu'à 7 semaines. La présence de nombreux Th2, dont l'activité pro-fibrosante a été identifiée dans de nombreux modèles, pourrait justifier pour partie l'accumulation de MEC au sein du tissu. Les Th2 favorisent la fibrose en activant la synthèse de collagène par les fibroblastes (Barron et Wynn, 2011). Associée à cette réponse pro-fibrosante, la persistance de lymphocytes Th1 participerait au maintien de l'inflammation caractéristique de la phase chronique du développement de la fibrose.

Réponse des macrophages

L'irradiation induit un recrutement massif et chronique de macrophages au site de la lésion (Linard et coll., 2008, Blirando et coll., 2011, Linard et coll., 2013). Nous avons également observé une augmentation significative de l'infiltrat de macrophages au sein du côlon des animaux irradiés à 4 semaines. Cette infiltration de macrophages est associée à l'augmentation de l'expression d'Arg1, Mrc1 et Nos2, trois marqueurs spécifiques de ce type cellulaire. 7 semaines après irradiation, nous n'avons pas noté de différence de densité de macrophages entre les animaux irradiés et contrôles, et l'expression des marqueurs de macrophages était proche de l'état basal.

Le recrutement des macrophages est principalement réalisé via la production de CCL2 et CCL3 par les cellules résidentes. Le récepteur CCR2 présent sur les macrophages permet leur chimiotactisme. Au cours de notre étude, ces 3 facteurs étaient surexprimés dès 4 semaines, suggérant leur implication dans l'augmentation de l'infiltrat de macrophages. CCL2 est produit par de nombreux types cellulaires, dont les fibroblastes, cellules endothéliales, cellules épithéliales, les CML et les monocytes eux-mêmes (Deshmane et coll., 2009). CCL3 est principalement produit par les macrophages et cellules épithéliales (Smith et coll., 1994). Les dommages importants induits à l'épithélium et l'endothélium par l'irradiation pourraient expliquer la production importante de ces chimiokines. D'autre part, les macrophages sont en mesure d'induire le recrutement et la différenciation de monocytes circulants, amplifiant la chronicité de l'inflammation.

Dans l'intestin, les macrophages sont d'importants producteurs de MMP et de TIMP, en particulier MMP-1, -3, -9, -12 et -13 favorisent la production de MMP-9 par les cellules T en les activant par l'IL-1β (Pender et coll., 1997, Schuppan et Hahn, 2000). L'augmentation de leur infiltration dans le tissu pourrait en partie expliquer la modification du profil de remodelage collagen-to-MMP-to-TIMP.

La polarisation des macrophages, déterminante dans leur fonction, est fortement influencée par la composition de la population de lymphocytes T. Les macrophages classiquement activés, M1, sont pro-inflammatoires et donc souvent associés à la mise en place de l'inflammation responsable de la fibrose. Les macrophages alternativement activés, M2, sont considérés comme anti-inflammatoires et favorisant notamment le remodelage matriciel. Chez le cochon, l'augmentation de la proportion de macrophages M2 est associée à l'amélioration de la fibrose (Linard et coll., 2013).

Au cours de notre étude, nous n'avons pas observé de différence dans la proportion de macrophages M2 au sein du tissu. Il semble donc que l'augmentation du nombre de macrophages soit

accompagnée du maintien de l'équilibre de la polarisation des macrophages, accompagné par la surexpression de marqueurs de la réponse M1 (Nos2) et M2 (Arg-1, Mrc-1) à 4 semaines.

Plus particulièrement, la présence d'un fort infiltrat de M1 est observée dans la muqueuse, ce qui est en accord avec l'apoptose élevée trouvée au sein du tissu. En effet, les M1 sont principalement activés par la reconnaissance de PAMP et de DAMP, élevés dans notre cas en raison de l'ulcération de la muqueuse. De même, la quasi-totalité des macrophages M2 sontt localisés dans la sous-muqueuse. Les M2 sont classiquement associés aux phases chroniques de la fibrose et au remodelage matriciel, et leur localisation au niveau de la sous-muqueuse dans notre modèle pourrait expliquer l'hypertrophie de la sous-muqueuse.

Il existe des connexions entre la réponse des cellules T et celle des macrophages. La différenciation des lymphocytes T CD4+ est en générale précédée ou suivie par l'acquisition d'un profil similaire des macrophages. Les macrophages M2 sont activés par et promeuvent la réponse anti-inflammatoire Th2. Dans notre modèle, la promotion de la réponse Th2 par les M2 est supportée par la surexpression de nombreux marqueurs des M2 : IL-10, IGF-1, Arg-1, MRC-1, MMP-12, PDGF, VEGF et fibronectine (Lech et Anders, 2013). Ces macrophages pourraient donc participer à la production de l'IL-10 et expliquer les résultats obtenus par Bessout et coll. qui avaient observé après irradiation une augmentation de Treg sans augmentation de l'expression de l'IL-10. Ces résultats pourraient également expliquer la surexpression de l'IGF-1 et l'activation des CML par un processus indépendant de TGF-β1. Bien que nécessaire afin de limiter l'inflammation au sein du tissu, la réponse M2 a été associée à l'apparition de la fibrose dans plusieurs modèles (Wynn et Barron, 2010). En particulier, dans un modèle de fibrose pulmonaire, la polarisation M2 est nécessaire à la mise en place de la réponse Th2 responsable de l'initiation de la fibrose (Migliaccio et coll., 2008).

La réponse M1 était maintenue chez les animaux irradiés au cours de l'étude. Les macrophages M1 favorisent l'inflammation dans le tissu en produisant des cytokines pro-inflammatoires dont nous avons observé la surexpression : CCL-2, CCL-3, IL-1β et IL-6. Ces cytokines participent au recrutement de nouveaux macrophages ainsi qu'à l'activation des myofibroblastes. Elles permettent aussi d'entretenir la réponse M1 de manière autocrine (Wynn et Vannella, 2016). Le maintien d'un pool important de M1 est en accord avec la présence d'un infiltrat de cellules Th1, comme suggéré précédemment. Ces macrophages sont également responsables de la production massive de ROS, nécessaires à leur action bactéricide.

d. Mécanismes de développement de la fibrose dans le modèle d'irradiation colorectale dose unique

Il existe relativement peu de données sur le développement de la fibrose colorectale radio-induite. Néanmoins, les précédentes études réalisées sur des modèles similaires au notre permettent d'émettre des hypothèses sur les mécanismes impliqués. L'irradiation induit une augmentation rapide de l'inflammation au sein du tissu, avec le recrutement de différentes populations de leucocytes chargés de la clairance des débris cellulaires et des pathogènes, ainsi que de la réparation du tissu. L'augmentation de la proportion de lymphocytes Th2 et de la quantité de macrophages M2 lors de la phase chronique permet de réduire l'inflammation et de promouvoir le remodelage matriciel nécessaire à la régénération. Cette phase est également caractérisée par la production importante de médiateurs de la fibrose, tels que TGF-β1 et CTGF.

2. Conclusion

Notre étude suggère que TGF-β1 et CTGF ne sont pas impliqués dans la phase chronique de la pathologie, caractérisée par une population mixte de lymphocytes T et de macrophages participant à la mise en place de l'inflammation chronique et de la fibrogénèse (Figure 33). L'augmentation de l'apoptose et de la prolifération au sein de la muqueuse suggère un remaniement permanent de l'architecture tissulaire, caractéristique d'un processus de réparation défectueux. Cette étape est marquée par la production d'autres molécules pro-fibrosantes, en particulier PDGF, et par une production de MEC excédentaire. La surexpression des TIMP favorise l'accumulation de MEC en bloquant l'activité enzymatique des MMP, également surexprimés. La production de facteurs de croissance et cytokines stimulateurs de fibroblastes, tels que FGF-2, pourrait participer à l'augmentation et au maintien de la population de myofibroblastes sub-épithéliaux. En accord avec les études réalisées précédemment sur la fibrose intestinale (Linard et coll., 2013, Semont et coll., 2013, Bessout et coll., 2014, Bessout et coll., 2015), il semblerait que les myofibroblastes sub-épithéliaux aient une faible implication dans la production de la MEC excédentaire dans les couches musculaires et la sous-muqueuse. La production d'IGF-1, en particulier par les macrophages M2, serait à l'origine de l'acquisition du phénotype pro-fibrosant par les CML. La phase tardive de notre étude est caractérisée par la diminution de l'inflammation et des médiateurs de la dégradation de la MEC. Le dépôt de MEC est maximal à 7 semaines, point définit comme critique du point de vue du décès de l'animal. À cette période, l'épaississement important du tissu, associé à une perte de contractibilité musculaire, pourrait être à l'origine de la sténose et de l'occlusion.

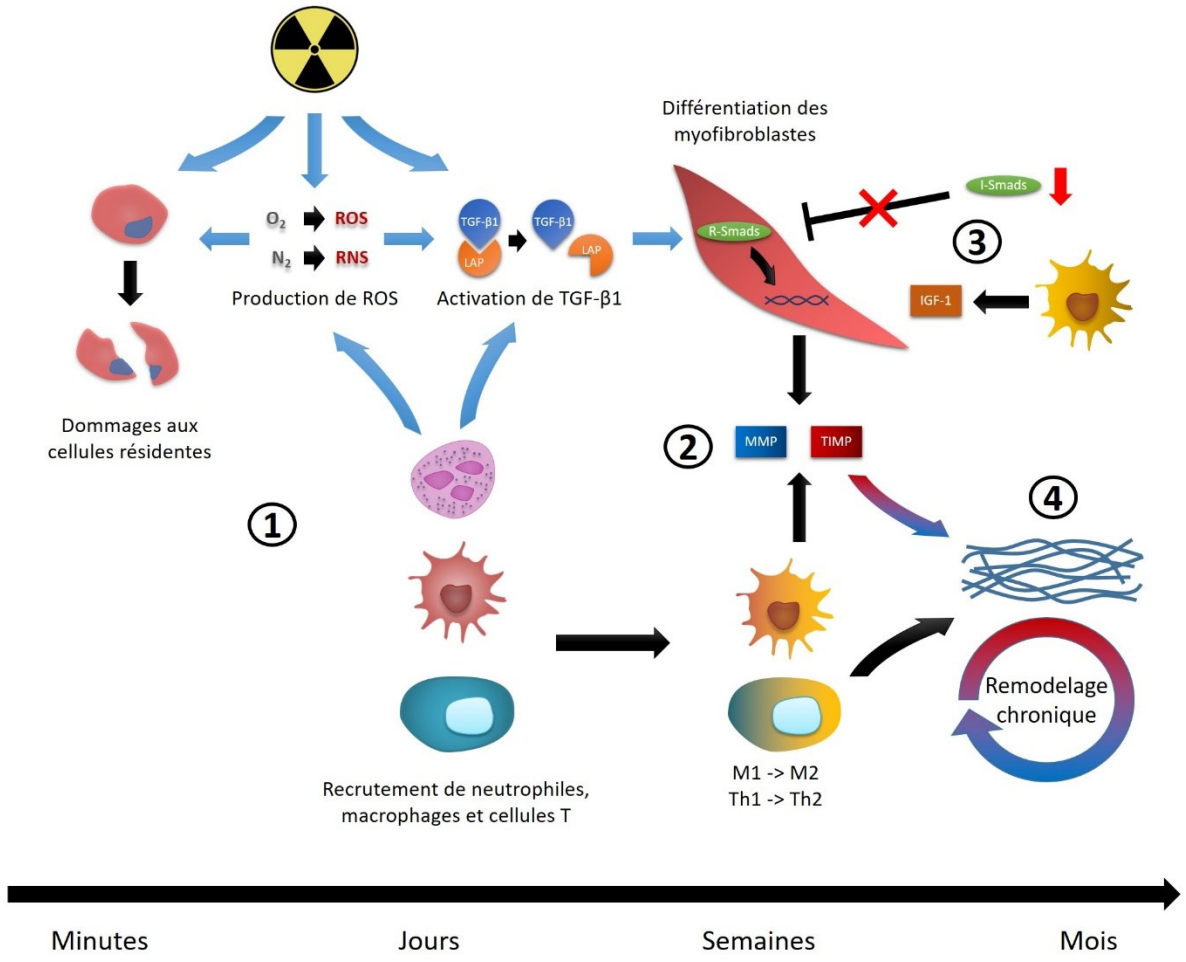


Figure 33 : mécanismes impliqués dans le développement de la fibrose colorectale radio-induite chez le rat. ***1 : les rayonnements ionisants induisent des dommages aux cellules résidentes et le recrutement des cellules immunitaires, la production de ROS et l'activation de TGF-β1. La production de cytokines et de ROS par les cellules immunitaires contribue à l'activation de TGF-β1 et la différenciation des myofibroblastes. 2 : L'activation de la réponse Th2/M2 participe au remodelage de la matrice extracellulaire par les myofibroblastes. 3 : La levée de l'inhibition de la voie Smad et l'activation des CML par IGF-1 amplifie le phénomène de remodelage. 4 : Le remodelage chronique induit la fibrose.***

III. Effet des CSM sur le développement de la fibrose colorectale radio-induite

Comme nous l'avons présenté dans la partie CSM et fibrose, les études réalisées à ce jour suggère un potentiel anti-fibrosant des CSM, quel que soit l'organe et la pathologie considérée. Il existe à l'heure actuelle peu de littérature traitant de l'utilisation de ce type de thérapie dans le cadre de la fibrose radio-induite au côlon-rectum. Néanmoins, les résultats existant sur l'utilisation des CSM dans le cadre des complications des radiothérapies sont prometteurs et il semble que ce traitement permette d'améliorer la régénération du côlon irradié. Nous avons mis en évidence différents effets des CSM que nous avons souhaité mettre en évidence dans notre modèle.

1. Remodelage matriciel

L'accumulation de MEC au sein du tissu et la perte de fonctionnalité qui en résulte sont les principales caractéristiques de la fibrose. Dans notre modèle, nous avons observé une augmentation significative du dépôt de MEC au sein du tissu dès 4 semaines. À 7 semaines, la proportion de MEC dans le côlon-rectum est maximale. Les CSM produisent de nombreux effets, en particulier sur la voie TGF-β/Smad, permettant de réduire la production de MEC et d'améliorer sa dégradation.

En effet, 4 et 5 semaines après irradiation, les animaux transplantés présentaient une proportion de MEC dans le côlon-rectum équivalente à celle observée chez les animaux non transplantés. En revanche, le dépôt de MEC était significativement inférieur 7 semaines après irradiation dans le groupe traité par les CSM. À la fin de l'étude, la surface de fibrose observée dans le groupe traité était similaire à celle observée chez les animaux non-irradiés.

Ce résultat contredit les données par Sémont et coll. qui n'ont pas observé de différence de score de fibrose 8 semaines après irradiation dans un protocole d'injections itératives de CSM de la moelle osseuse (Semont et coll., 2013). Dans cette étude, le processus de fibrose semblait continuer malgré l'injection de CSM, comme indiqué par l'augmentation du score de fibrose entre 8 et 21 semaines. Le timing d'injection des cellules pourraient être à l'origine de cette différence. En effet, ce protocole consistait en une première injection 3 semaines après irradiation, suivi d'une nouvelle transplantation toutes les 2 semaines.

Les données présentées dans la partie CSM et fibrose montrent que l'injection précoce des CSM permet d'optimiser leurs effets sur la fibrose du rein et du poumon (Ortiz et coll., 2003, Alfarano et coll., 2012). L'origine des cellules transplantées pourraient avoir également une influence sur leur potentiel anti-fibrosant. Les cellules souches du tissu adipeux constituent une population plus hétérogène que les CSM de la moelle osseuse et ont donc été longtemps considérées comme potentiellement moins efficaces. Des études réalisées au sein de notre laboratoire ont montré une meilleure efficacité des cellules souches du tissu adipeux dans le modèle d'irradiation colorectale dose unique. De même, les CSM de la membrane fœtale, de la moelle osseuse ou du tissu adipeux produisent des résultats identiques sur l'infarctus du myocarde, la fibrose pulmonaire et la sclérose systémique (Ishikane et coll., 2013, Fikry et coll., 2015, Maria et coll., 2016).

Chez les animaux irradiés, le déséquilibre entre la production de MEC et la synthèse des MMP et des TIMP conduit à la fibrose. Malgré l'augmentation de l'expression des MMP, leur inhibition par

un nombre de TIMP accrue limite la dégradation de la MEC. Plusieurs études montrent que la transplantation de CSM permet de réduire les ratios CMP et de restaurer les fonctions de dégradation de la MEC. Dans un modèle de fibrose rectale radio-induite, Linard et coll. ont montré l'induction d'un profil favorisant la dégradation de la MEC suite à la transplantation de CSM (Linard et coll., 2013). Bessout et coll. ont également observé une importante diminution de ces ratios après transplantation de CSM (Bessout et coll., 2015).

Nos résultats indiquent une modulation du profil d'accumulation/dégradation de MEC par les CSM, avec une activité de remodelage importante 5 semaines après irradiation. À l'instar de l'étude réalisée par Bessout et coll., les valeurs élevées des ratios CMP 4 et 5 semaines après irradiation dans le groupe traité par CSM suggère une tendance à l'accumulation de MEC au sein du tissu (Bessout et coll., 2015). Néanmoins, le retour du dépôt de MEC à l'état basal à 7 semaines est en adéquation avec la diminution des ratios CMP. En revanche, seule une légère augmentation du pourcentage de fibrose a été observée à 5 semaines chez les animaux transplantés, malgré la tendance à l'accumulation suggérée. De plus, la différence d'évolution des ratios CMP entre les groupes irradiés et irradiés + CSM ne permet pas de justifier les dépôts de MEC observés à 7 semaines. Les CSM semblent exercer un effet inhibiteur sur l'expression et la production des éléments de la MEC dans de nombreux modèles de fibrose (Cf. Remodelage matriciel). Le même effet a été observé sur des modèles de fibrose radio-induite (Linard et coll., 2013, Bessout et coll., 2015). Nous avons montré le retour à l'état basal de l'expression des collagènes de type 1 et 3, de la fibronectine et de Sparc chez les animaux transplantés 4 semaines après irradiation. À 7 semaines, le collagène de type 3 était sous-exprimé sous l'effet des CSM.

La transplantation de CSM induit une modulation de l'expression des MMP et TIMP dans plusieurs modèles de fibrose (Cf. Remodelage matriciel) ainsi qu'après irradiation colorectale. La capacité des CSM à induire l'activation de certaines MMP a également été mise en évidence. Nos travaux suggèrent l'induction par les CSM de la surexpression de plusieurs MMP. Cinq semaines après irradiation, les MMP-9 et MMP-19 étaient surexprimés chez les animaux transplantés, puis les MMP-12 et MMP-13, 2 semaines plus tard. À 7 semaines, la concentration de MMP-2, une métalloprotéinase à spectre large, était significativement augmentée dans le groupe traité. Le système du plasminogène est le principal régulateur de l'activité des MMP. Dans notre étude, l'augmentation de l'expression du plasminogène pourrait contrebalancer la surexpression de PAI-1 en permettant la disponibilité de quantités accrues de plasmine, favorisant ainsi l'activation des MMP. Cinq semaines après irradiation, la transplantation de CSM induit la levée de l'inhibition de l'expression de l'activateur du plasminogène Plau.

Entre 5 et 7 semaines, l'augmentation de la concentration et de l'activité des MMP dans le tissu, associées à la diminution de la production de MEC, serait à l'origine de la diminution du dépôt de MEC dans le tissu, en accord avec les observations réalisées précédemment dans plusieurs modèles de fibrose radio-induite. Les CSM semblent modifier la cinétique de remodelage de la MEC, en induisant une phase d'accumulation de MEC intense à 5 semaines, suivie d'une phase de dégradation tardive aboutissant à un retour du dépôt de MEC à l'état basal.

2. Myofibroblastes/voie TGF-β/Smad

Au centre du processus de fibrogénèse se trouvent les myofibroblastes et la voie TGF-β/Smad, respectivement principaux acteurs cellulaires et moléculaires de la fibrose. Les données de la littérature suggèrent que l'effet anti-fibrosant des CSM est majoritairement induit par l'inhibition de l'activation des protéines Smad effectrices qui induisent la différenciation myofibroblastique et la production de MEC en activant leurs gènes cible (α-SMA, collagènes…).

Cette hypothèse est appuyée par la diminution de l'expression des collagènes et de l'activation des myofibroblastes dans de nombreux modèles, y compris radio-induits (Cf. Remodelage matriciel). Bessout et coll. ont observé une corrélation entre l'augmentation de l'expression du TGF-β1 et des collagènes de type I et III dans une culture de CML coliques traitées à l'IL-17. Dans la muqueuse rectale, Linard et coll. ont également montré une corrélation de l'inhibition de TGF-β1 et des collagènes après transplantation de CSM. Au cours de notre étude, la sous-expression des collagènes I et III, de la fibronectine, de Sparc et de l'α-SMA était simultanée à la répression transcriptionnelle de CTGF et TGF-β3 par les CSM à 4 semaines. La concentration en TGF-β1 était significativement diminuée durant la totalité de l'étude dans le groupe irradié + CSM par rapport au groupe non irradié. L'expression de Smad7 et Tgif1, deux inhibiteurs de la voie Smad, était restaurée à son état basal suite à l'injection de CSM, respectivement à 4 et 7 semaines.

Le point 5 semaines était caractérisé dans notre modèle par la surexpression de plusieurs intégrines dans le groupe irradié + CSM comparé aux irradiés. En particulier, les chaînes α_V et β_6 sont impliquées dans l'activation du TGF-β latent (Munger et coll., 1999). L'augmentation de la concentration de MMP-2 chez les animaux transplantés avec des CSM pourrait également entrainer une augmentation de l'activation de TGF-β1.

L'inhibition de TGF-β et CTGF, ainsi que la levée de la répression de certains inhibiteurs de la voie Smad, permettrait en partie aux CSM de limiter la fibrose induite par ce mécanisme. Néanmoins,

les faibles variations observées sur l'expression de ces gènes renforcent l'hypothèse proposée concernant l'entretien de la fibrose par un mécanisme indépendant de cette voie de signalisation.

a. Myofibroblastes

Le recrutement et l'activation des précurseurs de myofibroblastes est une caractéristique commune des modèles de fibrose. Les myofibroblastes et CML sont les principaux producteurs de MEC lors de la fibrose colorectale. Nous avons mis en évidence la présence de nombreux myofibroblastes sub-épithéliaux ainsi que l'hypertrophie de la musculaire propre qui suggère l'activation des CML en cellules sécrétrices de MEC. Les CSM induisent une diminution de l'expression de l'α-SMA et du nombre de myofibroblastes au cours de la fibrose (Cf. Remodelage matriciel). La conséquence de l'activité inhibitrice des CSM est une réduction de la production des éléments de la MEC, ainsi que de la production des TIMP et MMP produits par les myofibroblastes.

Quatre et 5 semaines après irradiation, le nombre de cellules α-SMA+ était réduit dans la sous-muqueuse dans le groupe irradié traité par les CSM comparé au groupe irradié, en accord avec la sous-expression de α-SMA à 4 semaines. La fibronectine étant essentielle à la différenciation des myofibroblastes, son inhibition à 4 semaines supporte la diminution des myofibroblastes dans la muqueuse. L'inhibition de la différenciation des myofibroblaste pourrait expliquer la diminution de l'expression des gènes de la MEC observée chez les animaux traités à 4 semaines.

b. CML

Nous avons suggéré que la perte du phénotype contractile des CML au profit d'un profil sécrétoire était à l'origine de l'épaississement de la musculaire propre observé, et de la perte de contractibilité supposée produire l'occlusion dans notre modèle. Bessout et coll. ont montré que l'injection de cellules souches du tissu adipeux après irradiation colorectale induit la restauration du tonus musculaire à son état basal (Bessout et coll., 2015). Les CSM seraient donc en mesure de bloquer, voire reverser le changement phénotypique observé chez les CML pro-fibrosantes.

Quatre semaines après irradiation, le ratio γ-SMA/α-SMA est en faveur du phénotype pro-fibrosant des CML. Nous avons posé l'hypothèse que différents facteurs de croissance, en particulier l'IGF-1, étaient responsables de la poursuite de la fibrose dans ce modèle en favorisant la production de MEC par les CML. L'augmentation de l'expression de PDGF-B chez les animaux traités par les CSM,

5 semaines après irradiation suggère l'inhibition de la maturation des CML et est en accord avec le profil de remodelage observé à ce temps.

A l'instar des résultats présentés dans la partie Remodelage matriciel, nous avons montré un effet d'inhibition de la prolifération des myofibroblastes par les CSM. La diminution du dépôt de MEC au sein du tissu pourrait donc être en partie due à la diminution de la densité de cellules pro-fibrosantes dans la muqueuse. L'effet produit par les CSM est suffisant pour induire un retour de la proportion de MEC dans le tissu au niveau basal. Néanmoins, nous n'avons pas été en mesure d'identifier un mécanisme permettant aux CSM de reverser l'activation du profil sécrétoire des CML.

3. Inflammation

L'évolution de la lésion induite par irradiation colorectale est fortement liée aux modulations de l'inflammation, en particulier des populations de leucocytes recrutées. Conformément aux observations réalisées lors de précédentes études, la fibrose semble être amplifiée par une réponse Th2 prononcée, ainsi qu'un infiltrat de macrophages pro-fibrosants. L'augmentation de l'apoptose au sein du tissu favorise le recrutement de nombreux leucocytes et le remaniement chronique de l'architecture tissulaire.

a. Apoptose/prolifération

A 4 et 7 semaines, le nombre de cellules en prolifération (surface de cellules positives à PCNA) était augmenté dans la muqueuse suite à l'injection de CSM. La surexpression à 7 semaines de l'EGF observée dans le groupe CSM semble favoriser la régénération de l'épithélium. Sémont et coll. ont montré un effet similaire induit par la stimulation des progéniteurs de cellules endothéliales via la voie non-canonique Wnt (Semont et coll., 2013). Cet effet était lié à une amélioration de la survie des animaux transplantés. La régénération de l'épithélium colique permet de restaurer la fonction d'absorption et de barrière à l'entrée des pathogènes et limiter ainsi les fréquences des diarrhées ainsi que le risque d'infection. Des résultats obtenus récemment au sein de notre laboratoire montrent une amélioration de la perméabilité du côlon irradié après transplantation de CSM (Moussa et coll., article soumis).

Au sein de la muqueuse, la quantité de cellules apoptotiques était significativement augmentée à 4 semaines. Le recrutement massif de cellules inflammatoires pourrait induire des effets délétères sur les cellules saines et être à l'origine pour partie de l'apoptose.

b. Réponse des cellules T CD4+

Nous avons observé une réponse mixte des lymphocytes T $CD4^+$ après irradiation dans notre modèle. En particulier, il semble que la réponse Th2 soit favorisée par rapport aux autres sous-groupes de cellules T. Les cellules Th2 ont une activité pro-fibrosante incriminée dans différents modèles. Bessout et coll. ont associé l'effet bénéfique des CSM sur le côlon irradié à une diminution de la réponse Th17 (Bessout et coll., 2015). Dans une autre étude, la diminution de la réponse Treg et de la production d'IL-10 qui la caractérise était observable après transplantation de CSM (Bessout et coll., 2014).

Le ratio T-bet/Gata3 représentatif du ratio Th1/Th2 au sein du tissu indique une modulation de l'infiltrat inflammatoire dès 4 semaines. L'évolution de ce ratio indique des proportions inverses à celles observées dans le groupe irradié. En effet, l'injection de CSM semble induire préférentiellement une réponse Th1 à 4 semaines, suivie d'une augmentation de l'infiltrat de Th2 à 5 semaines. Ce résultat est en accord avec les profils de remodelage de MEC mis en évidence par les ratios CMP. En effet, l'augmentation de la réponse Th2 est concomitante à l'apparition d'un profil d'accumulation de la MEC. 5 semaines après irradiation, l'expression de Gata3 est significativement plus élevée dans le groupe irradié + CSM. L'augmentation de l'expression d'iNos au même temps permettrait d'inhiber la réponse Th1. La phase tardive correspond à surexpression de nombreux médiateurs de l'inflammation chez les animaux transplantés avec les CSM (CCL2, CCL3, IL-1α, IL-1β et IL-6). Ce profil pro-inflammatoire pourrait être dû à l'activité des macrophages ainsi qu'à la reprise de la réponse Th17 mise en évidence par Bessout et coll. (Bessout et coll., 2015). Lors d'une étude *in vitro*, le traitement de CML du côlon par l'IL-17 a induit la surexpression de l'IL-6 et de l'IL-1β (Bessout et coll., 2015). L'expression de RORC, caractéristique des Th17, est augmentée jusqu'à 7 semaines dans notre modèle, ce qui suggère la persistance de cette réponse. La transplantation de CSM induit également le maintien de la population de Treg, comme indiqué par la surexpression de Foxp3 à un niveau constant. Lors de l'essai compassionnel réalisé sur les patients d'Épinal, l'amélioration des lésions induite par les CSM a été associée à la répression des lymphocytes T helper ainsi qu'à une augmentation des Treg. Ce résultats souligne l'importance de l'effet anti-inflammatoire des CSM dans le traitement des atteintes radio-induites (Voswinkel et coll., 2013).

c. Macrophages

Linard et coll. ont attribué pour partie l'amélioration de la lésion radio-induite à l'augmentation de la proportion de macrophages M2 (Linard et coll., 2013). Des données récentes suggèrent que la cinétique d'apparition des différentes formes de polarisation serait plus importante que l'augmentation des M2 dans la détermination de l'évolution de la lésion. Nous avons observé que la lésion radio-induite est associée à un infiltrat de macrophages conséquent caractérisé par une augmentation simultanée du nombre de M1 et de M2.

Dans le groupe d'animaux traités par injection de CSM, la proportion de macrophages M2 était significativement accrue par rapport aux groupes irradié et non-irradié, 4 semaines après irradiation. À 7 semaines, la proportion de M2 était retourné à son état basal chez les animaux irradiés, avec ou sans CSM. Cependant, la densité de macrophages dans le tissu est restée plus élevée dans les groupes irradiés durant la totalité de l'étude. L'augmentation de l'infiltrat de macrophages est confirmée par une augmentation significative de l'expression de Nos2, Arg-1 et Mrc-1 au cours de l'étude. Quatre semaines après irradiation, les animaux transplantés présentaient une surexpression significative de Arg1 par rapport aux irradiés, en accord avec l'augmentation constatée de la proportion de M2. À 5 semaines, l'augmentation significative de l'expression de Mrc1, spécifique des M2, suggère la promotion de cette polarisation par les CSM. Cette phase étant caractérisée par une activité de remodelage intense favorisée par l'infiltrat de lymphocytes Th2, une forte activité des M2 était prévisible. L'augmentation induite par les CSM de l'expression de l'IL-10, PDGFA et PDGFB appuie cette hypothèse. Sept semaines après irradiation, l'activité des macrophages M2 reste élevée dans le groupe CSM, comme indiqué par la forte expression d'Arg1, Mrc1 et IL-10. A l'instar des résultats observés concernant la réponse T, la phase tardive de l'étude est caractérisée par une forte activité pro-inflammatoire (augmentation de l'expression de CCL2, CCL3, IL-1α, IL-1β et IL-6), probablement régulée par les lymphocytes Th1 et les macrophages M1. Cet effet supporte vraisemblablement la phase de dégradation de la MEC aboutissant à la diminution de la surface de fibrose suite à l'injection de CSM. En particulier, l'augmentation de l'expression de MMP-12 et -13 chez les animaux transplantés appuie ce postulat.

Bessout et coll. ont montré que les CSM inhibaient l'activité des lymphocytes en induisant la production de glucocorticoïdes dans le côlon irradié de rat (Bessout et coll., 2014). Or, les glucocorticoïdes induisent la polarisation M2 des macrophages (Gratchev et coll., 2008). Les macrophages induits par les glucocorticoïdes présentent une activation prolongée de la signalisation

liée à Smad2 lorsqu'ils sont stimulés par TGF-β. Cet effet semble dû à la surexpression de SIRT1, un répresseur de Smad7. En synthétisant des glucocorticoïdes, les CSM participeraient donc à la promotion de la réponse M2

4. Conclusion sur l'effet des CSM

La transplantation de CSM deux semaines après irradiation permet de limiter la fibrose dans le modèle de fibrose colorectale radio-induite dans notre modèle. L'effet anti-fibrosant des CSM est appuyé par une amélioration significative de la survie des animaux transplantés par rapport au groupe irradié. L'action notable des CSM sur ce modèle semble consister en une cinétique de réparation différente en comparaison des animaux irradiés. En effet, alors que la phase de remodelage apparait 4 semaines après irradiation chez le groupe témoin, ce temps correspond à une réponse inflammatoire plus intense chez les animaux transplantés, caractérisée notamment par une forte activité Th1 et M1. L'augmentation de la réponse Th2 et M2 induite par les CSM après 4 semaines permet de supprimer l'inflammation et d'induire une phase de remodelage intense de la MEC. À l'issue de cette phase, la proportion de MEC au sein du tissu est restaurée à son état basal par les CSM. La phase de remodelage chez les animaux irradiés semble trop courte ou insuffisamment efficace pour induire un retour du tissu à état physiologique normal. L'amélioration fonctionnels du côlon rectum, en particulier de la contractibilité musculaire, de la barrière épithéliale et de la perméabilité, semble participer à l'amélioration de la survie des animaux, en accord avec les études antérieures (Linard et coll., 2013, Semont et coll., 2013, Bessout et coll., 2015).

IV. HGF et TSG-6 sécrétés par les CSM participent à la réduction de la fibrose

L'analyse de la littérature sur l'utilisation de la thérapie par les CSM dans le contexte de la fibrose nous a permis d'identifier deux facteurs anti-fibrosants sécrétés par les CSM et responsables d'une part importante de leur effet : HGF et TSG-6. La production de HGF par les CSM a été associée à une régression de la fibrose dans des modèles cardiaques, pulmonaires, hépatiques et péritonéaux (Mias et coll., 2009, Gazdhar et coll., 2013, Ueno et coll., 2013, Seo et coll., 2014). TSG-6 a été proposé comme un acteur majeur de l'immunosuppression par les CSM, notamment par un effet direct sur les macrophages (Prockop, 2013). Dans la peau et le rein, l'expression de TSG-6 par les CSM permet de réduire le dépôt de MEC au sein du tissu (Qi et coll., 2014, Wu et coll., 2014). Nous avons mis en place

un protocole d'extinction des gènes correspondant par interférence ARN afin de mettre en évidence les mécanismes impliqués dans l'action du HGF et du TSG-6. Cette stratégie nous a permis de transplanter des CSM sous-exprimant le HGF ou le TSG-6 d'environ 80% au moment de l'injection. Tous les résultats présentés dans cette partie ont été observés 7 semaines après irradiation (4 semaines après la dernière injection de CSM).

1. Implication de HGF dans l'effet anti-fibrosant des CSM

Nous avons présenté dans la partie HGF les mécanismes d'action supposés de HGF sur la fibrose portant notamment sur : la modulation de l'apoptose, l'immunosuppression et l'inhibition de la voie TGF-β/Smad. Ce sont ces effets qui sont exploités dans le cadre de la fibrose.

L'injection de CSM déficientes pour l'expression du HGF induit une modification radicale de la réponse du tissu. Le groupe d'animaux transplanté avec ces cellules (groupe siHGF dans la suite du texte) présentait un dépôt de MEC similaire à celui observé chez les animaux irradiés non transplantés. La surface de MEC mesurée était significativement augmentée par rapport aux groupes non-irradiés et irradiés + CSM. Au même temps, nous avons mis en évidence une augmentation du ratio CMP par rapport aux autres groupes, signifiant une tendance accrue à l'accumulation de MEC. Ce profil était simultané à la surexpression de nombreux gènes impliqués dans la régulation de la MEC par rapport au groupe CSM :

- composants de la MEC : Collagènes de type I et III, fibronectine et Sparc
- MMP : -3, -9, -12, -13, -14
- TIMP : -1 et -4
- Système du plasminogène : Plau, Plg, PAI-1

La surexpression des MMP ne semble pas suffisante pour contrebalancer la production massive d'éléments de la MEC et la surexpression des TIMP. Le niveau d'expression très élevé de PAI-1 dans le groupe siHGF pourrait induire un défaut d'activation des MMP résultant en l'impossibilité de dégrader la MEC excédentaire.

HGF exerce deux fonctions d'inhibition distinctes sur la voie TGF-β/Smad en inhibant l'expression de TGF-β1 et en bloquant la translocation du complexe Smad2/3 activé vers le noyau. Ce dernier mécanisme semble reposer sur la stabilisation et la surexpression des répresseurs de la voie Smad : SnoN (Skil) et TGIF.

Dans le groupe siHGF, nous avons observé la diminution de l'expression de deux inhibiteurs de la voie Smad : Skil, Smad6. Cet effet inhibiteur était associé à la surexpression de composés pro-fibrosants de la voie TGF-β/Smad : CTGF, TGF-β1, -β2 et –β3. Une augmentation de l'expression des activateurs de TGF-β, thrombospondine (Thbs1 et Thbs2) et MMP-9, était induite dans le groupe siHGF par rapport au groupe CSM.

Le groupe siHGF présente un profil inflammatoire similaire à celui observé dans le groupe d'animaux irradié, caractérisé par une élévation de Gata3 et Foxp3, marqueurs respectifs des lymphocytes Th2 et Treg. L'accumulation de macrophages M2 dans ce groupe pourrait expliquer le remodelage de la MEC conduisant à la fibrose.

L'inflammation semble entretenue par un taux élevé d'apoptose dans la muqueuse, en accord avec les effets anti-apoptotiques connus de HGF (Cf. HGF). La suppression de HGF semble également limiter la capacité de l'épithélium à se régénérer, la surface de cellules en prolifération étant inférieure à celle des autres groupes.

En conformité avec les données connues sur les mécanismes d'action de HGF dans la fibrose, le groupe siHGF semble présenter une activité élevée de TGF-β et des protéines apparentées. Bien que nous ayons émis l'hypothèse que la fibrose n'était pas entretenue dans notre modèle par l'activation de la voie TGF-β/Smad, il semble que la perte d'inhibition induite par HGF favorise l'activation de cette voie.

Deux hypothèses peuvent expliquer l'action de HGF :

- HGF est capable d'induire sa propre expression ainsi que celle de son récepteur c-Met (Cf. HGF) et il est donc possible que l'expression de HGF par les CSM transplantées permette d'induire une boucle d'activation anti-fibrosante au sein du tissu
- Une autre hypothèse suggère que le HGF produit par les CSM exerce une action autocrine permettant d'orienter la réponse à la fibrose, éventuellement en modulant leur production de TGF-β.

Cette deuxième proposition semble mieux s'adapter à notre modèle, étant donné qu'aucune augmentation significative de l'expression de HGF n'a été observée au cours de l'étude, quel que soit le groupe. En réalité, malgré une expression modérée de TGF-β, l'expression de HGF était réduite de moitié dans la majorité des groupes. Ceci suggère l'implication d'un autre système de régulation de HGF au sein du tissu fibrosé. Les CSM sont connues pour pouvoir acquérir des caractéristiques myofibroblastiques selon des mécanismes similaires à ceux observés chez les autres précurseurs de cellules pro-fibrosantes. Ainsi, la levée de l'inhibition de TGF-β pourrait induire un effet autocrine de

ce facteur sur les CSM et favoriser une réponse pro-fibrosante. La capacité de HGF et TGF-β à activer leur propre expression en inhibant l'expression de l'autre est en faveur de cette hypothèse et servir de système de régulation autocrine chez les CSM (Figure 34). La promotion de la réponse Th2/M2 sous l'influence des CSM sous-exprimant le HGF participe à la mise en place d'une dynamique proche de celle mise en évidence chez les animaux irradiés et non-transplantés.

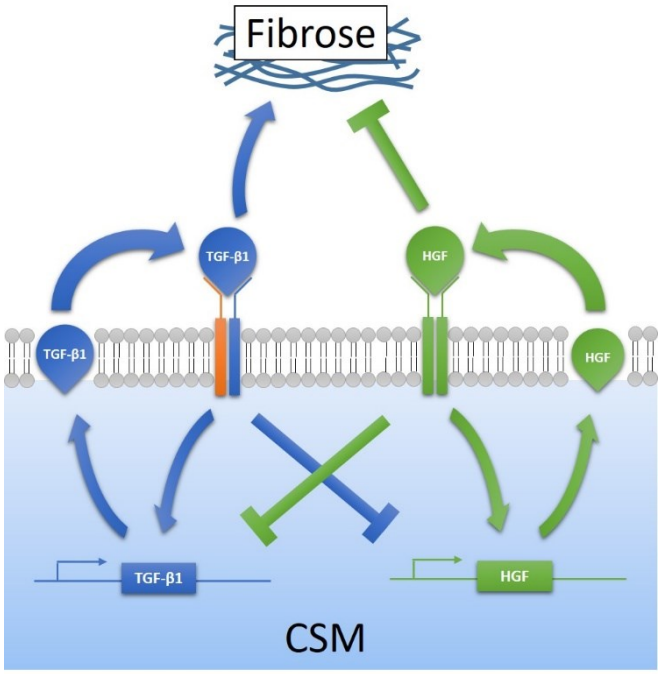


Figure 34 : hypothèse sur la régulation autocrine de la fonction des CSM par TGF- et HGF

2. Implication de TSG-6 dans l'effet anti-fibrosant des CSM

Le TSG-6 est une protéine immunomodulatrice exprimée en réponse à différents médiateurs de l'inflammation, principalement le TNF-α. Il est exprimé par les CSM en réponse à l'IL-1, au TNF-α, aux LPS et au PGE2 entre autres. Il est majoritairement détecté dans le cas de pathologies inflammatoires et dans les situations de remodelage de la MEC. TSG-6 interagit avec la hyaluronane pour lui conférer ses propriétés pro-inflammatoires et pro-fibrosantes. A l'inverse, Choi et coll. ont mis en évidence l'action immunosuppressive de TSG-6 par inhibition de la voie NF-κB, induisant l'inhibition de l'activation classique des macrophages (Cf. TSG-6).

L'injection de CSM sous-exprimant TSG-6 (groupe siTSG-6) sur le modèle d'irradiation colorectale dose unique a induit à 7 semaines l'augmentation du dépôt de MEC à un niveau proche de

celui du groupe irradié. Au même temps, les ratios CMP du groupe siTSG-6 étaient en faveur de l'accumulation de MEC, notamment concernant le collagène de type I et la fibronectine. Nous avons observé la surexpression des collagènes de type I et III par rapport au groupe CSM. Plus généralement, ce groupe présentait une expression importante de :

- Collagène de type I, fibronectine et Sparc
- MMP-2, -3, -9, -12, -13 et -19
- TIMP-1
- Plat, Plg, PAI-1

Ces résultats suggèrent une surproduction de MEC accompagnée de la production de nombreuses MMP inhibées par un excès de TIMP-1 et un défaut d'activation par la plasmine, en raison de l'expression élevée de PAI-1.

A l'instar des observations réalisées sur les groupes irradiés et CSM, il semble que la fibrose ne soit pas conduite par l'axe TGF-β/CTGF/Smad, puisqu'aucune différence significative de l'expression des gènes de cette famille n'a été mise en évidence. L'injection des CSM sous-exprimant HGF induit une forte expression de l'IGF-1 et la surexpression du PDGFB et de l'IL-1β, suggérant l'implication d'un mécanisme d'activation des CML identique à celui décrit dans le groupe irradié.

L'effet le plus conséquent de la suppression de TSG-6 dans les CSM transplantées concerne la polarisation des macrophages. Le groupe siTSG-6 était le seul à présenter une élévation significative de la densité et de la proportion de M2 dans le tissu, par rapport à l'ensemble des groupes, y compris siHGF. Cette observation est appuyée par la sous-expression, par rapport au groupe CSM, de différents gènes impliqués dans la réponse M1 : iNOS, NF-κB1, CCL3. Plusieurs gènes de la réponse M2 étaient fortement exprimés dans ce groupe, Arg1, Mrc1 et IL-10 en particulier. La réponse des lymphocytes T était en revanche à un état proche de celui des animaux non-irradiés, suggérant un mécanisme pro-fibrosant indépendant de la réponse Th2. La persistance de la réponse M2 semble donc induire, une augmentation de la fibrose.

Sur la base des observations réalisées par Choi et coll. sur l'inhibition de la réponse M1 par le TSG-6, nous supposions que la délétion de TSG-6 induirait une augmentation de la proportion de M1 dans le tissu. N'ayant pas de données sur l'évolution de la lésion entre l'injection des CSM défectives pour TSG-6 et le temps 7 semaines post-irradiation, nous ne pouvons conclure sur l'infiltration éventuelle de macrophages M1. Néanmoins, les résultats présentés ici semblent impliquer directement la réponse M2 dans l'augmentation du dépôt de MEC.

L'intérêt porté sur l'influence de TSG-6 au cours de l'inflammation est récent, et peu de données existent à l'heure actuelle sur les mécanismes sous-tendant l'effet de TSG-6. La quantité et la nature de la hyaluronane (HA) présente dans le tissu semblent être étroitement liées à l'effet de TSG-6, et cette donnée n'est à l'heure actuelle que peu voire pas prise en compte. Comme explicité dans la partie TSG-6, la présence de polymères de HA de haut poids moléculaire dans le tissu produit un effet immunosuppresseur, alors que le HA de faible poids moléculaire favorise l'inflammation en activant les cellules T. TSG-6 peut limiter la polarisation M1 des macrophages en inhibant la voie NF-κB via l'activation de CD44, mais HA peut également favoriser l'inflammation et la fibrose en activant ce même récepteur. Enfin, la capacité de HA à se fixer au récepteur TLR2, exprimé par les CSM, suggère la possibilité d'une action de reprogrammation des cellules transplantées.

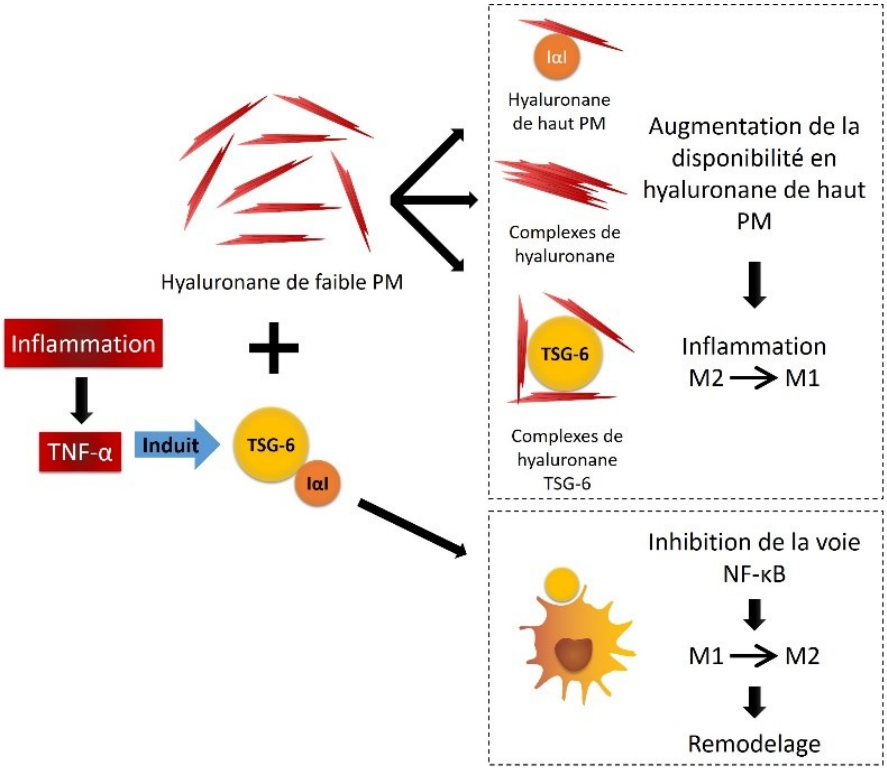


Figure 35 : hypothèse sur le mécanisme d'immunomodulation par TSG-6. ***TSG-6 agit par deux mécanismes principaux au cours de la fibrose : l'augmentation de la disponibilité en hyaluronane de haut poids moléculaire (PM) et l'inhibition de la polarisation M1 des macrophages.***

Sur la base des données de la littérature, nous suggérons l'existence d'un système de régulation de l'inflammation et du remodelage matriciel par modulation de la disponibilité en HA de haut poids moléculaire par TSG-6. L'induction de la production de TSG-6 lors de la phase aigüe de l'inflammation permettrait la formation de polymères de HA de haut poids moléculaire en mesure de

favoriser le recrutement et l'activation des cellules du système immunitaire. Lors des phases de remodelage matriciel, le même mécanisme permettrait de promouvoir le recrutement, la différenciation et la prolifération des myofibroblastes et de favoriser ainsi le remodelage. Le déplacement temporel de la phase de remodelage dans le groupe siTSG-6 par rapport au groupe CSM pourrait donc être dû à une diminution de la disponibilité en HA de haut PM lors de la phase précoce de l'action des CSM. Dans ce modèle, l'augmentation de la concentration en HA pro-fibrosant serait opérée par les fibroblastes et myofibroblastes présents dans le tissu et nécessiterait donc davantage de temps. Si le phénotype observé à 7 semaines dans le groupe siTSG-6 correspond à une cinétique de réparation plus tardive que celle observée après transplantation de CSM, il serait intéressant d'étudier l'évolution de la lésion au-delà de 7 semaines.

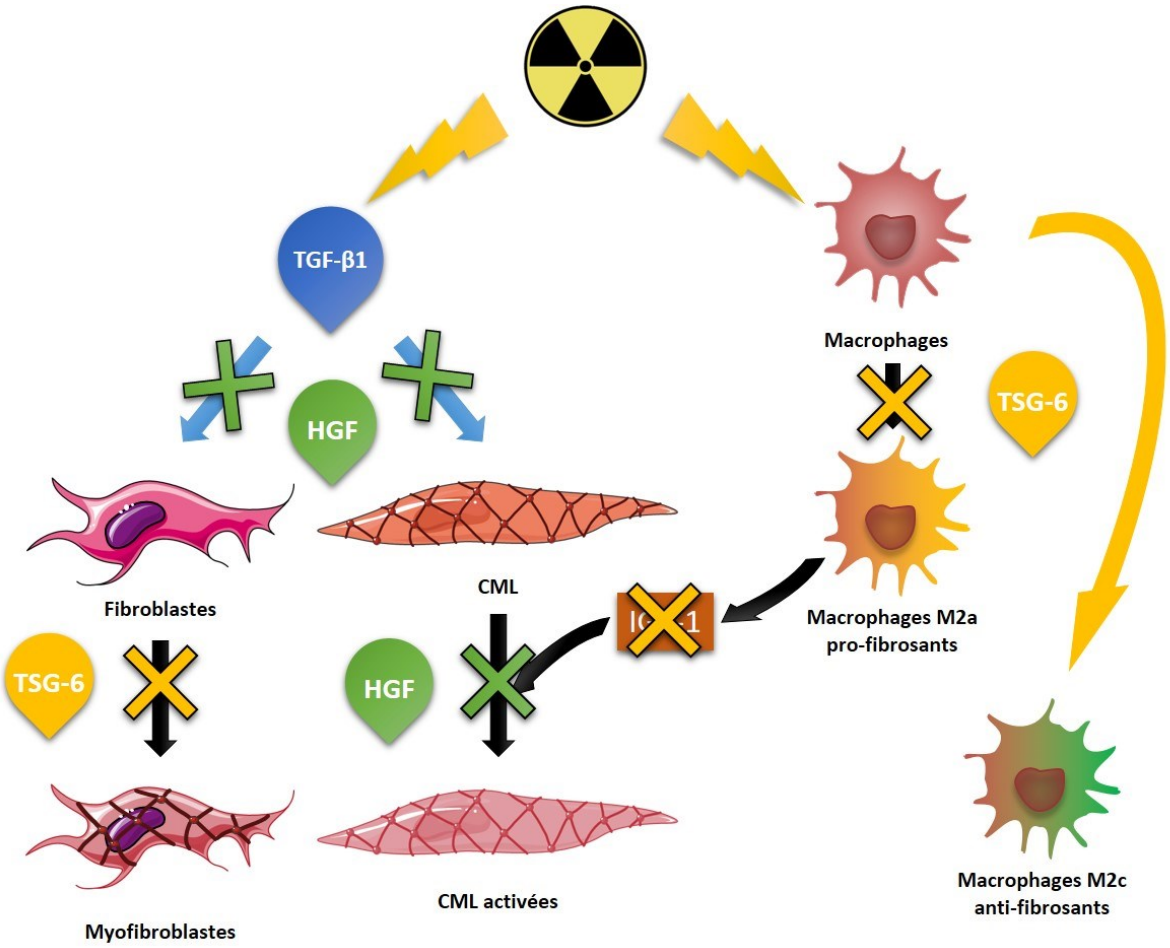


Figure 36 : influence de HGF et TSG-6 sécrétés par les CSM sur la fibrose colorectale radio-induite

V. Perspectives

1. Description du modèle

Nous avons décrit un processus de fibrogénèse dans lequel l'évolution intermédiaire et chronique de la fibrose est contrôlée par l'infiltrat inflammatoire de lymphocytes T et macrophages. Ces mécanismes semblent indépendants de l'axe TGF-β/Smad/CTGF, habituellement décrit comme à l'origine de la fibrose et responsable de la chronicité de la pathologie. Dans notre étude, l'activation des lymphocytes Th2 et des macrophages M2 induit un remodelage intense de la MEC associé à un remaniement permanent de l'architecture du tissu caractérisé par une prolifération et une apoptose accrues. L'épaississement du tissu résultant de l'accumulation de MEC dans les différentes couches du côlon-rectum et la perte de contractibilité du muscle induit par le changement phénotypique des CML conduisent à la sténose et à l'occlusion létale.

En l'absence de données concernant les phases précoces de la lésion dans notre modèle, nous avons supposé que les mécanismes décrits auparavant, notamment au sein de l'IRSN, s'appliquaient à notre étude. Cependant, il conviendrait de caractériser la lésion lors des premières semaines suivant l'irradiation afin de confirmer ces données. De plus, il est nécessaire de confirmer les hypothèses développées dans ce document en confirmant par exemple la capacité de l'IGF-1 à soutenir le phénotype pro-fibrosant des CML, dans le cadre d'une expérimentation *in vitro*. Nous souhaitons également confirmer l'implication des différentes populations leucocytaires identifiées lors de cette étude. Une meilleure caractérisation des mécanismes impliqués dans les dommages radio-induits au côlon-rectum permettrait une identification plus efficace des agents anti-fibrosants impliqués dans l'effet des CSM.

2. Effet des CSM

La transplantation de CSM chez les rats irradiés a permis de réduire la fibrose au sein du côlon-rectum et d'améliorer la survie des animaux. Les CSM induisent une réponse orchestrée composée d'une phase inflammatoire précoce, suivie d'une phase de remodelage intense permettant de restituer le dépôt de MEC à son niveau basal. Cet effet semble principalement produit par la modulation successive des populations de lymphocytes Th1 et Th2 et de macrophages M1 et M2. Il est nécessaire de confirmer cette hypothèse *in vitro*, en analysant les interactions des CSM et de lymphocytes T ou macrophages issus d'animaux irradiés dans les mêmes conditions. Les données de la littérature suggèrent la capacité des CSM à induire des changements de cette nature et renforcent les hypothèses formulées quant à l'effet des CSM.

3. Implication de HGF et TSG-6 dans l'effet des CSM sur la fibrose

Conformément à notre hypothèse de travail, la sous-expression de HGF ou TSG-6 dans les CSM transplantées accroit la fibrose. De façon inattendue, l'injection de ces cellules a induit une augmentation significative du dépôt de MEC par rapport aux groupes non-irradiés et irradiés et transplantés avec des CSM. Bien qu'agissant par différents mécanismes, ces deux facteurs semblent donc indispensables à l'effet anti-fibrosant des CSM.

Nous suggérons que le HGF et le TSG-6 produits par les CSM transplantées limitent la fibrogénèse en inhibant la voie TGF-β/Smad pour HGF et en modulant la réponse des macrophages pour TSG-6. En revanche, il est à l'heure actuelle difficile de déterminer l'origine des effets pro-fibrosants des CSM modifiées par interférence ARN. Nous avons émis l'hypothèse que ces composés ont une action de contrôle sur le phénotype des CSM en plus de leur effet sur le tissu dans lequel ils sont sécrétés. Ainsi, en l'absence de ces systèmes de contrôle, les CSM orienteraient la réponse du tissu vers la fibrogénèse plutôt que de la limiter. L'administration de HGF ou de TSG-6 recombinant, en systémique ou localement, après irradiation colorectale, nous permettrait également de confirmer nos résultats.

Ces données soulignent l'intérêt de l'utilisation des CSM lors du traitement de pathologies complexes telles que la fibrose. La perte de l'expression d'un seul des facteurs sécrétés par les CSM peut induire une réponse totalement différente aboutissant à un effet délétère du traitement. Nous n'avons pas connaissance d'autre exemple de ce type d'effet, concernant la transplantation de CSM pour le traitement de la fibrose.

Contrairement aux traitements pharmacologiques, les CSM injectées ponctuellement peuvent induire une modification profonde et durable de l'évolution d'une lésion. Cet effet est lié à la capacité des CSM à sécréter une large gamme de protéines, miRNA, facteurs de transcriptions et de facteurs de croissance et à adapter leur sécrétome en fonction de la lésion. Ces résultats posent également la question de la modulation du profil d'expression des CSM lors d'un protocole de thérapie cellulaire. Ainsi, la sur ou la sous-expression de gènes spécifiques chez les CSM pourrait permettre de favoriser leurs effets de protection ou de régénération tissulaire. En outre, l'utilisation d'un phénotype de CSM spécifique de l'état de la lésion au moment du traitement pourrait en améliorer l'efficacité.

4. Optimisation du protocole

Comme nous l'avons détaillé dans la partie Modalités de traitement par les CSM, les protocoles de thérapie cellulaire peuvent être optimisés selon de nombreux paramètres : origine des cellules, quantité de cellules, nombre d'injections, timing d'injection, méthode de délivrance…

A l'heure actuelle, la recherche sur la thérapie par les CSM semble s'orienter vers l'utilisation des cellules souches dérivées du tissu adipeux, à l'instar des méthodes utilisées dans notre étude. En effet, ces cellules sont disponibles en grande quantité et la méthode de prélèvement reste moins impactante pour le patient que le prélèvement de moelle. Des études réalisées au sein de notre laboratoire montrent un effet similaire des cellules souches du tissu adipeux et des CSM de la moelle osseuse (résultats non publiés). Les données de la littérature semblent confirmer que les propriétés anti-fibrosantes des CSM sont similaires suivant leur origine. Néanmoins, des différences phénotypiques des CSM en fonction de leur origine ont été démontrées et l'évaluation de l'effet de ces différentes populations sur notre modèle est nécessaire.

La courbe de survie des animaux irradiés avec ou sans transplantation de CSM montre une amélioration significative de la survie suite au traitement par CSM. Dans le cadre de l'essai compassionnel réalisé sur quatre patients d'Épinal, l'administration d'une injection supplémentaire de CSM a induit une nouvelle amélioration de l'état de l'un des patients. Une troisième injection de CSM pourrait permettre d'améliorer l'effet du traitement, voire de reverser la pathologie.

Enfin, l'amélioration des méthodes de délivrance des CSM, notamment par utilisation de matrices et autres biomatériaux, permet d'optimiser la dose de cellules délivrée à la lésion ainsi que de favoriser le maintien des cellules dans le tissu. Au cours de notre étude, les CSM, suivies grâce à leur expression de la GFP, n'ont pas été retrouvées dans le tissu 1 semaine après transplantation Moussa et coll. ont démontré que l'injection locale de CSM dans un hydrogel au niveau du côlon irradié permettait d'augmenter le nombre de CSM présentes au niveau du tissu de façon durable. Ce type de méthode pourrait améliorer le coût et l'efficacité des traitements en délivrant un nombre de cellules plus restreint à un endroit précis.

Conclusion

La transplantation de CSM est reconnue comme une méthode efficace dans le traitement des pathologies inflammatoires et des brûlures radiologiques. Néanmoins, leur utilisation dans le contexte clinique reste controversée, notamment dans le cas des patients atteints de cancer ou ayant subi une radiothérapie. Le manque de données sur les mécanismes responsables de l'effet des CSM ne permet pas de prédire avec certitude leur effet, notamment sur la croissance tumorale et la fibrose. Les essais compassionnels réalisés sur 4 patients impliqués dans l'accident de radiothérapie du centre hospitalier d'Épinal ont montré un effet bénéfique des CSM sur les atteintes coliques radio-induites ainsi que l'absence d'effets secondaires notable.

Nous avons montré au cours de cette étude que les CSM n'induisent pas d'effet pro-tumoral au cours de la tumorigénèse colique et après radiothérapie. A l'inverse, les CSM potentialisent l'effet de la radiothérapie en induisant la diminution du volume tumoral au sein du côlon et améliorent ainsi la survie des animaux transplantés. Après radiothérapie abdomino-pelvienne, nous avons montré que la transplantation de CSM permet de réduire le développement de la fibrose radio-induite et d'améliorer également ainsi la survie des animaux. Ces effets des CSM sont majoritairement dus à leurs propriétés immunomodulatrices, tel que décrit dans des modèles de pathologies inflammatoires.

Nos résultats démontrent l'innocuité et l'efficacité de la transplantation des CSM pour le traitement des atteintes radio-induites tardives. A l'heure actuelle, l'augmentation du nombre de patients survivant du cancer pose le problème de la prise en charge des complications des radiothérapies. En l'absence de traitement efficace, nous proposons un protocole thérapeutique permettant d'améliorer la prise en charge de ces patients. À l'avenir, la transplantation de CSM pourrait être utilisée en routine pour le traitement des patients souffrant de complications des radiothérapies. Un nouvel essai clinique va être mené dès 2017 sur un nouveau groupe de patients sur-irradiés d'Épinal. Nous serons ainsi en mesure d'évaluer plus précisément l'effet des CSM dans le cadre de la radiothérapie abdomino-pelvienne.

Références Bibliographiques

(2010, March 9, 2010). "Pulmonary-Allergy Drugs Advisory Committee Complete Response on Pirfenidone." Retrieved May 30, 2014, from http://www.fda.gov/downloads/AdvisoryCommittees/CommitteesMeetingMaterials/Drugs/Pulmonary-AllergyDrugsAdvisoryCommittee/UCM206399.pdf.

Abbadi, A., M. Lauer, S. Swaidani, A. Wang and V. Hascall (2016). "Hyaluronan Rafts on Airway Epithelial Cells." J Biol Chem **291**(3): 1448-1455.

Abd-Allah, S. H., S. M. Shalaby, A. S. El-Shal, E. A. Elkader, S. Hussein, E. Emam, N. F. Mazen, M. El Kateb and M. Atfy (2014). "Effect of bone marrow-derived mesenchymal stromal cells on hepatoma." Cytotherapy **16**(9): 1197-1206.

Abe, H., K. Okajima, H. Okabe, K. Takatsuki and B. R. Binder (1994). "Granulocyte proteases and hydrogen peroxide synergistically inactivate thrombomodulin of endothelial cells in vitro." J Lab Clin Med **123**(6): 874-881.

Abreu, J. G., N. I. Ketpura, B. Reversade and E. M. De Robertis (2002). "Connective-tissue growth factor (CTGF) modulates cell signalling by BMP and TGF-beta." Nat Cell Biol **4**(8): 599-604.

Abreu, M. T., M. Fukata and M. Arditi (2005). "TLR signaling in the gut in health and disease." J Immunol **174**(8): 4453-4460.

Adams, D. H., L. Harvath, D. P. Bottaro, R. Interrante, G. Catalano, Y. Tanaka, A. Strain, S. G. Hubscher and S. Shaw (1994). "Hepatocyte growth factor and macrophage inflammatory protein 1 beta: structurally distinct cytokines that induce rapid cytoskeletal changes and subset-preferential migration in T cells." Proc Natl Acad Sci U S A **91**(15): 7144-7148.

Adelmann-Grill, B. C., R. Hein, F. Wach and T. Krieg (1987). "Inhibition of fibroblast chemotaxis by recombinant human interferon gamma and interferon alpha." J Cell Physiol **130**(2): 270-275.

Adhyatmika, A., K. S. Putri, L. Beljaars and B. N. Melgert (2015). "The Elusive Antifibrotic Macrophage." Front Med (Lausanne) **2**: 81.

Aggarwal, S. and M. F. Pittenger (2005). "Human mesenchymal stem cells modulate allogeneic immune cell responses." Blood **105**(4): 1815-1822.

Ahmad, T., S. Mukherjee, B. Pattnaik, M. Kumar, S. Singh, M. Kumar, R. Rehman, B. K. Tiwari, K. A. Jha, A. P. Barhanpurkar, M. R. Wani, S. S. Roy, U. Mabalirajan, B. Ghosh and A. Agrawal (2014). "Miro1 regulates intercellular mitochondrial transport & enhances mesenchymal stem cell rescue efficacy." EMBO J **33**(9): 994-1010.

Aisagbonhi, O., M. Rai, S. Ryzhov, N. Atria, I. Feoktistov and A. K. Hatzopoulos (2011). "Experimental myocardial infarction triggers canonical Wnt signaling and endothelial-to-mesenchymal transition." Dis Model Mech **4**(4): 469-483.

Akhurst, R. J. and A. Hata (2012). "Targeting the TGFbeta signalling pathway in disease." Nat Rev Drug Discov **11**(10): 790-811.

Akita, S., K. Akino, A. Hirano, A. Ohtsuru and S. Yamashita (2010). "Noncultured autologous adipose-derived stem cells therapy for chronic radiation injury." Stem Cells Int **2010**: 532704.

Akyurekli, C., Y. Le, R. B. Richardson, D. Fergusson, J. Tay and D. S. Allan (2015). "A systematic review of preclinical studies on the therapeutic potential of mesenchymal stromal cell-derived microvesicles." Stem Cell Rev **11**(1): 150-160.

Albeiroti, S., A. Soroosh and C. A. de la Motte (2015). "Hyaluronan's Role in Fibrosis: A Pathogenic Factor or a Passive Player?" Biomed Res Int **2015**: 790203.

Alfarano, C., C. Roubeix, R. Chaaya, C. Ceccaldi, D. Calise, C. Mias, D. Cussac, J. L. Bascands and A. Parini (2012). "Intraparenchymal injection of bone marrow mesenchymal stem cells reduces kidney fibrosis after ischemia-reperfusion in cyclosporine-immunosuppressed rats." Cell Transplant **21**(9): 2009-2019.

Ali, G., S. Mohsin, M. Khan, G. A. Nasir, S. Shams, S. N. Khan and S. Riazuddin (2012). "Nitric oxide augments mesenchymal stem cell ability to repair liver fibrosis." J Transl Med **10**: 75.

Almand, B., J. I. Clark, E. Nikitina, J. van Beynen, N. R. English, S. C. Knight, D. P. Carbone and D. I. Gabrilovich (2001). "Increased production of immature myeloid cells in cancer patients: a mechanism of immunosuppression in cancer." J Immunol **166**(1): 678-689.

Anders, H. J. and M. Ryu (2011). "Renal microenvironments and macrophage phenotypes determine progression or resolution of renal inflammation and fibrosis." Kidney Int **80**(9): 915-925.

Andreyev, H. J., A. Wotherspoon, J. W. Denham and M. Hauer-Jensen (2011). ""Pelvic radiation disease": new understanding and new solutions for a new disease in the era of cancer survivorship." Scand J Gastroenterol **46**(4): 389-397.

Annes, J. P., J. S. Munger and D. B. Rifkin (2003). "Making sense of latent TGFbeta activation." J Cell Sci **116**(Pt 2): 217-224.

Arcangeli, S. and C. Greco (2016). "Hypofractionated radiotherapy for organ-confined prostate cancer: is less more?" Nat Rev Urol.

Arslan, F., R. C. Lai, M. B. Smeets, L. Akeroyd, A. Choo, E. N. Aguor, L. Timmers, H. V. van Rijen, P. A. Doevendans, G. Pasterkamp, S. K. Lim and D. P. de Kleijn (2013). "Mesenchymal stem cell-derived exosomes increase ATP levels, decrease oxidative stress and activate PI3K/Akt pathway to enhance myocardial viability and prevent adverse remodeling after myocardial ischemia/reperfusion injury." Stem Cell Res **10**(3): 301-312.

Asanuma, H., B. A. Vanderbrink, M. T. Campbell, K. L. Hile, H. Zhang, D. R. Meldrum and K. K. Meldrum (2011). "Arterially delivered mesenchymal stem cells prevent obstruction-induced renal fibrosis." J Surg Res **168**(1): e51-59.

Baek, J. H., C. Birchmeier, M. Zenke and T. Hieronymus (2012). "The HGF receptor/Met tyrosine kinase is a key regulator of dendritic cell migration in skin immunity." J Immunol **189**(4): 1699-1707.

Baglio, S. R., D. M. Pegtel and N. Baldini (2012). "Mesenchymal stem cell secreted vesicles provide novel opportunities in (stem) cell-free therapy." Front Physiol **3**: 359.

Bai, L., D. P. Lennon, V. Eaton, K. Maier, A. I. Caplan, S. D. Miller and R. H. Miller (2009). "Human bone marrow-derived mesenchymal stem cells induce Th2-polarized immune response and promote endogenous repair in animal models of multiple sclerosis." Glia **57**(11): 1192-1203.

Bai, Z. M., X. D. Deng, J. D. Li, D. H. Li, H. Cao, Z. X. Liu and J. Zhang (2013). "Arterially transplanted mesenchymal stem cells in a mouse reversible unilateral ureteral obstruction model: in vivo bioluminescence imaging and effects on renal fibrosis." Chin Med J (Engl) **126**(10): 1890-1894.

Bakin, A. V., C. Rinehart, A. K. Tomlinson and C. L. Arteaga (2002). "p38 mitogen-activated protein kinase is required for TGFbeta-mediated fibroblastic transdifferentiation and cell migration." J Cell Sci **115**(Pt 15): 3193-3206.

Bar-Shavit, R., A. Kahn, J. W. Fenton, 2nd and G. D. Wilner (1983). "Chemotactic response of monocytes to thrombin." J Cell Biol **96**(1): 282-285.

Baranova, N. S., E. Nileback, F. M. Haller, D. C. Briggs, S. Svedhem, A. J. Day and R. P. Richter "The inflammation-associated protein TSG-6 cross-links hyaluronan via hyaluronan-induced TSG-6 oligomers." J Biol Chem **286**(29): 25675-25686.

Barker, N. (2014). "Adult intestinal stem cells: critical drivers of epithelial homeostasis and regeneration." Nat Rev Mol Cell Biol **15**(1): 19-33.

Barron, L. and T. A. Wynn (2011). "Fibrosis is regulated by Th2 and Th17 responses and by dynamic interactions between fibroblasts and macrophages." Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol **300**(5): G723-728.

Barton, F. B., M. R. Rickels, R. Alejandro, B. J. Hering, S. Wease, B. Naziruddin, J. Oberholzer, J. S. Odorico, M. R. Garfinkel, M. Levy, F. Pattou, T. Berney, A. Secchi, S. Messinger, P. A. Senior, P. Maffi, A. Posselt, P. G. Stock, D. B. Kaufman, X. Luo, F. Kandeel, E. Cagliero, N. A. Turgeon, P. Witkowski, A. Naji, P. J. O'Connell, C. Greenbaum, Y. C. Kudva, K. L. Brayman, M. J. Aull, C. Larsen, T. W. Kay, L. A. Fernandez, M. C. Vantyghem, M. Bellin and A. M. Shapiro (2012). "Improvement in outcomes of clinical islet transplantation: 1999-2010." Diabetes Care **35**(7): 1436-1445.

Bartosh, T. J., M. Ullah, S. Zeitouni, J. Beaver and D. J. Prockop (2016). "Cancer cells enter dormancy after cannibalizing mesenchymal stem/stromal cells (MSCs)." Proc Natl Acad Sci U S A **113**(42): E6447-E6456.

Batten, P., P. Sarathchandra, J. W. Antoniw, S. S. Tay, M. W. Lowdell, P. M. Taylor and M. H. Yacoub (2006). "Human mesenchymal stem cells induce T cell anergy and downregulate T cell allo-responses via the TH2 pathway: relevance to tissue engineering human heart valves." Tissue Eng **12**(8): 2263-2273.

Baujat, B., J. Bourhis, P. Blanchard, J. Overgaard, K. K. Ang, M. Saunders, A. Le Maitre, J. Bernier, J. C. Horiot, E. Maillard, T. F. Pajak, M. G. Poulsen, A. Bourredjem, B. O'Sullivan, W. Dobrowsky, H. Andrzej, K. Skladowski, J. H. Hay, L. H. Pinto, K. K. Fu, C. Fallai, R. Sylvester and J. P. Pignon (2010). "Hyperfractionated or accelerated radiotherapy for head and neck cancer." Cochrane Database Syst Rev(12): CD002026.

Baulier, E., F. Favreau, A. Le Corf, C. Jayle, F. Schneider, J. M. Goujon, O. Feraud, A. Bennaceur-Griscelli, T. Hauet and A. G. Turhan (2014). "Amniotic fluid-derived mesenchymal stem cells prevent fibrosis and preserve renal function in a preclinical porcine model of kidney transplantation." Stem Cells Transl Med **3**(7): 809-820.

Beattie, G. M., T. Otonkoski, A. D. Lopez and A. Hayek (1997). "Functional beta-cell mass after transplantation of human fetal pancreatic cells: differentiation or proliferation?" Diabetes **46**(2): 244-248.

Beckendorf, V., J. M. Bachaud, P. Bey, S. Bourdin, C. Carrie, O. Chapet, D. Cowen, S. Guerif, H. M. Hay, J. L. Lagrange, P. Maingon, E. Le Prise, P. Pommier and J. M. Simon (2002). "[Target-volume and critical-organ delineation for conformal radiotherapy of prostate cancer: experience of French dose-escalation trials]." Cancer Radiother **6 Suppl 1**: 78s-92s.

Beddy, D., R. W. Watson, J. M. Fitzpatrick and P. R. O'Connell (2004). "Increased vascular endothelial growth factor production in fibroblasts isolated from strictures in patients with Crohn's disease." Br J Surg **91**(1): 72-77.

Beilmann, M., M. Odenthal, W. Jung, G. F. Vande Woude, H. P. Dienes and P. Schirmacher (1997). "Neoexpression of the c-met/hepatocyte growth factor-scatter factor receptor gene in activated monocytes." Blood **90**(11): 4450-4458.

Beilmann, M., G. F. Vande Woude, H. P. Dienes and P. Schirmacher (2000). "Hepatocyte growth factor-stimulated invasiveness of monocytes." Blood **95**(12): 3964-3969.

Benassi, L., D. Ottani, F. Fantini, A. Marconi, C. Chiodino, A. Giannetti and C. Pincelli (1997). "1,25-dihydroxyvitamin D3, transforming growth factor beta1, calcium, and ultraviolet B radiation induce apoptosis in cultured human keratinocytes." J Invest Dermatol **109**(3): 276-282.

Bendinelli, P., E. Matteucci, G. Dogliotti, M. M. Corsi, G. Banfi, P. Maroni and M. A. Desiderio (2010). "Molecular basis of anti-inflammatory action of platelet-rich plasma on human chondrocytes: mechanisms of NF-kappaB inhibition via HGF." J Cell Physiol **225**(3): 757-766.

Benkhoucha, M., M. L. Santiago-Raber, G. Schneiter, M. Chofflon, H. Funakoshi, T. Nakamura and P. H. Lalive (2010). "Hepatocyte growth factor inhibits CNS autoimmunity by inducing tolerogenic dendritic cells and CD25+Foxp3+ regulatory T cells." Proc Natl Acad Sci U S A **107**(14): 6424-6429.

Bennaceur-Griscelli, A., C. Pondarre, V. Schiavon, W. Vainchenker and L. Coulombel (2001). "Stromal cells retard the differentiation of CD34(+)CD38(low/neg) human primitive progenitors exposed to cytokines independent of their mitotic history." Blood **97**(2): 435-441.

Bensidhoum, M., A. Chapel, S. Francois, C. Demarquay, C. Mazurier, L. Fouillard, S. Bouchet, J. M. Bertho, P. Gourmelon, J. Aigueperse, P. Charbord, N. C. Gorin, D. Thierry and M. Lopez (2004). "Homing of in vitro expanded Stro-1- or Stro-1+ human mesenchymal stem cells into the NOD/SCID mouse and their role in supporting human CD34 cell engraftment." Blood **103**(9): 3313-3319.

Bentzen, S. M. (2006). "Preventing or reducing late side effects of radiation therapy: radiobiology meets molecular pathology." Nat Rev Cancer **6**(9): 702-713.

Bernardo, M. E., L. M. Ball, A. M. Cometa, H. Roelofs, M. Zecca, M. A. Avanzini, A. Bertaina, L. Vinti, A. Lankester, R. Maccario, O. Ringden, K. Le Blanc, R. M. Egeler, W. E. Fibbe and F. Locatelli (2011). "Co-infusion of ex vivo-expanded, parental MSCs prevents life-threatening acute GVHD, but does not reduce the risk of graft failure in pediatric patients undergoing allogeneic umbilical cord blood transplantation." Bone Marrow Transplant **46**(2): 200-207.

Bessout, R. (2012). Traitement des lésions colorectales radio-induites par injection de Cellules Stromales Mésenchymateuses (CSM) : Implication du processus inflammatoire. Immunologie, Université Pierre et Marie Curie**:** 294.

Bessout, R., C. Demarquay, L. Moussa, A. Rene, B. Doix, M. Benderitter, A. Semont and N. Mathieu (2015). "TH17 predominant T-cell responses in radiation-induced bowel disease are modulated by treatment with adipose-derived mesenchymal stromal cells." J Pathol **237**(4): 435-446.

Bessout, R., A. Semont, C. Demarquay, A. Charcosset, M. Benderitter and N. Mathieu (2014). "Mesenchymal stem cell therapy induces glucocorticoid synthesis in colonic mucosa and suppresses radiation-activated T cells: new insights into MSC immunomodulation." Mucosal Immunol **7**(3): 656-669.

Betancourt, A. M. (2013). "New Cell-Based Therapy Paradigm: Induction of Bone Marrow-Derived Multipotent Mesenchymal Stromal Cells into Pro-Inflammatory MSC1 and Anti-inflammatory MSC2 Phenotypes." Adv Biochem Eng Biotechnol **130**: 163-197.

Beyth, S., Z. Borovsky, D. Mevorach, M. Liebergall, Z. Gazit, H. Aslan, E. Galun and J. Rachmilewitz (2005). "Human mesenchymal stem cells alter antigen-presenting cell maturation and induce T-cell unresponsiveness." Blood **105**(5): 2214-2219.

Bhowmick, N. A., M. Ghiassi, A. Bakin, M. Aakre, C. A. Lundquist, M. E. Engel, C. L. Arteaga and H. L. Moses (2001). "Transforming growth factor-beta1 mediates epithelial to mesenchymal transdifferentiation through a RhoA-dependent mechanism." Mol Biol Cell **12**(1): 27-36.

Bianco, P., X. Cao, P. S. Frenette, J. J. Mao, P. G. Robey, P. J. Simmons and C. Y. Wang (2013). "The meaning, the sense and the significance: translating the science of mesenchymal stem cells into medicine." Nat Med **19**(1): 35-42.

Biert, J., T. Wobbes, J. Hoogenhout, B. de Man and T. Hendriks (1996). "Combined preoperative irradiation and direct postoperative 5-fluorouracil without negative effects on early anastomotic healing in the rat colon." Radiother Oncol **41**(3): 257-262.

Bifari, F., V. Lisi, E. Mimiola, A. Pasini and M. Krampera (2008). "Immune Modulation by Mesenchymal Stem Cells." Transfus Med Hemother **35**(3): 194-204.

Billiard, F., V. Buard, M. Benderitter and C. Linard (2011). "Abdominal gamma-radiation induces an accumulation of function-impaired regulatory T cells in the small intestine." Int J Radiat Oncol Biol Phys **80**(3): 869-876.

Biswas, S. K. and A. Mantovani (2010). "Macrophage plasticity and interaction with lymphocyte subsets: cancer as a paradigm." Nat Immunol **11**(10): 889-896.

Bizios, R., L. Lai, J. W. Fenton, 2nd and A. B. Malik (1986). "Thrombin-induced chemotaxis and aggregation of neutrophils." J Cell Physiol **128**(3): 485-490.

Bjermer, L., R. Lundgren and R. Hallgren (1989). "Hyaluronan and type III procollagen peptide concentrations in bronchoalveolar lavage fluid in idiopathic pulmonary fibrosis." Thorax **44**(2): 126-131.

Blirando, K., F. Milliat, I. Martelly, J. C. Sabourin, M. Benderitter and A. Francois (2011). "Mast cells are an essential component of human radiation proctitis and contribute to experimental colorectal damage in mice." Am J Pathol **178**(2): 640-651.

Block, G. J., S. Ohkouchi, F. Fung, J. Frenkel, C. Gregory, R. Pochampally, G. DiMattia, D. E. Sullivan and D. J. Prockop (2009). "Multipotent stromal cells are activated to reduce apoptosis in part by upregulation and secretion of stanniocalcin-1." Stem Cells **27**(3): 670-681.

Blocki, A., Y. Wang, M. Koch, P. Peh, S. Beyer, P. Law, J. Hui and M. Raghunath (2013). "Not all MSCs can act as pericytes: functional in vitro assays to distinguish pericytes from other mesenchymal stem cells in angiogenesis." Stem Cells Dev **22**(17): 2347-2355.

Blom, I. E., R. Goldschmeding and A. Leask (2002). "Gene regulation of connective tissue growth factor: new targets for antifibrotic therapy?" Matrix Biol **21**(6): 473-482.

Boelens, M. C., T. J. Wu, B. Y. Nabet, B. Xu, Y. Qiu, T. Yoon, D. J. Azzam, C. Twyman-Saint Victor, B. Z. Wiemann, H. Ishwaran, P. J. Ter Brugge, J. Jonkers, J. Slingerland and A. J. Minn (2014). "Exosome transfer from stromal to breast cancer cells regulates therapy resistance pathways." Cell **159**(3): 499-513.

Bollyky, P. L., J. D. Lord, S. A. Masewicz, S. P. Evanko, J. H. Buckner, T. N. Wight and G. T. Nepom (2007). "Cutting edge: high molecular weight hyaluronan promotes the suppressive effects of CD4+CD25+ regulatory T cells." J Immunol **179**(2): 744-747.

Bosi, F., E. Silini, M. Luisetti, A. M. Romano, U. Prati, M. Silvestri, C. Tinelli, I. M. Samloff and R. Fiocca (1993). "Aspartic proteinases in normal lung and interstitial pulmonary diseases." Am J Respir Cell Mol Biol **8**(6): 626-632.

Bourdoulous, S., G. Orend, D. A. MacKenna, R. Pasqualini and E. Ruoslahti (1998). "Fibronectin matrix regulates activation of RHO and CDC42 GTPases and cell cycle progression." J Cell Biol **143**(1): 267-276.

Bourhis, J., M. Lapeyre, J. Tortochaux, M. Rives, M. Aghili, S. Bourdin, F. Lesaunier, T. Benassi, C. Lemanski, L. Geoffrois, A. Lusinchi, P. Verrelle, E. Bardet, M. Julieron, P. Wibault, M. Luboinski and E. Benhamou (2006). "Phase III randomized trial of very accelerated radiation therapy compared with conventional radiation therapy in squamous cell head and neck cancer: a GORTEC trial." J Clin Oncol **24**(18): 2873-2878.

Bournia, V. K., K. Evangelou and P. P. Sfikakis (2013). "Therapeutic inhibition of tyrosine kinases in systemic sclerosis: a review of published experience on the first 108 patients treated with imatinib." Semin Arthritis Rheum **42**(4): 377-390.

Brannigan, A. E., R. W. Watson, D. Beddy, H. Hurley, J. M. Fitzpatrick and P. R. O'Connell (2002). "Increased adhesion molecule expression in serosal fibroblasts isolated from patients with inflammatory bowel disease is secondary to inflammation." Ann Surg **235**(4): 507-511.

Brent, G. A. (2010). "Environmental exposures and autoimmune thyroid disease." Thyroid **20**(7): 755-761.

Brittingham, J., C. Phiel, W. C. Trzyna, V. Gabbeta and K. M. McHugh (1998). "Identification of distinct molecular phenotypes in cultured gastrointestinal smooth muscle cells." Gastroenterology **115**(3): 605-617.

Brown, L. F., D. Dubin, L. Lavigne, B. Logan, H. F. Dvorak and L. Van de Water (1993). "Macrophages and fibroblasts express embryonic fibronectins during cutaneous wound healing." Am J Pathol **142**(3): 793-801.

Brugger, W., K. J. Bross, M. Glatt, F. Weber, R. Mertelsmann and L. Kanz (1994). "Mobilization of tumor cells and hematopoietic progenitor cells into peripheral blood of patients with solid tumors." Blood **83**(3): 636-640.

Bruno, S., C. Grange, M. C. Deregibus, R. A. Calogero, S. Saviozzi, F. Collino, L. Morando, A. Busca, M. Falda, B. Bussolati, C. Tetta and G. Camussi (2009). "Mesenchymal stem cell-derived microvesicles protect against acute tubular injury." J Am Soc Nephrol **20**(5): 1053-1067.

Buttner, C., A. Skupin, T. Reimann, E. P. Rieber, G. Unteregger, P. Geyer and K. H. Frank (1997). "Local production of interleukin-4 during radiation-induced pneumonitis and pulmonary fibrosis in rats: macrophages as a prominent source of interleukin-4." Am J Respir Cell Mol Biol **17**(3): 315-325.

Cabrera, S., M. Gaxiola, J. L. Arreola, R. Ramirez, P. Jara, J. D'Armiento, T. Richards, M. Selman and A. Pardo (2007). "Overexpression of MMP9 in macrophages attenuates pulmonary fibrosis induced by bleomycin." Int J Biochem Cell Biol **39**(12): 2324-2338.

Cao, T. V., M. La, S. J. Getting, A. J. Day and M. Perretti (2004). "Inhibitory effects of TSG-6 Link module on leukocyte-endothelial cell interactions in vitro and in vivo." Microcirculation **11**(7): 615-624.

Caplan, A. I. (1991). "Mesenchymal stem cells." J Orthop Res **9**(5): 641-650.

Caplan, A. I. (1994). "The mesengenic process." Clin Plast Surg **21**(3): 429-435.

Caplan, A. I. (2008). "All MSCs are pericytes?" Cell Stem Cell **3**(3): 229-230.

Carre, A. L., A. W. James, L. MacLeod, W. Kong, K. Kawai, M. T. Longaker and H. P. Lorenz (2010). "Interaction of wingless protein (Wnt), transforming growth factor-beta1, and hyaluronan production in fetal and postnatal fibroblasts." Plast Reconstr Surg **125**(1): 74-88.

Carter, N. J. (2011). "Pirfenidone: in idiopathic pulmonary fibrosis." Drugs **71**(13): 1721-1732.

Castelo-Branco, M. T., I. D. Soares, D. V. Lopes, F. Buongusto, C. A. Martinusso, A. do Rosario, Jr., S. A. Souza, B. Gutfilen, L. M. Fonseca, C. Elia, K. Madi, A. Schanaider, M. I. Rossi and H. S. Souza (2012). "Intraperitoneal but not intravenous cryopreserved mesenchymal stromal cells home to the inflamed colon and ameliorate experimental colitis." PLoS One **7**(3): e33360.

Caviggioli, F., L. Maione, D. Forcellini, F. Klinger and M. Klinger (2011). "Autologous fat graft in postmastectomy pain syndrome." Plast Reconstr Surg **128**(2): 349-352.

Caviggioli, F., V. Vinci and L. Codolini (2013). "Autologous fat grafting: an innovative solution for the treatment of post-mastectomy pain syndrome." Breast Cancer **20**(3): 281-282.

Ceccaldi, C., R. Bushkalova, C. Alfarano, O. Lairez, D. Calise, P. Bourin, C. Frugier, C. Rouzaud-Laborde, D. Cussac, A. Parini, B. Sallerin and S. G. Fullana (2014). "Evaluation of polyelectrolyte complex-based scaffolds for mesenchymal stem cell therapy in cardiac ischemia treatment." Acta Biomater **10**(2): 901-911.

Centeno, C. J., J. R. Schultz, M. Cheever, B. Robinson, M. Freeman and W. Marasco (2010). "Safety and complications reporting on the re-implantation of culture-expanded mesenchymal stem cells using autologous platelet lysate technique." Curr Stem Cell Res Ther **5**(1): 81-93.

Cesaro, S., A. Brugiolo, M. Faraci, C. Uderzo, R. Rondelli, C. Favre, M. Zecca, G. Garetto, G. Dini, M. Pillon, C. Messina, L. Zanesco, A. Pession and F. Locatelli (2003). "Incidence and treatment of hemorrhagic cystitis in children given hematopoietic stem cell transplantation: a survey from the Italian association of pediatric hematology oncology-bone marrow transplantation group." Bone Marrow Transplant **32**(9): 925-931.

Cesaro, S., C. Facchin, G. Tridello, C. Messina, E. Calore, M. A. Biasolo, M. Pillon, S. Varotto, A. Brugiolo, C. Mengoli and G. Palu (2008). "A prospective study of BK-virus-associated haemorrhagic cystitis in paediatric patients undergoing allogeneic haematopoietic stem cell transplantation." Bone Marrow Transplant **41**(4): 363-370.

Champlin, R. E., N. Schmitz, M. M. Horowitz, B. Chapuis, R. Chopra, J. J. Cornelissen, R. P. Gale, J. M. Goldman, F. R. Loberiza, Jr., B. Hertenstein, J. P. Klein, E. Montserrat, M. J. Zhang, O. Ringden, S. C. Tomany, P. A. Rowlings, M. E. Van Hoef and A. Gratwohl (2000). "Blood stem cells compared with bone marrow as a source of hematopoietic cells for allogeneic transplantation. IBMTR Histocompatibility and Stem Cell Sources Working Committee and the European Group for Blood and Marrow Transplantation (EBMT)." Blood **95**(12): 3702-3709.

Chang, P., Y. Qu, Y. Liu, S. Cui, D. Zhu, H. Wang and X. Jin (2013). "Multi-therapeutic effects of human adipose-derived mesenchymal stem cells on radiation-induced intestinal injury." Cell Death Dis **4**: e685.

Chang, P. Y., X. Jin, Y. Y. Jiang, L. X. Wang, Y. J. Liu and J. Wang (2016). "Mensenchymal stem cells can delay radiation-induced crypt death: impact on intestinal CD44(+) fragments." Cell Tissue Res **364**(2): 331-344.

Chang, Y. J., J. W. Liu, P. C. Lin, L. Y. Sun, C. W. Peng, G. H. Luo, T. M. Chen, R. P. Lee, S. Z. Lin, H. J. Harn and T. W. Chiou (2009). "Mesenchymal stem cells facilitate recovery from chemically induced liver damage and decrease liver fibrosis." Life Sci **85**(13-14): 517-525.

Chanock, S. J., J. el Benna, R. M. Smith and B. M. Babior (1994). "The respiratory burst oxidase." J Biol Chem **269**(40): 24519-24522.

Chapel, A., J. M. Bertho, M. Bensidhoum, L. Fouillard, R. G. Young, J. Frick, C. Demarquay, F. Cuvelier, E. Mathieu, F. Trompier, N. Dudoignon, C. Germain, C. Mazurier, J. Aigueperse, J. Borneman, N. C. Gorin, P. Gourmelon and D. Thierry (2003). "Mesenchymal stem cells home to injured tissues when co-infused with hematopoietic cells to treat a radiation-induced multi-organ failure syndrome." J Gene Med **5**(12): 1028-1038.

Chapel, A., S. Francois, L. Douay, M. Benderitter and J. Voswinkel (2013). "New insights for pelvic radiation disease treatment: Multipotent stromal cell is a promise mainstay treatment for the restoration of abdominopelvic severe chronic damages induced by radiotherapy." World J Stem Cells **5**(4): 106-111.

Chapman, J. D. G., C.J. (1981). Radiation-induced Events and Their Time Scale in Mammalian Cells. Advances in Radiation Biology. New York, Academic Press**:** 9-143.

Chaqour, B., R. Yang and Q. Sha (2006). "Mechanical stretch modulates the promoter activity of the profibrotic factor CCN2 through increased actin polymerization and NF-kappaB activation." J Biol Chem **281**(29): 20608-20622.

Chen, C. N., Y. S. Li, Y. T. Yeh, P. L. Lee, S. Usami, S. Chien and J. J. Chiu (2006). "Synergistic roles of platelet-derived growth factor-BB and interleukin-1beta in phenotypic modulation of human aortic smooth muscle cells." Proc Natl Acad Sci U S A **103**(8): 2665-2670.

Chen, D., S. Liu, H. Ma, X. Liang, H. Ma, X. Yan, B. Yang, J. Wei and X. Liu (2015). "Paracrine factors from adipose-mesenchymal stem cells enhance metastatic capacity through Wnt signaling pathway in a colon cancer cell co-culture model." Cancer Cell Int **15**: 42.

Chen, S. J., W. Yuan, Y. Mori, A. Levenson, M. Trojanowska and J. Varga (1999). "Stimulation of type I collagen transcription in human skin fibroblasts by TGF-beta: involvement of Smad 3." J Invest Dermatol **112**(1): 49-57.

Chen, S. L., W. W. Fang, F. Ye, Y. H. Liu, J. Qian, S. J. Shan, J. J. Zhang, R. Z. Chunhua, L. M. Liao, S. Lin and J. P. Sun (2004). "Effect on left ventricular function of intracoronary transplantation of autologous bone marrow mesenchymal stem cell in patients with acute myocardial infarction." Am J Cardiol **94**(1): 92-95.

Chen, Y., D. J. Abraham, X. Shi-Wen, J. D. Pearson, C. M. Black, K. M. Lyons and A. Leask (2004). "CCN2 (connective tissue growth factor) promotes fibroblast adhesion to fibronectin." Mol Biol Cell **15**(12): 5635-5646.

Chen, Y. T., C. K. Sun, Y. C. Lin, L. T. Chang, Y. L. Chen, T. H. Tsai, S. Y. Chung, S. Chua, Y. H. Kao, C. H. Yen, P. L. Shao, K. C. Chang, S. Leu and H. K. Yip (2011). "Adipose-derived mesenchymal stem cell protects kidneys against ischemia-reperfusion injury through suppressing oxidative stress and inflammatory reaction." J Transl Med **9**: 51.

Cheng, S. and D. H. Lovett (2003). "Gelatinase A (MMP-2) is necessary and sufficient for renal tubular cell epithelial-mesenchymal transformation." Am J Pathol **162**(6): 1937-1949.

Cheng, S., A. S. Pollock, R. Mahimkar, J. L. Olson and D. H. Lovett (2006). "Matrix metalloproteinase 2 and basement membrane integrity: a unifying mechanism for progressive renal injury." FASEB J **20**(11): 1898-1900.

Cheng, T., N. Rodrigues, H. Shen, Y. Yang, D. Dombkowski, M. Sykes and D. T. Scadden (2000). "Hematopoietic stem cell quiescence maintained by p21cip1/waf1." Science **287**(5459): 1804-1808.

Chiaramonte, M. G., D. D. Donaldson, A. W. Cheever and T. A. Wynn (1999). "An IL-13 inhibitor blocks the development of hepatic fibrosis during a T-helper type 2-dominated inflammatory response." J Clin Invest **104**(6): 777-785.

Chinnery, H. R., E. Pearlman and P. G. McMenamin (2008). "Cutting edge: Membrane nanotubes in vivo: a feature of MHC class II+ cells in the mouse cornea." J Immunol **180**(9): 5779-5783.

Cho, J. A., H. Park, E. H. Lim, K. H. Kim, J. S. Choi, J. H. Lee, J. W. Shin and K. W. Lee (2011). "Exosomes from ovarian cancer cells induce adipose tissue-derived mesenchymal stem cells to acquire the physical and functional characteristics of tumor-supporting myofibroblasts." Gynecol Oncol **123**(2): 379-386.

Cho, J. H. (2003). "Significant role of genetics in IBD: the NOD2 gene." Rev Gastroenterol Disord **3 Suppl 1**: S18-22.

Choi, H., R. H. Lee, N. Bazhanov, J. Y. Oh and D. J. Prockop (2011). "Anti-inflammatory protein TSG-6 secreted by activated MSCs attenuates zymosan-induced mouse peritonitis by decreasing TLR2/NF-kappaB signaling in resident macrophages." Blood **118**(2): 330-338.

Choi, M., T. Ban and T. Rhim (2014). "Therapeutic use of stem cell transplantation for cell replacement or cytoprotective effect of microvesicle released from mesenchymal stem cell." Mol Cells **37**(2): 133-139.

Chowdhury, R., J. P. Webber, M. Gurney, M. D. Mason, Z. Tabi and A. Clayton (2015). "Cancer exosomes trigger mesenchymal stem cell differentiation into pro-angiogenic and pro-invasive myofibroblasts." Oncotarget **6**(2): 715-731.

Ciccocioppo, R., M. E. Bernardo, A. Sgarella, R. Maccario, M. A. Avanzini, C. Ubezio, A. Minelli, C. Alvisi, A. Vanoli, F. Calliada, P. Dionigi, C. Perotti, F. Locatelli and G. R. Corazza (2011). "Autologous bone marrow-derived mesenchymal stromal cells in the treatment of fistulising Crohn's disease." Gut **60**(6): 788-798.

Cieslik, K. A., J. Trial, S. Carlson, G. E. Taffet and M. L. Entman (2013). "Aberrant differentiation of fibroblast progenitors contributes to fibrosis in the aged murine heart: role of elevated circulating insulin levels." FASEB J **27**(4): 1761-1771.

Claassen, M. A., R. J. de Knegt, H. W. Tilanus, H. L. Janssen and A. Boonstra (2010). "Abundant numbers of regulatory T cells localize to the liver of chronic hepatitis C infected patients and limit the extent of fibrosis." J Hepatol **52**(3): 315-321.

Conget, P. A. and J. J. Minguell (1999). "Phenotypical and functional properties of human bone marrow mesenchymal progenitor cells." J Cell Physiol **181**(1): 67-73.

Corcione, A., F. Benvenuto, E. Ferretti, D. Giunti, V. Cappiello, F. Cazzanti, M. Risso, F. Gualandi, G. L. Mancardi, V. Pistoia and A. Uccelli (2006). "Human mesenchymal stem cells modulate B-cell functions." Blood **107**(1): 367-372.

Cortez, D. M., M. D. Feldman, S. Mummidi, A. J. Valente, B. Steffensen, M. Vincenti, J. L. Barnes and B. Chandrasekar (2007). "IL-17 stimulates MMP-1 expression in primary human cardiac

fibroblasts via p38 MAPK- and ERK1/2-dependent C/EBP-beta , NF-kappaB, and AP-1 activation." Am J Physiol Heart Circ Physiol **293**(6): H3356-3365.

Cousin, B., E. Ravet, S. Poglio, F. De Toni, M. Bertuzzi, H. Lulka, I. Touil, M. Andre, J. L. Grolleau, J. M. Peron, J. P. Chavoin, P. Bourin, L. Penicaud, L. Casteilla, L. Buscail and P. Cordelier (2009). "Adult stromal cells derived from human adipose tissue provoke pancreatic cancer cell death both in vitro and in vivo." PLoS One **4**(7): e6278.

Crew, J. P., C. R. Jephcott and J. M. Reynard (2001). "Radiation-induced haemorrhagic cystitis." Eur Urol **40**(2): 111-123.

Crisan, M., S. Yap, L. Casteilla, C. W. Chen, M. Corselli, T. S. Park, G. Andriolo, B. Sun, B. Zheng, L. Zhang, C. Norotte, P. N. Teng, J. Traas, R. Schugar, B. M. Deasy, S. Badylak, H. J. Buhring, J. P. Giacobino, L. Lazzari, J. Huard and B. Peault (2008). "A perivascular origin for mesenchymal stem cells in multiple human organs." Cell Stem Cell **3**(3): 301-313.

Croitoru-Lamoury, J., F. M. Lamoury, J. J. Zaunders, L. A. Veas and B. J. Brew (2007). "Human mesenchymal stem cells constitutively express chemokines and chemokine receptors that can be upregulated by cytokines, IFN-beta, and Copaxone." J Interferon Cytokine Res **27**(1): 53-64.

Crosby, C. V., P. A. Fleming, W. S. Argraves, M. Corada, L. Zanetta, E. Dejana and C. J. Drake (2005). "VE-cadherin is not required for the formation of nascent blood vessels but acts to prevent their disassembly." Blood **105**(7): 2771-2776.

Cui, R., H. Rekasi, M. Hepner-Schefczyk, K. Fessmann, R. M. Petri, K. Bruderek, S. Brandau, M. Jager and S. B. Flohe (2016). "Human mesenchymal stromal/stem cells acquire immunostimulatory capacity upon cross-talk with natural killer cells and might improve the NK cell function of immunocompromised patients." Stem Cell Res Ther **7**(1): 88.

Curiel, T. J., G. Coukos, L. Zou, X. Alvarez, P. Cheng, P. Mottram, M. Evdemon-Hogan, J. R. Conejo-Garcia, L. Zhang, M. Burow, Y. Zhu, S. Wei, I. Kryczek, B. Daniel, A. Gordon, L. Myers, A. Lackner, M. L. Disis, K. L. Knutson, L. Chen and W. Zou (2004). "Specific recruitment of regulatory T cells in ovarian carcinoma fosters immune privilege and predicts reduced survival." Nat Med **10**(9): 942-949.

D'Souza, N., J. S. Burns, G. Grisendi, O. Candini, E. Veronesi, S. Piccinno, E. M. Horwitz, P. Paolucci, P. Conte and M. Dominici (2013). "MSC and Tumors: Homing, Differentiation, and Secretion Influence Therapeutic Potential." Adv Biochem Eng Biotechnol **130**: 209-266.

da Silva, A. F., K. Silva, L. A. Reis, V. P. Teixeira and N. Schor (2015). "Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stem Cells and Their Conditioned Medium Attenuate Fibrosis in an Irreversible Model of Unilateral Ureteral Obstruction." Cell Transplant **24**(12): 2657-2666.

da Silva Meirelles, L., P. C. Chagastelles and N. B. Nardi (2006). "Mesenchymal stem cells reside in virtually all post-natal organs and tissues." J Cell Sci **119**(Pt 11): 2204-2213.

Dabiri, G., A. Campaner, J. R. Morgan and L. Van De Water (2006). "A TGF-beta1-dependent autocrine loop regulates the structure of focal adhesions in hypertrophic scar fibroblasts." J Invest Dermatol **126**(5): 963-970.

Dai, C. and Y. Liu (2004). "Hepatocyte growth factor antagonizes the profibrotic action of TGF-beta1 in mesangial cells by stabilizing Smad transcriptional corepressor TGIF." J Am Soc Nephrol **15**(6): 1402-1412.

Daley, J. M., S. K. Brancato, A. A. Thomay, J. S. Reichner and J. E. Albina (2010). "The phenotype of murine wound macrophages." J Leukoc Biol **87**(1): 59-67.

Daniels, C. E., M. C. Wilkes, M. Edens, T. J. Kottom, S. J. Murphy, A. H. Limper and E. B. Leof (2004). "Imatinib mesylate inhibits the profibrogenic activity of TGF-beta and prevents bleomycin-mediated lung fibrosis." J Clin Invest **114**(9): 1308-1316.

Davies, M., M. Robinson, E. Smith, S. Huntley, S. Prime and I. Paterson (2005). "Induction of an epithelial to mesenchymal transition in human immortal and malignant keratinocytes by TGF-beta1 involves MAPK, Smad and AP-1 signalling pathways." J Cell Biochem **95**(5): 918-931.

De Bari, C., F. Dell'Accio, P. Tylzanowski and F. P. Luyten (2001). "Multipotent mesenchymal stem cells from adult human synovial membrane." Arthritis Rheum **44**(8): 1928-1942.

Decaens, C., R. Gautier, N. Daher, J. Bara and P. Burtin (1989). "Induction of rat intestinal carcinogenesis with single doses, low and high repeated doses of 1,2-dimethylhydrazine." Carcinogenesis **10**(1): 69-72.

Delaney, B., W. S. Koh, K. H. Yang, S. C. Strom and N. E. Kaminski (1993). "Hepatocyte growth factor enhances B-cell activity." Life Sci **53**(5): PL89-93.

DeMichele, M. A. and F. L. Minnear (1992). "Modulation of vascular endothelial permeability by thrombin." Semin Thromb Hemost **18**(3): 287-295.

Denham, J. W. and M. Hauer-Jensen (2002). "The radiotherapeutic injury--a complex 'wound'." Radiother Oncol **63**(2): 129-145.

Denham, J. W., M. Hauer-Jensen and L. J. Peters (2001). "Is it time for a new formalism to categorize normal tissue radiation injury?" Int J Radiat Oncol Biol Phys **50**(5): 1105-1106.

Dennler, S., S. Itoh, D. Vivien, P. ten Dijke, S. Huet and J. M. Gauthier (1998). "Direct binding of Smad3 and Smad4 to critical TGF beta-inducible elements in the promoter of human plasminogen activator inhibitor-type 1 gene." EMBO J **17**(11): 3091-3100.

Denton, A. S., H. J. Andreyev, A. Forbes and E. J. Maher (2002). "Systematic review for non-surgical interventions for the management of late radiation proctitis." Br J Cancer **87**(2): 134-143.

Derynck, R. and Y. E. Zhang (2003). "Smad-dependent and Smad-independent pathways in TGF-beta family signalling." Nature **425**(6958): 577-584.

Deryugina, E. I. and J. P. Quigley (2012). "Cell surface remodeling by plasmin: a new function for an old enzyme." J Biomed Biotechnol **2012**: 564259.

Desai, V. D., H. C. Hsia and J. E. Schwarzbauer (2014). "Reversible modulation of myofibroblast differentiation in adipose-derived mesenchymal stem cells." PLoS One **9**(1): e86865.

Deshmane, S. L., S. Kremlev, S. Amini and B. E. Sawaya (2009). "Monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1): an overview." J Interferon Cytokine Res **29**(6): 313-326.

Desmouliere, A., M. Redard, I. Darby and G. Gabbiani (1995). "Apoptosis mediates the decrease in cellularity during the transition between granulation tissue and scar." Am J Pathol **146**(1): 56-66.

Dexter, T. M., T. D. Allen and L. G. Lajtha (1977). "Conditions controlling the proliferation of haemopoietic stem cells in vitro." J Cell Physiol **91**(3): 335-344.

Di Ianni, M., B. Del Papa, M. De Ioanni, L. Moretti, E. Bonifacio, D. Cecchini, P. Sportoletti, F. Falzetti and A. Tabilio (2008). "Mesenchymal cells recruit and regulate T regulatory cells." Exp Hematol **36**(3): 309-318.

Di Nicola, M., C. Carlo-Stella, M. Magni, M. Milanesi, P. D. Longoni, P. Matteucci, S. Grisanti and A. M. Gianni (2002). "Human bone marrow stromal cells suppress T-lymphocyte proliferation induced by cellular or nonspecific mitogenic stimuli." Blood **99**(10): 3838-3843.

Di Sario, A., E. Bendia, G. Macarri, C. Candelaresi, S. Taffetani, M. Marzioni, A. Omenetti, S. De Minicis, L. Trozzi and A. Benedetti (2004). "The anti-fibrotic effect of pirfenidone in rat liver fibrosis is mediated by downregulation of procollagen alpha1(I), TIMP-1 and MMP-2." Dig Liver Dis **36**(11): 744-751.

Diaz-Montero, C. M., M. L. Salem, M. I. Nishimura, E. Garrett-Mayer, D. J. Cole and A. J. Montero (2009). "Increased circulating myeloid-derived suppressor cells correlate with clinical cancer stage, metastatic tumor burden, and doxorubicin-cyclophosphamide chemotherapy." Cancer Immunol Immunother **58**(1): 49-59.

Diederichsen, A. C., J. E. Moller, P. Thayssen, L. Videbaek, S. G. Saekmose, T. Barington and M. Kassem (2010). "Changes in left ventricular filling patterns after repeated injection of autologous bone marrow cells in heart failure patients." Scand Cardiovasc J **44**(3): 139-145.

Dignass, A. U. (2001). "Mechanisms and modulation of intestinal epithelial repair." Inflamm Bowel Dis **7**(1): 68-77.

Direkze, N. C., K. Hodivala-Dilke, R. Jeffery, T. Hunt, R. Poulsom, D. Oukrif, M. R. Alison and N. A. Wright (2004). "Bone marrow contribution to tumor-associated myofibroblasts and fibroblasts." Cancer Res **64**(23): 8492-8495.

Distler, J. H., A. Jungel, L. C. Huber, U. Schulze-Horsel, J. Zwerina, R. E. Gay, B. A. Michel, T. Hauser, G. Schett, S. Gay and O. Distler (2007). "Imatinib mesylate reduces production of

extracellular matrix and prevents development of experimental dermal fibrosis." Arthritis Rheum **56**(1): 311-322.

Dominici, M., K. Le Blanc, I. Mueller, I. Slaper-Cortenbach, F. Marini, D. Krause, R. Deans, A. Keating, D. Prockop and E. Horwitz (2006). "Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement." Cytotherapy **8**(4): 315-317.

Doucet, C., D. Brouty-Boye, C. Pottin-Clemenceau, G. W. Canonica, C. Jasmin and B. Azzarone (1998). "Interleukin (IL) 4 and IL-13 act on human lung fibroblasts. Implication in asthma." J Clin Invest **101**(10): 2129-2139.

Dubaybo, B. A. and L. A. Thet (1990). "Effect of transforming growth factor beta on synthesis of glycosaminoglycans by human lung fibroblasts." Exp Lung Res **16**(5): 389-403.

Duffield, J. S., M. Lupher, V. J. Thannickal and T. A. Wynn (2013). "Host responses in tissue repair and fibrosis." Annu Rev Pathol **8**: 241-276.

Duijvestein, M., A. C. Vos, H. Roelofs, M. E. Wildenberg, B. B. Wendrich, H. W. Verspaget, E. M. Kooy-Winkelaar, F. Koning, J. J. Zwaginga, H. H. Fidder, A. P. Verhaar, W. E. Fibbe, G. R. van den Brink and D. W. Hommes (2010). "Autologous bone marrow-derived mesenchymal stromal cell treatment for refractory luminal Crohn's disease: results of a phase I study." Gut **59**(12): 1662-1669.

Duijvestein, M., M. E. Wildenberg, M. M. Welling, S. Hennink, I. Molendijk, V. L. van Zuylen, T. Bosse, A. C. Vos, E. S. de Jonge-Muller, H. Roelofs, L. van der Weerd, H. W. Verspaget, W. E. Fibbe, A. A. te Velde, G. R. van den Brink and D. W. Hommes (2011). "Pretreatment with interferon-gamma enhances the therapeutic activity of mesenchymal stromal cells in animal models of colitis." Stem Cells **29**(10): 1549-1558.

Durand, C., S. Pezet, H. Eutamene, C. Demarquay, N. Mathieu, L. Moussa, R. Daudin, V. Holler, J. C. Sabourin, F. Milliat, A. Francois, V. Theodorou, R. Tamarat, M. Benderitter and A. Semont (2015). "Persistent visceral allodynia in rats exposed to colorectal irradiation is reversed by mesenchymal stromal cell treatment." Pain **156**(8): 1465-1476.

Ebrahimi, B., A. Eirin, Z. Li, X. Y. Zhu, X. Zhang, A. Lerman, S. C. Textor and L. O. Lerman (2013). "Mesenchymal stem cells improve medullary inflammation and fibrosis after revascularization of swine atherosclerotic renal artery stenosis." PLoS One **8**(7): e67474.

Edlund, S., S. Bu, N. Schuster, P. Aspenstrom, R. Heuchel, N. E. Heldin, P. ten Dijke, C. H. Heldin and M. Landstrom (2003). "Transforming growth factor-beta1 (TGF-beta)-induced apoptosis of prostate cancer cells involves Smad7-dependent activation of p38 by TGF-beta-activated kinase 1 and mitogen-activated protein kinase kinase 3." Mol Biol Cell **14**(2): 529-544.

Edlund, S., M. Landstrom, C. H. Heldin and P. Aspenstrom (2002). "Transforming growth factor-beta-induced mobilization of actin cytoskeleton requires signaling by small GTPases Cdc42 and RhoA." Mol Biol Cell **13**(3): 902-914.

Egeblad, M., E. S. Nakasone and Z. Werb (2010). "Tumors as organs: complex tissues that interface with the entire organism." Dev Cell **18**(6): 884-901.

Eid, J. E. and C. B. Garcia (2015). "Reprogramming of mesenchymal stem cells by oncogenes." Semin Cancer Biol **32**: 18-31.

Ellis, I. R. and S. L. Schor (1996). "Differential effects of TGF-beta1 on hyaluronan synthesis by fetal and adult skin fibroblasts: implications for cell migration and wound healing." Exp Cell Res **228**(2): 326-333.

Emura, M., A. Ochiai, M. Horino, W. Arndt, K. Kamino and S. Hirohashi (2000). "Development of myofibroblasts from human bone marrow mesenchymal stem cells cocultured with human colon carcinoma cells and TGF beta 1." In Vitro Cell Dev Biol Anim **36**(2): 77-80.

Estes, J. D., S. Wietgrefe, T. Schacker, P. Southern, G. Beilman, C. Reilly, J. M. Milush, J. D. Lifson, D. L. Sodora, J. V. Carlis and A. T. Haase (2007). "Simian immunodeficiency virus-induced lymphatic tissue fibrosis is mediated by transforming growth factor beta 1-positive regulatory T cells and begins in early infection." J Infect Dis **195**(4): 551-561.

Evanko, S. P., S. Potter-Perigo, L. J. Petty, G. A. Workman and T. N. Wight (2015). "Hyaluronan Controls the Deposition of Fibronectin and Collagen and Modulates TGF-beta1 Induction of Lung Myofibroblasts." Matrix Biol **42**: 74-92.

Ewida, S. F., A. G. Abdou, A. A. El-Rasol Elhosary and S. A. El-Ghane Metawe (2016). "Hepatocyte-like Versus Mesenchymal Stem Cells in CCl4-induced Liver Fibrosis." Appl Immunohistochem Mol Morphol.

Eyden, B., A. Curry and G. Wang (2011). "Stromal cells in the human gut show ultrastructural features of fibroblasts and smooth muscle cells but not myofibroblasts." J Cell Mol Med **15**(7): 1483-1491.

Fallowfield, J. A., M. Mizuno, T. J. Kendall, C. M. Constandinou, R. C. Benyon, J. S. Duffield and J. P. Iredale (2007). "Scar-associated macrophages are a major source of hepatic matrix metalloproteinase-13 and facilitate the resolution of murine hepatic fibrosis." J Immunol **178**(8): 5288-5295.

Fang, B., M. Shi, L. Liao, S. Yang, Y. Liu and R. C. Zhao (2004). "Systemic infusion of FLK1(+) mesenchymal stem cells ameliorate carbon tetrachloride-induced liver fibrosis in mice." Transplantation **78**(1): 83-88.

Feng, W., W. Li, W. Liu, F. Wang, Y. Li and W. Yan (2009). "IL-17 induces myocardial fibrosis and enhances RANKL/OPG and MMP/TIMP signaling in isoproterenol-induced heart failure." Exp Mol Pathol **87**(3): 212-218.

Fessler, E., F. E. Dijkgraaf, E. M. F. De Sousa and J. P. Medema (2013). "Cancer stem cell dynamics in tumor progression and metastasis: is the microenvironment to blame?" Cancer Lett **341**(1): 97-104.

Fevr, T., S. Robine, D. Louvard and J. Huelsken (2007). "Wnt/beta-catenin is essential for intestinal homeostasis and maintenance of intestinal stem cells." Mol Cell Biol **27**(21): 7551-7559.

Fikry, E. M., M. M. Safar, W. A. Hasan, H. M. Fawzy and E. E. El-Denshary (2015). "Bone Marrow and Adipose-Derived Mesenchymal Stem Cells Alleviate Methotrexate-Induced Pulmonary Fibrosis in Rat: Comparison with Dexamethasone." J Biochem Mol Toxicol **29**(7): 321-329.

Fiore, E. J., J. M. Bayo, M. G. Garcia, M. Malvicini, R. Lloyd, F. Piccioni, M. Rizzo, E. Peixoto, M. B. Sola, C. Atorrasagasti, L. Alaniz, M. A. Camilletti, M. Enguita, J. Prieto, J. B. Aquino and G. Mazzolini (2015). "Mesenchymal stromal cells engineered to produce IGF-I by recombinant adenovirus ameliorate liver fibrosis in mice." Stem Cells Dev **24**(6): 791-801.

Flanders, K. C., B. M. Ho, P. R. Arany, C. Stuelten, M. Mamura, M. O. Paterniti, A. Sowers, J. B. Mitchell and A. B. Roberts (2008). "Absence of Smad3 induces neutrophil migration after cutaneous irradiation: possible contribution to subsequent radioprotection." Am J Pathol **173**(1): 68-76.

Forbes, G. M., M. J. Sturm, R. W. Leong, M. P. Sparrow, D. Segarajasingam, A. G. Cummins, M. Phillips and R. P. Herrmann (2014). "A phase 2 study of allogeneic mesenchymal stromal cells for luminal Crohn's disease refractory to biologic therapy." Clin Gastroenterol Hepatol **12**(1): 64-71.

Fouillard, L., M. Bensidhoum, D. Bories, H. Bonte, M. Lopez, A. M. Moseley, A. Smith, S. Lesage, F. Beaujean, D. Thierry, P. Gourmelon, A. Najman and N. C. Gorin (2003). "Engraftment of allogeneic mesenchymal stem cells in the bone marrow of a patient with severe idiopathic aplastic anemia improves stroma." Leukemia **17**(2): 474-476.

Fouillard, L., A. Chapel, D. Bories, S. Bouchet, J. M. Costa, H. Rouard, P. Herve, P. Gourmelon, D. Thierry, M. Lopez and N. C. Gorin (2007). "Infusion of allogeneic-related HLA mismatched mesenchymal stem cells for the treatment of incomplete engraftment following autologous haematopoietic stem cell transplantation." Leukemia **21**(3): 568-570.

Fouillard, L., S. Francois, S. Bouchet, M. Bensidhoum, A. Elm'selmi and A. Chapel (2013). "Innovative cell therapy in the treatment of serious adverse events related to both chemo-radiotherapy protocol and acute myeloid leukemia syndrome: the infusion of mesenchymal stem cells post-treatment reduces hematopoietic toxicity and promotes hematopoietic reconstitution." Curr Pharm Biotechnol **14**(9): 842-848.

Francavilla, A., N. L. Vujanovic, L. Polimeno, A. Azzarone, A. Iacobellis, A. Deleo, M. Hagiya, T. L. Whiteside and T. E. Starzl (1997). "The in vivo effect of hepatotrophic factors augmenter of liver regeneration, hepatocyte growth factor, and insulin-like growth factor-II on liver natural killer cell functions." Hepatology **25**(2): 411-415.

Francois, A., F. Milliat, O. Guipaud and M. Benderitter (2013). "Inflammation and immunity in radiation damage to the gut mucosa." Biomed Res Int **2013**: 123241.

Francois, M., E. Birman, K. A. Forner, L. Gaboury and J. Galipeau (2012). "Adoptive transfer of mesenchymal stromal cells accelerates intestinal epithelium recovery of irradiated mice in an interleukin-6-dependent manner." Cytotherapy **14**(10): 1164-1170.

Francois, M., R. Romieu-Mourez, M. Li and J. Galipeau (2012). "Human MSC suppression correlates with cytokine induction of indoleamine 2,3-dioxygenase and bystander M2 macrophage differentiation." Mol Ther **20**(1): 187-195.

Francois, S., M. Bensidhoum, M. Mouiseddine, C. Mazurier, B. Allenet, A. Semont, J. Frick, A. Sache, S. Bouchet, D. Thierry, P. Gourmelon, N. C. Gorin and A. Chapel (2006). "Local irradiation not only induces homing of human mesenchymal stem cells at exposed sites but promotes their widespread engraftment to multiple organs: a study of their quantitative distribution after irradiation damage." Stem Cells **24**(4): 1020-1029.

Francois, S., M. Mouiseddine, B. Allenet-Lepage, J. Voswinkel, L. Douay, M. Benderitter and A. Chapel (2014). "Human mesenchymal stem cells provide protection against radiation-induced liver injury by antioxidative process, vasculature protection, hepatocyte differentiation, and trophic effects." Biomed Res Int **2013**: 151679.

Franquesa, M., E. Herrero, J. Torras, E. Ripoll, M. Flaquer, M. Goma, N. Lloberas, I. Anegon, J. M. Cruzado, J. M. Grinyo and I. Herrero-Fresneda (2012). "Mesenchymal stem cell therapy prevents interstitial fibrosis and tubular atrophy in a rat kidney allograft model." Stem Cells Dev **21**(17): 3125-3135.

Frazier, K., S. Williams, D. Kothapalli, H. Klapper and G. R. Grotendorst (1996). "Stimulation of fibroblast cell growth, matrix production, and granulation tissue formation by connective tissue growth factor." J Invest Dermatol **107**(3): 404-411.

Frazzoni, L., M. La Marca, A. Guido, A. G. Morganti, F. Bazzoli and L. Fuccio (2015). "Pelvic radiation disease: Updates on treatment options." World J Clin Oncol **6**(6): 272-280.

Friedenstein, A. J., R. K. Chailakhyan and U. V. Gerasimov (1987). "Bone marrow osteogenic stem cells: in vitro cultivation and transplantation in diffusion chambers." Cell Tissue Kinet **20**(3): 263-272.

Friedenstein, A. J., J. F. Gorskaja and N. N. Kulagina (1976). "Fibroblast precursors in normal and irradiated mouse hematopoietic organs." Exp Hematol **4**(5): 267-274.

Friedenstein, A. J., K. V. Petrakova, A. I. Kurolesova and G. P. Frolova (1968). "Heterotopic of bone marrow. Analysis of precursor cells for osteogenic and hematopoietic tissues." Transplantation **6**(2): 230-247.

Friedenstein, A. J., S. Piatetzky, II and K. V. Petrakova (1966). "Osteogenesis in transplants of bone marrow cells." J Embryol Exp Morphol **16**(3): 381-390.

Friedman, S. L. (2008). "Mechanisms of hepatic fibrogenesis." Gastroenterology **134**(6): 1655-1669.

Funaba, M., C. M. Zimmerman and L. S. Mathews (2002). "Modulation of Smad2-mediated signaling by extracellular signal-regulated kinase." J Biol Chem **277**(44): 41361-41368.

Galli, S. J., N. Borregaard and T. A. Wynn (2011). "Phenotypic and functional plasticity of cells of innate immunity: macrophages, mast cells and neutrophils." Nat Immunol **12**(11): 1035-1044.

Galligan, C. L. and E. N. Fish (2013). "The role of circulating fibrocytes in inflammation and autoimmunity." J Leukoc Biol **93**(1): 45-50.

Gallo, S., V. Sala, S. Gatti and T. Crepaldi (2015). "Cellular and molecular mechanisms of HGF/Met in the cardiovascular system." Clin Sci (Lond) **129**(12): 1173-1193.

Gangji, V., J. P. Hauzeur, C. Matos, V. De Maertelaer, M. Toungouz and M. Lambermont (2004). "Treatment of osteonecrosis of the femoral head with implantation of autologous bone-marrow cells. A pilot study." J Bone Joint Surg Am **86-A**(6): 1153-1160.

Gao, Z., Q. Zhang, Y. Han, X. Cheng, Y. Lu, L. Fan and Z. Wu (2012). "Mesenchymal stromal cell-conditioned medium prevents radiation-induced small intestine injury in mice." Cytotherapy **14**(3): 267-273.

Garcia-Olmo, D., M. Garcia-Arranz, D. Herreros, I. Pascual, C. Peiro and J. A. Rodriguez-Montes (2005). "A phase I clinical trial of the treatment of Crohn's fistula by adipose mesenchymal stem cell transplantation." Dis Colon Rectum **48**(7): 1416-1423.

Garcia-Olmo, D., D. Herreros, I. Pascual, J. A. Pascual, E. Del-Valle, J. Zorrilla, P. De-La-Quintana, M. Garcia-Arranz and M. Pascual (2009). "Expanded adipose-derived stem cells for the treatment of complex perianal fistula: a phase II clinical trial." Dis Colon Rectum **52**(1): 79-86.

Gasperini, P., G. Espigol-Frigole, P. J. McCormick, O. Salvucci, D. Maric, T. S. Uldrick, M. N. Polizzotto, R. Yarchoan and G. Tosato (2012). "Kaposi sarcoma herpesvirus promotes endothelial-to-mesenchymal transition through Notch-dependent signaling." Cancer Res **72**(5): 1157-1169.

Gasse, P., N. Riteau, R. Vacher, M. L. Michel, A. Fautrel, F. di Padova, L. Fick, S. Charron, V. Lagente, G. Eberl, M. Le Bert, V. F. Quesniaux, F. Huaux, M. Leite-de-Moraes, B. Ryffel and I. Couillin (2011). "IL-1 and IL-23 mediate early IL-17A production in pulmonary inflammation leading to late fibrosis." PLoS One **6**(8): e23185.

Gatti, S., S. Bruno, M. C. Deregibus, A. Sordi, V. Cantaluppi, C. Tetta and G. Camussi (2011). "Microvesicles derived from human adult mesenchymal stem cells protect against ischaemia-reperfusion-induced acute and chronic kidney injury." Nephrol Dial Transplant **26**(5): 1474-1483.

Gazdhar, A., N. Susuri, K. Hostettler, M. Gugger, L. Knudsen, M. Roth, M. Ochs and T. Geiser (2013). "HGF Expressing Stem Cells in Usual Interstitial Pneumonia Originate from the Bone Marrow and Are Antifibrotic." PLoS One **8**(6): e65453.

Getting, S. J., D. J. Mahoney, T. Cao, M. S. Rugg, E. Fries, C. M. Milner, M. Perretti and A. J. Day (2002). "The link module from human TSG-6 inhibits neutrophil migration in a hyaluronan- and inter-alpha -inhibitor-independent manner." J Biol Chem **277**(52): 51068-51076.

Ghoreschi, K., A. Laurence, X. P. Yang, C. M. Tato, M. J. McGeachy, J. E. Konkel, H. L. Ramos, L. Wei, T. S. Davidson, N. Bouladoux, J. R. Grainger, Q. Chen, Y. Kanno, W. T. Watford, H. W. Sun, G. Eberl, E. M. Shevach, Y. Belkaid, D. J. Cua, W. Chen and J. J. O'Shea (2010). "Generation of pathogenic T(H)17 cells in the absence of TGF-beta signalling." Nature **467**(7318): 967-971.

Giannopoulou, M., C. Dai, X. Tan, X. Wen, G. K. Michalopoulos and Y. Liu (2008). "Hepatocyte growth factor exerts its anti-inflammatory action by disrupting nuclear factor-kappaB signaling." Am J Pathol **173**(1): 30-41.

Gimble, J. M., A. J. Katz and B. A. Bunnell (2007). "Adipose-derived stem cells for regenerative medicine." Circ Res **100**(9): 1249-1260.

Glant, T. T., R. V. Kamath, T. Bardos, I. Gal, S. Szanto, Y. M. Murad, J. D. Sandy, J. S. Mort, P. J. Roughley and K. Mikecz (2002). "Cartilage-specific constitutive expression of TSG-6 protein (product of tumor necrosis factor alpha-stimulated gene 6) provides a chondroprotective, but not antiinflammatory, effect in antigen-induced arthritis." Arthritis Rheum **46**(8): 2207-2218.

Glennie, S., I. Soeiro, P. J. Dyson, E. W. Lam and F. Dazzi (2005). "Bone marrow mesenchymal stem cells induce division arrest anergy of activated T cells." Blood **105**(7): 2821-2827.

Gonzalez, M. A., E. Gonzalez-Rey, L. Rico, D. Buscher and M. Delgado (2009). "Treatment of experimental arthritis by inducing immune tolerance with human adipose-derived mesenchymal stem cells." Arthritis Rheum **60**(4): 1006-1019.

Good, R. B., A. J. Gilbane, S. L. Trinder, C. P. Denton, G. Coghlan, D. J. Abraham and A. M. Holmes (2015). "Endothelial to Mesenchymal Transition Contributes to Endothelial Dysfunction in Pulmonary Arterial Hypertension." Am J Pathol **185**(7): 1850-1858.

Gordon, S. (2003). "Alternative activation of macrophages." Nat Rev Immunol **3**(1): 23-35.

Goumans, M. J., A. J. van Zonneveld and P. ten Dijke (2008). "Transforming growth factor beta-induced endothelial-to-mesenchymal transition: a switch to cardiac fibrosis?" Trends Cardiovasc Med **18**(8): 293-298.

Graham, M. F. (1995). "Pathogenesis of intestinal strictures in Crohn's disease-an update." Inflamm Bowel Dis **1**(3): 220-227.

Graham, M. F., G. R. Bryson and R. F. Diegelmann (1990). "Transforming growth factor beta 1 selectively augments collagen synthesis by human intestinal smooth muscle cells." Gastroenterology **99**(2): 447-453.

Gratchev, A., J. Kzhyshkowska, S. Kannookadan, M. Ochsenreiter, A. Popova, X. Yu, S. Mamidi, E. Stonehouse-Usselmann, I. Muller-Molinet, L. Gooi and S. Goerdt (2008). "Activation of a TGF-beta-specific multistep gene expression program in mature macrophages requires glucocorticoid-mediated surface expression of TGF-beta receptor II." J Immunol **180**(10): 6553-6565.

Greenhalgh, S. N., J. P. Iredale and N. C. Henderson (2013). "Origins of fibrosis: pericytes take centre stage." F1000Prime Rep **5**: 37.

Gregorini, M., V. Corradetti, C. Rocca, E. F. Pattonieri, T. Valsania, S. Milanesi, N. Serpieri, G. Bedino, P. Esposito, C. Libetta, M. A. Avanzini, M. Mantelli, D. Ingo, S. Peressini, R. Albertini, A. Dal Canton and T. Rampino (2016). "Mesenchymal Stromal Cells Prevent Renal Fibrosis in a Rat Model of Unilateral Ureteral Obstruction by Suppressing the Renin-Angiotensin System via HuR." PLoS One **11**(2): e0148542.

Gremy, O., M. Benderitter and C. Linard (2008). "Acute and persisting Th2-like immune response after fractionated colorectal gamma-irradiation." World J Gastroenterol **14**(46): 7075-7085.

Groh, M. E., B. Maitra, E. Szekely and O. N. Koc (2005). "Human mesenchymal stem cells require monocyte-mediated activation to suppress alloreactive T cells." Exp Hematol **33**(8): 928-934.

Guadalajara, H., D. Herreros, P. De-La-Quintana, J. Trebol, M. Garcia-Arranz and D. Garcia-Olmo (2012). "Long-term follow-up of patients undergoing adipose-derived adult stem cell administration to treat complex perianal fistulas." Int J Colorectal Dis **27**(5): 595-600.

Guiho, R., K. Biteau, G. Grisendi, J. Taurelle, M. Chatelais, M. Gantier, D. Heymann, M. Dominici and F. Redini (2016). "TRAIL delivered by mesenchymal stromal/stem cells counteracts tumor development in orthotopic Ewing sarcoma models." Int J Cancer **139**(12): 2802-2811.

Gurzu, S., C. Silveanu, A. Fetyko, V. Butiurca, Z. Kovacs and I. Jung (2016). "Systematic review of the old and new concepts in the epithelial-mesenchymal transition of colorectal cancer." World J Gastroenterol **22**(30): 6764-6775.

Haldar, S., C. Dru and N. A. Bhowmick (2014). "Mechanisms of hemorrhagic cystitis." Am J Clin Exp Urol **2**(3): 199-208.

Hallahan, D., E. T. Clark, J. Kuchibhotla, B. L. Gewertz and T. Collins (1995). "E-selectin gene induction by ionizing radiation is independent of cytokine induction." Biochem Biophys Res Commun **217**(3): 784-795.

Hallahan, D. E., L. Geng and Y. Shyr (2002). "Effects of intercellular adhesion molecule 1 (ICAM-1) null mutation on radiation-induced pulmonary fibrosis and respiratory insufficiency in mice." J Natl Cancer Inst **94**(10): 733-741.

Han, G., H. Zhang, C. H. Xie and Y. F. Zhou (2011). "Th2-like immune response in radiation-induced lung fibrosis." Oncol Rep **26**(2): 383-388.

Hanabayashi, M., N. Takahashi, Y. Sobue, S. Hirabara, N. Ishiguro and T. Kojima (2016). "Hyaluronan Oligosaccharides Induce MMP-1 and -3 via Transcriptional Activation of NF-kappaB and p38 MAPK in Rheumatoid Synovial Fibroblasts." PLoS One **11**(8): e0161875.

Hanna, J., M. Wernig, S. Markoulaki, C. W. Sun, A. Meissner, J. P. Cassady, C. Beard, T. Brambrink, L. C. Wu, T. M. Townes and R. Jaenisch (2007). "Treatment of sickle cell anemia mouse model with iPS cells generated from autologous skin." Science **318**(5858): 1920-1923.

Hanson, B., R. MacDonald and A. Shaukat (2012). "Endoscopic and medical therapy for chronic radiation proctopathy: a systematic review." Dis Colon Rectum **55**(10): 1081-1095.

Hare, J. M., J. E. Fishman, G. Gerstenblith, D. L. DiFede Velazquez, J. P. Zambrano, V. Y. Suncion, M. Tracy, E. Ghersin, P. V. Johnston, J. A. Brinker, E. Breton, J. Davis-Sproul, I. H. Schulman, J. Byrnes, A. M. Mendizabal, M. H. Lowery, D. Rouy, P. Altman, C. Wong Po Foo, P. Ruiz, A. Amador, J. Da Silva, I. K. McNiece, A. W. Heldman, R. George and A. Lardo (2012). "Comparison of allogeneic vs autologous bone marrow-derived mesenchymal stem cells delivered by transendocardial injection in patients with ischemic cardiomyopathy: the POSEIDON randomized trial." JAMA **308**(22): 2369-2379.

Hare, J. M., J. H. Traverse, T. D. Henry, N. Dib, R. K. Strumpf, S. P. Schulman, G. Gerstenblith, A. N. DeMaria, A. E. Denktas, R. S. Gammon, J. B. Hermiller, Jr., M. A. Reisman, G. L. Schaer and W. Sherman (2009). "A randomized, double-blind, placebo-controlled, dose-escalation study of intravenous adult human mesenchymal stem cells (prochymal) after acute myocardial infarction." J Am Coll Cardiol **54**(24): 2277-2286.

Hartsough, M. T. and K. M. Mulder (1995). "Transforming growth factor beta activation of p44mapk in proliferating cultures of epithelial cells." J Biol Chem **270**(13): 7117-7124.

Hass, R. (2009). "Retrodifferentiation--a mechanism for cellular regeneration?" Biol Chem **390**(5-6): 409-416.

Hass, R. and A. Otte (2012). "Mesenchymal stem cells as all-round supporters in a normal and neoplastic microenvironment." Cell Commun Signal **10**(1): 26.

Hauer-Jensen, M., J. W. Denham and H. J. Andreyev (2014). "Radiation enteropathy--pathogenesis, treatment and prevention." Nat Rev Gastroenterol Hepatol **11**(8): 470-479.

Hauer-Jensen, M., K. K. Richter, J. Wang, E. Abe, C. C. Sung and J. W. Hardin (1998). "Changes in transforming growth factor beta1 gene expression and immunoreactivity levels during development of chronic radiation enteropathy." Radiat Res **150**(6): 673-680.

Hausmann, M., F. Obermeier, K. Schreiter, T. Spottl, W. Falk, J. Scholmerich, H. Herfarth, P. Saftig and G. Rogler (2004). "Cathepsin D is up-regulated in inflammatory bowel disease macrophages." Clin Exp Immunol **136**(1): 157-167.

Haydont, V., C. Bourgier and M. C. Vozenin-Brotons (2007). "Rho/ROCK pathway as a molecular target for modulation of intestinal radiation-induced toxicity." Br J Radiol **80 Spec No 1**: S32-40.

Haydont, V., D. Mathe, C. Bourgier, J. Abdelali, J. Aigueperse, J. Bourhis and M. C. Vozenin-Brotons (2005). "Induction of CTGF by TGF-beta1 in normal and radiation enteritis human smooth muscle cells: Smad/Rho balance and therapeutic perspectives." Radiother Oncol **76**(2): 219-225.

Haydont, V. and M. C. Vozenin-Brotons (2007). "Maintenance of radiation-induced intestinal fibrosis: cellular and molecular features." World J Gastroenterol **13**(19): 2675-2683.

Haynesworth, S. E., M. A. Baber and A. I. Caplan (1996). "Cytokine expression by human marrow-derived mesenchymal progenitor cells in vitro: effects of dexamethasone and IL-1 alpha." J Cell Physiol **166**(3): 585-592.

He, X. W., X. S. He, L. Lian, X. J. Wu and P. Lan (2012). "Systemic infusion of bone marrow-derived mesenchymal stem cells for treatment of experimental colitis in mice." Dig Dis Sci **57**(12): 3136-3144.

Heldin, P., T. C. Laurent and C. H. Heldin (1989). "Effect of growth factors on hyaluronan synthesis in cultured human fibroblasts." Biochem J **258**(3): 919-922.

Heldring, N., I. Mager, M. J. Wood, K. Le Blanc and S. E. Andaloussi (2015). "Therapeutic Potential of Multipotent Mesenchymal Stromal Cells and Their Extracellular Vesicles." Hum Gene Ther **26**(8): 506-517.

Heller, F., I. J. Fuss, E. E. Nieuwenhuis, R. S. Blumberg and W. Strober (2002). "Oxazolone colitis, a Th2 colitis model resembling ulcerative colitis, is mediated by IL-13-producing NK-T cells." Immunity **17**(5): 629-638.

Herbert, D. R., C. Holscher, M. Mohrs, B. Arendse, A. Schwegmann, M. Radwanska, M. Leeto, R. Kirsch, P. Hall, H. Mossmann, B. Claussen, I. Forster and F. Brombacher (2004). "Alternative macrophage activation is essential for survival during schistosomiasis and downmodulates T helper 1 responses and immunopathology." Immunity **20**(5): 623-635.

Hernigou, P., A. Poignard, F. Beaujean and H. Rouard (2005). "Percutaneous autologous bone-marrow grafting for nonunions. Influence of the number and concentration of progenitor cells." J Bone Joint Surg Am **87**(7): 1430-1437.

Herreros, M. D., M. Garcia-Arranz, H. Guadalajara, P. De-La-Quintana, D. Garcia-Olmo and F. C. Group (2012). "Autologous expanded adipose-derived stem cells for the treatment of complex

cryptoglandular perianal fistulas: a phase III randomized clinical trial (FATT 1: fistula Advanced Therapy Trial 1) and long-term evaluation." Dis Colon Rectum **55**(7): 762-772.

Heusinger-Ribeiro, J., M. Eberlein, N. A. Wahab and M. Goppelt-Struebe (2001). "Expression of connective tissue growth factor in human renal fibroblasts: regulatory roles of RhoA and cAMP." J Am Soc Nephrol **12**(9): 1853-1861.

Hinz, B., D. Mastrangelo, C. E. Iselin, C. Chaponnier and G. Gabbiani (2001). "Mechanical tension controls granulation tissue contractile activity and myofibroblast differentiation." Am J Pathol **159**(3): 1009-1020.

Hinz, B., S. H. Phan, V. J. Thannickal, A. Galli, M. L. Bochaton-Piallat and G. Gabbiani (2007). "The myofibroblast: one function, multiple origins." Am J Pathol **170**(6): 1807-1816.

Ho, I. A., H. C. Toh, W. H. Ng, Y. L. Teo, C. M. Guo, K. M. Hui and P. Y. Lam (2013). "Human bone marrow-derived mesenchymal stem cells suppress human glioma growth through inhibition of angiogenesis." Stem Cells **31**(1): 146-155.

Honczarenko, M., Y. Le, M. Swierkowski, I. Ghiran, A. M. Glodek and L. E. Silberstein (2006). "Human bone marrow stromal cells express a distinct set of biologically functional chemokine receptors." Stem Cells **24**(4): 1030-1041.

Hong, J. J., W. Park and E. D. Ehrenpreis (2001). "Review article: current therapeutic options for radiation proctopathy." Aliment Pharmacol Ther **15**(9): 1253-1262.

Horton, J. A., K. E. Hudak, E. J. Chung, A. O. White, B. T. Scroggins, J. F. Burkeen and D. E. Citrin (2013). "Mesenchymal stem cells inhibit cutaneous radiation-induced fibrosis by suppressing chronic inflammation." Stem Cells **31**(10): 2231-2241.

Horwitz, E. M., K. Le Blanc, M. Dominici, I. Mueller, I. Slaper-Cortenbach, F. C. Marini, R. J. Deans, D. S. Krause and A. Keating (2005). "Clarification of the nomenclature for MSC: The International Society for Cellular Therapy position statement." Cytotherapy **7**(5): 393-395.

Huang, R. Y., P. Guilford and J. P. Thiery (2012). "Early events in cell adhesion and polarity during epithelial-mesenchymal transition." J Cell Sci **125**(Pt 19): 4417-4422.

Humphreys, B. D., S. L. Lin, A. Kobayashi, T. E. Hudson, B. T. Nowlin, J. V. Bonventre, M. T. Valerius, A. P. McMahon and J. S. Duffield (2010). "Fate tracing reveals the pericyte and not epithelial origin of myofibroblasts in kidney fibrosis." Am J Pathol **176**(1): 85-97.

Humphries, A. and N. A. Wright (2008). "Colonic crypt organization and tumorigenesis." Nat Rev Cancer **8**(6): 415-424.

Hung, S. C., H. Cheng, C. Y. Pan, M. J. Tsai, L. S. Kao and H. L. Ma (2002). "In vitro differentiation of size-sieved stem cells into electrically active neural cells." Stem Cells **20**(6): 522-529.

Hung, S. C., R. R. Pochampally, S. C. Chen, S. C. Hsu and D. J. Prockop (2007). "Angiogenic effects of human multipotent stromal cell conditioned medium activate the PI3K-Akt pathway in hypoxic endothelial cells to inhibit apoptosis, increase survival, and stimulate angiogenesis." Stem Cells **25**(9): 2363-2370.

Husebye, E., M. Hauer-Jensen, K. Kjorstad and V. Skar (1994). "Severe late radiation enteropathy is characterized by impaired motility of proximal small intestine." Dig Dis Sci **39**(11): 2341-2349.

Huuskes, B. M., A. F. Wise, A. J. Cox, E. X. Lim, N. L. Payne, D. J. Kelly, C. S. Samuel and S. D. Ricardo (2015). "Combination therapy of mesenchymal stem cells and serelaxin effectively attenuates renal fibrosis in obstructive nephropathy." FASEB J **29**(2): 540-553.

Huynh, M. L., V. A. Fadok and P. M. Henson (2002). "Phosphatidylserine-dependent ingestion of apoptotic cells promotes TGF-beta1 secretion and the resolution of inflammation." J Clin Invest **109**(1): 41-50.

Hwa Cho, H., Y. C. Bae and J. S. Jung (2006). "Role of toll-like receptors on human adipose-derived stromal cells." Stem Cells **24**(12): 2744-2752.

Ilic, D., L. Devito, C. Miere and S. Codognotto (2015). "Human embryonic and induced pluripotent stem cells in clinical trials." Br Med Bull **116**: 19-27.

Ilic, D. and C. Ogilvie (2016). "Human Embryonic Stem Cells-What Have We Done? What Are We Doing? Where Are We Going?" Stem Cells.

Ishikane, S., H. Hosoda, K. Yamahara, Y. Akitake, J. Kyoungsook, K. Mishima, K. Iwasaki, M. Fujiwara, M. Miyazato, K. Kangawa and T. Ikeda (2013). "Allogeneic transplantation of fetal membrane-derived mesenchymal stem cell sheets increases neovascularization and improves cardiac function after myocardial infarction in rats." Transplantation **96**(8): 697-706.

Islam, M. N., S. R. Das, M. T. Emin, M. Wei, L. Sun, K. Westphalen, D. J. Rowlands, S. K. Quadri, S. Bhattacharya and J. Bhattacharya (2012). "Mitochondrial transfer from bone-marrow-derived stromal cells to pulmonary alveoli protects against acute lung injury." Nat Med **18**(5): 759-765.

Ito, T., J. D. Williams, S. Al-Assaf, G. O. Phillips and A. O. Phillips (2004). "Hyaluronan and proximal tubular cell migration." Kidney Int **65**(3): 823-833.

Iwamoto, N., J. H. Distler and O. Distler (2011). "Tyrosine kinase inhibitors in the treatment of systemic sclerosis: from animal models to clinical trials." Curr Rheumatol Rep **13**(1): 21-27.

Iyer, S. N., G. Gurujeyalakshmi and S. N. Giri (1999). "Effects of pirfenidone on transforming growth factor-beta gene expression at the transcriptional level in bleomycin hamster model of lung fibrosis." J Pharmacol Exp Ther **291**(1): 367-373.

Jahroudi, N., A. M. Ardekani and J. S. Greenberger (1996). "Ionizing irradiation increases transcription of the von Willebrand factor gene in endothelial cells." Blood **88**(10): 3801-3814.

Jakubzick, C., E. S. Choi, S. L. Kunkel, B. H. Joshi, R. K. Puri and C. M. Hogaboam (2003). "Impact of interleukin-13 responsiveness on the synthetic and proliferative properties of Th1- and Th2-type pulmonary granuloma fibroblasts." Am J Pathol **162**(5): 1475-1486.

Jang, Y. O., M. Y. Kim, M. Y. Cho, S. K. Baik, Y. Z. Cho and S. O. Kwon (2014). "Effect of bone marrow-derived mesenchymal stem cells on hepatic fibrosis in a thioacetamide-induced cirrhotic rat model." BMC Gastroenterol **14**: 198.

Jansen, B. J., C. Gilissen, H. Roelofs, A. Schaap-Oziemlak, J. A. Veltman, R. A. Raymakers, J. H. Jansen, G. Kogler, C. G. Figdor, R. Torensma and G. J. Adema (2010). "Functional differences between mesenchymal stem cell populations are reflected by their transcriptome." Stem Cells Dev **19**(4): 481-490.

Ji, J. F., B. P. He, S. T. Dheen and S. S. Tay (2004). "Interactions of chemokines and chemokine receptors mediate the migration of mesenchymal stem cells to the impaired site in the brain after hypoglossal nerve injury." Stem Cells **22**(3): 415-427.

Jiang, C., H. Huang, J. Liu, Y. Wang, Z. Lu and Z. Xu (2012). "Adverse events of pirfenidone for the treatment of pulmonary fibrosis: a meta-analysis of randomized controlled trials." PLoS One **7**(10): e47024.

Jiang, W., M. C. Puntis, T. Nakamura and M. B. Hallett (1992). "Neutrophil priming by hepatocyte growth factor, a novel cytokine." Immunology **77**(1): 147-149.

Jiang, X. X., Y. Zhang, B. Liu, S. X. Zhang, Y. Wu, X. D. Yu and N. Mao (2005). "Human mesenchymal stem cells inhibit differentiation and function of monocyte-derived dendritic cells." Blood **105**(10): 4120-4126.

Jiang, Y., B. N. Jahagirdar, R. L. Reinhardt, R. E. Schwartz, C. D. Keene, X. R. Ortiz-Gonzalez, M. Reyes, T. Lenvik, T. Lund, M. Blackstad, J. Du, S. Aldrich, A. Lisberg, W. C. Low, D. A. Largaespada and C. M. Verfaillie (2002). "Pluripotency of mesenchymal stem cells derived from adult marrow." Nature **418**(6893): 41-49.

Johnson, L. A., E. S. Rodansky, K. L. Sauder, J. C. Horowitz, J. D. Mih, D. J. Tschumperlin and P. D. Higgins (2013). "Matrix stiffness corresponding to strictured bowel induces a fibrogenic response in human colonic fibroblasts." Inflamm Bowel Dis **19**(5): 891-903.

Joyce, N. C., M. F. Haire and G. E. Palade (1987). "Morphologic and biochemical evidence for a contractile cell network within the rat intestinal mucosa." Gastroenterology **92**(1): 68-81.

Jullien, N., K. Blirando, F. Milliat, J. C. Sabourin, M. Benderitter and A. Francois (2009). "Up-regulation of endothelin type a receptor in human and rat radiation proctitis: preclinical therapeutic approach with endothelin receptor blockade." Int J Radiat Oncol Biol Phys **74**(2): 528-538.

Jung, Y., J. K. Kim, Y. Shiozawa, J. Wang, A. Mishra, J. Joseph, J. E. Berry, S. McGee, E. Lee, H. Sun, J. Wang, T. Jin, H. Zhang, J. Dai, P. H. Krebsbach, E. T. Keller, K. J. Pienta and R. S. Taichman

(2013). "Recruitment of mesenchymal stem cells into prostate tumours promotes metastasis." Nat Commun **4**: 1795.

Kadivar, M., S. Khatami, Y. Mortazavi, M. A. Shokrgozar, M. Taghikhani and M. Soleimani (2006). "In vitro cardiomyogenic potential of human umbilical vein-derived mesenchymal stem cells." Biochem Biophys Res Commun **340**(2): 639-647.

Kaisho, T. and S. Akira (2001). "Toll-like receptors and their signaling mechanism in innate immunity." Acta Odontol Scand **59**(3): 124-130.

Kalluri, R. and R. A. Weinberg (2009). "The basics of epithelial-mesenchymal transition." J Clin Invest **119**(6): 1420-1428.

Kalluri, R. and M. Zeisberg (2006). "Fibroblasts in cancer." Nat Rev Cancer **6**(5): 392-401.

Kamath, P. S., R. H. Wiesner, M. Malinchoc, W. Kremers, T. M. Therneau, C. L. Kosberg, G. D'Amico, E. R. Dickson and W. R. Kim (2001). "A model to predict survival in patients with end-stage liver disease." Hepatology **33**(2): 464-470.

Kanazawa, H., Y. Fujimoto, T. Teratani, J. Iwasaki, N. Kasahara, K. Negishi, T. Tsuruyama, S. Uemoto and E. Kobayashi (2011). "Bone marrow-derived mesenchymal stem cells ameliorate hepatic ischemia reperfusion injury in a rat model." PLoS One **6**(4): e19195.

Karnoub, A. E., A. B. Dash, A. P. Vo, A. Sullivan, M. W. Brooks, G. W. Bell, A. L. Richardson, K. Polyak, R. Tubo and R. A. Weinberg (2007). "Mesenchymal stem cells within tumour stroma promote breast cancer metastasis." Nature **449**(7162): 557-563.

Kato, N., T. Kosugi, W. Sato, T. Ishimoto, H. Kojima, Y. Sato, K. Sakamoto, S. Maruyama, Y. Yuzawa, S. Matsuo and K. Kadomatsu (2011). "Basigin/CD147 promotes renal fibrosis after unilateral ureteral obstruction." Am J Pathol **178**(2): 572-579.

Kaviratne, M., M. Hesse, M. Leusink, A. W. Cheever, S. J. Davies, J. H. McKerrow, L. M. Wakefield, J. J. Letterio and T. A. Wynn (2004). "IL-13 activates a mechanism of tissue fibrosis that is completely TGF-beta independent." J Immunol **173**(6): 4020-4029.

Kawate, K., H. Yajima, H. Ohgushi, N. Kotobuki, K. Sugimoto, T. Ohmura, Y. Kobata, K. Shigematsu, K. Kawamura, K. Tamai and Y. Takakura (2006). "Tissue-engineered approach for the treatment of steroid-induced osteonecrosis of the femoral head: transplantation of autologous mesenchymal stem cells cultured with beta-tricalcium phosphate ceramics and free vascularized fibula." Artif Organs **30**(12): 960-962.

Keating, A. (2008). "How do mesenchymal stromal cells suppress T cells?" Cell Stem Cell **2**(2): 106-108.

Kemp, K., K. Hares, E. Mallam, K. J. Heesom, N. Scolding and A. Wilkins (2010). "Mesenchymal stem cell-secreted superoxide dismutase promotes cerebellar neuronal survival." J Neurochem **114**(6): 1569-1580.

Khakoo, A. Y., S. Pati, S. A. Anderson, W. Reid, M. F. Elshal, Rovira, II, A. T. Nguyen, D. Malide, C. A. Combs, G. Hall, J. Zhang, M. Raffeld, T. B. Rogers, W. Stetler-Stevenson, J. A. Frank, M. Reitz and T. Finkel (2006). "Human mesenchymal stem cells exert potent antitumorigenic effects in a model of Kaposi's sarcoma." J Exp Med **203**(5): 1235-1247.

Khan, M. A., J. Van Dyk, I. W. Yeung and R. P. Hill (2003). "Partial volume rat lung irradiation; assessment of early DNA damage in different lung regions and effect of radical scavengers." Radiother Oncol **66**(1): 95-102.

Kharaziha, P., P. M. Hellstrom, B. Noorinayer, F. Farzaneh, K. Aghajani, F. Jafari, M. Telkabadi, A. Atashi, M. Honardoost, M. R. Zali and M. Soleimani (2009). "Improvement of liver function in liver cirrhosis patients after autologous mesenchymal stem cell injection: a phase I-II clinical trial." Eur J Gastroenterol Hepatol **21**(10): 1199-1205.

Kidd, S., E. Spaeth, J. L. Dembinski, M. Dietrich, K. Watson, A. Klopp, V. L. Battula, M. Weil, M. Andreeff and F. C. Marini (2009). "Direct evidence of mesenchymal stem cell tropism for tumor and wounding microenvironments using in vivo bioluminescent imaging." Stem Cells **27**(10): 2614-2623.

Kim, D. H., K. H. Yoo, K. S. Choi, J. Choi, S. Y. Choi, S. E. Yang, Y. S. Yang, H. J. Im, K. H. Kim, H. L. Jung, K. W. Sung and H. H. Koo (2005). "Gene expression profile of cytokine and growth factor during differentiation of bone marrow-derived mesenchymal stem cell." Cytokine **31**(2): 119-126.

Kim, J. and P. Hematti (2009). "Mesenchymal stem cell-educated macrophages: a novel type of alternatively activated macrophages." Exp Hematol **37**(12): 1445-1453.

Kim, K. K., Y. Wei, C. Szekeres, M. C. Kugler, P. J. Wolters, M. L. Hill, J. A. Frank, A. N. Brumwell, S. E. Wheeler, J. A. Kreidberg and H. A. Chapman (2009). "Epithelial cell alpha3beta1 integrin links beta-catenin and Smad signaling to promote myofibroblast formation and pulmonary fibrosis." J Clin Invest **119**(1): 213-224.

Kinnaird, T., E. Stabile, M. S. Burnett, C. W. Lee, S. Barr, S. Fuchs and S. E. Epstein (2004). "Marrow-derived stromal cells express genes encoding a broad spectrum of arteriogenic cytokines and promote in vitro and in vivo arteriogenesis through paracrine mechanisms." Circ Res **94**(5): 678-685.

Kinnaird, T., E. Stabile, M. S. Burnett, M. Shou, C. W. Lee, S. Barr, S. Fuchs and S. E. Epstein (2004). "Local delivery of marrow-derived stromal cells augments collateral perfusion through paracrine mechanisms." Circulation **109**(12): 1543-1549.

Kitta, K., R. M. Day, Y. Kim, I. Torregroza, T. Evans and Y. J. Suzuki (2003). "Hepatocyte growth factor induces GATA-4 phosphorylation and cell survival in cardiac muscle cells." J Biol Chem **278**(7): 4705-4712.

Klimanskaya, I., Y. Chung, S. Becker, S. J. Lu and R. Lanza (2007). "Derivation of human embryonic stem cells from single blastomeres." Nat Protoc **2**(8): 1963-1972.

Klingberg, F., M. L. Chow, A. Koehler, S. Boo, L. Buscemi, T. M. Quinn, M. Costell, B. A. Alman, E. Genot and B. Hinz (2014). "Prestress in the extracellular matrix sensitizes latent TGF-beta1 for activation." J Cell Biol **207**(2): 283-297.

Klopp, A. H., A. Gupta, E. Spaeth, M. Andreeff and F. Marini, 3rd (2011). "Concise review: Dissecting a discrepancy in the literature: do mesenchymal stem cells support or suppress tumor growth?" Stem Cells **29**(1): 11-19.

Klyushnenkova, E., J. D. Mosca, V. Zernetkina, M. K. Majumdar, K. J. Beggs, D. W. Simonetti, R. J. Deans and K. R. McIntosh (2005). "T cell responses to allogeneic human mesenchymal stem cells: immunogenicity, tolerance, and suppression." J Biomed Sci **12**(1): 47-57.

Koc, O. N., S. L. Gerson, B. W. Cooper, S. M. Dyhouse, S. E. Haynesworth, A. I. Caplan and H. M. Lazarus (2000). "Rapid hematopoietic recovery after coinfusion of autologous-blood stem cells and culture-expanded marrow mesenchymal stem cells in advanced breast cancer patients receiving high-dose chemotherapy." J Clin Oncol **18**(2): 307-316.

Komuro, T. (1990). "Re-evaluation of fibroblasts and fibroblast-like cells." Anat Embryol (Berl) **182**(2): 103-112.

Kopen, G. C., D. J. Prockop and D. G. Phinney (1999). "Marrow stromal cells migrate throughout forebrain and cerebellum, and they differentiate into astrocytes after injection into neonatal mouse brains." Proc Natl Acad Sci U S A **96**(19): 10711-10716.

Kotsianidis, I., E. Nakou, I. Bouchliou, A. Tzouvelekis, E. Spanoudakis, P. Steiropoulos, I. Sotiriou, V. Aidinis, D. Margaritis, C. Tsatalas and D. Bouros (2009). "Global impairment of CD4+CD25+FOXP3+ regulatory T cells in idiopathic pulmonary fibrosis." Am J Respir Crit Care Med **179**(12): 1121-1130.

Kovacic, J. C., N. Mercader, M. Torres, M. Boehm and V. Fuster (2012). "Epithelial-to-mesenchymal and endothelial-to-mesenchymal transition: from cardiovascular development to disease." Circulation **125**(14): 1795-1808.

Krampera, M., L. Cosmi, R. Angeli, A. Pasini, F. Liotta, A. Andreini, V. Santarlasci, B. Mazzinghi, G. Pizzolo, F. Vinante, P. Romagnani, E. Maggi, S. Romagnani and F. Annunziato (2006). "Role for interferon-gamma in the immunomodulatory activity of human bone marrow mesenchymal stem cells." Stem Cells **24**(2): 386-398.

Krampera, M., S. Glennie, J. Dyson, D. Scott, R. Laylor, E. Simpson and F. Dazzi (2003). "Bone marrow mesenchymal stem cells inhibit the response of naive and memory antigen-specific T cells to their cognate peptide." Blood **101**(9): 3722-3729.

Kretzschmar, M., J. Doody and J. Massague (1997). "Opposing BMP and EGF signalling pathways converge on the TGF-beta family mediator Smad1." Nature **389**(6651): 618-622.

Kruidenier, L., I. Kuiper, W. Van Duijn, M. A. Mieremet-Ooms, R. A. van Hogezand, C. B. Lamers and H. W. Verspaget (2003). "Imbalanced secondary mucosal antioxidant response in inflammatory bowel disease." J Pathol **201**(1): 17-27.

Kruidenier, L. and H. W. Verspaget (2002). "Review article: oxidative stress as a pathogenic factor in inflammatory bowel disease--radicals or ridiculous?" Aliment Pharmacol Ther **16**(12): 1997-2015.

Kucerova, L., S. Skolekova, M. Matuskova, M. Bohac and Z. Kozovska (2013). "Altered features and increased chemosensitivity of human breast cancer cells mediated by adipose tissue-derived mesenchymal stromal cells." BMC Cancer **13**: 535.

Kudo, K., Y. Liu, K. Takahashi, K. Tarusawa, M. Osanai, D. L. Hu, I. Kashiwakura, H. Kijima and A. Nakane (2010). "Transplantation of mesenchymal stem cells to prevent radiation-induced intestinal injury in mice." J Radiat Res **51**(1): 73-79.

Kumagai, S., H. Ohtani, T. Nagai, K. Funa, N. O. Hiwatashi, Shimosegawa and H. Nagura (2001). "Platelet-derived growth factor and its receptors are expressed in areas of both active inflammation and active fibrosis in inflammatory bowel disease." Tohoku J Exp Med **195**(1): 21-33.

Kunori, T. and O. Ringden (1980). "Polyclonal antibody secretion induced in human mixed lymphocyte cultures. II. No direct activation of B cells." Tissue Antigens **15**(5): 483-491.

Kuroda, R., A. Usas, S. Kubo, K. Corsi, H. Peng, T. Rose, J. Cummins, F. H. Fu and J. Huard (2006). "Cartilage repair using bone morphogenetic protein 4 and muscle-derived stem cells." Arthritis Rheum **54**(2): 433-442.

Kurowska-Stolarska, M., B. Stolarski, P. Kewin, G. Murphy, C. J. Corrigan, S. Ying, N. Pitman, A. Mirchandani, B. Rana, N. van Rooijen, M. Shepherd, C. McSharry, I. B. McInnes, D. Xu and F. Y. Liew (2009). "IL-33 amplifies the polarization of alternatively activated macrophages that contribute to airway inflammation." J Immunol **183**(10): 6469-6477.

Kursova, L. V., A. G. Konoplyannikov, V. V. Pasov, I. N. Ivanova, M. V. Poluektova and O. A. Konoplyannikova (2009). "Possibilities for the use of autologous mesenchymal stem cells in the therapy of radiation-induced lung injuries." Bull Exp Biol Med **147**(4): 542-546.

Kuzu, M. A., C. Koksoy, F. H. Akyol, D. Uzal and I. T. Kale (1999). "Colonic anastomotic healing after preoperative chemo-radiotherapy in rat." Radiat Med **17**(2): 181-187.

Laan, M., Z. H. Cui, H. Hoshino, J. Lotvall, M. Sjostrand, D. C. Gruenert, B. E. Skoogh and A. Linden (1999). "Neutrophil recruitment by human IL-17 via C-X-C chemokine release in the airways." J Immunol **162**(4): 2347-2352.

Lai, L., J. Chen, X. Wei, M. Huang, X. Hu, R. Yang, X. Jiang and H. Shan (2016). "Transplantation of MSCs Overexpressing HGF into a Rat Model of Liver Fibrosis." Mol Imaging Biol **18**(1): 43-51.

Lai, R. C., F. Arslan, M. M. Lee, N. S. Sze, A. Choo, T. S. Chen, M. Salto-Tellez, L. Timmers, C. N. Lee, R. M. El Oakley, G. Pasterkamp, D. P. de Kleijn and S. K. Lim (2010). "Exosome secreted by MSC reduces myocardial ischemia/reperfusion injury." Stem Cell Res **4**(3): 214-222.

Lai, R. C., S. S. Tan, R. W. Yeo, A. B. Choo, A. T. Reiner, Y. Su, Y. Shen, Z. Fu, L. Alexander, S. K. Sze and S. K. Lim (2016). "MSC secretes at least 3 EV types each with a unique permutation of membrane lipid, protein and RNA." J Extracell Vesicles **5**: 29828.

Lalu, M. M., L. McIntyre, C. Pugliese, D. Fergusson, B. W. Winston, J. C. Marshall, J. Granton, D. J. Stewart and G. Canadian Critical Care Trials (2012). "Safety of cell therapy with mesenchymal stromal cells (SafeCell): a systematic review and meta-analysis of clinical trials." PLoS One **7**(10): e47559.

Lamouille, S. and R. Derynck (2007). "Cell size and invasion in TGF-beta-induced epithelial to mesenchymal transition is regulated by activation of the mTOR pathway." J Cell Biol **178**(3): 437-451.

Lan, Y. W., K. B. Choo, C. M. Chen, T. H. Hung, Y. B. Chen, C. H. Hsieh, H. P. Kuo and K. Y. Chong (2015). "Hypoxia-preconditioned mesenchymal stem cells attenuate bleomycin-induced pulmonary fibrosis." Stem Cell Res Ther **6**: 97.

Langberg, C. W., M. Hauer-Jensen, C. C. Sung and C. J. Kane (1994). "Expression of fibrogenic cytokines in rat small intestine after fractionated irradiation." Radiother Oncol **32**(1): 29-36.

Larocca, R. A., P. M. Moraes-Vieira, E. J. Bassi, P. Semedo, D. C. de Almeida, M. B. da Silva, T. Thornley, A. Pacheco-Silva and N. O. Camara (2013). "Adipose tissue-derived mesenchymal stem cells increase skin allograft survival and inhibit Th-17 immune response." PLoS One **8**(10): e76396.

Lataillade, J. J., C. Doucet, E. Bey, H. Carsin, C. Huet, I. Clairand, J. F. Bottollier-Depois, A. Chapel, I. Ernou, M. Gourven, L. Boutin, A. Hayden, C. Carcamo, E. Buglova, M. Joussemet, T. de Revel and P. Gourmelon (2007). "New approach to radiation burn treatment by dosimetry-guided surgery combined with autologous mesenchymal stem cell therapy." Regen Med **2**(5): 785-794.

Lawrence, C. E., J. C. Paterson, X. Q. Wei, F. Y. Liew, P. Garside and M. W. Kennedy (2000). "Nitric oxide mediates intestinal pathology but not immune expulsion during Trichinella spiralis infection in mice." J Immunol **164**(8): 4229-4234.

Lazarus, H. M., O. N. Koc, S. M. Devine, P. Curtin, R. T. Maziarz, H. K. Holland, E. J. Shpall, P. McCarthy, K. Atkinson, B. W. Cooper, S. L. Gerson, M. J. Laughlin, F. R. Loberiza, Jr., A. B. Moseley and A. Bacigalupo (2005). "Cotransplantation of HLA-identical sibling culture-expanded mesenchymal stem cells and hematopoietic stem cells in hematologic malignancy patients." Biol Blood Marrow Transplant **11**(5): 389-398.

Le Blanc, K., F. Frassoni, L. Ball, F. Locatelli, H. Roelofs, I. Lewis, E. Lanino, B. Sundberg, M. E. Bernardo, M. Remberger, G. Dini, R. M. Egeler, A. Bacigalupo, W. Fibbe, O. Ringden, B. Developmental Committee of the European Group for and T. Marrow (2008). "Mesenchymal stem

cells for treatment of steroid-resistant, severe, acute graft-versus-host disease: a phase II study." Lancet **371**(9624): 1579-1586.

Le Blanc, K., L. Tammik, B. Sundberg, S. E. Haynesworth and O. Ringden (2003). "Mesenchymal stem cells inhibit and stimulate mixed lymphocyte cultures and mitogenic responses independently of the major histocompatibility complex." Scand J Immunol **57**(1): 11-20.

Le Visage, C., O. Gournay, N. Benguirat, S. Hamidi, L. Chaussumier, N. Mougenot, J. A. Flanders, R. Isnard, J. B. Michel, S. Hatem, D. Letourneur and F. Norol (2012). "Mesenchymal stem cell delivery into rat infarcted myocardium using a porous polysaccharide-based scaffold: a quantitative comparison with endocardial injection." Tissue Eng Part A **18**(1-2): 35-44.

Leask, A. (2004). "Transcriptional profiling of the scleroderma fibroblast reveals a potential role for connective tissue growth factor (CTGF) in pathological fibrosis." Keio J Med **53**(2): 74-77.

Lech, M. and H. J. Anders (2013). "Macrophages and fibrosis: How resident and infiltrating mononuclear phagocytes orchestrate all phases of tissue injury and repair." Biochim Biophys Acta **1832**(7): 989-997.

Lee, C., S. A. Mitsialis, M. Aslam, S. H. Vitali, E. Vergadi, G. Konstantinou, K. Sdrimas, A. Fernandez-Gonzalez and S. Kourembanas (2012). "Exosomes mediate the cytoprotective action of mesenchymal stromal cells on hypoxia-induced pulmonary hypertension." Circulation **126**(22): 2601-2611.

Lee, C. G., R. J. Homer, Z. Zhu, S. Lanone, X. Wang, V. Koteliansky, J. M. Shipley, P. Gotwals, P. Noble, Q. Chen, R. M. Senior and J. A. Elias (2001). "Interleukin-13 induces tissue fibrosis by selectively stimulating and activating transforming growth factor beta(1)." J Exp Med **194**(6): 809-821.

Lee, E. H. and C. K. Joo (1999). "Role of transforming growth factor-beta in transdifferentiation and fibrosis of lens epithelial cells." Invest Ophthalmol Vis Sci **40**(9): 2025-2032.

Lee, G. W., J. H. Lee, S. J. Choi, S. Kim, M. Seol, W. K. Kim, J. S. Lee and K. H. Lee (2003). "Hemorrhagic cystitis following allogeneic hematopoietic cell transplantation." J Korean Med Sci **18**(2): 191-195.

Lee, J. D. and M. H. Lee (2013). "Activation of extrinsic apoptotic pathway from bladder biopsy in patients with interstitial cystitis/painful bladder syndrome." Urology **82**(6): 1451 e1457-1411.

Lee, J. K., S. R. Park, B. K. Jung, Y. K. Jeon, Y. S. Lee, M. K. Kim, Y. G. Kim, J. Y. Jang and C. W. Kim (2013). "Exosomes derived from mesenchymal stem cells suppress angiogenesis by down-regulating VEGF expression in breast cancer cells." PLoS One **8**(12): e84256.

Lee, S. H., A. S. Jang, Y. E. Kim, J. Y. Cha, T. H. Kim, S. Jung, S. K. Park, Y. K. Lee, J. H. Won, Y. H. Kim and C. S. Park (2010). "Modulation of cytokine and nitric oxide by mesenchymal stem cell transfer in lung injury/fibrosis." Respir Res **11**: 16.

Lee, Y., S. El Andaloussi and M. J. Wood (2012). "Exosomes and microvesicles: extracellular vesicles for genetic information transfer and gene therapy." Hum Mol Genet **21**(R1): R125-134.

Leeb, S. N., D. Vogl, W. Falk, J. Scholmerich, G. Rogler and C. M. Gelbmann (2002). "Regulation of migration of human colonic myofibroblasts." Growth Factors **20**(2): 81-91.

Leeb, S. N., D. Vogl, J. Grossmann, W. Falk, J. Scholmerich, G. Rogler and C. M. Gelbmann (2004). "Autocrine fibronectin-induced migration of human colonic fibroblasts." Am J Gastroenterol **99**(2): 335-340.

Leeb, S. N., D. Vogl, M. Gunckel, S. Kiessling, W. Falk, M. Goke, J. Scholmerich, C. M. Gelbmann and G. Rogler (2003). "Reduced migration of fibroblasts in inflammatory bowel disease: role of inflammatory mediators and focal adhesion kinase." Gastroenterology **125**(5): 1341-1354.

Letterio, J. J. and E. P. Bottinger (1998). "TGF-beta knockout and dominant-negative receptor transgenic mice." Miner Electrolyte Metab **24**(2-3): 161-167.

Li, H., C. J. Meininger, J. R. Hawker, Jr., T. E. Haynes, D. Kepka-Lenhart, S. K. Mistry, S. M. Morris, Jr. and G. Wu (2001). "Regulatory role of arginase I and II in nitric oxide, polyamine, and proline syntheses in endothelial cells." Am J Physiol Endocrinol Metab **280**(1): E75-82.

Li, H. J., F. Reinhardt, H. R. Herschman and R. A. Weinberg (2012). "Cancer-stimulated mesenchymal stem cells create a carcinoma stem cell niche via prostaglandin E2 signaling." Cancer Discov **2**(9): 840-855.

Li, L., Y. Zhang, Y. Li, B. Yu, Y. Xu, S. Zhao and Z. Guan (2008). "Mesenchymal stem cell transplantation attenuates cardiac fibrosis associated with isoproterenol-induced global heart failure." Transpl Int **21**(12): 1181-1189.

Li, M., V. Jendrossek and C. Belka (2007). "The role of PDGF in radiation oncology." Radiat Oncol **2**: 5.

Li, P., Y. Zhao and L. Ge (2016). "Therapeutic effects of human gingiva-derived mesenchymal stromal cells on murine contact hypersensitivity via prostaglandin E2-EP3 signaling." Stem Cell Res Ther **7**(1): 103.

Li, R. K., Z. Q. Jia, R. D. Weisel, D. A. Mickle, J. Zhang, M. K. Mohabeer, V. Rao and J. Ivanov (1996). "Cardiomyocyte transplantation improves heart function." Ann Thorac Surg **62**(3): 654-660; discussion 660-651.

Li, T., Y. Yan, B. Wang, H. Qian, X. Zhang, L. Shen, M. Wang, Y. Zhou, W. Zhu, W. Li and W. Xu (2013). "Exosomes derived from human umbilical cord mesenchymal stem cells alleviate liver fibrosis." Stem Cells Dev **22**(6): 845-854.

Li, X., Y. Zhang, S. C. Yeung, Y. Liang, X. Liang, Y. Ding, M. S. Ip, H. F. Tse, J. C. Mak and Q. Lian (2014). "Mitochondrial transfer of induced pluripotent stem cell-derived mesenchymal stem cells to airway epithelial cells attenuates cigarette smoke-induced damage." Am J Respir Cell Mol Biol **51**(3): 455-465.

Li, X., H. Zhao, C. Qi, Y. Zeng, F. Xu and Y. Du (2015). "Direct intercellular communications dominate the interaction between adipose-derived MSCs and myofibroblasts against cardiac fibrosis." Protein Cell **6**(10): 735-745.

Liang, J., H. Zhang, D. Wang, X. Feng, H. Wang, B. Hua, B. Liu and L. Sun (2012). "Allogeneic mesenchymal stem cell transplantation in seven patients with refractory inflammatory bowel disease." Gut **61**(3): 468-469.

Lilly, C. M., H. Tateno, T. Oguma, E. Israel and L. A. Sonna (2005). "Effects of allergen challenge on airway epithelial cell gene expression." Am J Respir Crit Care Med **171**(6): 579-586.

Lim, M. J., K. J. Choi, Y. Ding, J. H. Kim, B. S. Kim, Y. H. Kim, J. Lee, W. Choe, I. Kang, J. Ha, K. S. Yoon and S. S. Kim (2007). "RhoA/Rho kinase blocks muscle differentiation via serine phosphorylation of insulin receptor substrate-1 and -2." Mol Endocrinol **21**(9): 2282-2293.

Lim, P. K., S. A. Bliss, S. A. Patel, M. Taborga, M. A. Dave, L. A. Gregory, S. J. Greco, M. Bryan, P. S. Patel and P. Rameshwar (2011). "Gap junction-mediated import of microRNA from bone marrow stromal cells can elicit cell cycle quiescence in breast cancer cells." Cancer Res **71**(5): 1550-1560.

Lin, C. Y., P. H. Tsai, C. C. Kandaswami, P. P. Lee, C. J. Huang, J. J. Hwang and M. T. Lee (2011). "Matrix metalloproteinase-9 cooperates with transcription factor Snail to induce epithelial-mesenchymal transition." Cancer Sci **102**(4): 815-827.

Lin, F., N. Wang and T. C. Zhang (2012). "The role of endothelial-mesenchymal transition in development and pathological process." IUBMB Life **64**(9): 717-723.

Linard, C., E. Busson, V. Holler, C. Strup-Perrot, J. V. Lacave-Lapalun, B. Lhomme, M. Prat, P. Devauchelle, J. C. Sabourin, J. M. Simon, M. Bonneau, J. J. Lataillade and M. Benderitter (2013). "Repeated autologous bone marrow-derived mesenchymal stem cell injections improve radiation-induced proctitis in pigs." Stem Cells Transl Med **2**(11): 916-927.

Linard, C., O. Gremy and M. Benderitter (2008). "Reduction of peroxisome proliferation-activated receptor gamma expression by gamma-irradiation as a mechanism contributing to inflammatory response in rat colon: modulation by the 5-aminosalicylic acid agonist." J Pharmacol Exp Ther **324**(3): 911-920.

Liotta, F., R. Angeli, L. Cosmi, L. Fili, C. Manuelli, F. Frosali, B. Mazzinghi, L. Maggi, A. Pasini, V. Lisi, V. Santarlasci, L. Consoloni, M. L. Angelotti, P. Romagnani, P. Parronchi, M. Krampera, E. Maggi, S. Romagnani and F. Annunziato (2008). "Toll-like receptors 3 and 4 are expressed by human bone

marrow-derived mesenchymal stem cells and can inhibit their T-cell modulatory activity by impairing Notch signaling." Stem Cells **26**(1): 279-289.

Lis, R., C. Touboul, N. M. Halabi, A. S. Madduri, D. Querleu, J. Mezey, J. A. Malek, K. Suhre and A. Rafii (2014). "Mesenchymal cell interaction with ovarian cancer cells induces a background dependent pro-metastatic transcriptomic profile." J Transl Med **12**: 59.

Liu, F., J. Liu, D. Weng, Y. Chen, L. Song, Q. He and J. Chen (2010). "CD4+CD25+Foxp3+ regulatory T cells depletion may attenuate the development of silica-induced lung fibrosis in mice." PLoS One **5**(11): e15404.

Liu, H., Y. Kim, S. Sharkis, L. Marchionni and Y. Y. Jang (2011). "In vivo liver regeneration potential of human induced pluripotent stem cells from diverse origins." Sci Transl Med **3**(82): 82ra39.

Liu, K., K. Ji, L. Guo, W. Wu, H. Lu, P. Shan and C. Yan (2014). "Mesenchymal stem cells rescue injured endothelial cells in an in vitro ischemia-reperfusion model via tunneling nanotube like structure-mediated mitochondrial transfer." Microvasc Res **92**: 10-18.

Liu, S., C. Ginestier, S. J. Ou, S. G. Clouthier, S. H. Patel, F. Monville, H. Korkaya, A. Heath, J. Dutcher, C. G. Kleer, Y. Jung, G. Dontu, R. Taichman and M. S. Wicha (2011). "Breast cancer stem cells are regulated by mesenchymal stem cells through cytokine networks." Cancer Res **71**(2): 614-624.

Liu, Y. (1999). "Hepatocyte growth factor promotes renal epithelial cell survival by dual mechanisms." Am J Physiol **277**(4 Pt 2): F624-633.

Liu, Y. (2004). "Hepatocyte growth factor in kidney fibrosis: therapeutic potential and mechanisms of action." Am J Physiol Renal Physiol **287**(1): F7-16.

Liu, Y. (2010). "New insights into epithelial-mesenchymal transition in kidney fibrosis." J Am Soc Nephrol **21**(2): 212-222.

Lombardo, E., O. DelaRosa, P. Mancheno-Corvo, R. Menta, C. Ramirez and D. Buscher (2009). "Toll-like receptor-mediated signaling in human adipose-derived stem cells: implications for immunogenicity and immunosuppressive potential." Tissue Eng Part A **15**(7): 1579-1589.

Lorenzi, B., F. Pessina, P. Lorenzoni, S. Urbani, R. Vernillo, G. Sgaragli, R. Gerli, B. Mazzanti, A. Bosi, R. Saccardi and M. Lorenzi (2008). "Treatment of experimental injury of anal sphincters with primary surgical repair and injection of bone marrow-derived mesenchymal stem cells." Dis Colon Rectum **51**(4): 411-420.

Lund, P. K. (1998). "The alpha-smooth muscle actin promoter: a useful tool to analyse autocrine and paracrine roles of mesenchymal cells in normal and diseased bowel." Gut **42**(3): 320-322.

Mack, C. P., A. V. Somlyo, M. Hautmann, A. P. Somlyo and G. K. Owens (2001). "Smooth muscle differentiation marker gene expression is regulated by RhoA-mediated actin polymerization." J Biol Chem **276**(1): 341-347.

Majumdar, M. K., M. Keane-Moore, D. Buyaner, W. B. Hardy, M. A. Moorman, K. R. McIntosh and J. D. Mosca (2003). "Characterization and functionality of cell surface molecules on human mesenchymal stem cells." J Biomed Sci **10**(2): 228-241.

Majumdar, M. K., M. A. Thiede, S. E. Haynesworth, S. P. Bruder and S. L. Gerson (2000). "Human marrow-derived mesenchymal stem cells (MSCs) express hematopoietic cytokines and support long-term hematopoiesis when differentiated toward stromal and osteogenic lineages." J Hematother Stem Cell Res **9**(6): 841-848.

Majumdar, M. K., M. A. Thiede, J. D. Mosca, M. Moorman and S. L. Gerson (1998). "Phenotypic and functional comparison of cultures of marrow-derived mesenchymal stem cells (MSCs) and stromal cells." J Cell Physiol **176**(1): 57-66.

Mandel, K., Y. Yang, A. Schambach, S. Glage, A. Otte and R. Hass (2013). "Mesenchymal stem cells directly interact with breast cancer cells and promote tumor cell growth in vitro and in vivo." Stem Cells Dev **22**(23): 3114-3127.

Mani, S. A., W. Guo, M. J. Liao, E. N. Eaton, A. Ayyanan, A. Y. Zhou, M. Brooks, F. Reinhard, C. C. Zhang, M. Shipitsin, L. L. Campbell, K. Polyak, C. Brisken, J. Yang and R. A. Weinberg (2008). "The epithelial-mesenchymal transition generates cells with properties of stem cells." Cell **133**(4): 704-715.

Mansilla, E., G. H. Marin, H. Drago, F. Sturla, E. Salas, C. Gardiner, S. Bossi, R. Lamonega, A. Guzman, A. Nunez, M. A. Gil, G. Piccinelli, R. Ibar and C. Soratti (2006). "Bloodstream cells phenotypically identical to human mesenchymal bone marrow stem cells circulate in large amounts under the influence of acute large skin damage: new evidence for their use in regenerative medicine." Transplant Proc **38**(3): 967-969.

Mantovani, A., S. K. Biswas, M. R. Galdiero, A. Sica and M. Locati (2013). "Macrophage plasticity and polarization in tissue repair and remodelling." J Pathol **229**(2): 176-185.

Mantovani, A., A. Sica, S. Sozzani, P. Allavena, A. Vecchi and M. Locati (2004). "The chemokine system in diverse forms of macrophage activation and polarization." Trends Immunol **25**(12): 677-686.

Mantovani, A., S. Sozzani, M. Locati, P. Allavena and A. Sica (2002). "Macrophage polarization: tumor-associated macrophages as a paradigm for polarized M2 mononuclear phagocytes." Trends Immunol **23**(11): 549-555.

Marchand-Adam, S., J. Marchal, M. Cohen, P. Soler, B. Gerard, Y. Castier, G. Leseche, D. Valeyre, H. Mal, M. Aubier, M. Dehoux and B. Crestani (2003). "Defect of hepatocyte growth factor

secretion by fibroblasts in idiopathic pulmonary fibrosis." Am J Respir Crit Care Med **168**(10): 1156-1161.

Marchesi, V., D. Aigle, D. Peiffert, A. Noel and J. M. Simon (2009). "[Securitization of the bi-site radiotherapy activity as part of the resumption of treatments in the Hospital of Epinal by the team of Alexis Vautrin Nancy Cancer Center]." Cancer Radiother **13**(8): 740-743.

Maria, A. T., K. Toupet, M. Maumus, G. Fonteneau, A. Le Quellec, C. Jorgensen, P. Guilpain and D. Noel (2016). "Human adipose mesenchymal stem cells as potent anti-fibrosis therapy for systemic sclerosis." J Autoimmun **70**: 31-39.

Martin, M., J. Lefaix and S. Delanian (2000). "TGF-beta1 and radiation fibrosis: a master switch and a specific therapeutic target?" Int J Radiat Oncol Biol Phys **47**(2): 277-290.

Martin, M., M. C. Vozenin, N. Gault, F. Crechet, C. M. Pfarr and J. L. Lefaix (1997). "Coactivation of AP-1 activity and TGF-beta1 gene expression in the stress response of normal skin cells to ionizing radiation." Oncogene **15**(8): 981-989.

Matheson, J., C. Buhnemann, E. J. Carter, D. Barnes, H. J. Hoppe, J. Hughes, S. Cobbold, J. Harper, H. Morreau, M. Surakhy and A. B. Hassan (2016). "Epithelial-mesenchymal transition and nuclear beta-catenin induced by conditional intestinal disruption of Cdh1 with Apc is E-cadherin EC1 domain dependent." Oncotarget.

Matsumoto, K. and T. Nakamura (1993). "Roles of HGF as a pleiotropic factor in organ regeneration." EXS **65**: 225-249.

Matsumoto, K., H. Okazaki and T. Nakamura (1992). "Up-regulation of hepatocyte growth factor gene expression by interleukin-1 in human skin fibroblasts." Biochem Biophys Res Commun **188**(1): 235-243.

Matsuura, I., G. Wang, D. He and F. Liu (2005). "Identification and characterization of ERK MAP kinase phosphorylation sites in Smad3." Biochemistry **44**(37): 12546-12553.

Matzinger, P. (2002). "The danger model: a renewed sense of self." Science **296**(5566): 301-305.

Mavalia, C., C. Scaletti, P. Romagnani, A. M. Carossino, A. Pignone, L. Emmi, C. Pupilli, G. Pizzolo, E. Maggi and S. Romagnani (1997). "Type 2 helper T-cell predominance and high CD30 expression in systemic sclerosis." Am J Pathol **151**(6): 1751-1758.

Medici, D. (2016). "Endothelial-Mesenchymal Transition in Regenerative Medicine." Stem Cells Int **2016**: 6962801.

Medici, D., S. Potenta and R. Kalluri (2011). "Transforming growth factor-beta2 promotes Snail-mediated endothelial-mesenchymal transition through convergence of Smad-dependent and Smad-independent signalling." Biochem J **437**(3): 515-520.

Meier, R. P., R. Mahou, P. Morel, J. Meyer, E. Montanari, Y. D. Muller, P. Christofilopoulos, C. Wandrey, C. Gonelle-Gispert and L. H. Buhler (2015). "Microencapsulated human mesenchymal stem cells decrease liver fibrosis in mice." J Hepatol **62**(3): 634-641.

Meisel, R., A. Zibert, M. Laryea, U. Gobel, W. Daubener and D. Dilloo (2004). "Human bone marrow stromal cells inhibit allogeneic T-cell responses by indoleamine 2,3-dioxygenase-mediated tryptophan degradation." Blood **103**(12): 4619-4621.

Melief, S. M., E. Schrama, M. H. Brugman, M. M. Tiemessen, M. J. Hoogduijn, W. E. Fibbe and H. Roelofs (2013). "Multipotent stromal cells induce human regulatory T cells through a novel pathway involving skewing of monocytes toward anti-inflammatory macrophages." Stem Cells **31**(9): 1980-1991.

Melzer, C., Y. Yang and R. Hass (2016). "Interaction of MSC with tumor cells." Cell Commun Signal **14**(1): 20.

Menasche, P., V. Vanneaux, A. Hagege, A. Bel, B. Cholley, I. Cacciapuoti, A. Parouchev, N. Benhamouda, G. Tachdjian, L. Tosca, J. H. Trouvin, J. R. Fabreguettes, V. Bellamy, R. Guillemain, C. Suberbielle Boissel, E. Tartour, M. Desnos and J. Larghero (2015). "Human embryonic stem cell-derived cardiac progenitors for severe heart failure treatment: first clinical case report." Eur Heart J **36**(30): 2011-2017.

Mendez, M. G., S. Kojima and R. D. Goldman (2010). "Vimentin induces changes in cell shape, motility, and adhesion during the epithelial to mesenchymal transition." FASEB J **24**(6): 1838-1851.

Meng, X. M., A. C. Chung and H. Y. Lan (2013). "Role of the TGF-beta/BMP-7/Smad pathways in renal diseases." Clin Sci (Lond) **124**(4): 243-254.

Meng, X. M., D. J. Nikolic-Paterson and H. Y. Lan (2016). "TGF-beta: the master regulator of fibrosis." Nat Rev Nephrol **12**(6): 325-338.

Menzel, K., M. Hausmann, F. Obermeier, K. Schreiter, N. Dunger, F. Bataille, W. Falk, J. Scholmerich, H. Herfarth and G. Rogler (2006). "Cathepsins B, L and D in inflammatory bowel disease macrophages and potential therapeutic effects of cathepsin inhibition in vivo." Clin Exp Immunol **146**(1): 169-180.

Meran, S., D. W. Thomas, P. Stephens, S. Enoch, J. Martin, R. Steadman and A. O. Phillips (2008). "Hyaluronan facilitates transforming growth factor-beta1-mediated fibroblast proliferation." J Biol Chem **283**(10): 6530-6545.

Mi, S., Z. Li, H. Z. Yang, H. Liu, J. P. Wang, Y. G. Ma, X. X. Wang, H. Z. Liu, W. Sun and Z. W. Hu (2011). "Blocking IL-17A promotes the resolution of pulmonary inflammation and fibrosis via TGF-beta1-dependent and -independent mechanisms." J Immunol **187**(6): 3003-3014.

Mias, C., O. Lairez, E. Trouche, J. Roncalli, D. Calise, M. H. Seguelas, C. Ordener, M. D. Piercecchi-Marti, N. Auge, A. N. Salvayre, P. Bourin, A. Parini and D. Cussac (2009). "Mesenchymal

stem cells promote matrix metalloproteinase secretion by cardiac fibroblasts and reduce cardiac ventricular fibrosis after myocardial infarction." Stem Cells **27**(11): 2734-2743.

Mias, C., E. Trouche, M. H. Seguelas, F. Calcagno, F. Dignat-George, F. Sabatier, M. D. Piercecchi-Marti, L. Daniel, P. Bianchi, D. Calise, P. Bourin, A. Parini and D. Cussac (2008). "Ex vivo pretreatment with melatonin improves survival, proangiogenic/mitogenic activity, and efficiency of mesenchymal stem cells injected into ischemic kidney." Stem Cells **26**(7): 1749-1757.

Midgley, A. C., M. Rogers, M. B. Hallett, A. Clayton, T. Bowen, A. O. Phillips and R. Steadman (2013). "Transforming growth factor-beta1 (TGF-beta1)-stimulated fibroblast to myofibroblast differentiation is mediated by hyaluronan (HA)-facilitated epidermal growth factor receptor (EGFR) and CD44 co-localization in lipid rafts." J Biol Chem **288**(21): 14824-14838.

Migliaccio, C. T., M. C. Buford, F. Jessop and A. Holian (2008). "The IL-4Ralpha pathway in macrophages and its potential role in silica-induced pulmonary fibrosis." J Leukoc Biol **83**(3): 630-639.

Milliat, F., J. C. Sabourin, G. Tarlet, V. Holler, E. Deutsch, V. Buard, R. Tamarat, A. Atfi, M. Benderitter and A. Francois (2008). "Essential role of plasminogen activator inhibitor type-1 in radiation enteropathy." Am J Pathol **172**(3): 691-701.

Milner, C. M., V. A. Higman and A. J. Day (2006). "TSG-6: a pluripotent inflammatory mediator?" Biochem Soc Trans **34**(Pt 3): 446-450.

Mine, S., Y. Tanaka, M. Suematu, M. Aso, T. Fujisaki, S. Yamada and S. Eto (1998). "Hepatocyte growth factor is a potent trigger of neutrophil adhesion through rapid activation of lymphocyte function-associated antigen-1." Lab Invest **78**(11): 1395-1404.

Mirkovic, S., A. M. Seymour, A. Fenning, A. Strachan, S. B. Margolin, S. M. Taylor and L. Brown (2002). "Attenuation of cardiac fibrosis by pirfenidone and amiloride in DOCA-salt hypertensive rats." Br J Pharmacol **135**(4): 961-968.

Mizuno, S., K. Matsumoto, M. Y. Li and T. Nakamura (2005). "HGF reduces advancing lung fibrosis in mice: a potential role for MMP-dependent myofibroblast apoptosis." FASEB J **19**(6): 580-582.

Mizuno, S. and T. Nakamura (2004). "Suppressions of chronic glomerular injuries and TGF-beta 1 production by HGF in attenuation of murine diabetic nephropathy." Am J Physiol Renal Physiol **286**(1): F134-143.

Moghadasali, R., M. Hajinasrollah, H. Argani, S. M. Nassiri, M. Najarasl, N. Sodeifi, H. Baharvand and N. Aghdami (2015). "Autologous transplantation of mesenchymal stromal cells tends to prevent progress of interstitial fibrosis in a rhesus Macaca mulatta monkey model of chronic kidney disease." Cytotherapy **17**(11): 1495-1505.

Mohamadnejad, M., K. Alimoghaddam, M. Mohyeddin-Bonab, M. Bagheri, M. Bashtar, H. Ghanaati, H. Baharvand, A. Ghavamzadeh and R. Malekzadeh (2007). "Phase 1 trial of autologous

bone marrow mesenchymal stem cell transplantation in patients with decompensated liver cirrhosis." Arch Iran Med **10**(4): 459-466.

Mohammadi Gorji, S., A. A. Karimpor Malekshah, M. B. Hashemi-Soteh, A. Rafiei, K. Parivar and N. Aghdami (2012). "Effect of mesenchymal stem cells on Doxorubicin-induced fibrosis." Cell J **14**(2): 142-151.

Mok, P. L., C. F. Leong and S. K. Cheong (2013). "Cellular mechanisms of emerging applications of mesenchymal stem cells." Malays J Pathol **35**(1): 17-32.

Mole, R. H. (1953). "Whole body irradiation; radiobiology or medicine?" Br J Radiol **26**(305): 234-241.

Molnarfi, N., M. Benkhoucha, H. Funakoshi, T. Nakamura and P. H. Lalive (2015). "Hepatocyte growth factor: A regulator of inflammation and autoimmunity." Autoimmun Rev **14**(4): 293-303.

Moodley, Y., D. Atienza, U. Manuelpillai, C. S. Samuel, J. Tchongue, S. Ilancheran, R. Boyd and A. Trounson (2009). "Human umbilical cord mesenchymal stem cells reduce fibrosis of bleomycin-induced lung injury." Am J Pathol **175**(1): 303-313.

Moransard, M., M. Sawitzky, A. Fontana and T. Suter (2010). "Expression of the HGF receptor c-met by macrophages in experimental autoimmune encephalomyelitis." Glia **58**(5): 559-571.

Moreira, R. K. (2007). "Hepatic stellate cells and liver fibrosis." Arch Pathol Lab Med **131**(11): 1728-1734.

Mouiseddine, M., S. Francois, A. Semont, A. Sache, B. Allenet, N. Mathieu, J. Frick, D. Thierry and A. Chapel (2007). "Human mesenchymal stem cells home specifically to radiation-injured tissues in a non-obese diabetes/severe combined immunodeficiency mouse model." Br J Radiol **80 Spec No 1**: S49-55.

Mourcin, F., N. Grenier, J. F. Mayol, J. J. Lataillade, J. J. Sotto, F. Herodin and M. Drouet (2005). "Mesenchymal stem cells support expansion of in vitro irradiated CD34(+) cells in the presence of SCF, FLT3 ligand, TPO and IL3: potential application to autologous cell therapy in accidentally irradiated victims." Radiat Res **164**(1): 1-9.

Moussa, L., B. Usunier, C. Demarquay, M. Benderitter, R. Tamarat, A. Semont and N. Mathieu (2016). "Bowel Radiation Injury: Complexity of the pathophysiology and promises of cell and tissue engineering." Cell Transplant.

Mucsi, I., K. L. Skorecki and H. J. Goldberg (1996). "Extracellular signal-regulated kinase and the small GTP-binding protein, Rac, contribute to the effects of transforming growth factor-beta1 on gene expression." J Biol Chem **271**(28): 16567-16572.

Muehlberg, F. L., Y. H. Song, A. Krohn, S. P. Pinilla, L. H. Droll, X. Leng, M. Seidensticker, J. Ricke, A. M. Altman, E. Devarajan, W. Liu, R. B. Arlinghaus and E. U. Alt (2009). "Tissue-resident stem cells promote breast cancer growth and metastasis." Carcinogenesis **30**(4): 589-597.

Muguruma, Y., T. Yahata, H. Miyatake, T. Sato, T. Uno, J. Itoh, S. Kato, M. Ito, T. Hotta and K. Ando (2006). "Reconstitution of the functional human hematopoietic microenvironment derived from human mesenchymal stem cells in the murine bone marrow compartment." Blood **107**(5): 1878-1887.

Munger, J. S., X. Huang, H. Kawakatsu, M. J. Griffiths, S. L. Dalton, J. Wu, J. F. Pittet, N. Kaminski, C. Garat, M. A. Matthay, D. B. Rifkin and D. Sheppard (1999). "The integrin alpha v beta 6 binds and activates latent TGF beta 1: a mechanism for regulating pulmonary inflammation and fibrosis." Cell **96**(3): 319-328.

Muraguchi, A., T. Hirano, B. Tang, T. Matsuda, Y. Horii, K. Nakajima and T. Kishimoto (1988). "The essential role of B cell stimulatory factor 2 (BSF-2/IL-6) for the terminal differentiation of B cells." J Exp Med **167**(2): 332-344.

Murai, M., O. Turovskaya, G. Kim, R. Madan, C. L. Karp, H. Cheroutre and M. Kronenberg (2009). "Interleukin 10 acts on regulatory T cells to maintain expression of the transcription factor Foxp3 and suppressive function in mice with colitis." Nat Immunol **10**(11): 1178-1184.

Murray, L. A., R. L. Argentieri, F. X. Farrell, M. Bracht, H. Sheng, B. Whitaker, H. Beck, P. Tsui, K. Cochlin, H. L. Evanoff, C. M. Hogaboam and A. M. Das (2008). "Hyper-responsiveness of IPF/UIP fibroblasts: interplay between TGFbeta1, IL-13 and CCL2." Int J Biochem Cell Biol **40**(10): 2174-2182.

Nagasawa, H. and J. B. Little (1992). "Induction of sister chromatid exchanges by extremely low doses of alpha-particles." Cancer Res **52**(22): 6394-6396.

Nakahara, H., J. E. Dennis, S. P. Bruder, S. E. Haynesworth, D. P. Lennon and A. I. Caplan (1991). "In vitro differentiation of bone and hypertrophic cartilage from periosteal-derived cells." Exp Cell Res **195**(2): 492-503.

Nakahara, H., V. M. Goldberg and A. I. Caplan (1991). "Culture-expanded human periosteal-derived cells exhibit osteochondral potential in vivo." J Orthop Res **9**(4): 465-476.

Nakamura, T., K. Sakai and K. Matsumoto "Hepatocyte growth factor twenty years on: Much more than a growth factor." J Gastroenterol Hepatol **26 Suppl 1**: 188-202.

Narisawa, T., N. E. Magadia, J. H. Weisburger and E. L. Wynder (1974). "Promoting effect of bile acids on colon carcinogenesis after intrarectal instillation of N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine in rats." J Natl Cancer Inst **53**(4): 1093-1097.

Nasef, A., A. Chapel, C. Mazurier, S. Bouchet, M. Lopez, N. Mathieu, L. Sensebe, Y. Zhang, N. C. Gorin, D. Thierry and L. Fouillard (2007). "Identification of IL-10 and TGF-beta transcripts involved in the inhibition of T-lymphocyte proliferation during cell contact with human mesenchymal stem cells." Gene Expr **13**(4-5): 217-226.

Nasef, A., N. Mathieu, A. Chapel, J. Frick, S. Francois, C. Mazurier, A. Boutarfa, S. Bouchet, N. C. Gorin, D. Thierry and L. Fouillard (2007). "Immunosuppressive effects of mesenchymal stem cells: involvement of HLA-G." Transplantation **84**(2): 231-237.

Nasef, A., C. Mazurier, S. Bouchet, S. Francois, A. Chapel, D. Thierry, N. C. Gorin and L. Fouillard (2008). "Leukemia inhibitory factor: Role in human mesenchymal stem cells mediated immunosuppression." Cell Immunol **253**(1-2): 16-22.

Nasir, G. A., S. Mohsin, M. Khan, S. Shams, G. Ali, S. N. Khan and S. Riazuddin (2013). "Mesenchymal stem cells and Interleukin-6 attenuate liver fibrosis in mice." J Transl Med **11**: 78.

Neheman, A., O. Nativ, B. Moskovitz, Y. Melamed and A. Stein (2005). "Hyperbaric oxygen therapy for radiation-induced haemorrhagic cystitis." BJU Int **96**(1): 107-109.

Nelson, T. J., A. Martinez-Fernandez, S. Yamada, C. Perez-Terzic, Y. Ikeda and A. Terzic (2009). "Repair of acute myocardial infarction by human stemness factors induced pluripotent stem cells." Circulation **120**(5): 408-416.

Nemeth, K., A. Leelahavanichkul, P. S. Yuen, B. Mayer, A. Parmelee, K. Doi, P. G. Robey, K. Leelahavanichkul, B. H. Koller, J. M. Brown, X. Hu, I. Jelinek, R. A. Star and E. Mezey (2009). "Bone marrow stromal cells attenuate sepsis via prostaglandin E(2)-dependent reprogramming of host macrophages to increase their interleukin-10 production." Nat Med **15**(1): 42-49.

Ngo, M. A., A. Muller, Y. Li, S. Neumann, G. Tian, I. M. Dixon, R. C. Arora and D. H. Freed (2014). "Human mesenchymal stem cells express a myofibroblastic phenotype in vitro: comparison to human cardiac myofibroblasts." Mol Cell Biochem **392**(1-2): 187-204.

Ning, H., F. Yang, M. Jiang, L. Hu, K. Feng, J. Zhang, Z. Yu, B. Li, C. Xu, Y. Li, J. Wang, J. Hu, X. Lou and H. Chen (2008). "The correlation between cotransplantation of mesenchymal stem cells and higher recurrence rate in hematologic malignancy patients: outcome of a pilot clinical study." Leukemia **22**(3): 593-599.

Niu, J., A. Azfer, O. Zhelyabovska, S. Fatma and P. E. Kolattukudy (2008). "Monocyte chemotactic protein (MCP)-1 promotes angiogenesis via a novel transcription factor, MCP-1-induced protein (MCPIP)." J Biol Chem **283**(21): 14542-14551.

Noda-Heiny, H. and B. E. Sobel (1995). "Vascular smooth muscle cell migration mediated by thrombin and urokinase receptor." Am J Physiol **268**(5 Pt 1): C1195-1201.

Noel, W., G. Raes, G. Hassanzadeh Ghassabeh, P. De Baetselier and A. Beschin (2004). "Alternatively activated macrophages during parasite infections." Trends Parasitol **20**(3): 126-133.

Nori, S., Y. Okada, A. Yasuda, O. Tsuji, Y. Takahashi, Y. Kobayashi, K. Fujiyoshi, M. Koike, Y. Uchiyama, E. Ikeda, Y. Toyama, S. Yamanaka, M. Nakamura and H. Okano (2011). "Grafted human-induced pluripotent stem-cell-derived neurospheres promote motor functional recovery after spinal cord injury in mice." Proc Natl Acad Sci U S A **108**(40): 16825-16830.

Numata, M., A. Ido, A. Moriuchi, I. Kim, Y. Tahara, S. Yamamoto, S. Hasuike, K. Nagata, Y. Miyata, H. Uto and H. Tsubouchi (2005). "Hepatocyte growth factor facilitates the repair of large colonic ulcers in 2,4,6-trinitrobenzene sulfonic acid-induced colitis in rats." Inflamm Bowel Dis **11**(6): 551-558.

Oberhammer, F. A., M. Pavelka, S. Sharma, R. Tiefenbacher, A. F. Purchio, W. Bursch and R. Schulte-Hermann (1992). "Induction of apoptosis in cultured hepatocytes and in regressing liver by transforming growth factor beta 1." Proc Natl Acad Sci U S A **89**(12): 5408-5412.

Ohab, J. J., S. Fleming, A. Blesch and S. T. Carmichael (2006). "A neurovascular niche for neurogenesis after stroke." J Neurosci **26**(50): 13007-13016.

Ohlsson, L. B., L. Varas, C. Kjellman, K. Edvardsen and M. Lindvall (2003). "Mesenchymal progenitor cell-mediated inhibition of tumor growth in vivo and in vitro in gelatin matrix." Exp Mol Pathol **75**(3): 248-255.

Okunieff, P., M. Mester, J. Wang, T. Maddox, X. Gong, D. Tang, M. Coffee and I. Ding (1998). "In vivo radioprotective effects of angiogenic growth factors on the small bowel of C3H mice." Radiat Res **150**(2): 204-211.

Ong, C., C. Wong, C. R. Roberts, H. S. Teh and F. R. Jirik (1998). "Anti-IL-4 treatment prevents dermal collagen deposition in the tight-skin mouse model of scleroderma." Eur J Immunol **28**(9): 2619-2629.

Ong, Z. Y., R. J. Gibson, J. M. Bowen, A. M. Stringer, J. M. Darby, R. M. Logan, A. S. Yeoh and D. M. Keefe (2010). "Pro-inflammatory cytokines play a key role in the development of radiotherapy-induced gastrointestinal mucositis." Radiat Oncol **5**: 22.

Orozco, L., A. Munar, R. Soler, M. Alberca, F. Soler, M. Huguet, J. Sentis, A. Sanchez and J. Garcia-Sancho (2013). "Treatment of knee osteoarthritis with autologous mesenchymal stem cells: a pilot study." Transplantation **95**(12): 1535-1541.

Ortiz, L. A., F. Gambelli, C. McBride, D. Gaupp, M. Baddoo, N. Kaminski and D. G. Phinney (2003). "Mesenchymal stem cell engraftment in lung is enhanced in response to bleomycin exposure and ameliorates its fibrotic effects." Proc Natl Acad Sci U S A **100**(14): 8407-8411.

Otsu, K., S. Das, S. D. Houser, S. K. Quadri, S. Bhattacharya and J. Bhattacharya (2009). "Concentration-dependent inhibition of angiogenesis by mesenchymal stem cells." Blood **113**(18): 4197-4205.

Otte, J. M., I. M. Rosenberg and D. K. Podolsky (2003). "Intestinal myofibroblasts in innate immune responses of the intestine." Gastroenterology **124**(7): 1866-1878.

Ozdamar, B., R. Bose, M. Barrios-Rodiles, H. R. Wang, Y. Zhang and J. L. Wrana (2005). "Regulation of the polarity protein Par6 by TGFbeta receptors controls epithelial cell plasticity." Science **307**(5715): 1603-1609.

Pan, R. L., P. Wang, L. X. Xiang and J. Z. Shao (2011). "Delta-like 1 serves as a new target and contributor to liver fibrosis down-regulated by mesenchymal stem cell transplantation." J Biol Chem **286**(14): 12340-12348.

Panganiban, R. A. and R. M. Day "Hepatocyte growth factor in lung repair and pulmonary fibrosis." Acta Pharmacol Sin **32**(1): 12-20.

Pantel, K., C. Alix-Panabieres and S. Riethdorf (2009). "Cancer micrometastases." Nat Rev Clin Oncol **6**(6): 339-351.

Pardo, A. and M. Selman (2006). "Matrix metalloproteases in aberrant fibrotic tissue remodeling." Proc Am Thorac Soc **3**(4): 383-388.

Paris, F., Z. Fuks, A. Kang, P. Capodieci, G. Juan, D. Ehleiter, A. Haimovitz-Friedman, C. Cordon-Cardo and R. Kolesnick (2001). "Endothelial apoptosis as the primary lesion initiating intestinal radiation damage in mice." Science **293**(5528): 293-297.

Park, M., Y. H. Kim, S. Y. Woo, H. J. Lee, Y. Yu, H. S. Kim, Y. S. Park, I. Jo, J. W. Park, S. C. Jung, H. Lee, B. Jeong and K. H. Ryu (2015). "Tonsil-derived mesenchymal stem cells ameliorate CCl4-induced liver fibrosis in mice via autophagy activation." Sci Rep **5**: 8616.

Park, M. J., S. H. Lee, S. H. Lee, E. J. Lee, E. K. Kim, J. Y. Choi and M. L. Cho (2015). "IL-1 Receptor Blockade Alleviates Graft-versus-Host Disease through Downregulation of an Interleukin-1beta-Dependent Glycolytic Pathway in Th17 Cells." Mediators Inflamm **2015**: 631384.

Parsons, C. L. (2011). "The role of a leaky epithelium and potassium in the generation of bladder symptoms in interstitial cystitis/overactive bladder, urethral syndrome, prostatitis and gynaecological chronic pelvic pain." BJU Int **107**(3): 370-375.

Pawlik, T. M. and K. Keyomarsi (2004). "Role of cell cycle in mediating sensitivity to radiotherapy." Int J Radiat Oncol Biol Phys **59**(4): 928-942.

Peiffert, D., J. M. Simon and F. Eschwege (2007). "[Epinal radiotherapy accident: passed, present, future]." Cancer Radiother **11**(6-7): 309-312.

Pender, S. L., S. P. Tickle, A. J. Docherty, D. Howie, N. C. Wathen and T. T. MacDonald (1997). "A major role for matrix metalloproteinases in T cell injury in the gut." J Immunol **158**(4): 1582-1590.

Pesce, J., M. Kaviratne, T. R. Ramalingam, R. W. Thompson, J. F. Urban, Jr., A. W. Cheever, D. A. Young, M. Collins, M. J. Grusby and T. A. Wynn (2006). "The IL-21 receptor augments Th2 effector function and alternative macrophage activation." J Clin Invest **116**(7): 2044-2055.

Pesce, J. T., T. R. Ramalingam, M. M. Mentink-Kane, M. S. Wilson, K. C. El Kasmi, A. M. Smith, R. W. Thompson, A. W. Cheever, P. J. Murray and T. A. Wynn (2009). "Arginase-1-expressing macrophages suppress Th2 cytokine-driven inflammation and fibrosis." PLoS Pathog **5**(4): e1000371.

Petersen, B. E., W. C. Bowen, K. D. Patrene, W. M. Mars, A. K. Sullivan, N. Murase, S. S. Boggs, J. S. Greenberger and J. P. Goff (1999). "Bone marrow as a potential source of hepatic oval cells." Science **284**(5417): 1168-1170.

Pevsner-Fischer, M., V. Morad, M. Cohen-Sfady, L. Rousso-Noori, A. Zanin-Zhorov, S. Cohen, I. R. Cohen and D. Zipori (2007). "Toll-like receptors and their ligands control mesenchymal stem cell functions." Blood **109**(4): 1422-1432.

Piek, E., W. J. Ju, J. Heyer, D. Escalante-Alcalde, C. L. Stewart, M. Weinstein, C. Deng, R. Kucherlapati, E. P. Bottinger and A. B. Roberts (2001). "Functional characterization of transforming growth factor beta signaling in Smad2- and Smad3-deficient fibroblasts." J Biol Chem **276**(23): 19945-19953.

Pierdomenico, L., L. Bonsi, M. Calvitti, D. Rondelli, M. Arpinati, G. Chirumbolo, E. Becchetti, C. Marchionni, F. Alviano, V. Fossati, N. Staffolani, M. Franchina, A. Grossi and G. P. Bagnara (2005). "Multipotent mesenchymal stem cells with immunosuppressive activity can be easily isolated from dental pulp." Transplantation **80**(6): 836-842.

Pittenger, M. F., A. M. Mackay, S. C. Beck, R. K. Jaiswal, R. Douglas, J. D. Mosca, M. A. Moorman, D. W. Simonetti, S. Craig and D. R. Marshak (1999). "Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells." Science **284**(5411): 143-147.

Plotnikov, E. Y., T. G. Khryapenkova, A. K. Vasileva, M. V. Marey, S. I. Galkina, N. K. Isaev, E. V. Sheval, V. Y. Polyakov, G. T. Sukhikh and D. B. Zorov (2008). "Cell-to-cell cross-talk between mesenchymal stem cells and cardiomyocytes in co-culture." J Cell Mol Med **12**(5A): 1622-1631.

Ponte, A. L., E. Marais, N. Gallay, A. Langonne, B. Delorme, O. Herault, P. Charbord and J. Domenech (2007). "The in vitro migration capacity of human bone marrow mesenchymal stem cells: comparison of chemokine and growth factor chemotactic activities." Stem Cells **25**(7): 1737-1745.

Pontz, B. F., A. Albini, H. Mensing, M. Cantz and P. K. Muller (1984). "Pattern of collagen synthesis and chemotactic response of fibroblasts derived from mucopolysaccharidosis patients." Exp Cell Res **155**(2): 457-466.

Poon, R., S. A. Nik, J. Ahn, L. Slade and B. A. Alman (2009). "Beta-catenin and transforming growth factor beta have distinct roles regulating fibroblast cell motility and the induction of collagen lattice contraction." BMC Cell Biol **10**: 38.

Powell, D. W., R. C. Mifflin, J. D. Valentich, S. E. Crowe, J. I. Saada and A. B. West (1999). "Myofibroblasts. II. Intestinal subepithelial myofibroblasts." Am J Physiol **277**(2 Pt 1): C183-201.

Prakash, M. D., S. Miller, S. Randall-Demllo and K. Nurgali (2016). "Mesenchymal Stem Cell Treatment of Inflammation-Induced Cancer." Inflamm Bowel Dis **22**(11): 2694-2703.

Prockop, D. J. (2013). "Concise review: two negative feedback loops place mesenchymal stem/stromal cells at the center of early regulators of inflammation." Stem Cells **31**(10): 2042-2046.

Qi, Y., D. Jiang, A. Sindrilaru, A. Stegemann, S. Schatz, N. Treiber, M. Rojewski, H. Schrezenmeier, S. Vander Beken, M. Wlaschek, M. Bohm, A. Seitz, N. Scholz, L. Durselen, J. Brinckmann, A. Ignatius and K. Scharffetter-Kochanek (2014). "TSG-6 released from intradermally injected mesenchymal stem cells accelerates wound healing and reduces tissue fibrosis in murine full-thickness skin wounds." J Invest Dermatol **134**(2): 526-537.

Qian, B. Z. and J. W. Pollard (2010). "Macrophage diversity enhances tumor progression and metastasis." Cell **141**(1): 39-51.

Qiao, H., Y. Tong, H. Han, W. Xu, Z. Ren, J. Ouyang and Y. Chen (2011). "A novel therapeutic regimen for hepatic fibrosis using the combination of mesenchymal stem cells and baicalin." Pharmazie **66**(1): 37-43.

Qiao, L., Z. L. Xu, T. J. Zhao, L. H. Ye and X. D. Zhang (2008). "Dkk-1 secreted by mesenchymal stem cells inhibits growth of breast cancer cells via depression of Wnt signalling." Cancer Lett **269**(1): 67-77.

Qin, H., M. W. Chan, S. Liyanarachchi, C. Balch, D. Potter, I. J. Souriraj, A. S. Cheng, F. J. Agosto-Perez, E. V. Nikonova, P. S. Yan, H. J. Lin, K. P. Nephew, J. H. Saltz, L. C. Showe, T. H. Huang and R. V. Davuluri (2009). "An integrative ChIP-chip and gene expression profiling to model SMAD regulatory modules." BMC Syst Biol **3**: 73.

Quail, D. F. and J. A. Joyce (2013). "Microenvironmental regulation of tumor progression and metastasis." Nat Med **19**(11): 1423-1437.

Quarmby, S., P. Kumar, J. Wang, J. A. Macro, J. J. Hutchinson, R. D. Hunter and S. Kumar (1999). "Irradiation induces upregulation of CD31 in human endothelial cells." Arterioscler Thromb Vasc Biol **19**(3): 588-597.

Rabani, V., M. Shahsavani, M. Gharavi, A. Piryaei, Z. Azhdari and H. Baharvand (2010). "Mesenchymal stem cell infusion therapy in a carbon tetrachloride-induced liver fibrosis model affects matrix metalloproteinase expression." Cell Biol Int **34**(6): 601-605.

Rafei, M., P. M. Campeau, A. Aguilar-Mahecha, M. Buchanan, P. Williams, E. Birman, S. Yuan, Y. K. Young, M. N. Boivin, K. Forner, M. Basik and J. Galipeau (2009). "Mesenchymal stromal cells ameliorate experimental autoimmune encephalomyelitis by inhibiting CD4 Th17 T cells in a CC chemokine ligand 2-dependent manner." J Immunol **182**(10): 5994-6002.

Rafei, M., J. Hsieh, S. Fortier, M. Li, S. Yuan, E. Birman, K. Forner, M. N. Boivin, K. Doody, M. Tremblay, B. Annabi and J. Galipeau (2008). "Mesenchymal stromal cell-derived CCL2 suppresses plasma cell immunoglobulin production via STAT3 inactivation and PAX5 induction." Blood **112**(13): 4991-4998.

Rafii, R., M. M. Juarez, T. E. Albertson and A. L. Chan (2013). "A review of current and novel therapies for idiopathic pulmonary fibrosis." J Thorac Dis **5**(1): 48-73.

Ragosta, M., W. L. Barry, L. W. Gimple, S. D. Gertz, K. W. McCoy, G. A. Stouffer, C. A. McNamara, E. R. Powers, G. K. Owens and I. J. Sarembock (1996). "Effect of thrombin inhibition with desulfatohirudin on early kinetics of cellular proliferation after balloon angioplasty in atherosclerotic rabbits." Circulation **93**(6): 1194-1200.

Ramasamy, R., E. W. Lam, I. Soeiro, V. Tisato, D. Bonnet and F. Dazzi (2007). "Mesenchymal stem cells inhibit proliferation and apoptosis of tumor cells: impact on in vivo tumor growth." Leukemia **21**(2): 304-310.

Randall, K. and J. E. Coggle (1995). "Expression of transforming growth factor-beta 1 in mouse skin during the acute phase of radiation damage." Int J Radiat Biol **68**(3): 301-309.

Raposo, G. and W. Stoorvogel (2013). "Extracellular vesicles: exosomes, microvesicles, and friends." J Cell Biol **200**(4): 373-383.

Rasmusson, I., K. Le Blanc, B. Sundberg and O. Ringden (2007). "Mesenchymal stem cells stimulate antibody secretion in human B cells." Scand J Immunol **65**(4): 336-343.

Rasmusson, I., O. Ringden, B. Sundberg and K. Le Blanc (2005). "Mesenchymal stem cells inhibit lymphocyte proliferation by mitogens and alloantigens by different mechanisms." Exp Cell Res **305**(1): 33-41.

Rastegar, F., D. Shenaq, J. Huang, W. Zhang, B. Q. Zhang, B. C. He, L. Chen, G. W. Zuo, Q. Luo, Q. Shi, E. R. Wagner, E. Huang, Y. Gao, J. L. Gao, S. H. Kim, J. Z. Zhou, Y. Bi, Y. Su, G. Zhu, J. Luo, X. Luo, J. Qin, R. R. Reid, H. H. Luu, R. C. Haydon, Z. L. Deng and T. C. He (2010). "Mesenchymal stem cells: Molecular characteristics and clinical applications." World J Stem Cells **2**(4): 67-80.

Rehman, J., D. Traktuev, J. Li, S. Merfeld-Clauss, C. J. Temm-Grove, J. E. Bovenkerk, C. L. Pell, B. H. Johnstone, R. V. Considine and K. L. March (2004). "Secretion of angiogenic and antiapoptotic factors by human adipose stromal cells." Circulation **109**(10): 1292-1298.

Reiman, R. M., R. W. Thompson, C. G. Feng, D. Hari, R. Knight, A. W. Cheever, H. F. Rosenberg and T. A. Wynn (2006). "Interleukin-5 (IL-5) augments the progression of liver fibrosis by regulating IL-13 activity." Infect Immun **74**(3): 1471-1479.

Reinders, M. E., J. W. de Fijter, H. Roelofs, I. M. Bajema, D. K. de Vries, A. F. Schaapherder, F. H. Claas, P. P. van Miert, D. L. Roelen, C. van Kooten, W. E. Fibbe and T. J. Rabelink (2013). "Autologous bone marrow-derived mesenchymal stromal cells for the treatment of allograft rejection after renal transplantation: results of a phase I study." Stem Cells Transl Med **2**(2): 107-111.

Reinhardt, D., H. H. Sigusch, J. Hensse, S. C. Tyagi, R. Korfer and H. R. Figulla (2002). "Cardiac remodelling in end stage heart failure: upregulation of matrix metalloproteinase (MMP) irrespective of the underlying disease, and evidence for a direct inhibitory effect of ACE inhibitors on MMP." Heart **88**(5): 525-530.

Reth, M. (2002). "Hydrogen peroxide as second messenger in lymphocyte activation." Nat Immunol **3**(12): 1129-1134.

Rhee, Y. H., J. Y. Ko, M. Y. Chang, S. H. Yi, D. Kim, C. H. Kim, J. W. Shim, A. Y. Jo, B. W. Kim, H. Lee, S. H. Lee, W. Suh, C. H. Park, H. C. Koh, Y. S. Lee, R. Lanza, K. S. Kim and S. H. Lee (2011). "Protein-based human iPS cells efficiently generate functional dopamine neurons and can treat a rat model of Parkinson disease." J Clin Invest **121**(6): 2326-2335.

Riboli, E. (2014). "The role of metabolic carcinogenesis in cancer causation and prevention: evidence from the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition." Cancer Treat Res **159**: 3-20.

Riches, D. W., D. S. Backos and E. F. Redente (2015). "ROCK and Rho: Promising therapeutic targets to ameliorate pulmonary fibrosis." Am J Pathol **185**(4): 909-912.

Richter, A., S. M. Puddicombe, J. L. Lordan, F. Bucchieri, S. J. Wilson, R. Djukanovic, G. Dent, S. T. Holgate and D. E. Davies (2001). "The contribution of interleukin (IL)-4 and IL-13 to the epithelial-mesenchymal trophic unit in asthma." Am J Respir Cell Mol Biol **25**(3): 385-391.

Ridley, A. J. (2001). "Rho family proteins: coordinating cell responses." Trends Cell Biol **11**(12): 471-477.

Rieder, F., J. Brenmoehl, S. Leeb, J. Scholmerich and G. Rogler (2007). "Wound healing and fibrosis in intestinal disease." Gut **56**(1): 130-139.

Rieder, F., S. P. Kessler, G. A. West, S. Bhilocha, C. de la Motte, T. M. Sadler, B. Gopalan, E. Stylianou and C. Fiocchi (2011). "Inflammation-induced endothelial-to-mesenchymal transition: a novel mechanism of intestinal fibrosis." Am J Pathol **179**(5): 2660-2673.

Rigotti, G., A. Marchi, M. Galie, G. Baroni, D. Benati, M. Krampera, A. Pasini and A. Sbarbati (2007). "Clinical treatment of radiotherapy tissue damage by lipoaspirate transplant: a healing process mediated by adipose-derived adult stem cells." Plast Reconstr Surg **119**(5): 1409-1422; discussion 1423-1404.

Rigotti, G., A. Marchi, P. Stringhini, G. Baroni, M. Galie, A. M. Molino, A. Mercanti, R. Micciolo and A. Sbarbati (2010). "Determining the oncological risk of autologous lipoaspirate grafting for post-mastectomy breast reconstruction." Aesthetic Plast Surg **34**(4): 475-480.

Ringden, O., M. Uzunel, B. Sundberg, L. Lonnies, S. Nava, J. Gustafsson, L. Henningsohn and K. Le Blanc (2007). "Tissue repair using allogeneic mesenchymal stem cells for hemorrhagic cystitis, pneumomediastinum and perforated colon." Leukemia **21**(11): 2271-2276.

Ringe, J., S. Strassburg, K. Neumann, M. Endres, M. Notter, G. R. Burmester, C. Kaps and M. Sittinger (2007). "Towards in situ tissue repair: human mesenchymal stem cells express chemokine receptors CXCR1, CXCR2 and CCR2, and migrate upon stimulation with CXCL8 but not CCL2." J Cell Biochem **101**(1): 135-146.

Riser, B. L., M. Denichilo, P. Cortes, C. Baker, J. M. Grondin, J. Yee and R. G. Narins (2000). "Regulation of connective tissue growth factor activity in cultured rat mesangial cells and its expression in experimental diabetic glomerulosclerosis." J Am Soc Nephrol **11**(1): 25-38.

Rizzo, R., D. Campioni, M. Stignani, L. Melchiorri, G. P. Bagnara, L. Bonsi, F. Alviano, G. Lanzoni, S. Moretti, A. Cuneo, F. Lanza and O. R. Baricordi (2008). "A functional role for soluble HLA-G antigens in immune modulation mediated by mesenchymal stromal cells." Cytotherapy **10**(4): 364-375.

Robert, S., T. Gicquel, T. Victoni, S. Valenca, E. Barreto, B. Bailly-Maitre, E. Boichot and V. Lagente (2016). "Involvement of matrix metalloproteinases (MMPs) and inflammasome pathway in molecular mechanisms of fibrosis." Biosci Rep **36**(4).

Robertson, I. B., M. Horiguchi, L. Zilberberg, B. Dabovic, K. Hadjiolova and D. B. Rifkin (2015). "Latent TGF-beta-binding proteins." Matrix Biol **47**: 44-53.

Rochefort, G. Y., B. Delorme, A. Lopez, O. Herault, P. Bonnet, P. Charbord, V. Eder and J. Domenech (2006). "Multipotential mesenchymal stem cells are mobilized into peripheral blood by hypoxia." Stem Cells **24**(10): 2202-2208.

Roddy, G. W., J. Y. Oh, R. H. Lee, T. J. Bartosh, J. Ylostalo, K. Coble, R. H. Rosa, Jr. and D. J. Prockop (2011). "Action at a distance: systemically administered adult stem/progenitor cells (MSCs) reduce inflammatory damage to the cornea without engraftment and primarily by secretion of TNF-alpha stimulated gene/protein 6." Stem Cells **29**(10): 1572-1579.

Rodemann, H. P. and M. Bamberg (1995). "Cellular basis of radiation-induced fibrosis." Radiother Oncol **35**(2): 83-90.

Roodhart, J. M., L. G. Daenen, E. C. Stigter, H. J. Prins, J. Gerrits, J. M. Houthuijzen, M. G. Gerritsen, H. S. Schipper, M. J. Backer, M. van Amersfoort, J. S. Vermaat, P. Moerer, K. Ishihara, E. Kalkhoven, J. H. Beijnen, P. W. Derksen, R. H. Medema, A. C. Martens, A. B. Brenkman and E. E. Voest (2011). "Mesenchymal stem cells induce resistance to chemotherapy through the release of platinum-induced fatty acids." Cancer Cell **20**(3): 370-383.

Roorda, B. D., A. ter Elst, W. A. Kamps and E. S. de Bont (2009). "Bone marrow-derived cells and tumor growth: contribution of bone marrow-derived cells to tumor micro-environments with special focus on mesenchymal stem cells." Crit Rev Oncol Hematol **69**(3): 187-198.

Rosenbloom, J., F. A. Mendoza and S. A. Jimenez (2013). "Strategies for anti-fibrotic therapies." Biochim Biophys Acta **1832**(7): 1088-1103.

Royce, S. G., M. Shen, K. P. Patel, B. M. Huuskes, S. D. Ricardo and C. S. Samuel (2015). "Mesenchymal stem cells and serelaxin synergistically abrogate established airway fibrosis in an experimental model of chronic allergic airways disease." Stem Cell Res **15**(3): 495-505.

Rubin, J. S., D. P. Bottaro and S. A. Aaronson (1993). "Hepatocyte growth factor/scatter factor and its receptor, the c-met proto-oncogene product." Biochim Biophys Acta **1155**(3): 357-371.

Rubin, P., C. J. Johnston, J. P. Williams, S. McDonald and J. N. Finkelstein (1995). "A perpetual cascade of cytokines postirradiation leads to pulmonary fibrosis." Int J Radiat Oncol Biol Phys **33**(1): 99-109.

Rustagi, T. and H. Mashimo (2011). "Endoscopic management of chronic radiation proctitis." World J Gastroenterol **17**(41): 4554-4562.

Rustom, A., R. Saffrich, I. Markovic, P. Walther and H. H. Gerdes (2004). "Nanotubular highways for intercellular organelle transport." Science **303**(5660): 1007-1010.

Rutella, S., G. Bonanno, A. Procoli, A. Mariotti, D. G. de Ritis, A. Curti, S. Danese, G. Pessina, S. Pandolfi, F. Natoni, A. Di Febo, G. Scambia, R. Manfredini, S. Salati, S. Ferrari, L. Pierelli, G. Leone and R. M. Lemoli (2006). "Hepatocyte growth factor favors monocyte differentiation into regulatory interleukin (IL)-10++IL-12low/neg accessory cells with dendritic-cell features." Blood **108**(1): 218-227.

Sabatini, F., L. Petecchia, M. Tavian, V. Jodon de Villeroche, G. A. Rossi and D. Brouty-Boye (2005). "Human bronchial fibroblasts exhibit a mesenchymal stem cell phenotype and multilineage differentiating potentialities." Lab Invest **85**(8): 962-971.

Saha, S., P. Bhanja, R. Kabarriti, L. Liu, A. A. Alfieri and C. Guha (2011). "Bone marrow stromal cell transplantation mitigates radiation-induced gastrointestinal syndrome in mice." PLoS One **6**(9): e24072.

Saito, S., G. Matsumiya, T. Sakaguchi, S. Miyagawa, T. Yamauchi, T. Kuratani and Y. Sawa (2010). "Cardiac fibrosis and cellular hypertrophy decrease the degree of reverse remodeling and improvement in cardiac function during left ventricular assist." J Heart Lung Transplant **29**(6): 672-679.

Salazar-Montes, A., L. Ruiz-Corro, A. Lopez-Reyes, E. Castrejon-Gomez and J. Armendariz-Borunda (2008). "Potent antioxidant role of pirfenidone in experimental cirrhosis." Eur J Pharmacol **595**(1-3): 69-77.

Salingcarnboriboon, R., H. Yoshitake, K. Tsuji, M. Obinata, T. Amagasa, A. Nifuji and M. Noda (2003). "Establishment of tendon-derived cell lines exhibiting pluripotent mesenchymal stem cell-like property." Exp Cell Res **287**(2): 289-300.

Sanders, K. M. (1996). "A case for interstitial cells of Cajal as pacemakers and mediators of neurotransmission in the gastrointestinal tract." Gastroenterology **111**(2): 492-515.

Sandler, N. G., M. M. Mentink-Kane, A. W. Cheever and T. A. Wynn (2003). "Global gene expression profiles during acute pathogen-induced pulmonary inflammation reveal divergent roles for Th1 and Th2 responses in tissue repair." J Immunol **171**(7): 3655-3667.

Sanggaard, K. W., C. Scavenius, A. J. Rasmussen, H. G. Wisniewski, I. B. Thogersen and J. J. Enghild "The TSG-6/HC2-mediated transfer is a dynamic process shuffling heavy chains between glycosaminoglycans." J Biol Chem **285**(29): 21988-21993.

Sant, G. R., D. Kempuraj, J. E. Marchand and T. C. Theoharides (2007). "The mast cell in interstitial cystitis: role in pathophysiology and pathogenesis." Urology **69**(4 Suppl): 34-40.

Sato, K., K. Ozaki, I. Oh, A. Meguro, K. Hatanaka, T. Nagai, K. Muroi and K. Ozawa (2007). "Nitric oxide plays a critical role in suppression of T-cell proliferation by mesenchymal stem cells." Blood **109**(1): 228-234.

Sato, K., N. Yamashita, M. Baba and T. Matsuyama (2003). "Regulatory dendritic cells protect mice from murine acute graft-versus-host disease and leukemia relapse." Immunity **18**(3): 367-379.

Sato, M. (2006). "Upregulation of the Wnt/beta-catenin pathway induced by transforming growth factor-beta in hypertrophic scars and keloids." Acta Derm Venereol **86**(4): 300-307.

Sato, S., T. Nagaoka, M. Hasegawa, T. Tamatani, T. Nakanishi, M. Takigawa and K. Takehara (2000). "Serum levels of connective tissue growth factor are elevated in patients with systemic sclerosis: association with extent of skin sclerosis and severity of pulmonary fibrosis." J Rheumatol **27**(1): 149-154.

Scarpino, S., A. Stoppacciaro, F. Ballerini, M. Marchesi, M. Prat, M. C. Stella, S. Sozzani, P. Allavena, A. Mantovani and L. P. Ruco (2000). "Papillary carcinoma of the thyroid: hepatocyte growth factor (HGF) stimulates tumor cells to release chemokines active in recruiting dendritic cells." Am J Pathol **156**(3): 831-837.

Schaue, D. and W. H. McBride (2012). "T lymphocytes and normal tissue responses to radiation." Front Oncol **2**: 119.

Schild, C. and B. Trueb (2002). "Mechanical stress is required for high-level expression of connective tissue growth factor." Exp Cell Res **274**(1): 83-91.

Schuppan, D. and E. G. Hahn (2000). "MMPs in the gut: inflammation hits the matrix." Gut **47**(1): 12-14.

Schwartz, S. D., J. P. Hubschman, G. Heilwell, V. Franco-Cardenas, C. K. Pan, R. M. Ostrick, E. Mickunas, R. Gay, I. Klimanskaya and R. Lanza (2012). "Embryonic stem cell trials for macular degeneration: a preliminary report." Lancet **379**(9817): 713-720.

Schwartz, S. D., C. D. Regillo, B. L. Lam, D. Eliott, P. J. Rosenfeld, N. Z. Gregori, J. P. Hubschman, J. L. Davis, G. Heilwell, M. Spirn, J. Maguire, R. Gay, J. Bateman, R. M. Ostrick, D. Morris, M. Vincent, E. Anglade, L. V. Del Priore and R. Lanza (2015). "Human embryonic stem cell-derived retinal pigment epithelium in patients with age-related macular degeneration and Stargardt's macular dystrophy: follow-up of two open-label phase 1/2 studies." Lancet **385**(9967): 509-516.

Secchiero, P., S. Zorzet, C. Tripodo, F. Corallini, E. Melloni, L. Caruso, R. Bosco, S. Ingrao, B. Zavan and G. Zauli (2010). "Human bone marrow mesenchymal stem cells display anti-cancer activity in SCID mice bearing disseminated non-Hodgkin's lymphoma xenografts." PLoS One **5**(6): e11140.

Semedo, P., M. Correa-Costa, M. Antonio Cenedeze, D. Maria Avancini Costa Malheiros, M. Antonia dos Reis, M. H. Shimizu, A. C. Seguro, A. Pacheco-Silva and N. O. Saraiva Camara (2009). "Mesenchymal stem cells attenuate renal fibrosis through immune modulation and remodeling properties in a rat remnant kidney model." Stem Cells **27**(12): 3063-3073.

Semont, A., C. Demarquay, R. Bessout, C. Durand, M. Benderitter and N. Mathieu (2013). "Mesenchymal stem cell therapy stimulates endogenous host progenitor cells to improve colonic epithelial regeneration." PLoS One **8**(7): e70170.

Semont, A., S. Francois, M. Mouiseddine, A. Francois, A. Sache, J. Frick, D. Thierry and A. Chapel (2006). "Mesenchymal stem cells increase self-renewal of small intestinal epithelium and accelerate structural recovery after radiation injury." Adv Exp Med Biol **585**: 19-30.

Semont, A., M. Mouiseddine, A. Francois, C. Demarquay, N. Mathieu, A. Chapel, A. Sache, D. Thierry, P. Laloi and P. Gourmelon (2010). "Mesenchymal stem cells improve small intestinal integrity through regulation of endogenous epithelial cell homeostasis." Cell Death Differ **17**(6): 952-961.

Seo, B. M., M. Miura, S. Gronthos, P. M. Bartold, S. Batouli, J. Brahim, M. Young, P. G. Robey, C. Y. Wang and S. Shi (2004). "Investigation of multipotent postnatal stem cells from human periodontal ligament." Lancet **364**(9429): 149-155.

Seo, K. W., S. Y. Sohn, D. H. Bhang, M. J. Nam, H. W. Lee and H. Y. Youn (2014). "Therapeutic effects of hepatocyte growth factor-overexpressing human umbilical cord blood-derived mesenchymal stem cells on liver fibrosis in rats." Cell Biol Int **38**(1): 106-116.

Serini, G., M. L. Bochaton-Piallat, P. Ropraz, A. Geinoz, L. Borsi, L. Zardi and G. Gabbiani (1998). "The fibronectin domain ED-A is crucial for myofibroblastic phenotype induction by transforming growth factor-beta1." J Cell Biol **142**(3): 873-881.

Shao, D. D., R. Suresh, V. Vakil, R. H. Gomer and D. Pilling (2008). "Pivotal Advance: Th-1 cytokines inhibit, and Th-2 cytokines promote fibrocyte differentiation." J Leukoc Biol **83**(6): 1323-1333.

Shi, S., Q. Zhang, Y. Xia, B. You, Y. Shan, L. Bao, L. Li, Y. You and Z. Gu (2016). "Mesenchymal stem cell-derived exosomes facilitate nasopharyngeal carcinoma progression." Am J Cancer Res **6**(2): 459-472.

Shi, Z., A. E. Wakil and D. C. Rockey (1997). "Strain-specific differences in mouse hepatic wound healing are mediated by divergent T helper cytokine responses." Proc Natl Acad Sci U S A **94**(20): 10663-10668.

Shimokawa, H. and S. Yasuda (2008). "Myocardial ischemia: current concepts and future perspectives." J Cardiol **52**(2): 67-78.

Shirato, K., H. Osawa, M. Kaizuka, N. Nakamura, T. Sugawara, M. Nakamura, M. Tamura, H. Yamabe and K. Okumura (2003). "Thrombin stimulates production of fibronectin by human proximal tubular epithelial cells via a transforming growth factor-beta-dependent mechanism." Nephrol Dial Transplant **18**(11): 2248-2254.

Silen, W. and S. Ito (1985). "Mechanisms for rapid re-epithelialization of the gastric mucosal surface." Annu Rev Physiol **47**: 217-229.

Simmons, J. G., J. B. Pucilowska, T. O. Keku and P. K. Lund (2002). "IGF-I and TGF-beta1 have distinct effects on phenotype and proliferation of intestinal fibroblasts." Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol **283**(3): G809-818.

Simon, K. (2016). "Colorectal cancer development and advances in screening." Clin Interv Aging **11**: 967-976.

Simone, N. L., B. P. Soule, L. Gerber, E. Augustine, S. Smith, R. M. Altemus, J. B. Mitchell and K. A. Camphausen (2007). "Oral pirfenidone in patients with chronic fibrosis resulting from radiotherapy: a pilot study." Radiat Oncol **2**: 19.

Singer, N. G. and A. I. Caplan (2011). "Mesenchymal stem cells: mechanisms of inflammation." Annu Rev Pathol **6**: 457-478.

Singhal, E., P. Kumar and P. Sen (2011). "A novel role for Bruton's tyrosine kinase in hepatocyte growth factor-mediated immunoregulation of dendritic cells." J Biol Chem **286**(37): 32054-32063.

Singhal, E. and P. Sen (2011). "Hepatocyte growth factor-induced c-Src-phosphatidylinositol 3-kinase-AKT-mammalian target of rapamycin pathway inhibits dendritic cell activation by blocking IkappaB kinase activity." Int J Biochem Cell Biol **43**(8): 1134-1146.

Skolekova, S., M. Matuskova, M. Bohac, L. Toro, E. Durinikova, S. Tyciakova, L. Demkova, J. Gursky and L. Kucerova (2016). "Cisplatin-induced mesenchymal stromal cells-mediated mechanism contributing to decreased antitumor effect in breast cancer cells." Cell Commun Signal **14**: 4.

Smith, A. M., F. Z. Rahman, B. Hayee, S. J. Graham, D. J. Marks, G. W. Sewell, C. D. Palmer, J. Wilde, B. M. Foxwell, I. S. Gloger, T. Sweeting, M. Marsh, A. P. Walker, S. L. Bloom and A. W. Segal (2009). "Disordered macrophage cytokine secretion underlies impaired acute inflammation and bacterial clearance in Crohn's disease." J Exp Med **206**(9): 1883-1897.

Smith, R. E., R. M. Strieter, S. H. Phan, N. W. Lukacs, G. B. Huffnagle, C. A. Wilke, M. D. Burdick, P. Lincoln, H. Evanoff and S. L. Kunkel (1994). "Production and function of murine macrophage inflammatory protein-1 alpha in bleomycin-induced lung injury." J Immunol **153**(10): 4704-4712.

So, K. A., K. J. Min, J. H. Hong and J. K. Lee (2015). "Interleukin-6 expression by interactions between gynecologic cancer cells and human mesenchymal stem cells promotes epithelial-mesenchymal transition." Int J Oncol **47**(4): 1451-1459.

Soehnlein, O. and L. Lindbom (2010). "Phagocyte partnership during the onset and resolution of inflammation." Nat Rev Immunol **10**(6): 427-439.

Soncini, M., E. Vertua, L. Gibelli, F. Zorzi, M. Denegri, A. Albertini, G. S. Wengler and O. Parolini (2007). "Isolation and characterization of mesenchymal cells from human fetal membranes." J Tissue Eng Regen Med **1**(4): 296-305.

Song, L., Y. J. Yang, Q. T. Dong, H. Y. Qian, R. L. Gao, S. B. Qiao, R. Shen, Z. X. He, M. J. Lu, S. H. Zhao, Y. J. Geng and B. J. Gersh (2013). "Atorvastatin enhance efficacy of mesenchymal stem cells treatment for swine myocardial infarction via activation of nitric oxide synthase." PLoS One **8**(5): e65702.

Song, W. K., K. M. Park, H. J. Kim, J. H. Lee, J. Choi, S. Y. Chong, S. H. Shim, L. V. Del Priore and R. Lanza (2015). "Treatment of macular degeneration using embryonic stem cell-derived retinal pigment epithelium: preliminary results in Asian patients." Stem Cell Reports **4**(5): 860-872.

Sordi, V., M. L. Malosio, F. Marchesi, A. Mercalli, R. Melzi, T. Giordano, N. Belmonte, G. Ferrari, B. E. Leone, F. Bertuzzi, G. Zerbini, P. Allavena, E. Bonifacio and L. Piemonti (2005). "Bone marrow mesenchymal stem cells express a restricted set of functionally active chemokine receptors capable of promoting migration to pancreatic islets." Blood **106**(2): 419-427.

Sorrell, J. M., M. A. Baber and A. I. Caplan (2009). "Influence of adult mesenchymal stem cells on in vitro vascular formation." Tissue Eng Part A **15**(7): 1751-1761.

Sorrentino, A., N. Thakur, S. Grimsby, A. Marcusson, V. von Bulow, N. Schuster, S. Zhang, C. H. Heldin and M. Landstrom (2008). "The type I TGF-beta receptor engages TRAF6 to activate TAK1 in a receptor kinase-independent manner." Nat Cell Biol **10**(10): 1199-1207.

Sotiropoulou, P. A., S. A. Perez, A. D. Gritzapis, C. N. Baxevanis and M. Papamichail (2006). "Interactions between human mesenchymal stem cells and natural killer cells." Stem Cells **24**(1): 74-85.

Spaggiari, G. M., H. Abdelrazik, F. Becchetti and L. Moretta (2009). "MSCs inhibit monocyte-derived DC maturation and function by selectively interfering with the generation of immature DCs: central role of MSC-derived prostaglandin E2." Blood **113**(26): 6576-6583.

Spaggiari, G. M., A. Capobianco, H. Abdelrazik, F. Becchetti, M. C. Mingari and L. Moretta (2008). "Mesenchymal stem cells inhibit natural killer-cell proliferation, cytotoxicity, and cytokine production: role of indoleamine 2,3-dioxygenase and prostaglandin E2." Blood **111**(3): 1327-1333.

Spaggiari, G. M., A. Capobianco, S. Becchetti, M. C. Mingari and L. Moretta (2006). "Mesenchymal stem cell-natural killer cell interactions: evidence that activated NK cells are capable

of killing MSCs, whereas MSCs can inhibit IL-2-induced NK-cell proliferation." Blood **107**(4): 1484-1490.

Spees, J. L., R. H. Lee and C. A. Gregory (2016). "Mechanisms of mesenchymal stem/stromal cell function." Stem Cell Res Ther **7**(1): 125.

Spees, J. L., S. D. Olson, M. J. Whitney and D. J. Prockop (2006). "Mitochondrial transfer between cells can rescue aerobic respiration." Proc Natl Acad Sci U S A **103**(5): 1283-1288.

Splawski, J. B., L. M. McAnally and P. E. Lipsky (1990). "IL-2 dependence of the promotion of human B cell differentiation by IL-6 (BSF-2)." J Immunol **144**(2): 562-569.

Srivastava, M., D. Zurakowski, P. Cheifetz, A. Leichtner and A. Bousvaros (2001). "Elevated serum hepatocyte growth factor in children and young adults with inflammatory bowel disease." J Pediatr Gastroenterol Nutr **33**(5): 548-553.

Stallmach, A., D. Schuppan, H. H. Riese, H. Matthes and E. O. Riecken (1992). "Increased collagen type III synthesis by fibroblasts isolated from strictures of patients with Crohn's disease." Gastroenterology **102**(6): 1920-1929.

Stern, R., A. A. Asari and K. N. Sugahara (2006). "Hyaluronan fragments: an information-rich system." Eur J Cell Biol **85**(8): 699-715.

Stone, R. C., I. Pastar, N. Ojeh, V. Chen, S. Liu, K. I. Garzon and M. Tomic-Canic (2016). "Epithelial-mesenchymal transition in tissue repair and fibrosis." Cell Tissue Res.

Strup-Perrot, C., D. Mathe, C. Linard, D. Violot, F. Milliat, A. Francois, J. Bourhis and M. C. Vozenin-Brotons (2004). "Global gene expression profiles reveal an increase in mRNA levels of collagens, MMPs, and TIMPs in late radiation enteritis." Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol **287**(4): G875-885.

Strup-Perrot, C., M. C. Vozenin-Brotons, M. Vandamme, M. Benderitter and D. Mathe (2006). "Expression and activation of MMP -2, -3, -9, -14 are induced in rat colon after abdominal X-irradiation." Scand J Gastroenterol **41**(1): 60-70.

Strup-Perrot, C., M. C. Vozenin-Brotons, M. Vandamme, C. Linard and D. Mathe (2005). "Expression of matrix metalloproteinases and tissue inhibitor metalloproteinases increases in X-irradiated rat ileum despite the disappearance of CD8a T cells." World J Gastroenterol **11**(40): 6312-6321.

Studeny, M., F. C. Marini, J. L. Dembinski, C. Zompetta, M. Cabreira-Hansen, B. N. Bekele, R. E. Champlin and M. Andreeff (2004). "Mesenchymal stem cells: potential precursors for tumor stroma and targeted-delivery vehicles for anticancer agents." J Natl Cancer Inst **96**(21): 1593-1603.

Stuhlmeier, K. M. and C. Pollaschek (2004). "Differential effect of transforming growth factor beta (TGF-beta) on the genes encoding hyaluronan synthases and utilization of the p38 MAPK pathway in TGF-beta-induced hyaluronan synthase 1 activation." J Biol Chem **279**(10): 8753-8760.

Suga, H., H. Eto, T. Shigeura, K. Inoue, N. Aoi, H. Kato, S. Nishimura, I. Manabe, K. Gonda and K. Yoshimura (2009). "IFATS collection: Fibroblast growth factor-2-induced hepatocyte growth factor secretion by adipose-derived stromal cells inhibits postinjury fibrogenesis through a c-Jun N-terminal kinase-dependent mechanism." Stem Cells **27**(1): 238-249.

Suganuma, H., A. Sato, R. Tamura and K. Chida (1995). "Enhanced migration of fibroblasts derived from lungs with fibrotic lesions." Thorax **50**(9): 984-989.

Sugiyama, T., H. Kohara, M. Noda and T. Nagasawa (2006). "Maintenance of the hematopoietic stem cell pool by CXCL12-CXCR4 chemokine signaling in bone marrow stromal cell niches." Immunity **25**(6): 977-988.

Sun, C. K., C. H. Yen, Y. C. Lin, T. H. Tsai, L. T. Chang, Y. H. Kao, S. Chua, M. Fu, S. F. Ko, S. Leu and H. K. Yip (2011). "Autologous transplantation of adipose-derived mesenchymal stem cells markedly reduced acute ischemia-reperfusion lung injury in a rodent model." J Transl Med **9**: 118.

Sun, R., A. Sbai, G. Ganem, M. Boudabous, F. Collin, P. Y. Marcy, A. Doglio and J. Thariat (2014). "[Non-targeted effects (bystander, abscopal) of external beam radiation therapy: an overview for the clinician]." Cancer Radiother **18**(8): 770-778.

Suresh, S. C., V. Selvaraju, M. Thirunavukkarasu, J. W. Goldman, A. Husain, J. Alexander Palesty, J. A. Sanchez, D. W. McFadden and N. Maulik (2015). "Thioredoxin-1 (Trx1) engineered mesenchymal stem cell therapy increased pro-angiogenic factors, reduced fibrosis and improved heart function in the infarcted rat myocardium." Int J Cardiol **201**: 517-528.

Sutherland, H. J., C. J. Eaves, P. M. Lansdorp, J. D. Thacker and D. E. Hogge (1991). "Differential regulation of primitive human hematopoietic cells in long-term cultures maintained on genetically engineered murine stromal cells." Blood **78**(3): 666-672.

Tahara, Y., A. Ido, S. Yamamoto, Y. Miyata, H. Uto, T. Hori, K. Hayashi and H. Tsubouchi (2003). "Hepatocyte growth factor facilitates colonic mucosal repair in experimental ulcerative colitis in rats." J Pharmacol Exp Ther **307**(1): 146-151.

Taichman, R. S. (2005). "Blood and bone: two tissues whose fates are intertwined to create the hematopoietic stem-cell niche." Blood **105**(7): 2631-2639.

Takahashi, K., K. Tanabe, M. Ohnuki, M. Narita, T. Ichisaka, K. Tomoda and S. Yamanaka (2007). "Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors." Cell **131**(5): 861-872.

Takahashi, K. and S. Yamanaka (2006). "Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors." Cell **126**(4): 663-676.

Takai, K., J. Hara, K. Matsumoto, G. Hosoi, Y. Osugi, A. Tawa, S. Okada and T. Nakamura (1997). "Hepatocyte growth factor is constitutively produced by human bone marrow stromal cells and indirectly promotes hematopoiesis." Blood **89**(5): 1560-1565.

Takakuta, K., A. Fujimori, T. Chikanishi, A. Tanokura, Y. Iwatsuki, M. Yamamoto, H. Nakajima, M. Okada and H. Itoh (2010). "Renoprotective properties of pirfenidone in subtotally nephrectomized rats." Eur J Pharmacol **629**(1-3): 118-124.

Tamarat, R., J. J. Lataillade, E. Bey, P. Gourmelon and M. Benderitter (2012). "Stem cell therapy: from bench to bedside." Radiat Prot Dosimetry **151**(4): 633-639.

Tamura, S., T. Sugawara, Y. Tokoro, H. Taniguchi, K. Fukao, H. Nakauchi and Y. Takahama (1998). "Expression and function of c-Met, a receptor for hepatocyte growth factor, during T-cell development." Scand J Immunol **47**(4): 296-301.

Tan, C. Y., R. C. Lai, W. Wong, Y. Y. Dan, S. K. Lim and H. K. Ho (2014). "Mesenchymal stem cell-derived exosomes promote hepatic regeneration in drug-induced liver injury models." Stem Cell Res Ther **5**(3): 76.

Tan, R. J., D. Zhou, L. Zhou and Y. Liu (2014). "Wnt/beta-catenin signaling and kidney fibrosis." Kidney Int Suppl (2011) **4**(1): 84-90.

Tan, T. K., G. Zheng, T. T. Hsu, S. R. Lee, J. Zhang, Y. Zhao, X. Tian, Y. Wang, Y. M. Wang, Q. Cao, Y. Wang, V. W. Lee, C. Wang, D. Zheng, S. I. Alexander, E. Thompson and D. C. Harris (2013). "Matrix metalloproteinase-9 of tubular and macrophage origin contributes to the pathogenesis of renal fibrosis via macrophage recruitment through osteopontin cleavage." Lab Invest **93**(4): 434-449.

Taniyama, Y., R. Morishita, M. Aoki, K. Hiraoka, K. Yamasaki, N. Hashiya, K. Matsumoto, T. Nakamura, Y. Kaneda and T. Ogihara (2002). "Angiogenesis and antifibrotic action by hepatocyte growth factor in cardiomyopathy." Hypertension **40**(1): 47-53.

Taniyama, Y., R. Morishita, H. Nakagami, A. Moriguchi, H. Sakonjo, K. Shokei, K. Matsumoto, T. Nakamura, J. Higaki and T. Ogihara (2000). "Potential contribution of a novel antifibrotic factor, hepatocyte growth factor, to prevention of myocardial fibrosis by angiotensin II blockade in cardiomyopathic hamsters." Circulation **102**(2): 246-252.

Theis, V. S., R. Sripadam, V. Ramani and S. Lal (2010). "Chronic radiation enteritis." Clin Oncol (R Coll Radiol) **22**(1): 70-83.

Thery, C., L. Zitvogel and S. Amigorena (2002). "Exosomes: composition, biogenesis and function." Nat Rev Immunol **2**(8): 569-579.

Tian, L. L., W. Yue, F. Zhu, S. Li and W. Li (2011). "Human mesenchymal stem cells play a dual role on tumor cell growth in vitro and in vivo." J Cell Physiol **226**(7): 1860-1867.

Togel, F., K. Weiss, Y. Yang, Z. Hu, P. Zhang and C. Westenfelder (2007). "Vasculotropic, paracrine actions of infused mesenchymal stem cells are important to the recovery from acute kidney injury." Am J Physiol Renal Physiol **292**(5): F1626-1635.

Tolg, C., S. R. Hamilton, E. Zalinska, L. McCulloch, R. Amin, N. Akentieva, F. Winnik, R. Savani, D. J. Bagli, L. G. Luyt, M. K. Cowman, J. B. McCarthy and E. A. Turley (2012). "A RHAMM mimetic

peptide blocks hyaluronan signaling and reduces inflammation and fibrogenesis in excisional skin wounds." Am J Pathol **181**(4): 1250-1270.

Toma, J. G., M. Akhavan, K. J. Fernandes, F. Barnabe-Heider, A. Sadikot, D. R. Kaplan and F. D. Miller (2001). "Isolation of multipotent adult stem cells from the dermis of mammalian skin." Nat Cell Biol **3**(9): 778-784.

Tomasek, J. J., G. Gabbiani, B. Hinz, C. Chaponnier and R. A. Brown (2002). "Myofibroblasts and mechano-regulation of connective tissue remodelling." Nat Rev Mol Cell Biol **3**(5): 349-363.

Tomasoni, S., L. Longaretti, C. Rota, M. Morigi, S. Conti, E. Gotti, C. Capelli, M. Introna, G. Remuzzi and A. Benigni (2013). "Transfer of growth factor receptor mRNA via exosomes unravels the regenerative effect of mesenchymal stem cells." Stem Cells Dev **22**(5): 772-780.

Tomchuck, S. L., K. J. Zwezdaryk, S. B. Coffelt, R. S. Waterman, E. S. Danka and A. B. Scandurro (2008). "Toll-like receptors on human mesenchymal stem cells drive their migration and immunomodulating responses." Stem Cells **26**(1): 99-107.

Torricelli, A. A., A. Santhanam, J. Wu, V. Singh and S. E. Wilson (2016). "The corneal fibrosis response to epithelial-stromal injury." Exp Eye Res **142**: 110-118.

Trotman, J., I. Nivison-Smith and A. Dodds (1999). "Haemorrhagic cystitis: incidence and risk factors in a transplant population using hyperhydration." Bone Marrow Transplant **23**(8): 797-801.

Tsai, P. C., T. W. Fu, Y. M. Chen, T. L. Ko, T. H. Chen, Y. H. Shih, S. C. Hung and Y. S. Fu (2009). "The therapeutic potential of human umbilical mesenchymal stem cells from Wharton's jelly in the treatment of rat liver fibrosis." Liver Transpl **15**(5): 484-495.

Tse, W. T., J. D. Pendleton, W. M. Beyer, M. C. Egalka and E. C. Guinan (2003). "Suppression of allogeneic T-cell proliferation by human marrow stromal cells: implications in transplantation." Transplantation **75**(3): 389-397.

Ueno, T., A. Nakashima, S. Doi, T. Kawamoto, K. Honda, Y. Yokoyama, T. Doi, Y. Higashi, N. Yorioka, Y. Kato, N. Kohno and T. Masaki (2013). "Mesenchymal stem cells ameliorate experimental peritoneal fibrosis by suppressing inflammation and inhibiting TGF-beta1 signaling." Kidney Int **84**(2): 297-307.

Ulloa, L., J. Doody and J. Massague (1999). "Inhibition of transforming growth factor-beta/SMAD signalling by the interferon-gamma/STAT pathway." Nature **397**(6721): 710-713.

Ungefroren, H., S. Sebens, D. Seidl, H. Lehnert and R. Hass (2011). "Interaction of tumor cells with the microenvironment." Cell Commun Signal **9**: 18.

Vaday, G. G. and O. Lider (2000). "Extracellular matrix moieties, cytokines, and enzymes: dynamic effects on immune cell behavior and inflammation." J Leukoc Biol **67**(2): 149-159.

Valencia, X., G. Stephens, R. Goldbach-Mansky, M. Wilson, E. M. Shevach and P. E. Lipsky (2006). "TNF downmodulates the function of human CD4+CD25hi T-regulatory cells." Blood **108**(1): 253-261.

Van De Water, L., S. Varney and J. J. Tomasek (2013). "Mechanoregulation of the Myofibroblast in Wound Contraction, Scarring, and Fibrosis: Opportunities for New Therapeutic Intervention." Adv Wound Care (New Rochelle) **2**(4): 122-141.

Vanhoutte, D., M. Schellings, Y. Pinto and S. Heymans (2006). "Relevance of matrix metalloproteinases and their inhibitors after myocardial infarction: a temporal and spatial window." Cardiovasc Res **69**(3): 604-613.

Velling, T., J. Risteli, K. Wennerberg, D. F. Mosher and S. Johansson (2002). "Polymerization of type I and III collagens is dependent on fibronectin and enhanced by integrins alpha 11beta 1 and alpha 2beta 1." J Biol Chem **277**(40): 37377-37381.

Verheij, M., L. G. Dewit and J. A. van Mourik (1995). "The effect of ionizing radiation on endothelial tissue factor activity and its cellular localization." Thromb Haemost **73**(5): 894-895.

Verrecchia, F. and A. Mauviel (2002). "Transforming growth factor-beta signaling through the Smad pathway: role in extracellular matrix gene expression and regulation." J Invest Dermatol **118**(2): 211-215.

Verrecchia, F. and A. Mauviel (2007). "Transforming growth factor-beta and fibrosis." World J Gastroenterol **13**(22): 3056-3062.

Vincent, T., E. P. Neve, J. R. Johnson, A. Kukalev, F. Rojo, J. Albanell, K. Pietras, I. Virtanen, L. Philipson, P. L. Leopold, R. G. Crystal, A. G. de Herreros, A. Moustakas, R. F. Pettersson and J. Fuxe (2009). "A SNAIL1-SMAD3/4 transcriptional repressor complex promotes TGF-beta mediated epithelial-mesenchymal transition." Nat Cell Biol **11**(8): 943-950.

Vinci, V., G. Borbon, L. Codolini, G. Pajardi, F. M. Klinger and F. Caviggioli (2013). "Fat grafting versus adipose-derived stem cell therapy: distinguishing indications, techniques, and outcomes." Aesthetic Plast Surg **37**(4): 856-857.

Vodovotz, Y., C. Bogdan, J. Paik, Q. W. Xie and C. Nathan (1993). "Mechanisms of suppression of macrophage nitric oxide release by transforming growth factor beta." J Exp Med **178**(2): 605-613.

Voll, R. E., M. Herrmann, E. A. Roth, C. Stach, J. R. Kalden and I. Girkontaite (1997). "Immunosuppressive effects of apoptotic cells." Nature **390**(6658): 350-351.

von Moltke, J., M. Ji, H. E. Liang and R. M. Locksley (2016). "Tuft-cell-derived IL-25 regulates an intestinal ILC2-epithelial response circuit." Nature **529**(7585): 221-225.

Voswinkel, J., S. Francois, J. M. Simon, M. Benderitter, N. C. Gorin, M. Mohty, L. Fouillard and A. Chapel (2013). "Use of mesenchymal stem cells (MSC) in chronic inflammatory fistulizing and fibrotic diseases: a comprehensive review." Clin Rev Allergy Immunol **45**(2): 180-192.

Vozenin-Brotons, M. C., F. Milliat, C. Linard, C. Strup, A. Francois, J. C. Sabourin, P. Lasser, A. Lusinchi, E. Deutsch, T. Girinsky, J. Aigueperse, J. Bourhis and D. Mathe (2004). "Gene expression profile in human late radiation enteritis obtained by high-density cDNA array hybridization." Radiat Res **161**(3): 299-311.

Vozenin-Brotons, M. C., F. Milliat, J. C. Sabourin, A. C. de Gouville, A. Francois, P. Lasser, P. Morice, C. Haie-Meder, A. Lusinchi, S. Antoun, J. Bourhis, D. Mathe, T. Girinsky and J. Aigueperse (2003). "Fibrogenic signals in patients with radiation enteritis are associated with increased connective tissue growth factor expression." Int J Radiat Oncol Biol Phys **56**(2): 561-572.

Wang, S., M. C. Wilkes, E. B. Leof and R. Hirschberg (2005). "Imatinib mesylate blocks a non-Smad TGF-beta pathway and reduces renal fibrogenesis in vivo." FASEB J **19**(1): 1-11.

Wang, Y., Y. Deng and G. Q. Zhou (2008). "SDF-1alpha/CXCR4-mediated migration of systemically transplanted bone marrow stromal cells towards ischemic brain lesion in a rat model." Brain Res **1195**: 104-112.

Wang, Y., F. Lian, J. Li, W. Fan, H. Xu, X. Yang, L. Liang, W. Chen and J. Yang (2012). "Adipose derived mesenchymal stem cells transplantation via portal vein improves microcirculation and ameliorates liver fibrosis induced by CCl4 in rats." J Transl Med **10**: 133.

Ward, W. F., Y. T. Kim, A. Molteni and N. H. Solliday (1988). "Radiation-induced pulmonary endothelial dysfunction in rats: modification by an inhibitor of angiotensin converting enzyme." Int J Radiat Oncol Biol Phys **15**(1): 135-140.

Ware, J. E., Jr. and C. D. Sherbourne (1992). "The MOS 36-item short-form health survey (SF-36). I. Conceptual framework and item selection." Med Care **30**(6): 473-483.

Waterman, R. S., S. L. Henkle and A. M. Betancourt (2012). "Mesenchymal stem cell 1 (MSC1)-based therapy attenuates tumor growth whereas MSC2-treatment promotes tumor growth and metastasis." PLoS One **7**(9): e45590.

Waterman, R. S., J. Morgenweck, B. D. Nossaman, A. E. Scandurro, S. A. Scandurro and A. M. Betancourt (2012). "Anti-inflammatory mesenchymal stem cells (MSC2) attenuate symptoms of painful diabetic peripheral neuropathy." Stem Cells Transl Med **1**(7): 557-565.

Waterman, R. S., S. L. Tomchuck, S. L. Henkle and A. M. Betancourt (2010). "A new mesenchymal stem cell (MSC) paradigm: polarization into a pro-inflammatory MSC1 or an Immunosuppressive MSC2 phenotype." PLoS One **5**(4): e10088.

Welch-Reardon, K. M., S. M. Ehsan, K. Wang, N. Wu, A. C. Newman, M. Romero-Lopez, A. H. Fong, S. C. George, R. A. Edwards and C. C. Hughes (2014). "Angiogenic sprouting is regulated by endothelial cell expression of Slug." J Cell Sci **127**(Pt 9): 2017-2028.

Weng, J. Y., X. Du, S. X. Geng, Y. W. Peng, Z. Wang, Z. S. Lu, S. J. Wu, C. W. Luo, R. Guo, W. Ling, C. X. Deng, P. J. Liao and A. P. Xiang (2010). "Mesenchymal stem cell as salvage treatment for refractory chronic GVHD." Bone Marrow Transplant **45**(12): 1732-1740.

Weston, C. R. and R. J. Davis (2002). "The JNK signal transduction pathway." Curr Opin Genet Dev **12**(1): 14-21.

Whiteman, E. L., C. J. Liu, E. R. Fearon and B. Margolis (2008). "The transcription factor snail represses Crumbs3 expression and disrupts apico-basal polarity complexes." Oncogene **27**(27): 3875-3879.

Wilkes, M. C., H. Mitchell, S. G. Penheiter, J. J. Dore, K. Suzuki, M. Edens, D. K. Sharma, R. E. Pagano and E. B. Leof (2005). "Transforming growth factor-beta activation of phosphatidylinositol 3-kinase is independent of Smad2 and Smad3 and regulates fibroblast responses via p21-activated kinase-2." Cancer Res **65**(22): 10431-10440.

Wilson, M. S., S. K. Madala, T. R. Ramalingam, B. R. Gochuico, I. O. Rosas, A. W. Cheever and T. A. Wynn (2010). "Bleomycin and IL-1beta-mediated pulmonary fibrosis is IL-17A dependent." J Exp Med **207**(3): 535-552.

Wipff, P. J., D. B. Rifkin, J. J. Meister and B. Hinz (2007). "Myofibroblast contraction activates latent TGF-beta1 from the extracellular matrix." J Cell Biol **179**(6): 1311-1323.

Wisniewski, H. G., J. C. Hua, D. M. Poppers, D. Naime, J. Vilcek and B. N. Cronstein (1996). "TNF/IL-1-inducible protein TSG-6 potentiates plasmin inhibition by inter-alpha-inhibitor and exerts a strong anti-inflammatory effect in vivo." J Immunol **156**(4): 1609-1615.

Wisniewski, H. G. and J. Vilcek (2004). "Cytokine-induced gene expression at the crossroads of innate immunity, inflammation and fertility: TSG-6 and PTX3/TSG-14." Cytokine Growth Factor Rev **15**(2-3): 129-146.

Wu, C., S. Amini-Nik, P. Nadesan, W. L. Stanford and B. A. Alman (2010). "Aggressive fibromatosis (desmoid tumor) is derived from mesenchymal progenitor cells." Cancer Res **70**(19): 7690-7698.

Wu, H. J., W. H. Yiu, R. X. Li, D. W. Wong, J. C. Leung, L. Y. Chan, Y. Zhang, Q. Lian, M. Lin, H. F. Tse, K. N. Lai and S. C. Tang (2014). "Mesenchymal stem cells modulate albumin-induced renal tubular inflammation and fibrosis." PLoS One **9**(3): e90883.

Wu, Y., S. Huang, J. Enhe, K. Ma, S. Yang, T. Sun and X. Fu (2014). "Bone marrow-derived mesenchymal stem cell attenuates skin fibrosis development in mice." Int Wound J **11**(6): 701-710.

Wynn, T. A. (2004). "Fibrotic disease and the T(H)1/T(H)2 paradigm." Nat Rev Immunol **4**(8): 583-594.

Wynn, T. A. and L. Barron (2010). "Macrophages: master regulators of inflammation and fibrosis." Semin Liver Dis **30**(3): 245-257.

Wynn, T. A. and T. R. Ramalingam (2012). "Mechanisms of fibrosis: therapeutic translation for fibrotic disease." Nat Med **18**(7): 1028-1040.

Wynn, T. A. and K. M. Vannella (2016). "Macrophages in Tissue Repair, Regeneration, and Fibrosis." Immunity **44**(3): 450-462.

Xin, H., Y. Li, B. Buller, M. Katakowski, Y. Zhang, X. Wang, X. Shang, Z. G. Zhang and M. Chopp (2012). "Exosome-mediated transfer of miR-133b from multipotent mesenchymal stromal cells to neural cells contributes to neurite outgrowth." Stem Cells **30**(7): 1556-1564.

Xin, H., Y. Li and M. Chopp (2014). "Exosomes/miRNAs as mediating cell-based therapy of stroke." Front Cell Neurosci **8**: 377.

Xin, H., Y. Li, Y. Cui, J. J. Yang, Z. G. Zhang and M. Chopp (2013). "Systemic administration of exosomes released from mesenchymal stromal cells promote functional recovery and neurovascular plasticity after stroke in rats." J Cereb Blood Flow Metab **33**(11): 1711-1715.

Xin, H., Y. Li, Z. Liu, X. Wang, X. Shang, Y. Cui, Z. G. Zhang and M. Chopp (2013). "MiR-133b promotes neural plasticity and functional recovery after treatment of stroke with multipotent mesenchymal stromal cells in rats via transfer of exosome-enriched extracellular particles." Stem Cells **31**(12): 2737-2746.

Xu, J., W. Liao, D. Gu, L. Liang, M. Liu, W. Du, P. Liu, L. Zhang, S. Lu, C. Dong, B. Zhou and Z. Han (2009). "Neural ganglioside GD2 identifies a subpopulation of mesenchymal stem cells in umbilical cord." Cell Physiol Biochem **23**(4-6): 415-424.

Xu, P., J. Liu and R. Derynck (2012). "Post-translational regulation of TGF-beta receptor and Smad signaling." FEBS Lett **586**(14): 1871-1884.

Yaguchi, T., Y. Fukuda, M. Ishizaki and N. Yamanaka (1998). "Immunohistochemical and gelatin zymography studies for matrix metalloproteinases in bleomycin-induced pulmonary fibrosis." Pathol Int **48**(12): 954-963.

Yamabe, H., H. Osawa, H. Inuma, M. Kaizuka, N. Tamura, S. Tsunoda, Y. Baba, K. Shirato and K. Onodera (1997). "Thrombin stimulates production of transforming growth factor-beta by cultured human mesangial cells." Nephrol Dial Transplant **12**(3): 438-442.

Yamada, Y., S. Saito and H. Morikawa (1998). "Hepatocyte growth factor in human breast milk." Am J Reprod Immunol **40**(2): 112-120.

Yamanaka, S. (2007). "Strategies and new developments in the generation of patient-specific pluripotent stem cells." Cell Stem Cell **1**(1): 39-49.

Yamashita, M., K. Fatyol, C. Jin, X. Wang, Z. Liu and Y. E. Zhang (2008). "TRAF6 mediates Smad-independent activation of JNK and p38 by TGF-beta." Mol Cell **31**(6): 918-924.

Yan, Z., S. Winawer and E. Friedman (1994). "Two different signal transduction pathways can be activated by transforming growth factor beta 1 in epithelial cells." J Biol Chem **269**(18): 13231-13237.

Yang, H. W., M. G. Shin, S. Lee, J. R. Kim, W. S. Park, K. H. Cho, T. Meyer and W. D. Heo (2012). "Cooperative activation of PI3K by Ras and Rho family small GTPases." Mol Cell **47**(2): 281-290.

Yang, J., C. Dai and Y. Liu (2002). "Hepatocyte growth factor gene therapy and angiotensin II blockade synergistically attenuate renal interstitial fibrosis in mice." J Am Soc Nephrol **13**(10): 2464-2477.

Yang, J., C. Dai and Y. Liu (2003). "Hepatocyte growth factor suppresses renal interstitial myofibroblast activation and intercepts Smad signal transduction." Am J Pathol **163**(2): 621-632.

Yang, J., C. Dai and Y. Liu (2005). "A novel mechanism by which hepatocyte growth factor blocks tubular epithelial to mesenchymal transition." J Am Soc Nephrol **16**(1): 68-78.

Yang, X., J. Hao, Y. Mao, Z. Q. Jin, R. Cao, C. H. Zhu, X. H. Liu, C. Liu, X. L. Ding, X. D. Wang, D. Chen and X. Z. Wu (2016). "bFGF Promotes Migration and Induces Cancer-Associated Fibroblast Differentiation of Mouse Bone Mesenchymal Stem Cells to Promote Tumor Growth." Stem Cells Dev.

Yang, Y., V. Bucan, H. Baehre, J. von der Ohe, A. Otte and R. Hass (2015). "Acquisition of new tumor cell properties by MSC-derived exosomes." Int J Oncol **47**(1): 244-252.

Yang, Y., A. Otte and R. Hass (2015). "Human mesenchymal stroma/stem cells exchange membrane proteins and alter functionality during interaction with different tumor cell lines." Stem Cells Dev **24**(10): 1205-1222.

Yang, Z. X., Z. B. Han, Y. R. Ji, Y. W. Wang, L. Liang, Y. Chi, S. G. Yang, L. N. Li, W. F. Luo, J. P. Li, D. D. Chen, W. J. Du, X. C. Cao, G. S. Zhuo, T. Wang and Z. C. Han (2013). "CD106 identifies a subpopulation of mesenchymal stem cells with unique immunomodulatory properties." PLoS One **8**(3): e59354.

Yarnold, J. and M. C. Brotons (2010). "Pathogenetic mechanisms in radiation fibrosis." Radiother Oncol **97**(1): 149-161.

Yip, H. K., Y. C. Chang, C. G. Wallace, L. T. Chang, T. H. Tsai, Y. L. Chen, H. W. Chang, S. Leu, Y. Y. Zhen, C. Y. Tsai, K. H. Yeh, C. K. Sun and C. H. Yen (2013). "Melatonin treatment improves adipose-derived mesenchymal stem cell therapy for acute lung ischemia-reperfusion injury." J Pineal Res **54**(2): 207-221.

Yoshiji, H., R. Noguchi, S. Kuriyama, Y. Ikenaka, J. Yoshii, K. Yanase, T. Namisaki, M. Kitade, T. Masaki and H. Fukui (2005). "Imatinib mesylate (STI-571) attenuates liver fibrosis development in rats." Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol **288**(5): G907-913.

Yuan, W. and J. Varga (2001). "Transforming growth factor-beta repression of matrix metalloproteinase-1 in dermal fibroblasts involves Smad3." J Biol Chem **276**(42): 38502-38510.

Zaher, W., L. Harkness, A. Jafari and M. Kassem (2014). "An update of human mesenchymal stem cell biology and their clinical uses." Arch Toxicol **88**(5): 1069-1082.

Zeisberg, E. M., O. Tarnavski, M. Zeisberg, A. L. Dorfman, J. R. McMullen, E. Gustafsson, A. Chandraker, X. Yuan, W. T. Pu, A. B. Roberts, E. G. Neilson, M. H. Sayegh, S. Izumo and R. Kalluri (2007). "Endothelial-to-mesenchymal transition contributes to cardiac fibrosis." Nat Med **13**(8): 952-961.

Zhang, B., M. Wang, A. Gong, X. Zhang, X. Wu, Y. Zhu, H. Shi, L. Wu, W. Zhu, H. Qian and W. Xu (2015). "HucMSC-Exosome Mediated-Wnt4 Signaling Is Required for Cutaneous Wound Healing." Stem Cells **33**(7): 2158-2168.

Zhang, B., Y. Yin, R. C. Lai, S. S. Tan, A. B. Choo and S. K. Lim (2014). "Mesenchymal stem cells secrete immunologically active exosomes." Stem Cells Dev **23**(11): 1233-1244.

Zhang, D., M. Jiang and D. Miao (2011). "Transplanted human amniotic membrane-derived mesenchymal stem cells ameliorate carbon tetrachloride-induced liver cirrhosis in mouse." PLoS One **6**(2): e16789.

Zhang, J., J. F. Gong, W. Zhang, W. M. Zhu and J. S. Li (2008). "Effects of transplanted bone marrow mesenchymal stem cells on the irradiated intestine of mice." J Biomed Sci **15**(5): 585-594.

Zhang, J., D. Sun, Q. Fu, Q. Cao, H. Zhang and K. Zhang (2016). "Bone mesenchymal stem cells differentiate into myofibroblasts in the tumor microenvironment." Oncol Lett **12**(1): 644-650.

Zhang, J. L., D. J. Sun, C. M. Hou, Y. L. Wei, X. Y. Li, Z. Y. Yu, J. N. Feng, B. F. Shen, Y. Li and H. Xiao (2010). "CD3 mAb treatment ameliorated the severity of the cGVHD-induced lupus nephritis in mice by up-regulation of Foxp3+ regulatory T cells in the target tissue: kidney." Transpl Immunol **24**(1): 17-25.

Zhang, W., W. Ge, C. Li, S. You, L. Liao, Q. Han, W. Deng and R. C. Zhao (2004). "Effects of mesenchymal stem cells on differentiation, maturation, and function of human monocyte-derived dendritic cells." Stem Cells Dev **13**(3): 263-271.

Zhang, Y., D. Handley, T. Kaplan, H. Yu, A. S. Bais, T. Richards, K. V. Pandit, Q. Zeng, P. V. Benos, N. Friedman, O. Eickelberg and N. Kaminski (2011). "High throughput determination of TGFbeta1/SMAD3 targets in A549 lung epithelial cells." PLoS One **6**(5): e20319.

Zhang, Y. E. (2009). "Non-Smad pathways in TGF-beta signaling." Cell Res **19**(1): 128-139.

Zhang, Z., H. Lin, M. Shi, R. Xu, J. Fu, J. Lv, L. Chen, S. Lv, Y. Li, S. Yu, H. Geng, L. Jin, G. K. Lau and F. S. Wang (2012). "Human umbilical cord mesenchymal stem cells improve liver function and ascites in decompensated liver cirrhosis patients." J Gastroenterol Hepatol **27 Suppl 2**: 112-120.

Zhao, F., Y. F. Zhang, Y. G. Liu, J. J. Zhou, Z. K. Li, C. G. Wu and H. W. Qi (2008). "Therapeutic effects of bone marrow-derived mesenchymal stem cells engraftment on bleomycin-induced lung injury in rats." Transplant Proc **40**(5): 1700-1705.

Zhao, W. and M. E. Robbins (2009). "Inflammation and chronic oxidative stress in radiation-induced late normal tissue injury: therapeutic implications." Curr Med Chem **16**(2): 130-143.

Zhou, B., Y. Liu, M. Kahn, D. K. Ann, A. Han, H. Wang, C. Nguyen, P. Flodby, Q. Zhong, M. S. Krishnaveni, J. M. Liebler, P. Minoo, E. D. Crandall and Z. Borok (2012). "Interactions between beta-catenin and transforming growth factor-beta signaling pathways mediate epithelial-mesenchymal transition and are dependent on the transcriptional co-activator cAMP-response element-binding protein (CREB)-binding protein (CBP)." J Biol Chem **287**(10): 7026-7038.

Zhou, C. H., M. L. Li, A. L. Qin, S. X. Lv, T. Wen, X. Y. Zhu, L. Y. Li, Y. Dong, C. Y. Hu, D. M. Hu and S. F. Wang (2013). "Reduction of fibrosis in dibutyltin dichloride-induced chronic pancreatitis using rat umbilical mesenchymal stem cells from Wharton's jelly." Pancreas **42**(8): 1291-1302.

Zhou, D., R. J. Tan, L. Zhou, Y. Li and Y. Liu (2013). "Kidney tubular beta-catenin signaling controls interstitial fibroblast fate via epithelial-mesenchymal communication." Sci Rep **3**: 1878.

Zhu, F., Q. Wang, C. Guo, X. Wang, X. Cao, Y. Shi, F. Gao, C. Ma and L. Zhang (2011). "IL-17 induces apoptosis of vascular endothelial cells: a potential mechanism for human acute coronary syndrome." Clin Immunol **141**(2): 152-160.

Zhu, W., L. Huang, Y. Li, X. Zhang, J. Gu, Y. Yan, X. Xu, M. Wang, H. Qian and W. Xu (2012). "Exosomes derived from human bone marrow mesenchymal stem cells promote tumor growth in vivo." Cancer Lett **315**(1): 28-37.

Zhu, W., W. Xu, R. Jiang, H. Qian, M. Chen, J. Hu, W. Cao, C. Han and Y. Chen (2006). "Mesenchymal stem cells derived from bone marrow favor tumor cell growth in vivo." Exp Mol Pathol **80**(3): 267-274.

Zipori, D., M. Krupsky and P. Resnitzky (1987). "Stromal cell effects on clonal growth of tumors." Cancer **60**(8): 1757-1762.

Zuk, P. A., M. Zhu, H. Mizuno, J. Huang, J. W. Futrell, A. J. Katz, P. Benhaim, H. P. Lorenz and M. H. Hedrick (2001). "Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell-based therapies." Tissue Eng **7**(2): 211-228.

Zvaifler, N. J., L. Marinova-Mutafchieva, G. Adams, C. J. Edwards, J. Moss, J. A. Burger and R. N. Maini (2000). "Mesenchymal precursor cells in the blood of normal individuals." Arthritis Res **2**(6): 477-488.

Annexes

Lara Moussa, **Benoît Usunier**, Christelle Demarquay, Marc Benderitter, Radia Tamarat, Alexandra Sémont, Noëllle Mathieu, "Bowel Radiation Injury: Complexity of the pathophysiology and promises of cell and tissue engineering" Cell Transplantation, 2016.

Benoît Usunier, Marc Benderitter, Radia Tamarat, and Alain Chapel, "Management of fibrosis: The Mesenchymal Stromal Cells Breakthrough", Stem Cells International, vol. 2014, Article ID 340257, 26 pages, 2014. doi:10.1155/2014/340257.

Aniya Larbi, Maria Teresa Mitjavila-Garcia, Stéphane Flamant, Yannick Valogne, Denis Clay, **Benoît Usunier**, Bruno l'Homme, Olivier Féraud, Ibrahim Casal, Emilie Gobbo, Dominique Divers, Alain Chapel, Ali G. Turhan, Annelise Bennaceur-Griscelli, Rima Haddad, "Generation of Multipotent Early Lymphoid Progenitors from Human Embryonic Stem Cells", Stem Cells and Development. December 2014, 23(24): 2983-2995. doi:10.1089/scd.2014.0171.

Sabine François, **Benoît Usunier**, Luc Douay, Marc Benderitter, Alain Chapel, "Long-Term Quantitative Biodistribution and Side Effects of Human Mesenchymal Stem Cells (hMSCs) Engraftment in NOD/SCID Mice following Irradiation", Stem Cells International. 2014;2014:939275. doi:10.1155/2014/939275.

Cell Transplantation, Vol. 25, pp. 1723–1746, 2016
Printed in the USA. All rights reserved.
Copyright © 2016 Cognizant, LLC.

0963-6897/16 $90.00 + .00
DOI: http://dx.doi.org/10.3727/096368916X691664
E-ISSN 1555-3892
www.cognizantcommunication.com

Review

Bowel Radiation Injury: Complexity of the Pathophysiology and Promises of Cell and Tissue Engineering

Lara Moussa, Benoît Usunier, Christelle Demarquay, Marc Benderitter, Radia Tamarat, Alexandra Sémont, and Noëlle Mathieu

Institut de Radioprotection et de Sûreté Nucléaire (IRSN), PRP-HOM/SRBE/LR2I, Fontenay-aux-Roses, France

Ionizing radiation is effective to treat malignant pelvic cancers, but the toxicity to surrounding healthy tissue remains a substantial limitation. Early and late side effects not only limit the escalation of the radiation dose to the tumor but may also be life-threatening in some patients. Numerous preclinical studies determined specific mechanisms induced after irradiation in different compartments of the intestine. This review outlines the complexity of the pathogenesis, highlighting the roles of the epithelial barrier in the vascular network, and the inflammatory microenvironment, which together lead to chronic fibrosis. Despite the large number of pharmacological molecules available, the studies presented in this review provide encouraging proof of concept regarding the use of mesenchymal stromal cell (MSC) therapy to treat radiation-induced intestinal damage. The therapeutic efficacy of MSCs has been demonstrated in animal models and in patients, but an enormous number of cells and multiple injections are needed due to their poor engraftment capacity. Moreover, it has been observed that although MSCs have pleiotropic effects, some intestinal compartments are less restored after a high dose of irradiation. Future research should seek to optimize the efficacy of the injected cells, particularly with regard to extending their life span in the irradiated tissue. Moreover, improving the host microenvironment, combining MSCs with other specific regenerative cells, or introducing new tissue engineering strategies could be tested as methods to treat the severe side effects of pelvic radiotherapy.

Key words: Mesenchymal stromal cells (MSCs); Bowel; Radiotherapy side effects; Regenerative medicine

INTRODUCTION

Radiotherapy is a mainstay in the management of malignant pelvic diseases. However, exposure of healthy tissue within the radiation field to ionizing radiation (IR) remains inevitable and leads to acute and/or chronic symptoms, which have been described as a new pathology by Andreyev et al., namely, "pelvic radiation disease" (4). At present, the number of declared pelvic cancers is increasing, and the advances in the efficacy of tumor control have led to an increase in the number of cancer survivors suffering from treatment-related adverse effects. Paradoxically, modern therapies threaten to increase the burden of chronic toxicity, not reduce it. The gastrointestinal symptoms induced by the chronic toxicity of irradiation have a substantial impact on the patient's quality of life. It is therefore important to understand these complications. Acute reactions impacting normal tissue injury early after irradiation are related to oxidative stress, modification of gene expression, and inflammation altering cells of the microenvironment as well as stem cells. These changes prime the irradiated tissue for a wide range of multifaceted late effects. Moreover, irradiation of the gut induces specific processes due to the presence of microbiota. This review outlines the pathophysiology of intestinal radiation injury and describes the involvement of epithelial, vascular, inflammatory, and mesenchymal compartments, which may result in rising or even catastrophic complications, such as obstruction and perforation of the intestine. Numerous pharmacological molecules have been studied, and stem cell therapy using

Received February 15, 2016; final acceptance August 5, 2016. Online prepub date: May 18, 2016.
Address correspondence to Noëlle Mathieu, IRSN/PRP-HOM/SRBE/LR2I, 2262 Fontenay-aux-Roses, France. Tel: +33158357640; Fax: +33158358467; E-mail: noelle.mathieu@irsn.fr

pleiotropic mesenchymal stromal cells (MSCs) has provided encouraging results for treating the adverse effects of radiotherapy. Moreover, research is being carried out to use MSCs associated with innovative tissue engineering methods to improve their therapeutic efficacy.

INTESTINAL EPITHELIUM

The intestinal tract is composed of the small intestine and the colon. The epithelium of the small intestine consists of repeated finger-like invaginations called crypts of Lieberkühn [residence of intestinal stem cells (ISCs)] associated with numerous protrusions/villi, which maximize nutrient breakdown and absorption. Villi are absent from the colon, and crypts are smaller compared with those found in the small intestine. The main function of the colon is the reabsorption of water from feces. Beside their own functions, the small and large intestinal epithelia act as a barrier against the penetration of pathogens. The intestinal epithelium is the most rapidly self-renewing tissue in the human body, with a 3- to 5-day turnover rate (74) throughout life. This process is regulated by ISCs residing near the bottom of the epithelial crypts and maintained by specific signals from the surrounding niche. In the small intestine, there are around four to six ISCs per crypt interspaced with the differentiated Paneth cells. Paneth cells belong to the secretory lineage. They secrete antibacterial components, but above all, they create a home for stem cells by providing signals [e.g., epidermal growth factor (EGF), Notch, and Wnt ligands] important for stem cell maintenance (Fig. 1). Paneth cells are absent from the colon. However, deep crypt secretory cells may represent the colon counterparts of Paneth cells (136).

Two models of ISC identity have been proposed: the label-retaining cells (LRC)+4 model and the crypt base

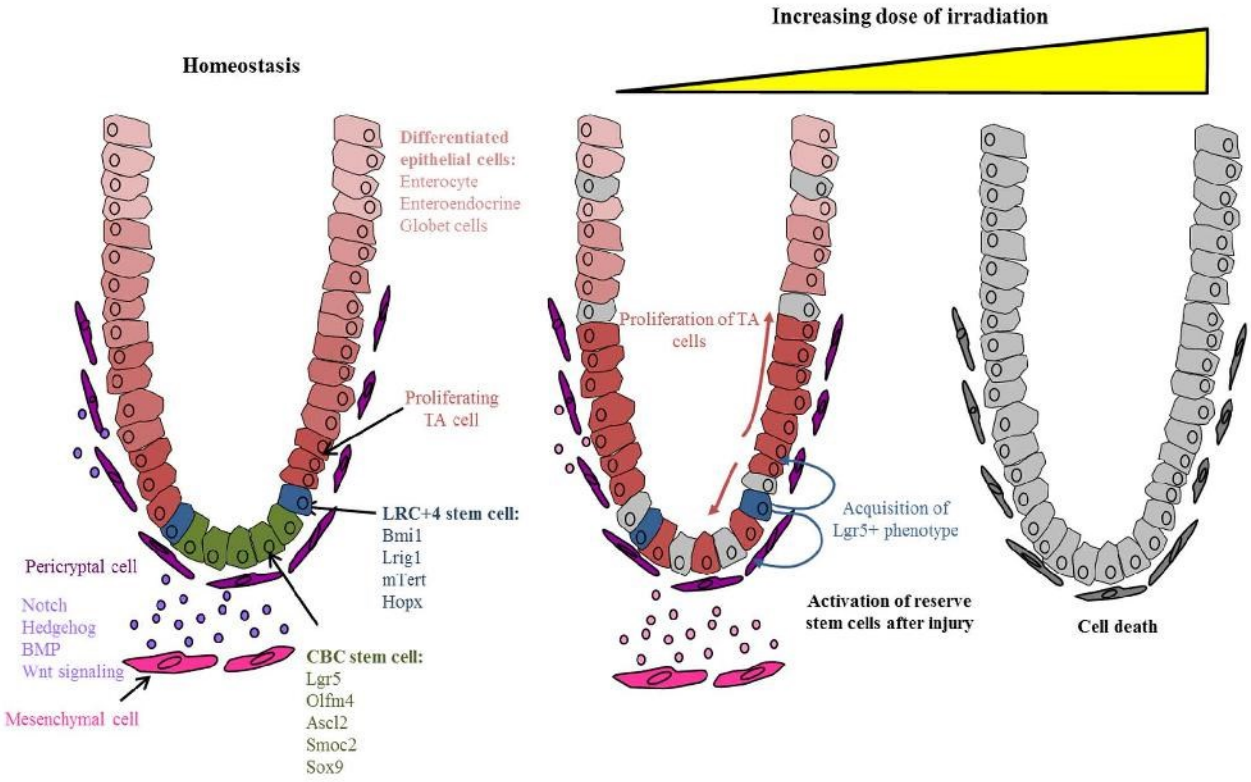


Figure 1. Schematic illustrations of colonic crypt in normal conditions (left) or after receiving an increasing dose of irradiation (middle and right). In normal condition, two putative populations of stem cells exist: the CBCs located in the deep crypt (green cells) and the quiescent/reserve population (+4 stem cell) located above (blue cells). The crypt unit is surrounded by pericryptal cells and mesenchymal cells including myofibroblasts. The confined microenvironment is known as the stem cell niche that generates signals involved in stem cell maintenance and progeny differentiation according to a gradient of molecules. Stem cells give rise to transit-amplifying cells (red cells) that differentiate into enterocytes, enteroendocrine, and goblet cells. According to the irradiation dose, +4 stem cell can acquire $Lgr5^{+}$ and proliferative phenotype (middle). Moreover, modification of the concentration gradient of molecules secreted by the niche, by modulation of gene expression or cell disruption following intestinal damage, can participate to modify the stem cell function. In this case, the number of proliferative cells increases. The resultant changes can have consequences on tumorigenesis, fibrosis, growth, and the regenerative capacity of the epithelium. At a dose of irradiation that induces apoptosis of all intestinal stem cells (ISCs), the epithelium cannot be renewed (right).

columnar (CBC) cell model. The LRC+4 model was proposed by Potten (133). Recent studies have focused on the identification of markers of cells located at the +4 position [B-lymphoma moloney murine leukemia virus insertion region-1 (Bmi1), telomerase reverse transcriptase (Tert), homeodomain-only protein homeobox (Hopx), and leucine-rich and immunoglobulin-like domains protein 1 (Lrig1)] and defined these cells as slowly cycling/quiescent cells. Bmi1 was the first stem cell marker investigated by lineage tracing and was reported to mark rare, slowly cycling cells at the +4 cell position, uniquely in the proximal small intestine. The CBC model revealed the existence of immature, cycling cells wedged between Paneth cells at positions 1–4 (32). Determined by a microarray experiment on human colonic cell line, Lgr5 was revealed to be a good CBC marker (9,172). It has been demonstrated that isolation of single $Lgr5^+$ cells in an adequate culture condition gives rise to a self-organizing mini-gut comprising all the differentiated intestinal cell types (145).

ISCs give rise to progenitor cells named transit-amplifying cells, which rapidly divide and differentiate into six subtypes of cells: enterocytes, neuroendocrine, goblet, Paneth, Tuft, and M cells. The two latter are rarely forming descendants of $Lgr5^+$ stem cells. Proliferating progenitors migrate upward while they differentiate into nutrient-absorbing enterocytes and secretory cells producing mucins (goblet cells) or hormones (enteroendocrine cells). The intestinal epithelial barrier consists of enterocytes tightly connected via intercellular junctions. Enterocytes also secrete cytokines and chemokines, which trigger the inflammatory response, as a second line of defense against luminal contents. In addition, goblet cells secrete the mucus layer that protects the mucosal surface from antigens and helps maintain the intestinal barrier function. Tuft cells are a secretory cell lineage. They secrete prostaglandin precursors and possibly perform a sensory role for luminal contents. M cells reside in the specialized epithelium overlying Peyer's patches. They capture and transport antigens to immune cells in the patches. To maintain the integrity of the intestinal epithelium, ISCs must self-renew, proliferate, and differentiate to populate the epithelium. The regulation of ISCs occurs within a discrete microenvironment confined to the crypt base, known as the stem cell niche. The stem cell niche is a complex and dynamic milieu that adapts in response to environmental stress. This niche is made of and influenced by nearby proliferating and differentiating epithelial cells as well as by surrounding mesenchymal cells. Although epithelial cells and mesenchymal cells are separated by the basement membrane, epithelial–mesenchymal cross talk is required to maintain the stem cell niche. The microenvironment surrounding the stem cell zone consists of enteric neurons, endothelial cells (ECs), smooth muscle cells (SMCs), intraepithelial lymphocytes, macrophages, and fibroblasts/myofibroblasts together with the extracellular matrix (ECM). The niche generates signals that favor the existence of a stem cell in its undifferentiated state and also provides an optimal microenvironment for the production of differentiated progeny. The paracrine secretion of molecules by the niche component acts according to a gradient to their target cells. The main signaling pathways involved in niche maintenance are Wnt, bone morphogenetic protein (BMP), Hedgehog, and Notch (18) (Fig. 1).

PATHOPHYSIOLOGY OF INTESTINAL RADIATION DAMAGE

The exposure of the abdominopelvic region to IR, such as that received during radiotherapy, is associated with the development of a number of symptoms that may limit the course of the cancer therapy. The clinical expression of the gastrointestinal radiation toxicity results from multiple and sequential organ dysfunctions, which have been recently recognized as a new pathology called "pelvic radiation disease" by Andreyev et al. in 2010 (4). Intestinal toxicity is a multifactorial problem, related not only to the dose and method of radiation delivered but also to the intrinsic processes within the responding tissues as regard cellular injury (individual genetic background and comorbid factors such as obesity, smoking, diabetes, vascular disorders, and inflammatory bowel disease), although their exact contributions are unknown.

Tissue response to radiation exposure is considered a continuum between very acute and chronic forms. Acute radiation damages, often occurring within 3 months after radiotherapy, are characterized by diarrhea, incontinency, bleeding, and abdominal pain (6). Acute radiation symptoms generally improve over time, but in 10% of cases, the chronic symptoms associated with the cancer treatment persist. Chronic radiation damages appear between 18 months and 6 years after radiotherapy. Chronic dysfunction may follow without pause from the acute symptoms or may arise de novo months, years, or even decades later (56). Chronic damage after radiation exposure is associated with an aggravation of the acute symptoms (in frequency and importance) (193) associated with the formation of fistulas, local abscesses, perforations, and, in severe cases, occlusion that can lead to mortality (56).

The pathogenesis of intestinal radiation damage is complex. Generally, it is ascribed to the effects of IR on the cell cycle of ISCs. However, the increasing knowledge of radiation biology evidences that all cell types are sensitive/modified by IR, in particular the stromal compartment, ECs, and SMCs (129). The enteric nervous system (ENS), composed of an extensive and elaborate network of neurons involved in the physiological functions of the gastrointestinal tract, such as motility and mucus secretion, has also been demonstrated to play a critical role in intestinal radiation injuries (179). The tissue response to radiation exposure involves tissue

necrosis and ischemia, chronic and self-maintained scarring process with excessive collagen deposition. These processes induce fibrosis and, later, organ dysfunction leading ultimately to occlusion.

Inflammatory Reaction, Oxidative Stress, and Cell Injury

When tissue is exposed to IR, radiochemical cell damage can occur by either direct or indirect action. The direct effect of IR consists of the particles/ions physically breaking the macromolecules. The indirect effect of IR consists of the production of highly reactive free radicals from the radiolysis of water and in the early activation of nitric oxide synthase (NOS) enzymes. These early biochemical modifications are responsible for the most important effects in the cells; however, it has been demonstrated that oxidative stress endures late after the initial exposure. Indeed, the oxidative stress is transmitted to the daughter cells and spreads to nonirradiated cells by intercellular mechanisms (8). Among the multitude effects, IR also disrupts the mitochondrial functions. Under normal conditions, the mitochondria participate in the regulation of the physiological reactive oxygen species (ROS) that are involved in the essential signaling pathways involved in numerous cellular functions, such as cellular differentiation and proliferation. Thus, mitochondrial dysfunction significantly contributes to the disturbance of the oxidation–reduction reactions that determine the cellular redox environment. Moreover, modifications of the antioxidant defense system have been demonstrated after intestinal irradiation (71). In response to IR, the immune cell recruitment (polymorphonuclear cells and macrophages) participates in the maintenance of the oxidative stress in tissue.

Reactive oxygen and nitrogen species (ROS/RNS) produced after IR are able to diffuse and to interact with biological targets causing damage to DNA, proteins, and lipids. The direct and indirect effects of IR initiate a series of biochemical and molecular signaling events that may repair the damage or induce cell phenotypic modifications. It is now well known that radiation induces DNA lesions, including damage to nucleotide bases, as well as DNA single- and double-strand breaks. DNA strand breaks result in the activation of multiple transduction pathways that activate transcription factors such as p53 and nuclear factor κB (NF-κB) (36). Moreover, lipid peroxidation results in the activation of genes such as those encoding JNK and C-Jun, which could upregulate other factors, such as NRF2. The transcription factor activation results in the upregulation of an extensive list of target genes, among which are proinflammatory cytokines [tumor necrosis factor-α (TNF-α), interleukin-1β (IL-1β), and IL-6], chemokines [IL-8 and monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1)], cell adhesion molecules (integrins and selectins), stress response genes, and cell surface receptors (157,158). A consequence of the gene upregulation is that a wide range of biologically active proteins accumulate and target the submucosa; they not only induce tissue injury but also provide a positive feedback to amplify the initial damage caused by radiation.

Depending on the importance of the damage induced by IR, cell death by apoptosis or necrosis or mitotic catastrophe can be observed. Cycling ISCs have been described as highly radiosensitive, a property that is positive for stem cells, preventing the accumulation of deleterious genome changes (133), although resulting in intestinal barrier disruption and impaired mucosal regeneration. Radiosensitivity has been used in numerous studies to analyze adult ISC biology and, particularly, the regenerative process.

The intestinal epithelium has a considerable ability to survive and regenerate following injury. Irradiation-induced injury models have contributed to a better understanding of the mechanisms of the regeneration process, revealing the existence, in the lower regions of the crypt, of "regular" stem cells ($Lgr5^+$ CBC) involved in the day-to-day renewal of the epithelium and "reserve" stem cells (LRC+4) mobilized after epithelial injuries. Some early progenitors can be recalled to the stem cell pool after irradiation (23,114,167,190) (Fig. 1). The fact that distinct or overlapping ISC populations with stem cell potential exist has been a matter of intense debate. Recent data evidenced for the high plasticity of cells within the epithelium, demonstrating that intestinal crypts are dynamic structures composed of diverse cell populations, including transit-amplifying progenitors, which carry some potential to assume ISC function when loss of a vital pool threatens the mucosa (Fig. 1). Such plasticity within the crypts suggests an important role of a niche-induced conversion of progenitors to functional stem cells. However, depending on the dose of irradiation, when CBC and reserve stem cells are both depleted, severe crypt loss ensues, leading to gastrointestinal failure.

It was long believed that the stem/progenitor radiosensitive epithelial cell compartment was a determinant in intestinal radiation toxicity and that tissue regeneration depended on the survival of stem/progenitor cells. Indeed, injection of R-spondin, a ligand of the Lgr5 receptor, before irradiation protects mice against the gastrointestinal syndrome (16). However, the increasing knowledge of radiation biology demonstrates that various cell types are modified extremely rapidly after irradiation and may influence the chronicity of the late damages. During the very early stages after irradiation, while the intestinal mucosa seems to have a normal structure, numerous studies describe a cascade of events beginning in the mucosa and the adjacent compartments that participate in the destruction of the mucosa. Even if endothelial apoptosis as the initiator event of intestinal radio-induced damage

is currently under debate (129,148), it is admitted that EC apoptosis participates in the tissue damage induced after irradiation. Indeed, in irradiated plasminogen activator inhibitor-1 $(PAI\text{-}1)^{-/-}$ mice, a decrease in the intestinal damage associated with reduced endothelial apoptosis has been observed (1). Moreover, endothelial-specific PAI-1 deletion affects the radiation-induced intestinal toxicity, thus demonstrating the endothelium-dependent mechanism of intestinal injury (138). After irradiation, the vascular endothelium acquires a proinflammatory, prothrombotic, and antifibrinolytic phenotype (Fig. 2). The phenotype induced after irradiation in ECs is characterized by the increased expression of cell adhesion proteins [vascular cell adhesion molecule 1 (VCAM-1), intracellular adhesion molecule 1 (ICAM-1), platelet and endothelial cell adhesion molecule 1 (PECAM-1), and E- and P-selectins] favoring bloodstream leukocyte transmigration and increase in platelet/EC interaction. Moreover, EC exposure led to the expression of several proinflammatory mediators such as IL-6 and IL-8 (61,112,117). These studies demonstrated that adhesion molecules, proinflammatory molecules, and chemoattractant molecules expressed on ECs after irradiation play a crucial role in the recruitment of leukocytes and in the inflammatory process, having consequences on the regenerative process. ECs play a key role for vascular tone by secretion of vasoconstrictor and vasodilator molecules that act on SMCs. During early events following irradiation, the vascular tone is modified. In particular, it has been demonstrated that irradiation disturbs the bioavailability of nitric oxide (NO) because of the effects of ROS on the endothelium (72). Another major dysfunction of the ECs is their loss of thromboresistance characterized by aggregation of platelets and development of platelet-fibrin clots associated with adhesion of leukocytes (178). The underlying molecular mechanisms involved the increase

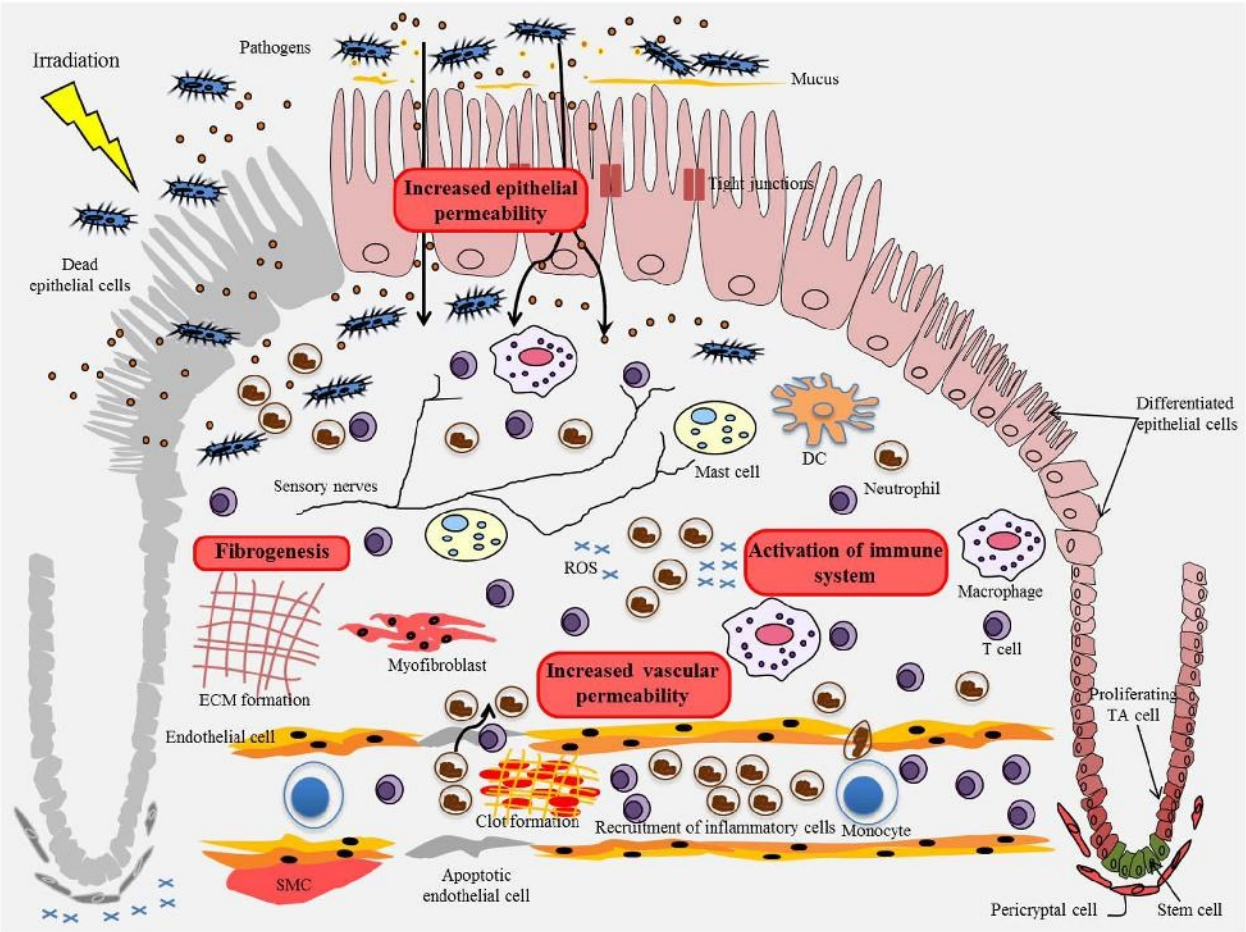


Figure 2. Schematic representation of the intestinal alterations induced after irradiation. This view highlights the complexity of radio-induced pathology with the interconnections of events: modification of the epithelial cell compartment, activation of the vascular compartment, and initiation and perpetuation of the inflammatory process, leading ultimately to fibrogenesis.

of various factors, such as the von Willebrand factor, platelet-activating factor, tissue factor, and the decrease in the anticoagulant thrombomodulin. Downregulation of thrombomodulin stimulates fibrogenesis and decreases fibrinolysis. Platelet aggregation, observed after irradiation, elicits an inflammatory response by the production of free radicals and the release of inflammatory molecules such as the potent profibrosing mediator transforming growth factor-β (TGF-β). Indeed, platelets contain a high amount of TGF-β (119).

Disruption of the Intestinal Epithelial Barrier

In normal conditions, the intestinal epithelial barrier is not impermeable, permitting fluid transport (108) and communication between the mucosal immune system and the commensal flora. The intestinal epithelial barrier is maintained by intracellular junctional complexes, such as tight junctions (TJs), adherent junctions, and desmosomes. TJs are composed of transmembrane proteins, claudins, occludin, and junctional adhesion molecules (JAMs) interacting with cytoplasmic proteins, such as zonula occludens-1 (ZO-1), to maintain dynamic structures with the cell cytoskeleton, thus determining paracellular spaces.

Disruption of the epithelial barrier after irradiation is related to the received dose. High doses of irradiation lead to complete loss of ISCs, thus entailing crypt loss. At lower doses, there is no sterilization of the crypts, but structural disruption occurs, which has been associated with increased intestinal permeability (IP). An increased passage of tracer in the extracellular spaces was observed in rat ileum after 5-Gy irradiation (132,156). Perturbations in the mucosal barrier function have been reported in breast cancer, sarcoma, and colorectal cancer patients treated with different chemotherapy agents or after radiotherapy (37,44,48,118,130).

Numerous studies have demonstrated a decrease in the TJ complexes that may disturb the epithelial barrier and increase the IP. Studies have shown that IR increases IP through a combination of epithelial TJ disruption and insufficient replacement of villus epithelium (42,118,155). Among the various molecular components of TJs, claudins play a critical role in tightening cell–cell contacts. Alteration of claudins is closely associated with inflammatory pathologies as well as radiation-induced intestinal injury (90,107,153,185,196). Studies have demonstrated that claudin-3 and claudin-4 decreased, whereas claudin-2 expression increased after irradiation (124,153). Moreover, epithelial barrier dysfunction allows infiltration and proliferation of bacteria in the mucosa (Fig. 2). This bacterial invasion induces the infiltrating mononuclear cells (MNCs) to release proinflammatory cytokines and ROS (45). A correlation between increased IP and inflammatory response has been described in patients with ovarian carcinoma (113), suggesting a role of the proinflammatory cytokines secreted after irradiation, such as IL-1β and TNF-α, in the increased IP. The interaction between the epithelium and inflammation is a two-way process. Intestinal epithelial cell treatment with TNF-α increases the expression and activation of the myosin light-chain kinase (MLCK), associated with an increase in paracellular permeability (104,177). Once activated, the MLCK phosphorylates MLC, leading to a contraction of the actin cytoskeleton and the opening of the TJs. In contrast, interferon-γ (IFN-γ) has a direct effect on junction proteins inducing endocytosis of occludin, JAM-1, and claudin-1 through macropinocytosis (82,170). Furthermore, in an animal model with constitutively increased IP, an inflammatory process was observed, suggesting that dysfunction of the epithelial barrier results in the recruitment or activation of immune cells (161).

Microbiota and Radiation-Induced Intestinal Injuries

The human gastrointestinal tract contains 1–2 kg of bacteria living in symbiosis with the host. The microbes obtain nutrients from the human host and protection from competing species by the immune system. However, the microbiota also benefits the host through different interactions by playing a role in the development and homeostasis of the intestinal epithelium, instructing the immune system and exerting an antioxidant activity. For example, germ-free animals display impaired epithelial proliferation in their crypts and have rudimentary mucosal-associated lymphoid tissues (173). The host distinguishes signals from microorganisms through transmembrane receptors. The well-known receptors are the toll-like receptor (TLR) family and the nucleotide-binding oligomerization domain receptor family (52,137). Bacteria are recognized by the TLRs, present at the external membrane of epithelial and immune cells, leading to the activation of NF-κB (41,137). Consecutively, activation of NF-κB ensures the development of the innate response but also participates in epithelial wound repair (48,73). The deleterious effect of IR on the epithelial barrier has been thought to be exacerbated by penetration of the gut microbiota into the tissue. The role of microbiota in initially driving or perpetuation of intestinal inflammation after irradiation has been highlighted by the use of antibiotics that generally reduces radiation-induced mortality in animal models. However, the efficacy of antibiotic treatment varies depending on the model used (22,88). Various studies demonstrated that germ-free mice show better survival than mice with conventional microflora at an equivalent radiation dose (35,111,127). The authors demonstrated that a protein called fasting-induced adipose factor (FIAF) decreases in germ-free mice, leading to an increase in endothelial and lymphocyte apoptosis. This study highlights the importance of microbial regulation

not only on the epithelial but also on the endothelial compartment to modulate intestinal radiation toxicity. However, because germ-free animals are known to have an impaired epithelial turnover (168), the involvement of microbiota in intestinal radioprotection must be reevaluated. Other studies demonstrated that pretreatment with bacterial component, TLR4 or TLR5 agonists, protects gut mucosal tissue against radiation-induced damage (24,140). In the same way, the use of a probiotic, through the TLR2 pathway, improves the severity of the intestinal damage after irradiation (34). Clinically, a phase II study demonstrated the efficacy of a nutritional supplement based on probiotics in preventing radiation-related gastrointestinal disorders (146).

Dysbiosis is the global imbalance of bacterial populations in the gut in various disorders such as radiation bowel disease. The gut microflora can have various radiation sensitivities. Moreover, modifications of the microenvironment after IR can influence microbial colonization. Various studies identified quantitative changes of specific groups of gut microbiota after pelvic radiotherapy (85,106,176). Although these studies are difficult to interpret due to the difference of microbiota between healthy individuals and cancer patients treated with chemotherapy or radiochemotherapy, it seems that radiotherapy decreases the microbial heterogeneity. Husebye et al. demonstrated that late radiation enteropathy leads to Gram-negative bacilli overgrowth and impaired intestinal motility (80). Dysbiosis also causes alteration of the expression and distribution of intercellular TJs (103), leading to the penetration of antigens participating in the chronicity of intestinal inflammation (7). Moreover, a pilot study investigated the correlation between fatigue, diarrhea, and microbial dysbiosis induced after pelvic cancer therapy (176). The epithelial mucus layer is a protective factor that contributes to intestinal integrity and is also regulated by bacteria. Moreover, bacteria induce secretion of numerous anti-inflammatory molecules such as short fatty acid, secondary bile acid, and butyrate, and modification of the microbial profile can exacerbate the intestinal inflammation. Altogether, these studies demonstrated that microbiota not only is involved in challenging the intestinal immune system after epithelial barrier disruption but could act at different levels to participate in intestinal radiation toxicity. However, TLR signaling pathways have an important role in the epithelial regenerative process and could be an interesting therapeutic target for protection against radiation injury.

Inflammation and Immunity in Radiation-Induced Damage

The excessive production of reactive free radicals generated immediately after IR is considered as the first proinflammatory signal. Subsequently, the radio-induced inflammatory process extends to innate and adaptive immune responses contributing significantly to the radiation injuries (53) (Fig. 2). Moreover, there is now an incontrovertible evidence of interaction between the immune system, in particular mast cells (MCs), and the ENS in the genesis and development of structural and functional damages induced after abdominal irradiation. Although the inflammatory process is necessary for normal scarring, tissue response to irradiation is considered as a chronic and self-maintaining scarring process leading to fibrosis.

Production of reactive free radicals activates cell death and proinflammatory molecule signaling pathways in irradiated microvascular and mucosal compartments. By targeting the vascular endothelium, irradiation induces, in a short time, modification of the phenotype, resulting in the migration of leukocytes into the damaged intestine for clearing the tissue. The epithelial cell death induced by irradiation leads to impaired barrier function and pathogen penetration into the mucosa. Neutrophils, possessing phagocytic and antimicrobial capacities, are the first cells that migrate to the injury sites. They eliminate dead cell debris to facilitate tissue repair; however, they also secrete high levels of antipathogenic enzymes, such as myeloperoxidase, which generate oxidative stress. This process adds to the oxidative stress induced by the radiolysis of water and reduces the regenerative capacities of the tissue. In rodent models, localized single-dose or fractionated radiation leads to an influx of neutrophils 1 week after irradiation and lasts up to 26 weeks (54,66). This influx is associated with increased expression of molecules having strong neutrophil chemoattractant activity after colorectal irradiation (14,20). Human biopsies from the rectal mucosa of patients at 2 and 6 weeks during the course of ongoing radiotherapy for prostate carcinoma showed an increased number of neutrophils (77). These observations lead us to consider neutrophils as deleterious in the radio-induced inflammatory process. However, in a model of radiation proctitis, in MC-deficient mice, Blirando et al. reported an acute increase in the influx of neutrophils associated with less colorectal damage (19). Another study also reported the importance of neutrophils influx in the radiation healing process after skin irradiation (51). Therefore, the detrimental or useful properties of early neutrophil infiltration after irradiation need to be elucidated.

The inflammatory microenvironment present in the irradiated tissue can induce the recruitment of circulating monocytes as well as the activation of resident macrophages. Depending on the inflammatory microenvironment, monocytes can differentiate into type 1 (M1/proinflammatory) or type 2 macrophages (M2/anti-inflammatory). After irradiation, numerous studies reported mucosal macrophage invasion in human tissue as well as in animal models (14,20,77). However, further investigations are needed

to characterize the subtype of the macrophages induced after irradiation. Macrophages also play a key role in the resolution of inflammation by clearing the tissue and secreting feedback signals that switch off the inflammatory response. Moreover, the epithelial breakthrough induced after intestinal irradiation facilitates the entry of pathogens, leading to macrophage activation that could secrete proinflammatory cytokines detected in mucosa such as IL-1β, IL-8, and IL-6 (14,20).

In humans, lymphocyte infiltration is a common feature after radiotherapy in the subacute and chronic phases (147), but it is difficult to assess their functional significance. Recently, in a rat model of colorectal irradiation, the depletion of T cells induced a reduction of mucosal injury and colonic muscle contractibility (14). In the same model, an infiltration of CD4 and CD8 T cells in colonic mucosa was shown as soon as 7 days after irradiation. Although the percentage of CD8 T cells returned to the control level 3 weeks after irradiation, CD4 T cells persisted in the colonic mucosa for 2 months. Following antigenic stimulation, naive CD4 T cells are able to differentiate into different effector T-cell subsets (TH1/TH2/TH17/Treg) with specific features such as cytokine production and functional properties. A TH1/TH2 immune imbalance has been shown to play a determining role in many inflammatory diseases and to potentially be involved in the chronicity of radiation-induced lesions. It has been demonstrated that fractionated irradiation localized to the colorectum induces expression of the TH2-specific transcriptional factor GATA3 for 6 months postirradiation (66). Moreover, intestinal irradiation in a TH1-deficient environment accelerates fibrogenesis (98). In an abdominal irradiation model, an increase in the Treg population, with impaired ability to control effector T cells, has been reported (14,17). The lack of capacity of Tregs to induce IL-10 secretion after irradiation can contribute to uncover the immune tolerance in the intestine. Until recently, the TH17 population had not been studied, and it has now been demonstrated that colorectal irradiation in rats specifically induces CD4 TH17 cells (13). Targeting the pathways of TH17 differentiation after irradiation can therefore be of therapeutic interest.

MCs have also been associated with diseases characterized by pathological tissue remodeling and fibrosis in different organs including intestinal radiation fibrosis. MCs secrete a plethora of inflammatory, vasoactive, chemotactic, and fibrotic molecules that interact with the immune system and the mucosal microenvironment including the ENS. In human proctitis following radiotherapy, MC hyperplasia has been highlighted in areas of inflammation and collagen deposition (20). Various studies, using MC-depleted animals, demonstrated their importance in late tissue fibrosis after intestinal irradiation even if the role of MCs in acute radiation damage is still controversial (20,197). The significance of various MC mediators in radiation fibrosis is not completely understood. However, in vitro studies demonstrated that MC chymase or tryptase can shift colonic muscularis smooth muscle to a proinflammatory phenotype and that MC-conditioned medium exacerbates the overexpression of proinflammatory genes induced after EC irradiation (19,20). These results describe MCs as putative participants in the global tissue inflammation following irradiation. Moreover, MCs can activate the protease-activated receptor-2 (PAR-2), which is expressed by numerous cells including epithelial cells and nerve fibers. The importance of PAR-2 activation has been demonstrated by the increase in PAR-2 expression after radiation exposure and by the attenuation of the fibroproliferative process in irradiated MC-deficient rats (180). Recently, the involvement of MCs in radio-induced visceral hypersensitivity has also been demonstrated (43). Ketotifen treatment, which specifically blocks MCs, reverses radiation-induced mechanical allodynia. Moreover, the same study demonstrated, in patients developing late side effects of radiotherapy for rectal adenocarcinoma, an increase in the interaction between MCs and nerve fibers.

Fibrosis/Chronic Mesenchymal Cell Activation

Fibrosis is the main late complication of radiation therapy. It can occur several months to years after exposure to IR. Fibrosis is an evolutive process characterized by an excessive accumulation of ECM components, mainly collagen, often causing loss of tissue function (169). Fibrosis is described as an unchecked regeneration process that occurs under chronic injury conditions, caused for instance by bacterial infection, ischemia, or chronic inflammation (159,188). In the intestine, it can lead to occlusion due to the thickening of the intestinal wall and the loss of muscular function.

The characterization of the cellular and molecular mechanisms that initiate and perpetuate fibrosis after irradiation is still under debate. However, the involvement of cells from various intestinal compartments seems to be a matter of consensus. The myofibroblasts, or myofibroblast-like cells, are mainly responsible for the ECM production in radio-induced fibrosis. In the intestine, there are several sources of myofibroblasts. They differentiate from fibroblasts or local equivalents through the activation by various signals and are continuously activated during chronic inflammation. SMCs have been identified as the main cell type responsible for fibrosis in the intestine (182). Pericryptic fibroblasts and myofibroblasts, while able to undergo activation to a profibrotic state, are involved to a lesser extent. They are less abundant, and ulceration of the mucosa further reduces their number. Last, endothelial-to-mesenchymal transition and epithelial-to-mesenchymal transition can increase the pool of myofibroblasts (116,187). In these processes, endothelial or epithelial cells are able to transdifferentiate into mesenchymal cells. This large pool of potentially profibrotic cells

makes the intestine particularly susceptible to fibrosis. An imbalance of dialogue between ECs and vascular SMCs can be involved in radiation-induced fibrosis (115). Irradiated ECs orient SMCs toward a profibrogenic phenotype: migration, proliferation, stimulation of synthesis of PAI-1, connective tissue growth factor (CTGF), heat shock protein 27 (HSP27), and collagens I and III.

Various pathways intervene in the differentiation of cells into myofibroblasts and their chronic activation. Irradiation leads to an acute inflammatory response with synthesis of profibrotic cytokines such as IL-4 and IL-13. Subsequently, a chronic inflammatory adaptive response induces differentiation of T lymphocytes toward TH2 or TH17 (depending on the model) that secrete profibrosing cytokines. It has also been reported that the interactions of radio-induced ROS with the EC compartment lead to inflammatory mediator secretion and thrombin synthesis that favor production of the profibrotic cytokine TGF-β. Recently, it has been proposed that the radiation effects to DNA can modify the epigenome of cells. These modifications (named as DNA methylation, histone acetylation, and miRNA synthesis) can be inheritable gene modifications that can induce and also perpetuate fibrogenesis even in the absence of the initial damaging stimulus (184). This hypothesis needs to be investigated and can provide a potential link between the acute radiation response and long-lasting radiation fibrosis.

Numerous signaling pathways, such as Rho, platelet-derived growth factor (PDGF), insulin-like growth factor (IGF), and TGF-β1, have been described to trigger fibrosis. TGF-β1 is considered as the main profibrotic cytokine. Active TGF-β can be processed in two ways: by direct induction of the activator protein-1 (AP-1) family transcription factor by IR and by activation of the latent form of TGF-β stored in the ECM. TGF-β associated with the latency-associated protein (LAP) is constitutively present in the microenvironment. ROS, RNS, and various cytokines generated in chronic radiation disease are involved in the release of TGF-β1 from LAP. Consequently, the activated TGF-β1 binds to its receptors and activates the Smad signaling pathway. The Smad family members activate various target genes (such as CTGF), and some of them are responsible for myofibroblast activation (12,73).

MANAGEMENT/REDUCTION OF RADIO-INDUCED INTESTINAL DAMAGE

Therapists try to prevent the development of sequelae after radiotherapy by restricting the dose and the volume of healthy irradiated tissue. Innovations in tumor imaging allow precise delineation of the tumor, and use of three-dimensional (3D) conformal radiation therapy (3D-CRT) and intensity-modulated radiation therapy (IM-RT) techniques allows better tumor targeting and reduces the volume of normal tissue located in the irradiation field. However, it has been reported that 90% of patients develop acute side effects, leading to, in the worst cases, the arrest of antitumoral treatment. Moreover, 10% of patients develop late side effects (10 years after radiotherapy), which severely affect their quality of life and entail substantial mortality. There is currently no known permanent cure to treat the side effects of abdominopelvic radiotherapy. In more severe cases, such as intestinal obstruction, perforation, fistulas, and severe bleeding, the surgical resection of injured segments remains the only therapeutic option (139). These interventions are highly complicated by the presence of extensive inflammation and fibrosis leading to dehiscence of colonic anastomoses (57,89). To improve the outcome after surgery, a wide resection of margins (123) is performed, increasing the risk of short bowel syndrome that can entail a need for parenteral nutrition. Preventing the occurrence of radiation enteritis in the first instance represents the best approach to avoid surgical morbidity. Intestinal radiation damage is characterized by injuries of all compartments, compromising their role in the healing process. The multiplicity of targets involved in the physiopathology makes the development of therapeutic strategies extremely complex.

Medication of RT Side Effects

Despite the absence of treatment to counteract the consequences of irradiation of healthy tissue, clinicians use nutritional measures, antibiotics, and pharmacological agents, such as anti-inflammatory drugs. Table 1 lists examples of the available treatments to manage gastrointestinal symptoms. However, further investigations are needed to demonstrate their effectiveness. It is also important to note that, as late radiation gastrointestinal toxicity shares numerous symptoms with inflammatory bowel disease, clinicians emphasized the importance of detecting pelvic radiation disease to rapidly provide appropriate and effective treatments to patients (5,165).

New Molecules for Improving Regeneration After Irradiation

Studies analyzing the healing process of the intestine suggest that all cells and compartments of the digestive tract are sequentially involved, in particular epithelium/mesenchyme/vasculature/immune and ENS. Clinical and laboratory research, as well as detailed knowledge of the mechanisms of action of the different actors in all tissue compartments, are essential for the development of new therapeutic strategies to prevent radio-induced damage and/or improve tissue regeneration. Table 2 summarizes the different molecules that have been tested to reduce intestinal radio-induced toxicity and details their effects on specific compartments. Although these treatments could potentially reduce irradiation-induced damage, none has

Table 1. Treatments for Gastrointestinal Symptoms Associated With Radiotherapy

Medical treatments	
Nutritional therapy	Lactose free, low fat, low residue Probiotics
Antidiarrhea	Loperamide Somatostatin and analogs (Octreotide, Pasireotide)
Antibiotic	Anti-gram-negative bacteria
Anti-inflammatory	Steroids Nonsteroid (5-aminosalicylate) Corticoids (rectal prednisolone betamethasone/hydrocortisone)
Cytoprotectant	Sucralfate (form protective barrier + epithelial regeneration) Butyrate Glutamine (essential amino acid supporting intestinal mucosal growth)
Endothelial protectants	Sphingolipid ceramide 3-Hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A (HMG-CoA)
Antioxidant	Pentoxyfilline gamma tocotrienol Statines (Pravastatine) Amifostine
Pain	Antalgic, opioid, antidepressive
Interventional treatments	
Rectal bleeding	Formalin chemical cauterization Argon plasma coagulation Hyperbaric oxygen therapy

been shown to have pleiotropic action, contrary to stem cell-based strategies.

NEW THERAPEUTIC APPROACHES: CELL AND TISSUE ENGINEERING

MSC Treatment

MSCs were initially identified in the bone marrow, but are also found in other tissues such as cartilage, skeletal muscle, tendon, adipose tissue, circulating blood, and placenta (175). A number of preclinical studies have highlighted structural and functional benefits of MSC transplantation in different pathologies such as models of myocardial infarction, muscular dystrophy, fibrosis, and bone or tendon defects (169). In humans, MSCs have been shown to be an effective therapy for patients suffering from graft-versus-host disease who develop gastrointestinal lesions (92). A phase II clinical study on the effect of MSC treatment on perianal fistulas in Crohn's disease patients has shown promising results (60). Furthermore, long-term follow-up of these patients for 10 years showed that MSC treatment is not associated with adverse effects (69).

Managing Intestinal Radiation Injuries Using MSC Regenerative Therapy

In various animal models, intravenous injections of MSCs have been shown to improve the intestinal function disrupted after irradiation (Fig. 3). The ability of human MSCs to restore the intestinal function (absorption and secretion capacity) was highlighted for the first time in NOD/SCID mice irradiated at a dose of 8.5 Gy in the abdominal region (142,151). Likewise, the goblet cell content, which decreased in colonic crypt cells in a model of colorectal irradiation in rats, was reestablished after MSC treatment. In addition, increased expression of the adherent junction protein (β-catenin) in the colonic mucosa was shown after MSC injection (149). A functional therapeutic benefit of MSC injection was also observed after fractionated irradiation of the prostate. Indeed, MSCs restore erectile function measured by intracavernous pressure in response to electrostimulation of the cavernous nerve (136). A recent study demonstrated that MSC treatment reverses persistent visceral allodynia in rats exposed to colorectal irradiation. This study demonstrates that MSCs reduce the fecal tryptase level and the number of anatomical interactions between MCs and nerve fibers, suggesting their role in stabilizing MCs and reducing activation of nerve fibers (43).

The therapeutic benefit of MSC injection on the intestinal structure was also observed. The MSC-treated animals present an increase in the crypt–villus axis compared with those having received abdominal irradiation (30,150,151). Furthermore, after colorectal irradiation inducing irreversible lesions in rats, intravenous injection

Table 2. Molecules to Improve Regeneration After Irradiation

Epithelium	
Stimulation of epithelial proliferation	Growth factors (TGF-α, TGF-β, EGF, FGF, KGF, IGF-I, IGF-II, HGF (78,160) GLP-2 (81) R-spondin (16) PGE2 (135,166) Cytokines (IL-1β, IL-2, IL-6, IL-22) (10,11,40,68) Trefoil peptides (160)
Increase epithelial restitution	TGF-α, EGF, IL-1β, INF-γ (40) Trefoil peptides (39) Galectin-2 and -4 (128)
Reduce apoptosis	IL-11, IGF-I, TGF-β3, FGF-2 and -4 (75,78,101,134,144) CBLB502 (24)
Reduce radiation-induced lesions	Neurotensin, gastrin (126,171) EGF, KGF, bFGF, VEGF (47,110,121,129) TLR9 agonist (143)
Intestinal barrier	
Protect tight junctions	KGF (26) *Bifidobacterium infantis* (46)
Decrease permeability	*Lactobacillus plantarum* (102)
Increase number of goblet cells	KGF (76)
Microbiota	
Prevent diarrhea	VSL#3, *Lactobacillus rhamnosus*, *Lactobacillus casei*, or a combination of *Lactobacillus acidophilus* with *Bifidobacterium bifidum* (21,33,62,125)
Decrease abdominal discomfort	*Lactobacillus rhamnosus* (125)
Reduce incidence of fever	*Bifidobacterium breve* strain Yakult (174)
Inflammation	
Reduce inflammation	NF-κB inhibitor (100)
Reduce fibrosis	Early administration of a recombinant of TGF-β receptor type 2 (197) Inhibition of Smad proteins (50)
Endothelium	
Control proinflammatory process within the vascular compartment	Platelet aggregation inhibitors (2)
Restore endothelial function	Statins (186)
Decrease prothrombotic phenotype	Thrombin inhibitor (hirudin) (181)

TGF, transforming growth factor; EGF, epidermal growth factor; FGF, fibroblast growth factor; KGF, keratinocyte growth factor; IGF, insulin-like growth factor; HGF, hepatocyte growth factor; GLP-2, glucagon-like peptide-2; PGE2, prostaglandin E2; IFN, interferon; VEGF, vascular endothelial growth factor; TLR, Toll-like receptor; NF-κB, nuclear factor-κB.

of MSCs decreases the epithelial injury score in a cell dose-dependent manner (149).

Cellular Events Induced After MSC Infusion

The accelerated reepithelization process after MSC injection of the radiation-exposed intestine is associated with a decrease in epithelial cell apoptosis (142,149,151) and stimulation of epithelial proliferation (30,142,149,151) (Fig. 3). More precisely, these studies demonstrated an increase in intestinal progenitor/stem cells (30,149,151) with a higher number of Musashi-1, SOX9-high positive, or Bmi1.

MSCs have also been reported to modulate radiation-induced inflammation (Fig. 3). T lymphocytes are involved in intestinal radiation toxicity (14,98), and MSC injection reduces the infiltration and proliferation of CD4 T cells and increases the apoptosis of radiation-activated T cells (14). After colorectal irradiation in rats, we also demonstrated for the first time the predominance of the TH17 subset, largely described for its role in profibrotic diseases and their repression after MSC injection (13). However, MSCs do not modify IL-10 secretion by Tregs after abdominopelvic irradiation. This may be due to the lack of Tregs, generated

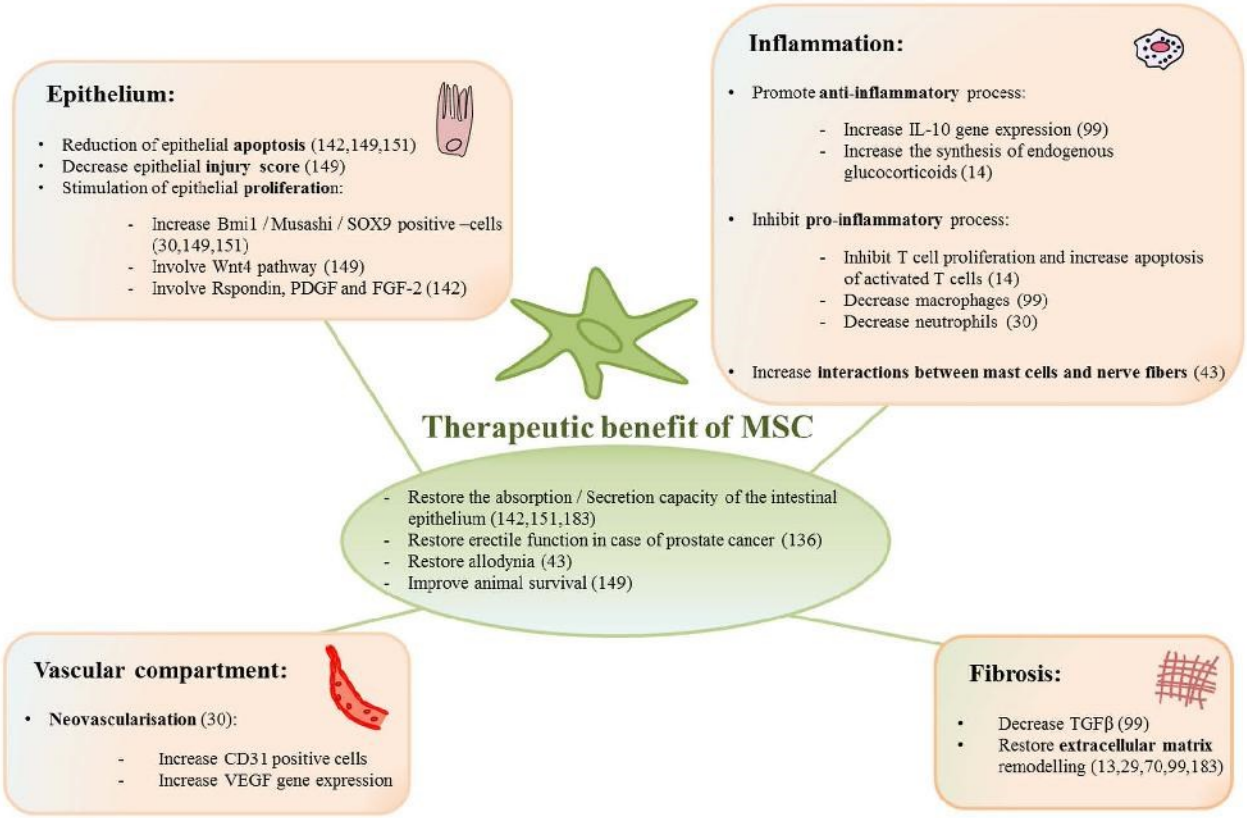


Figure 3. Use of MSCs to improve radio-induced intestinal injury. This figure summarizes the functional benefits induced after MSC treatment (green oval) in various preclinical studies. It also highlights the ability of MSCs to target various intestinal compartments (orange squares). Indeed, MSCs have been reported to induce cellular and molecular events in the epithelial and vascular compartments as well as on inflammatory and fibrosis processes.

after irradiation, to produce IL-10 (17). In a minipig model of severe colorectal damage induced by localized irradiation, iterative injections of autologous MSCs decreased the macrophage infiltration associated with wound healing (99). Studies showed a decrease in neutrophils infiltrate in the gut after injection of human MSCs (30,122). In addition, Ono et al. demonstrated a decrease in macrophage infiltrate in the rectum 3 days after injection of human amnion-derived MSCs (122). However, in a rat model with severe radio-induced mucosal damage, injection of rat MSCs induced no modification of innate cell infiltration (14). Importantly, MSC treatment reduces the radiation-induced fibrosis by reducing collagen deposition and expression of col1a1/col1a2/col3a1 (13,99) (Fig. 3).

Molecular Mechanisms of the Therapeutic Benefit of MSC Therapy

The mechanisms involved in the improvement of tissue healing by MSCs vary depending on the type of lesion and tissue damage. A complete understanding of these mechanisms therefore includes the identification of the complex interactions between MSCs and their environment. However, a large number of results published on various experimental models suggest that MSCs act through the secretion of a wide variety of bioactive (angiogenic, mitogenic, and antiapoptotic) molecules (28). Indeed, MSC-conditioned media accelerate the recovery of radio-induced structural damage (59). Moreover, microvesicles and exosomes produced by MSCs also demonstrate a therapeutic benefit in animal models of tissue regeneration, myocardial ischemia/reperfusion injury, hindlimb ischemia, and liver fibrosis (3,96).

To exert their therapeutic benefit, injected MSCs should home to the injury site. A quantitative study revealed that MSCs are able to migrate more abundantly toward the irradiated tissue, including the small intestine (55). The proinflammatory context induced in mucosa after irradiation can attract MSCs to the injury site. Moreover, we also demonstrated in colorectal-irradiated rats that MSC infusion induces plasmatic stromal cell-derived factor-1α (SDF-1α) associated with an increase in endogenous circulating MSCs. We can therefore hypothesize that endogenous MSCs ensure the continuation of tissue regeneration (Fig. 4). The local microenvironment induced after

irradiation can be unfavorable to the long-term survival of MSCs. However, several studies demonstrated that the inflammatory microenvironment is necessary to stimulate MSCs in order to achieve their full therapeutic benefit. Indeed, proinflammatory molecules, such as IFN-γ, are very important for stimulating MSC secretion and their regenerative capacities (27).

As detailed previously, radiation-induced intestinal toxicity is complex and involves various cellular compartments. Because of their large panel of molecule expression, MSCs seem to be the ideal candidate to promote intestinal regeneration after irradiation. Even if the underlying molecular mechanisms of action of MSCs are not fully understood, MSCs have multiple therapeutic effects. The most described are antiapoptotic, proproliferating, proangiogenic, and anti-inflammatory. MSCs reduce the radiation-induced apoptosis of epithelial cells (142,149). Even if in vivo MSC antioxidative properties are difficult to highlight, studies using gene-modified MSCs to overexpress the molecules involved in oxidative stress showed superior effectiveness in an intestinal irradiation model (79,191). Saha et al. reported that MSCs can protect irradiated intestine by increasing the levels of R-spondin, KGF, and bFGF protein, which promote proliferation and inhibit apoptosis (142). One study described an increase in the proliferation of crypt progenitor cells, positive for the SOX9 marker, after colorectal irradiation and systemic infusion of MSCs (149) (Fig. 5). This proregenerative effect of MSC injection is Wnt4 dependent. Furthermore, MSCs were demonstrated to promote neovascularization in irradiated small intestine (Fig. 3). The authors demonstrated that the number of ECs and also the naive ECs increases in MSC-treated animals associated with an increase in vascular endothelial growth factor (VEGF) gene expression in the intestine (99) and PDGF in the serum (142). In a pig model, rectal irradiation increased the vascular density in the rectum, associated with an increase in VEGF gene expression in the colon, rectal mucosa, and anus (99). Moreover, numerous studies reported anti-inflammatory effects of MSC treatment in various diseases and after irradiation. Downregulation of proinflammatory cytokines (IL-6, IL-1β, TNF-α, and IL-8) in pigs and IL-17 in rats was observed in the mucosa of colorectal-irradiated animals treated with MSCs (13, 99). Using enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) tests on irradiated intestine and colon, a reduction of IL-6 or IL-1β secretion by MSCs was not detected (14,142). However, the anti-inflammatory cytokine IL-10 increases rapidly following MSC treatment (142). Another study reported a significant increase in IL-10 at 5 days after MSC treatment (64,65). However, 10 days after MSC treatment, this increase was less important. These data can explain the absence of an increase in IL-10 at 21 days after colorectal irradiation in colonic mucosa (14) and the importance of repeated injections of MSCs (99). In addition, we also demonstrated that colorectal irradiation leads to stimulation of the synthesis of endogenous glucocorticoids in colonic mucosa and that MSC injection sustains this anti-inflammatory process over time (14). These data confirm the anti-inflammatory properties of MSCs and highlight their abilities to stimulate existing endogenous processes of intestinal regeneration. MSC injection also reduces radiation-induced fibrosis by decreasing the collagen gene expression associated with the modulation of the matrix metalloproteinase (MMP)-to-tissue-inhibitor of metalloproteinase (TIMP) ratio (13,99). Altogether, these preclinical data suggest that MSCs, by secreting various bioactive factors, reduce severe radiation-induced ulcers by activating areas in the margin of the lesions, leading to stimulation of the endogenous regeneration process. This benefit is effective in multiple cellular compartments (summarized in Fig. 3), leading to an increase in animal survival following irradiation of the abdominopelvic area (30,149,151).

Clinical Outcomes and Irradiation

MSC transplantation was used on compassionate grounds for the first time in the world in 2005 in a severe radiological burn victim hospitalized at the Percy HIA (91). Seven patients who had accidentally received very high doses of irradiation and developed severe radiation-induced burns were treated with repeated local injections of MSCs, in combination with surgical excision of the necrotic areas, followed by autologous skin transplantation or a skin and muscle flap. The results were spectacular, and the patients recovered the use of their limbs, which would have been impossible with conventional treatment (15,91,162). In addition to clinical applications on the skin, MSC injections have been used on compassionate grounds to treat patients who have been overirradiated during radiotherapy for prostate cancer (131). Three patients suffering from rectal bleeding and pain, signs of severe radiation-induced proctitis (grade IV according the SOMA-LENT scale), and who were refractory to symptomatic treatment were treated with MSCs. Although it was difficult to assess the treatment because of its compassionate nature, a decrease in T-cell activation and an increase in the number of Tregs were of particular significance (173). In addition, a decrease in pain sensitivity was experienced by the patients after injection of the cells. One of the patients was even able to stop opioid analgesic therapy during this period. As the beneficial effect of the MSC injection is temporary, repeated injections are required (173).

Nowadays, MSC treatment of severe radiation-induced colonic lesions is only used in the clinic on a compassionate basis. The absence of side effects after MSC injection as well as a better comprehension of mechanisms of action may, in the future, allow using MSCs as soon as the first symptoms appear. However, the use of MSCs as a prophylactic

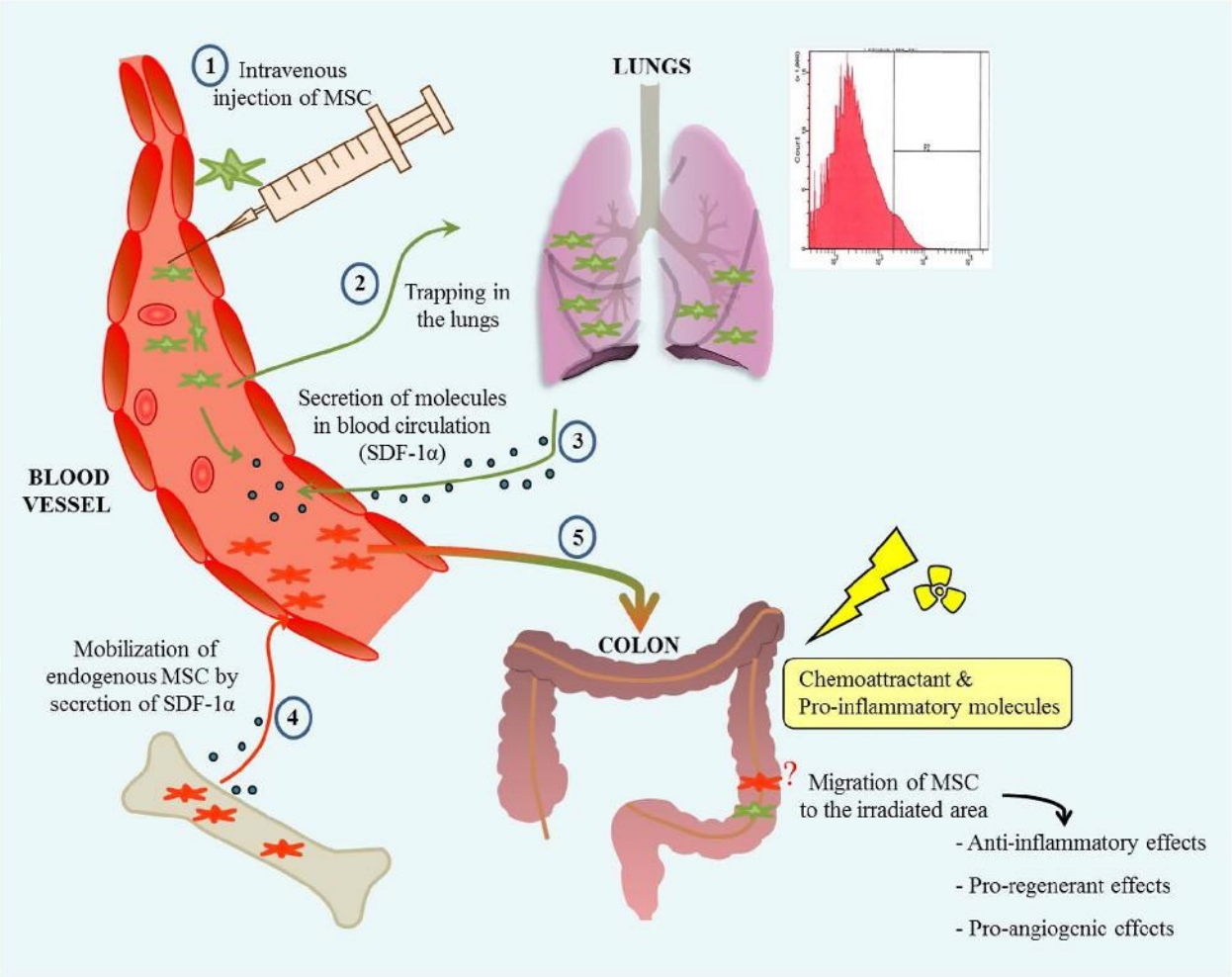


Figure 4. Schematic representation of MSC behavior after infusion into the blood circulation of colorectal irradiated rats. 1) Exogenously amplified MSCs were injected by intravenous route. 2) MSC infusion following colorectal irradiation demonstrated a high number of MSCs trapped in the lungs initially and for 3 days after injection. This is probably due to the incapacity of the larger MSCs to pass through the lung capillaries. Lung-trapped MSCs have been reported to improve myocardial infarction by secretion of molecules released into the blood circulation and acting through the abscopal effect (93). Such a mechanism can also be responsible for the initial benefit induced by MSCs on colonic epithelial regeneration following irradiation. 3) After MSC injection, a higher amount of SDF-1α chemoattractant molecule is retrieved in the plasma. 4) Associated with the SDF-1α increase in the plasma, an increase in endogenous circulating MSCs has been observed. This result suggests that MSC therapy, using secreted factors, can enhance the pool of endogenous MSCs by mobilizing them probably from organ storage. This endogenous MSC mobilization can indirectly potentiate and prolong the therapeutic effect of exogenous MSCs. This hypothesis could explain the therapeutic benefit of MSCs even if the level of infused MSC engraftment at the injury site is very low or undetectable with current techniques. However, the distribution of exogenous MSCs in the body following their systemic administration has demonstrated that MSCs migrate preferentially to the irradiated area (55). It can be hypothesized that MSCs will engraft in damaged tissue through the same mechanism as leukocytes. 5) Irradiation of the tissue leads to secretion of chemoattractants and proinflammatory molecules such as IL-6, IL-8, TNF-α, and IL-1β that can attract circulating MSCs. Thus, exogenous and also endogenous MSCs may be able to leave the bloodstream and migrate to the damaged tissue.

treatment, before radiotherapy, seems unrealistic since it has been shown that MSCs migrate to the site of the tumor (96) and could therefore be a stroma for cancer cells. Studies demonstrated the ability of MSCs to resist irradiation because of their high antioxidant capacity (31). Moreover, even if irradiation does not impair the immunosuppressive capacity of MSCs in vitro (38), it has been demonstrated that irradiation can modify MSC phenotype, their capacity to differentiate, and their molecule secretion profile (49). These modifications could alter their therapeutic benefit.

Optimizing the Therapeutic Properties of MSCs

Although MSCs have been shown to improve the intestinal regeneration process after irradiation, the low

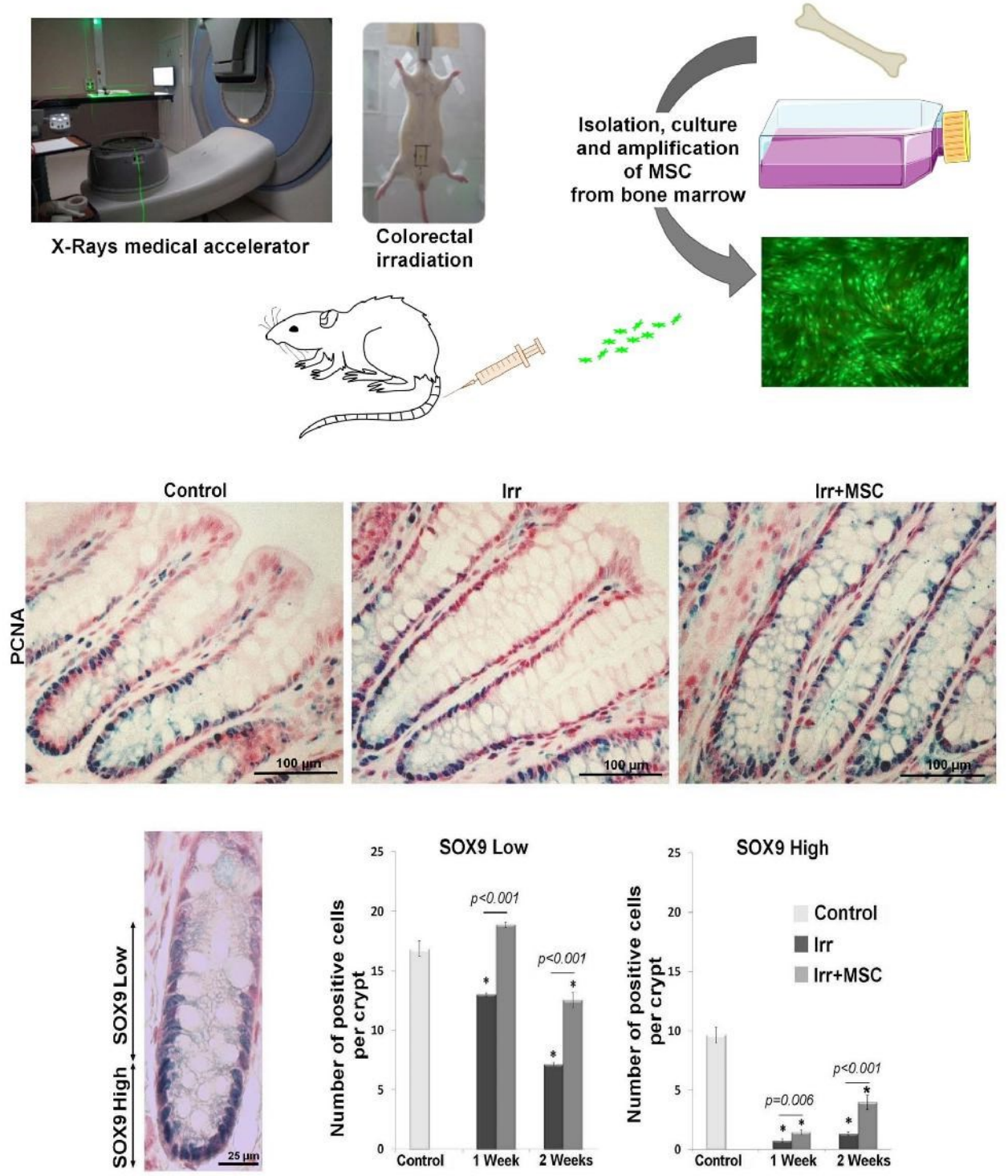


Figure 5. Mesenchymal stromal cell treatment stimulates epithelial proliferation and increases the number of SOX9-high-positive progenitor/stem cells. SD rats are subjected to colorectal irradiation, while MSCs from rat bone marrow were grown in parallel. After irradiation, animals were intravenously injected with 5×10^6 of MSCs. PCNA and SOX9 immunostaining was evaluated 1 or 2 weeks after injection. Representative pictures of PCNA immunostaining (blue staining) 2 weeks after irradiation. Original magnification: 650×. Representative pictures of SOX9 immunostaining (blue staining) 2 weeks after irradiation. Original magnification: 850×. Quantification of SOX9-low- and SOX9-high-expressing cells by crypt. $*p < 0.001$ versus control groups.

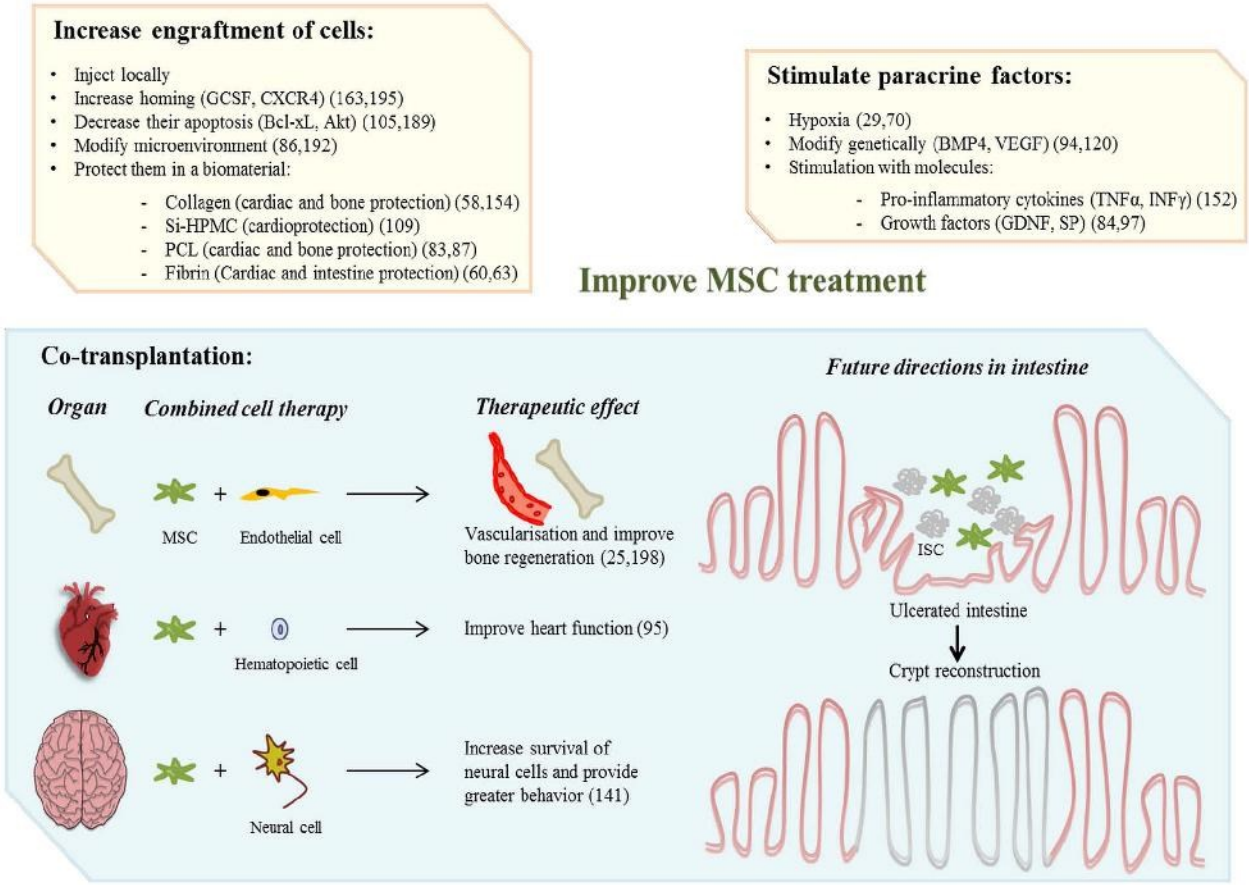


Figure 6. Strategies to improve MSC therapeutic benefits. Upper panels in yellow described the options used to optimize paracrine effects of MSCs. Increasing the engraftment of cells: 1) local delivery of MSCs is preferred wherever possible by surgeons. This method of administration allows fewer cells to be injected, which are directly implanted into the site of lesion, and reduces the spread of stem cells throughout the body, even though no side effects have been shown after MSC injection (164). 2) Engraftment in the injured area can be increased by coinjection of MSCs with mobilizing molecules (163) or genetic modification of MSCs (195). One study demonstrated that preconditioning of animals with hyperbaric oxygen increases MSC engraftment in infarcted myocardium (86). 3) Improving MSC survival by overexpressing antiapoptotic molecules. 4) Protection of the MSCs in biomaterials: cell encapsulation allows the diffusion of nutrients and oxygen, both essential for the survival of cells, while at the same time protects the implanted cells from the host's immune response and avoids the entrance of high molecular weight immune system components such as immunoglobulins and immune cells. The choice of the biomaterial (resolvability and biocompatibility) is very important depending on the characteristic of the tissue. 5) Stimulating paracrine effect: in vitro priming of MSCs by a wide variety of techniques, including hypoxia or molecule preconditioning. Cell engineering could be used to influence cell fate after in vivo injection. This strategy has been largely tested to increase the proangiogenic properties of MSCs by stimulating VEGF expression or to improve the anti-inflammatory capacities of MSCs. Lower panel in blue schematizes the combined cell-based therapies that have been tested in preclinical models to repair bone, heart, and brain (left) and future directions that can be envisaged to repair irradiated intestine (right). Cotherapy with MSCs can broaden the spectrum of action combining the beneficial effects of each cell type. As ISCs are destroyed by irradiation, combining ISCs with the anti-inflammatory and proangiogenic, proproliferative MSCs can improve the structural and functional benefit and accelerate the regeneration process after high doses of irradiation.

implantation and survival rates of the cells in the injured tissue limit their therapeutic benefit. Various studies demonstrate that this feature is common to various diseases. Consequently, this has prompted efforts to improve the therapeutic properties of MSCs (Fig. 6). First, the best route of administration of cells has been tested. Indeed, local injection of MSCs is preferred wherever possible by surgeons. This method of administration allows fewer cells to be injected, which are directly implanted into the site of lesion, and reduces the spreading of stem cells throughout the body. Other strategies have also been tested to increase MSC homing to the site of lesion: particularly, the combination of MSC injection with a mobilizing molecule or genetic modification of MSCs to overexpress the CXCR4 receptor. The poor viability of the injected MSCs in the tissue can be due to various

apoptotic signals. MSCs have a fibroblastic morphology and are attached to the culture plate during their in vitro amplification. The first stress occurs when the cells are detached from the culture dishes for the engraftment procedure. Once MSCs are locally injected into the damaged tissue, their lack of adhesion to ECM can lead to anoikis, which promotes apoptotic signaling. In addition, the innate immune cells like natural killer (NK) cells may also participate in MSC lysis (163). More recent studies demonstrated that preconditioning MSCs with TLR ligands protects them from death by NK cells (189) and enhances their therapeutic potential (70). Moreover, the host inflammatory microenvironment, which generates proinflammatory molecules and ROS, can also trigger apoptotic signaling. Strategies to decrease the apoptosis of MSCs have been successfully realized in animal models. Even if genetically modified MSCs would be difficult to use in the clinic, these experiments shed light on the correlation of the therapeutic benefit and inhibition of MSCs apoptosis. Other studies demonstrated that modification of the host by anti-inflammatory molecules or hyperbaric oxygen, already in clinical use, improves the outcome of MSCs (86,192). In the context of tissue engineering, growing evidence suggests that biomaterials can be used as scaffolds to protect MSCs from the environment and thus increase their life span.

The reparative potential of MSCs seems to be mediated by the release of a broad spectrum of soluble factors. This has prompted considerable efforts to enhance these paracrine capacities by various preconditioning strategies listed in Figure 6. Beyond the determination of the best route of injection, protection against apoptotic signals, and stimulation of their paracrine capacities, the question arises of the ability of one type of cells to improve entire organ regeneration. Because of their intrinsic supportive properties, MSCs are the ideal candidate to use in combination with other progenitor cells. Combined cell therapy has been tested in animal models to repair different tissues (Fig. 6). Significant challenges exist in the development of the intestinal mucosa with the successful ability to grow mini-gut structure in vitro into a 3D scaffold. Besides, in vivo engraftment of colonic progenitor cells has been realized in mice (194). Vacanti's lab has achieved encouraging results by seeding epithelial cells on a biodegradable scaffold and implanting them into host animals (67). At present, efforts are necessary to induce ISC growth on a tubular scaffold by using specific molecules or cell types to obtain a complex architecture that resembles the native intestine. This will require multidisciplinary collaboration to bring fundamental stem cell science, biomaterial engineering, and surgeons into closer contact to overcome the complexity of the intestine. Regenerative therapy for radiation injury is an important juncture. These innovative tissue engineering strategies will offer new hope to patients suffering from the severe side effects of radiotherapy.

ACKNOWLEDGMENT: The authors declare no conflicts of interest.

REFERENCES

1. Abderrahmani, R.; Francois, A.; Buard, V.; Benderitter, M.; Sabourin, J. C.; Crandall, D. L.; Milliat, F. Effects of pharmacological inhibition and genetic deficiency of plasminogen activator inhibitor-1 in radiation-induced intestinal injury. Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys. 74(3): 942–948; 2009.
2. Akyurek, S.; Yildiz, F.; Cengiz, M.; Onal, C.; Yildiz, O.; Genc, M.; Atahan, I. L. Importance of timing of antiaggregant treatment in the prevention of radiation induced enteropathy. Med. Hypotheses 65(4):736–739; 2005.
3. Akyurekli, C.; Le, Y.; Richardson, R. B.; Fergusson, D.; Tay, J.; Allan, D. S. A systematic review of preclinical studies on the therapeutic potential of mesenchymal stromal cell-derived microvesicles. Stem Cell Rev. 11(1):150–160; 2015.
4. Andreyev, H. J.; Wotherspoon, A.; Denham, J. W.; Hauer-Jensen, M. Defining pelvic-radiation disease for the survivorship era. Lancet Oncol. 11(4):310–312; 2010.
5. Andreyev, H. J.; Wotherspoon, A.; Denham, J. W.; Hauer-Jensen, M. "Pelvic radiation disease": New understanding and new solutions for a new disease in the era of cancer survivorship. Scand. J. Gastroenterol. 46(4):389–397; 2011.
6. Andreyev, J. Gastrointestinal complications of pelvic radiotherapy: Are they of any importance? Gut 54(8): 1051–1054; 2005.
7. Arseneau, K. O.; Cominelli, F. Leukocytapheresis in ulcerative colitis: A possible alternative to biological therapy? Dig. Liver Dis. 41(8):551–552; 2009.
8. Azzam, E. I.; Jay-Gerin, J. P.; Pain, D. Ionizing radiation-induced metabolic oxidative stress and prolonged cell injury. Cancer Lett. 327(1–2):48–60; 2012.
9. Barker, N.; van Es, J. H.; Kuipers, J.; Kujala, P.; van den Born, M.; Cozijnsen, M.; Haegebarth, A.; Korving, J.; Begthel, H.; Peters, P. J.; Clevers, H. Identification of stem cells in small intestine and colon by marker gene Lgr5. Nature 449(7165):1003–1007; 2007.
10. Becker, C.; Fantini, M. C.; Schramm, C.; Lehr, H. A.; Wirtz, S.; Nikolaev, A.; Burg, J.; Strand, S.; Kiesslich, R.; Huber, S.; Ito, H.; Nishimoto, N.; Yoshizaki, K.; Kishimoto, T.; Galle, P. R.; Blessing, M.; Rose-John, S.; Neurath, M. F. TGF-beta suppresses tumor progression in colon cancer by inhibition of IL-6 trans-signaling. Immunity 21(4):491–501; 2004.
11. Becker, C.; Fantini, M. C.; Wirtz, S.; Nikolaev, A.; Lehr, H. A.; Galle, P. R.; Rose-John, S.; Neurath, M. F. IL-6 signaling promotes tumor growth in colorectal cancer. Cell Cycle 4(2):217–220; 2005.
12. Bentzen, S. M. Preventing or reducing late side effects of radiation therapy: Radiobiology meets molecular pathology. Nat. Rev. Cancer 6(9):702–713; 2006.
13. Bessout, R.; Demarquay, C.; Moussa, L.; Rene, A.; Doix, B.; Benderitter, M.; Semont, A.; Mathieu, N. TH17 predominant T-cell responses in radiation-induced bowel disease are modulated by treatment with adipose-derived mesenchymal stromal cells. J. Pathol. 237(4):435–446; 2015.
14. Bessout, R.; Semont, A.; Demarquay, C.; Charcosset, A.; Benderitter, M.; Mathieu, N. Mesenchymal stem

cell therapy induces glucocorticoid synthesis in colonic mucosa and suppresses radiation-activated T cells: New insights into MSC immunomodulation. Mucosal Immunol. 7(3):656–669; 2014.
15. Bey, E.; Prat, M.; Duhamel, P.; Benderitter, M.; Brachet, M.; Trompier, F.; Battaglini, P.; Ernou, I.; Boutin, L.; Gourven, M.; Tissedre, F.; Crea, S.; Mansour, C. A.; de Revel, T.; Carsin, H.; Gourmelon, P.; Lataillade, J. J. Emerging therapy for improving wound repair of severe radiation burns using local bone marrow-derived stem cell administrations. Wound Repair Regen. 18(1):50–58; 2010.
16. Bhanja, P.; Saha, S.; Kabarriti, R.; Liu, L.; Roy-Chowdhury, N.; Roy-Chowdhury, J.; Sellers, R. S.; Alfieri, A. A.; Guha, C. Protective role of R-spondin1, an intestinal stem cell growth factor, against radiation-induced gastrointestinal syndrome in mice. PLoS One 4(11):e8014; 2009.
17. Billiard, F.; Buard, V.; Benderitter, M.; Linard, C. Abdominal gamma-radiation induces an accumulation of function-impaired regulatory T cells in the small intestine. Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys. 80(3):869–876; 2011.
18. Biswas, S.; Davis, H.; Irshad, S.; Sandberg, T.; Worthley, D.; Leedham, S. Microenvironmental control of stem cell fate in intestinal homeostasis and disease. J. Pathol. 237(2):135–145; 2015.
19. Blirando, K.; Hneino, M.; Martelly, I.; Benderitter, M.; Milliat, F.; Francois, A. Mast cells and ionizing radiation induce a synergistic expression of inflammatory genes in endothelial cells by a mechanism involving p38alpha MAP kinase and (p65) NF-kappaB activation. Radiat. Res. 178(6):556–567; 2012.
20. Blirando, K.; Milliat, F.; Martelly, I.; Sabourin, J. C.; Benderitter, M.; Francois, A. Mast cells are an essential component of human radiation proctitis and contribute to experimental colorectal damage in mice. Am. J. Pathol. 178(2):640–651; 2011.
21. Bowen, J. M.; Stringer, A. M.; Gibson, R. J.; Yeoh, A. S.; Hannam, S.; Keefe, D. M. VSL#3 probiotic treatment reduces chemotherapy-induced diarrhea and weight loss. Cancer Biol. Ther. 6(9):1449–1454; 2007.
22. Brook, I.; Elliott, T. B.; Ledney, G. D.; Shoemaker, M. O.; Knudson, G. B. Management of postirradiation infection: Lessons learned from animal models. Mil. Med. 169(3): 194–197; 2004.
23. Buczacki, S. J.; Zecchini, H. I.; Nicholson, A. M.; Russell, R.; Vermeulen, L.; Kemp, R.; Winton, D. J. Intestinal label-retaining cells are secretory precursors expressing Lgr5. Nature 495(7439):65–69; 2013.
24. Burdelya, L. G.; Krivokrysenko, V. I.; Tallant, T. C.; Strom, E.; Gleiberman, A. S.; Gupta, D.; Kurnasov, O. V.; Fort, F. L.; Osterman, A. L.; Didonato, J. A.; Feinstein, E.; Gudkov, A. V. An agonist of toll-like receptor 5 has radioprotective activity in mouse and primate models. Science 320(5873):226–230; 2008.
25. Butler, M. J.; Sefton, M. V. Cotransplantation of adipose-derived mesenchymal stromal cells and endothelial cells in a modular construct drives vascularization in SCID/bg mice. Tissue Eng. Part A 18(15–16):1628–1641; 2012.
26. Cai, Y.; Wang, W.; Liang, H.; Sun, L.; Teitelbaum, D. H.; Yang, H. Keratinocyte growth factor pretreatment prevents radiation-induced intestinal damage in a mouse model. Scand. J. Gastroenterol. 48(4):419–426; 2013.
27. Caplan, A. I. Why are MSCs therapeutic? New data: New insight. J. Pathol. 217(2):318–324; 2009.
28. Caplan, A. I.; Dennis, J. E. Mesenchymal stem cells as trophic mediators. J. Cell Biochem. 98(5):1076–1084; 2006.
29. Chang, C. P.; Chio, C. C.; Cheong, C. U.; Chao, C. M.; Cheng, B. C.; Lin, M. T. Hypoxic preconditioning enhances the therapeutic potential of the secretome from cultured human mesenchymal stem cells in experimental traumatic brain injury. Clin. Sci. (Lond) 124(3):165–176; 2013.
30. Chang, P.; Qu, Y.; Liu, Y.; Cui, S.; Zhu, D.; Wang, H.; Jin, X. Multi-therapeutic effects of human adipose-derived mesenchymal stem cells on radiation-induced intestinal injury. Cell Death Dis. 4(e685); 2013.
31. Chen, M. F.; Lin, C. T.; Chen, W. C.; Yang, C. T.; Chen, C. C.; Liao, S. K.; Liu, J. M.; Lu, C. H.; Lee, K. D. The sensitivity of human mesenchymal stem cells to ionizing radiation. Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys. 66(1):244–253; 2006.
32. Cheng, H.; Leblond, C. P. Origin, differentiation and renewal of the four main epithelial cell types in the mouse small intestine. I. Columnar cell. Am. J. Anat. 141(4):461–479; 1974.
33. Chitapanarux, I.; Chitapanarux, T.; Traisathit, P.; Kudumpee, S.; Tharavichitkul, E.; Lorvidhaya, V. Randomized controlled trial of live lactobacillus acidophilus plus bifidobacterium bifidum in prophylaxis of diarrhea during radiotherapy in cervical cancer patients. Radiat. Oncol. 5:31; 2010.
34. Ciorba, M. A.; Riehl, T. E.; Rao, M. S.; Moon, C.; Ee, X.; Nava, G. M.; Walker, M. R.; Marinshaw, J. M.; Stappenbeck, T. S.; Stenson, W. F. Lactobacillus probiotic protects intestinal epithelium from radiation injury in a TLR-2/cyclo-oxygenase-2-dependent manner. Gut 61(6):829–838; 2012.
35. Crawford, P. A.; Gordon, J. I. Microbial regulation of intestinal radiosensitivity. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 102(37):13254–13259; 2005.
36. Criswell, T.; Leskov, K.; Miyamoto, S.; Luo, G.; Boothman, D. A. Transcription factors activated in mammalian cells after clinically relevant doses of ionizing radiation. Oncogene 22(37):5813–5827; 2003.
37. Daniele, B.; Secondulfo, M.; De Vivo, R.; Pignata, S.; De Magistris, L.; Delrio, P.; Palaia, R.; Barletta, E.; Tambaro, R.; Carratu, R. Effect of chemotherapy with 5-fluorouracil on intestinal permeability and absorption in patients with advanced colorectal cancer. J. Clin. Gastroenterol. 32(3):228–230; 2001.
38. de Andrade, A. V.; Riewaldt, J.; Wehner, R.; Schmitz, M.; Odendahl, M.; Bornhauser, M.; Tonn, T. Gamma irradiation preserves immunosuppressive potential and inhibits clonogenic capacity of human bone marrow-derived mesenchymal stromal cells. J. Cell. Mol. Med. 18(6):1184–1193; 2014.
39. Dignass, A.; Lynch-Devaney, K.; Kindon, H.; Thim, L.; Podolsky, D. K. Trefoil peptides promote epithelial migration through a transforming growth factor beta-independent pathway. J. Clin. Invest. 94(1):376–383; 1994.
40. Dignass, A. U.; Podolsky, D. K. Cytokine modulation of intestinal epithelial cell restitution: Central role of transforming growth factor beta. Gastroenterology 105(5): 1323–1332; 1993.
41. Doyle, S. L.; O'Neill, L. A. Toll-like receptors: From the discovery of NFkappaB to new insights into transcriptional regulations in innate immunity. Biochem. Pharmacol. 72(9): 1102–1113; 2006.

42. Dublineau, I.; Lebrun, F.; Grison, S.; Griffiths, N. M. Functional and structural alterations of epithelial barrier properties of rat ileum following X-irradiation. Can. J. Physiol. Pharmacol. 82(2):84–93; 2004.
43. Durand, C.; Pezet, S.; Eutamene, H.; Demarquay, C.; Mathieu, N.; Moussa, L.; Daudin, R.; Holler, V.; Sabourin, J. C.; Milliat, F.; Francois, A.; Theodorou, V.; Tamarat, R.; Benderitter, M.; Semont, A. Persistent visceral allodynia in rats exposed to colorectal irradiation is reversed by mesenchymal stromal cell treatment. Pain 156(8):1465–1476; 2015.
44. Dvorak, J.; Melichar, B.; Hyspler, R.; Kremova, I.; Urbanek, L.; Kalabova, H.; Kasparova, M.; Solichova, D. Intestinal permeability, vitamin A absorption, alpha-tocopherol, and neopterin in patients with rectal carcinoma treated with chemoradiation. Med. Oncol. 27(3):690–696; 2010.
45. Engels-Deutsch, M.; Pini, A.; Yamashita, Y.; Shibata, Y.; Haikel, Y.; Scholler-Guinard, M.; Klein, J. P. Insertional inactivation of pac and rmlB genes reduces the release of tumor necrosis factor alpha, interleukin-6, and interleukin-8 induced by Streptococcus mutans in monocytic, dental pulp, and periodontal ligament cells. Infect. Immun. 71(9):5169–5177; 2003.
46. Ewaschuk, J. B.; Diaz, H.; Meddings, L.; Diederichs, B.; Dmytrash, A.; Backer, J.; Looijer-van Langen, M.; Madsen, K. L. Secreted bioactive factors from Bifidobacterium infantis enhance epithelial cell barrier function. Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol. 295(5):G1025–1034; 2008.
47. Farrell, C. L.; Bready, J. V.; Rex, K. L.; Chen, J. N.; DiPalma, C. R.; Whitcomb, K. L.; Yin, S.; Hill, D. C.; Wiemann, B.; Starnes, C. O.; Havill, A. M.; Lu, Z. N.; Aukerman, S. L.; Pierce, G. F.; Thomason, A.; Potten, C. S.; Ulich, T. R.; Lacey, D. L. Keratinocyte growth factor protects mice from chemotherapy and radiation-induced gastrointestinal injury and mortality. Cancer Res. 58(5):933–939; 1998.
48. Fazeny-Dorner, B.; Veitl, M.; Wenzel, C.; Brodowicz, T.; Zielinski, C.; Muhm, M.; Vogelsang, H.; Marosi, C. Alterations in intestinal permeability following the intensified polydrug-chemotherapy IFADIC (ifosfamide, Adriamycin, dacarbazine). Cancer Chemother. Pharmacol. 49(4):294–298; 2002.
49. Fekete, N.; Erle, A.; Amann, E. M.; Furst, D.; Rojewski, M. T.; Langonne, A.; Sensebe, L.; Schrezenmeier, H.; Schmidtke-Schrezenmeier, G. Effect of high-dose irradiation on human bone-marrow-derived mesenchymal stromal cells. Tissue Eng. Part C Methods 21(2):112–122; 2015.
50. Flanders, K. C. Smad3 as a mediator of the fibrotic response. Int. J. Exp. Pathol. 85(2):47–64; 2004.
51. Flanders, K. C.; Ho, B. M.; Arany, P. R.; Stuelten, C.; Mamura, M.; Paterniti, M. O.; Sowers, A.; Mitchell, J. B.; Roberts, A. B. Absence of Smad3 induces neutrophil migration after cutaneous irradiation: Possible contribution to subsequent radioprotection. Am. J. Pathol. 173(1):68–76; 2008.
52. Franchi, L.; Warner, N.; Viani, K.; Nunez, G. Function of Nod-like receptors in microbial recognition and host defense. Immunol. Rev. 227(1):106–128; 2009.
53. Francois, A.; Milliat, F.; Guipaud, O.; Benderitter, M. Inflammation and immunity in radiation damage to the gut mucosa. Biomed. Res. Int. 2013(123241); 2013.
54. Francois, A.; Milliat, F.; Vozenin-Brotons, M. C.; Mathe, D.; Griffiths, N. M. 'In-field' and 'out-of-field' functional impairment during subacute and chronic phases of experimental radiation enteropathy in the rat. Int. J. Radiat. Biol. 79(6):437–450; 2003.
55. Francois, S.; Bensidhoum, M.; Mouiseddine, M.; Mazurier, C.; Allenet, B.; Semont, A.; Frick, J.; Sache, A.; Bouchet, S.; Thierry, D.; Gourmelon, P.; Gorin, N. C.; Chapel, A. Local irradiation not only induces homing of human mesenchymal stem cells at exposed sites but promotes their widespread engraftment to multiple organs: A study of their quantitative distribution after irradiation damage. Stem Cells 24(4):1020–1029; 2006.
56. Galland, R. B.; Spencer, J. The natural history of clinically established radiation enteritis. Lancet 1(8440):1257–1258; 1985.
57. Galland, R. B.; Spencer, J. Surgical management of radiation enteritis. Surgery 99(2):133–139; 1986.
58. Gao, C.; Harvey, E. J.; Chua, M.; Chen, B. P.; Jiang, F.; Liu, Y.; Li, A.; Wang, H.; Henderson, J. E. MSC-seeded dense collagen scaffolds with a bolus dose of VEGF promote healing of large bone defects. Eur. Cell Mater. 26:195–207; discussion 207; 2013.
59. Gao, Z.; Zhang, Q.; Han, Y.; Cheng, X.; Lu, Y.; Fan, L.; Wu, Z. Mesenchymal stromal cell-conditioned medium prevents radiation-induced small intestine injury in mice. Cytotherapy 14(3):267–273; 2012.
60. Garcia-Olmo, D.; Herreros, D.; Pascual, I.; Pascual, J. A.; Del-Valle, E.; Zorrilla, J.; De-La-Quintana, P.; Garcia-Arranz, M.; Pascual, M. Expanded adipose-derived stem cells for the treatment of complex perianal fistula: A phase II clinical trial. Dis. Colon Rectum 52(1):79–86; 2009.
61. Gaugler, M. H.; Squiban, C.; van der Meeren, A.; Bertho, J. M.; Vandamme, M.; Mouthon, M. A. Late and persistent up-regulation of intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) expression by ionizing radiation in human endothelial cells in vitro. Int. J. Radiat. Biol. 72(2):201–209; 1997.
62. Giralt, J.; Regadera, J. P.; Verges, R.; Romero, J.; de la Fuente, I.; Biete, A.; Villoria, J.; Cobo, J. M.; Guarner, F. Effects of probiotic Lactobacillus casei DN-114 001 in prevention of radiation-induced diarrhea: Results from multicenter, randomized, placebo-controlled nutritional trial. Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys. 71(4):1213–1219; 2008.
63. Godier-Furnemont, A. F.; Martens, T. P.; Koeckert, M. S.; Wan, L.; Parks, J.; Arai, K.; Zhang, G.; Hudson, B.; Homma, S.; Vunjak-Novakovic, G. Composite scaffold provides a cell delivery platform for cardiovascular repair. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 108(19):7974–7979; 2011.
64. Gonzalez-Rey, E.; Anderson, P.; Gonzalez, M. A.; Rico, L.; Buscher, D.; Delgado, M. Human adult stem cells derived from adipose tissue protect against experimental colitis and sepsis. Gut 58(7):929–939; 2009.
65. Gonzalez, M. A.; Gonzalez-Rey, E.; Rico, L.; Buscher, D.; Delgado, M. Adipose-derived mesenchymal stem cells alleviate experimental colitis by inhibiting inflammatory and autoimmune responses. Gastroenterology 136(3):978–989; 2009.
66. Gremy, O.; Benderitter, M.; Linard, C. Acute and persisting Th2-like immune response after fractionated colorectal gamma-irradiation. World J. Gastroenterol. 14(46):7075–7085; 2008.
67. Grikscheit, T. C.; Ochoa, E. R.; Ramsanahie, A.; Alsberg, E.; Mooney, D.; Whang, E. E.; Vacanti, J. P. Tissue-engineered large intestine resembles native colon with appropriate in vitro physiology and architecture. Ann. Surg. 238(1):35–41; 2003.

68. Grivennikov, S.; Karin, E.; Terzic, J.; Mucida, D.; Yu, G. Y.; Vallabhapurapu, S.; Scheller, J.; Rose-John, S.; Cheroutre, H.; Eckmann, L.; Karin, M. IL-6 and Stat3 are required for survival of intestinal epithelial cells and development of colitis-associated cancer. Cancer Cell 15(2):103–113; 2009.
69. Guadalajara, H.; Herreros, D.; De-La-Quintana, P.; Trebol, J.; Garcia-Arranz, M.; Garcia-Olmo, D. Long-term follow-up of patients undergoing adipose-derived adult stem cell administration to treat complex perianal fistulas. Int. J. Colorectal Dis. 27(5):595–600; 2012.
70. Han, K. H.; Kim, A. K.; Kim, M. H.; Kim, D. H.; Go, H. N.; Kim, D. I. Enhancement of angiogenic effects by hypoxia-preconditioned human umbilical cord-derived mesenchymal stem cells in a mouse model of hindlimb ischemia. Cell Biol. Int. 40(1):27–35; 2015.
71. Haton, C.; Francois, A.; Vandamme, M.; Wysocki, J.; Griffiths, N. M.; Benderitter, M. Imbalance of the antioxidant network of mouse small intestinal mucosa after radiation exposure. Radiat. Res. 167(4):445–453; 2007.
72. Hatoum, O. A.; Otterson, M. F.; Kopelman, D.; Miura, H.; Sukhotnik, I.; Larsen, B. T.; Selle, R. M.; Moulder, J. E.; Gutterman, D. D. Radiation induces endothelial dysfunction in murine intestinal arterioles via enhanced production of reactive oxygen species. Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol. 26(2):287–294; 2006.
73. Haydont, V.; Vozenin-Brotons, M. C. Maintenance of radiation-induced intestinal fibrosis: Cellular and molecular features. World J. Gastroenterol. 13(19):2675–2683; 2007.
74. Heath, J. P. Epithelial cell migration in the intestine. Cell. Biol. Int. 20(2):139–146; 1996.
75. Houchen, C. W.; George, R. J.; Sturmoski, M. A.; Cohn, S. M. FGF-2 enhances intestinal stem cell survival and its expression is induced after radiation injury. Am. J. Physiol. 276(1 Pt 1):G249–258; 1999.
76. Housley, R. M.; Morris, C. F.; Boyle, W.; Ring, B.; Biltz, R.; Tarpley, J. E.; Aukerman, S. L.; Devine, P. L.; Whitehead, R. H.; Pierce, G. F. Keratinocyte growth factor induces proliferation of hepatocytes and epithelial cells throughout the rat gastrointestinal tract. J. Clin. Invest. 94(5):1764–1777; 1994.
77. Hovdenak, N.; Wang, J.; Sung, C. C.; Kelly, T.; Fajardo, L. F.; Hauer-Jensen, M. Clinical significance of increased gelatinolytic activity in the rectal mucosa during external beam radiation therapy of prostate cancer. Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys. 53(4):919–927; 2002.
78. Howarth, G. S.; Fraser, R.; Frisby, C. L.; Schirmer, M. B.; Yeoh, E. K. Effects of insulin-like growth factor-I administration on radiation enteritis in rats. Scand. J. Gastroenterol. 32(11):1118–1124; 1997.
79. Hu, J.; Yang, Z.; Wang, J.; Tang, Y.; Liu, H.; Zhang, B.; Chen, H. Infusion of Trx-1-overexpressing hucMSC prolongs the survival of acutely irradiated NOD/SCID mice by decreasing excessive inflammatory injury. PLoS One 8(11):e78227; 2013.
80. Husebye, E.; Skar, V.; Hoverstad, T.; Iversen, T.; Melby, K. Abnormal intestinal motor patterns explain enteric colonization with gram-negative bacilli in late radiation enteropathy. Gastroenterology 109(4):1078–1089; 1995.
81. Ishihara, H.; Tanaka, T.; Yakumaru, H.; Tanaka, M.; Satoh, A.; Ishiwata, A.; Yokochi, K.; Kurematsu, A.; Ueda, J.; Shibata, T.; Hachiya, M.; Akashi, M. Acceleration of regeneration of mucosa in small intestine damaged by ionizing radiation using anabolic steroids. Radiat. Res. 175(3):367–374; 2011.
82. Ivanov, A. I.; Nusrat, A.; Parkos, C. A. Endocytosis of epithelial apical junctional proteins by a clathrin-mediated pathway into a unique storage compartment. Mol. Biol. Cell 15(1):176–188; 2004.
83. Jin, J.; Jeong, S. I.; Shin, Y. M.; Lim, K. S.; Shin, H.; Lee, Y. M.; Koh, H. C.; Kim, K. S. Transplantation of mesenchymal stem cells within a poly(lactide-co-epsilon-caprolactone) scaffold improves cardiac function in a rat myocardial infarction model. Eur. J. Heart Fail. 11(2):147–153; 2009.
84. Jin, Y.; Hong, H. S.; Son, Y. Substance P enhances mesenchymal stem cells-mediated immune modulation. Cytokine 71(2):145–153; 2015.
85. Johnson, L. B.; Riaz, A. A.; Adawi, D.; Wittgren, L.; Back, S.; Thornberg, C.; Osman, N.; Gadaleanu, V.; Thorlacius, H.; Jeppsson, B. Radiation enteropathy and leucocyte-endothelial cell reactions in a refined small bowel model. BMC Surg. 4:10; 2004.
86. Khan, M.; Meduru, S.; Mohan, I. K.; Kuppusamy, M. L.; Wisel, S.; Kulkarni, A.; Rivera, B. K.; Hamlin, R. L.; Kuppusamy, P. Hyperbaric oxygenation enhances transplanted cell graft and functional recovery in the infarct heart. J. Mol. Cell. Cardiol. 47(2):275–287; 2009.
87. Kim, H. J.; Lee, J. H.; Im, G. I. Chondrogenesis using mesenchymal stem cells and PCL scaffolds. J. Biomed. Mater. Res. A 92(2):659–666; 2010.
88. Kim, K.; Pollard, J. M.; Norris, A. J.; McDonald, J. T.; Sun, Y.; Micewicz, E.; Pettijohn, K.; Damoiseaux, R.; Iwamoto, K. S.; Sayre, J. W.; Price, B. D.; Gatti, R. A.; McBride, W. H. High-throughput screening identifies two classes of antibiotics as radioprotectors: Tetracyclines and fluoroquinolones. Clin. Cancer Res. 15(23):7238–7245; 2009.
89. Kuroki, F.; Iida, M.; Matsui, T.; Matsumoto, T.; Fujishima, M.; Yao, T. Intraoperative endoscopy for small intestinal damage in radiation enteritis. Gastrointest. Endosc. 38(2):196–197; 1992.
90. Kwon, M. J. Emerging roles of claudins in human cancer. Int. J. Mol. Sci. 14(9):18148–18180; 2013.
91. Lataillade, J. J.; Doucet, C.; Bey, E.; Carsin, H.; Huet, C.; Clairand, I.; Bottollier-Depois, J. F.; Chapel, A.; Ernou, I.; Gourven, M.; Boutin, L.; Hayden, A.; Carcamo, C.; Buglova, E.; Joussemet, M.; de Revel, T.; Gourmelon, P. New approach to radiation burn treatment by dosimetry-guided surgery combined with autologous mesenchymal stem cell therapy. Regen. Med. 2(5):785–794; 2007.
92. Le Blanc, K.; Rasmusson, I.; Sundberg, B.; Gotherstrom, C.; Hassan, M.; Uzunel, M.; Ringden, O. Treatment of severe acute graft-versus-host disease with third party haploidentical mesenchymal stem cells. Lancet 363(9419):1439–1441; 2004.
93. Lee, R. H.; Pulin, A. A.; Seo, M. J.; Kota, D. J.; Ylostalo, J.; Larson, B. L.; Semprun-Prieto, L.; Delafontaine, P.; Prockop, D. J. Intravenous hMSCs improve myocardial infarction in mice because cells embolized in lung are activated to secrete the anti-inflammatory protein TSG-6. Cell Stem Cell 5(1):54–63; 2009.
94. Li, Q.; Wijesekera, O.; Salas, S. J.; Wang, J. Y.; Zhu, M.; Aprhys, C.; Chaichana, K. L.; Chesler, D. A.; Zhang, H.; Smith, C. L.; Guerrero-Cazares, H.; Levchenko, A.;

Quinones-Hinojosa, A. Mesenchymal stem cells from human fat engineered to secrete BMP4 are nononcogenic, suppress brain cancer, and prolong survival. Clin. Cancer Res. 20(9):2375–2387; 2014.
95. Li, T.; Ma, Q.; Ning, M.; Zhao, Y.; Hou, Y. Cotransplantation of human umbilical cord-derived mesenchymal stem cells and umbilical cord blood-derived CD34(+) cells in a rabbit model of myocardial infarction. Mol. Cell. Biochem. 387(1–2):91–100; 2014.
96. Li, T.; Yan, Y.; Wang, B.; Qian, H.; Zhang, X.; Shen, L.; Wang, M.; Zhou, Y.; Zhu, W.; Li, W.; Xu, W. Exosomes derived from human umbilical cord mesenchymal stem cells alleviate liver fibrosis. Stem Cells Dev. 22(6):845–854; 2013.
97. Lin, R.; Ding, Z.; Ma, H.; Shi, H.; Gao, Y.; Qian, W.; Shi, W.; Sun, Z.; Hou, X.; Li, X. In vitro conditioned bone marrow-derived mesenchymal stem cells promote de novo functional enteric nerve regeneration, but not through direct-transdifferentiation. Stem Cells 33(12):3545–3557; 2015.
98. Linard, C.; Billiard, F.; Benderitter, M. Intestinal irradiation and fibrosis in a Th1-deficient environment. Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys. 84(1):266–273; 2012.
99. Linard, C.; Busson, E.; Holler, V.; Strup-Perrot, C.; Lacave-Lapalun, J. V.; Lhomme, B.; Prat, M.; Devauchelle, P.; Sabourin, J. C.; Simon, J. M.; Bonneau, M.; Lataillade, J. J.; Benderitter, M. Repeated autologous bone marrow-derived mesenchymal stem cell injections improve radiation-induced proctitis in pigs. Stem Cells Transl. Med. 2(11):916–927; 2013.
100. Linard, C.; Marquette, C.; Mathieu, J.; Pennequin, A.; Clarencon, D.; Mathe, D. Acute induction of inflammatory cytokine expression after gamma-irradiation in the rat: Effect of an NF-kappaB inhibitor. Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys. 58(2):427–434; 2004.
101. Liu, Q.; Du, X. X.; Schindel, D. T.; Yang, Z. X.; Rescorla, F. J.; Williams, D. A.; Grosfeld, J. L. Trophic effects of interleukin-11 in rats with experimental short bowel syndrome. J. Pediatr. Surg. 31(8):1047–1050; discussion 1050–1041; 1996.
102. Liu, Q.; Nobaek, S.; Adawi, D.; Mao, Y.; Wang, M.; Molin, G.; Ekelund, M.; Jeppsson, B. Administration of Lactobacillus plantarum 299v reduces side-effects of external radiation on colon anastomotic healing in an experimental model. Colorectal Dis. 3(4):245–252; 2001.
103. Llopis, M.; Antolin, M.; Carol, M.; Borruel, N.; Casellas, F.; Martinez, C.; Espin-Basany, E.; Guarner, F.; Malagelada, J. R. Lactobacillus casei downregulates commensals' inflammatory signals in Crohn's disease mucosa. Inflamm. Bowel Dis. 15(2):275–283; 2009.
104. Ma, T. Y.; Boivin, M. A.; Ye, D.; Pedram, A.; Said, H. M. Mechanism of TNF-{alpha} modulation of Caco-2 intestinal epithelial tight junction barrier: Role of myosin light-chain kinase protein expression. Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol. 288(3):G422–430; 2005.
105. Mangi, A. A.; Noiseux, N.; Kong, D.; He, H.; Rezvani, M.; Ingwall, J. S.; Dzau, V. J. Mesenchymal stem cells modified with Akt prevent remodeling and restore performance of infarcted hearts. Nat. Med. 9(9):1195–1201; 2003.
106. Manichanh, C.; Varela, E.; Martinez, C.; Antolin, M.; Llopis, M.; Dore, J.; Giralt, J.; Guarner, F.; Malagelada, J. R. The gut microbiota predispose to the pathophysiology of acute postradiotherapy diarrhea. Am. J. Gastroenterol. 103(7):1754–1761; 2008.
107. Markov, A. G.; Veshnyakova, A.; Fromm, M.; Amasheh, M.; Amasheh, S. Segmental expression of claudin proteins correlates with tight junction barrier properties in rat intestine. J. Comp. Physiol. B 180(4):591–598; 2010.
108. Masyuk, A. I.; Marinelli, R. A.; LaRusso, N. F. Water transport by epithelia of the digestive tract. Gastroenterology 122(2):545–562; 2002.
109. Mathieu, E.; Lamirault, G.; Toquet, C.; Lhommet, P.; Rederstorff, E.; Sourice, S.; Biteau, K.; Hulin, P.; Forest, V.; Weiss, P.; Guicheux, J.; Lemarchand, P. Intramyocardial delivery of mesenchymal stem cell-seeded hydrogel preserves cardiac function and attenuates ventricular remodeling after myocardial infarction. PLoS One 7(12):e51991; 2012.
110. McKenna, K. J.; Ligato, S.; Kauffman, G. L., Jr.; Abt, A. B.; Stryker, J. A.; Conter, R. L. Epidermal growth factor enhances intestinal mitotic activity and DNA content after acute abdominal radiation. Surgery 115(5):626–632; 1994.
111. McLaughlin, M. M.; Dacquisto, M. P.; Jacobus, D. P.; Horowitz, R. E. Effects of the germfree state on responses of mice to whole-body irradiation. Radiat. Res. 23:333–349; 1964.
112. Meeren, A. V.; Bertho, J. M.; Vandamme, M.; Gaugler, M. H. Ionizing radiation enhances IL-6 and IL-8 production by human endothelial cells. Mediators Inflamm. 6(3):185–193; 1997.
113. Melichar, B.; Dvorak, J.; Hyspler, R.; Zadak, Z. Intestinal permeability in the assessment of intestinal toxicity of cytotoxic agents. Chemotherapy 51(6):336–338; 2005.
114. Metcalfe, C.; Kljavin, N. M.; Ybarra, R.; de Sauvage, F. J. Lgr5+ stem cells are indispensable for radiation-induced intestinal regeneration. Cell Stem Cell 14(2):149–159; 2014.
115. Milliat, F.; Francois, A.; Isoir, M.; Deutsch, E.; Tamarat, R.; Tarlet, G.; Atfi, A.; Validire, P.; Bourhis, J.; Sabourin, J. C.; Benderitter, M. Influence of endothelial cells on vascular smooth muscle cells phenotype after irradiation: Implication in radiation-induced vascular damages. Am. J. Pathol. 169(4):1484–1495; 2006.
116. Mintet, E.; Rannou, E.; Buard, V.; West, G.; Guipaud, O.; Tarlet, G.; Sabourin, J. C.; Benderitter, M.; Fiocchi, C.; Milliat, F.; Francois, A. Identification of endothelial-to-mesenchymal transition as a potential participant in radiation proctitis. Am. J. Pathol. 185(9):2550–2562; 2015.
117. Molla, M.; Gironella, M.; Miquel, R.; Tovar, V.; Engel, P.; Biete, A.; Pique, J. M.; Panes, J. Relative roles of ICAM-1 and VCAM-1 in the pathogenesis of experimental radiation-induced intestinal inflammation. Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys. 57(1):264–273; 2003.
118. Nejdfors, P.; Ekelund, M.; Westrom, B. R.; Willen, R.; Jeppsson, B. Intestinal permeability in humans is increased after radiation therapy. Dis. Colon Rectum 43(11):1582–1587; discussion 1587–1588; 2000.
119. O'Brien, P. J.; Ramanathan, R.; Yingling, J. M.; Baselga, J.; Rothenberg, M. L.; Carducci, M.; Daly, T.; Adcock, D.; Lahn, M. Analysis and variability of TGFbeta measurements in cancer patients with skeletal metastases. Biologics 2(3):563–569; 2008.
120. Oksuz, S.; Alagoz, M. S.; Karagoz, H.; Kucukodac, Z.; Karaoz, E.; Duruksu, G.; Aksu, G. Comparison of

treatments with local mesenchymal stem cells and mesenchymal stem cells with increased vascular endothelial growth factor expression on irradiation injury of expanded skin. Ann. Plast. Surg. 75(2):219–230; 2015.
121. Okunieff, P.; Mester, M.; Wang, J.; Maddox, T.; Gong, X.; Tang, D.; Coffee, M.; Ding, I. In vivo radioprotective effects of angiogenic growth factors on the small bowel of C3H mice. Radiat. Res. 150(2):204–211; 1998.
122. Ono, M.; Ohnishi, S.; Honda, M.; Ishikawa, M.; Hosono, H.; Onishi, R.; Nakagawa, K.; Takeda, H.; Sakamoto, N. Effects of human amnion-derived mesenchymal stromal cell transplantation in rats with radiation proctitis. Cytotherapy 17(11):1545–1559; 2015.
123. Onodera, H.; Nagayama, S.; Mori, A.; Fujimoto, A.; Tachibana, T.; Yonenaga, Y. Reappraisal of surgical treatment for radiation enteritis. World J. Surg. 29(4):459–463; 2005.
124. Oshima, T.; Miwa, H.; Joh, T. Changes in the expression of claudins in active ulcerative colitis. J. Gastroenterol. Hepatol. 23(Suppl 2):S146–150; 2008.
125. Osterlund, P.; Ruotsalainen, T.; Korpela, R.; Saxelin, M.; Ollus, A.; Valta, P.; Kouri, M.; Elomaa, I.; Joensuu, H. Lactobacillus supplementation for diarrhoea related to chemotherapy of colorectal cancer: A randomised study. Br. J. Cancer 97(8):1028–1034; 2007.
126. Ottewell, P. D.; Duckworth, C. A.; Varro, A.; Dimaline, R.; Wang, T. C.; Watson, A. J.; Dockray, G. J.; Pritchard, D. M. Gastrin increases murine intestinal crypt regeneration following injury. Gastroenterology 130(4):1169–1180; 2006.
127. Packey, C. D.; Ciorba, M. A. Microbial influences on the small intestinal response to radiation injury. Curr. Opin. Gastroenterol. 26(2):88–94; 2010.
128. Paclik, D.; Lohse, K.; Wiedenmann, B.; Dignass, A. U.; Sturm, A. Galectin-2 and -4, but not galectin-1, promote intestinal epithelial wound healing in vitro through a TGF-beta-independent mechanism. Inflamm. Bowel Dis. 14(10):1366–1372; 2008.
129. Paris, F.; Fuks, Z.; Kang, A.; Capodieci, P.; Juan, G.; Ehleiter, D.; Haimovitz-Friedman, A.; Cordon-Cardo, C.; Kolesnick, R. Endothelial apoptosis as the primary lesion initiating intestinal radiation damage in mice. Science 293(5528):293–297; 2001.
130. Parrilli, G.; Iaffaioli, R. V.; Martorano, M.; Cuomo, R.; Tafuto, S.; Zampino, M. G.; Budillon, G.; Bianco, A. R. Effects of anthracycline therapy on intestinal absorption in patients with advanced breast cancer. Cancer Res. 49(13):3689–3691; 1989.
131. Peiffert, D.; Simon, J. M.; Eschwege, F. [Epinal radiotherapy accident: Passed, present, future]. Cancer Radiother. 11(6–7):309–312; 2007.
132. Porvaznik, M. Tight junction disruption and recovery after sublethal gamma irradiation. Radiat. Res. 78(2):233–250; 1979.
133. Potten, C. S. Extreme sensitivity of some intestinal crypt cells to X and gamma irradiation. Nature 269(5628):518–521; 1977.
134. Potten, C. S.; Booth, C. The role of radiation-induced and spontaneous apoptosis in the homeostasis of the gastrointestinal epithelium: A brief review. Comp. Biochem. Physiol. B. Biochem. Mol. Biol. 118(3):473–478; 1997.
135. Powell, D. W.; Saada, J. I. Mesenchymal stem cells and prostaglandins may be critical for intestinal wound repair. Gastroenterology 143(1):19–22; 2012.
136. Qiu, X.; Villalta, J.; Ferretti, L.; Fandel, T. M.; Albersen, M.; Lin, G.; Dai, Y.; Lue, T. F.; Lin, C. S. Effects of intravenous injection of adipose-derived stem cells in a rat model of radiation therapy-induced erectile dysfunction. J. Sex. Med. 9(7):1834–1841; 2012.
137. Rakoff-Nahoum, S.; Paglino, J.; Eslami-Varzaneh, F.; Edberg, S.; Medzhitov, R. Recognition of commensal microflora by toll-like receptors is required for intestinal homeostasis. Cell 118(2):229–241; 2004.
138. Rannou, E.; Francois, A.; Toullec, A.; Guipaud, O.; Buard, V.; Tarlet, G.; Minet, E.; Jaillet, C.; Iruela-Arispe, M. L.; Benderitter, M.; Sabourin, J. C.; Milliat, F. In vivo evidence for an endothelium-dependent mechanism in radiation-induced normal tissue injury. Sci. Rep. 5:15738; 2015.
139. Regimbeau, J. M.; Panis, Y.; Gouzi, J. L.; Fagniez, P. L. Operative and long term results after surgery for chronic radiation enteritis. Am. J. Surg. 182(3):237–242; 2001.
140. Riehl, T.; Cohn, S.; Tessner, T.; Schloemann, S.; Stenson, W. F. Lipopolysaccharide is radioprotective in the mouse intestine through a prostaglandin-mediated mechanism. Gastroenterology 118(6):1106–1116; 2000.
141. Rossignol, J.; Fink, K.; Davis, K.; Clerc, S.; Crane, A.; Matchynski, J.; Lowrance, S.; Bombard, M.; Dekorver, N.; Lescaudron, L.; Dunbar, G. L. Transplants of adult mesenchymal and neural stem cells provide neuroprotection and behavioral sparing in a transgenic rat model of Huntington's disease. Stem Cells 32(2):500–509; 2014.
142. Saha, S.; Bhanja, P.; Kabarriti, R.; Liu, L.; Alfieri, A. A.; Guha, C. Bone marrow stromal cell transplantation mitigates radiation-induced gastrointestinal syndrome in mice. PLoS One 6(9):e24072; 2011.
143. Saha, S.; Bhanja, P.; Liu, L.; Alfieri, A. A.; Yu, D.; Kandimalla, E. R.; Agrawal, S.; Guha, C. TLR9 agonist protects mice from radiation-induced gastrointestinal syndrome. PLoS One 7(1):e29357; 2012.
144. Sasaki, H.; Hirai, K.; Yamamoto, H.; Tanooka, H.; Sakamoto, H.; Iwamoto, T.; Takahashi, T.; Terada, M.; Ochiya, T. HST-1/FGF-4 plays a critical role in crypt cell survival and facilitates epithelial cell restitution and proliferation. Oncogene 23(20):3681–3688; 2004.
145. Sato, T.; Vries, R. G.; Snippert, H. J.; van de Wetering, M.; Barker, N.; Stange, D. E.; van Es, J. H.; Abo, A.; Kujala, P.; Peters, P. J.; Clevers, H. Single Lgr5 stem cells build crypt-villus structures in vitro without a mesenchymal niche. Nature 459(7244):262–265; 2009.
146. Scartoni, D.; Desideri, I.; Giacomelli, I.; Di Cataldo, V.; Di Brina, L.; Mancuso, A.; Furfaro, I.; Bonomo, P.; Simontacchi, G.; Livi, L. Nutritional supplement based on zinc, prebiotics, probiotics and vitamins to prevent radiation-related gastrointestinal disorders. Anticancer Res. 35(10):5687–5692; 2015.
147. Schaue, D.; McBride, W. H. T lymphocytes and normal tissue responses to radiation. Front. Oncol. 2:119; 2012.
148. Schuller, B. W.; Binns, P. J.; Riley, K. J.; Ma, L.; Hawthorne, M. F.; Coderre, J. A. Selective irradiation of the vascular endothelium has no effect on the survival of murine intestinal crypt stem cells. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 103(10):3787–3792; 2006.
149. Semont, A.; Demarquay, C.; Bessout, R.; Durand, C.; Benderitter, M.; Mathieu, N. Mesenchymal stem cell therapy stimulates endogenous host progenitor cells to improve colonic epithelial regeneration. PLoS One 8(7):e70170; 2013.

150. Semont, A.; Francois, S.; Mouiseddine, M.; Francois, A.; Sache, A.; Frick, J.; Thierry, D.; Chapel, A. Mesenchymal stem cells increase self-renewal of small intestinal epithelium and accelerate structural recovery after radiation injury. Adv. Exp. Med. Biol. 585:19–30; 2006.
151. Semont, A.; Mouiseddine, M.; Francois, A.; Demarquay, C.; Mathieu, N.; Chapel, A.; Sache, A.; Thierry, D.; Laloi, P.; Gourmelon, P. Mesenchymal stem cells improve small intestinal integrity through regulation of endogenous epithelial cell homeostasis. Cell Death Differ. 17(6):952–961; 2010.
152. Sheng, H.; Wang, Y.; Jin, Y.; Zhang, Q.; Zhang, Y.; Wang, L.; Shen, B.; Yin, S.; Liu, W.; Cui, L.; Li, N. A critical role of IFNgamma in priming MSC-mediated suppression of T cell proliferation through up-regulation of B7-H1. Cell Res. 18(8):846–857; 2008.
153. Shim, S.; Lee, J. G.; Bae, C. H.; Lee, S. B.; Jang, W. S.; Lee, S. J.; Lee, S. S.; Park, S. Claudin-3 expression in radiation-exposed rat models: A potential marker for radiation-induced intestinal barrier failure. Biochem. Biophys. Res. Commun. 456(1):351–354; 2015.
154. Simpson, D.; Liu, H.; Fan, T. H.; Nerem, R.; Dudley, S. C., Jr. A tissue engineering approach to progenitor cell delivery results in significant cell engraftment and improved myocardial remodeling. Stem Cells 25(9):2350–2357; 2007.
155. Solheim, K. E.; Laerum, F.; Stordahl, A.; Aase, S. Urinary excretion of iohexol after enteral administration in rats with radiation injury of the small intestine. Scand. J. Gastroenterol. 26(10):1097–1106; 1991.
156. Somosy, Z.; Kovacs, J.; Siklos, L.; Koteles, G. J. Morphological and histochemical changes in intercellular junctional complexes in epithelial cells of mouse small intestine upon X-irradiation: Changes of ruthenium red permeability and calcium content. Scanning Microsc. 7(3):961–971; 1993.
157. Sonis, S. T. The biologic role for nuclear factor-kappaB in disease and its potential involvement in mucosal injury associated with anti-neoplastic therapy. Crit. Rev. Oral Biol. Med. 13(5):380–389; 2002.
158. Sonis, S. T. The pathobiology of mucositis. Nat. Rev. Cancer 4(4):277–284; 2004.
159. Strup-Perrot, C.; Mathe, D.; Linard, C.; Violot, D.; Milliat, F.; Francois, A.; Bourhis, J.; Vozenin-Brotons, M. C. Global gene expression profiles reveal an increase in mRNA levels of collagens, MMPs, and TIMPs in late radiation enteritis. Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol. 287(4):G875–885; 2004.
160. Sturm, A.; Dignass, A. U. Epithelial restitution and wound healing in inflammatory bowel disease. World J. Gastroenterol. 14(3):348–353; 2008.
161. Su, L.; Shen, L.; Clayburgh, D. R.; Nalle, S. C.; Sullivan, E. A.; Meddings, J. B.; Abraham, C.; Turner, J. R. Targeted epithelial tight junction dysfunction causes immune activation and contributes to development of experimental colitis. Gastroenterology 136(2):551–563; 2009.
162. Tamarat, R.; Lataillade, J. J.; Bey, E.; Gourmelon, P.; Benderitter, M. Stem cell therapy: From bench to bedside. Radiat. Prot. Dosimetry 151(4):633–639; 2012.
163. Tang, Y.; Chen, Y.; Wang, X.; Song, G.; Li, Y.; Shi, L. Combinatorial intervention with mesenchymal stem cells and granulocyte colony-stimulating factor in a rat model of ulcerative colitis. Dig. Dis. Sci. 60(7):1948–1957; 2015.
164. Tarte, K.; Gaillard, J.; Lataillade, J. J.; Fouillard, L.; Becker, M.; Mossafa, H.; Tchirkov, A.; Rouard, H.; Henry, C.; Splingard, M.; Dulong, J.; Monnier, D.; Gourmelon, P.; Gorin, N. C.; Sensebe, L. Clinical-grade production of human mesenchymal stromal cells: Occurrence of aneuploidy without transformation. Blood 115(8):1549–1553; 2010.
165. Teo, M. T.; Schag-Montefiore, D.; Donnellan, C. F. Prevention and management of radiation-induced late gastrointestinal toxicity. Clin. Oncol. (R Coll Radiol) 27(11):656–667; 2015.
166. Tessner, T. G.; Cohn, S. M.; Schloemann, S.; Stenson, W. F. Prostaglandins prevent decreased epithelial cell proliferation associated with dextran sodium sulfate injury in mice. Gastroenterology 115(4):874–882; 1998.
167. Tian, H.; Biehs, B.; Warming, S.; Leong, K. G.; Rangell, L.; Klein, O. D.; de Sauvage, F. J. A reserve stem cell population in small intestine renders Lgr5-positive cells dispensable. Nature 478(7368):255–259; 2011.
168. Uribe, A.; Alam, M.; Midtvedt, T.; Smedfors, B.; Theodorsson, E. Endogenous prostaglandins and microflora modulate DNA synthesis and neuroendocrine peptides in the rat gastrointestinal tract. Scand. J. Gastroenterol. 32(7):691–699; 1997.
169. Usunier, B.; Benderitter, M.; Tamarat, R.; Chapel, A. Management of fibrosis: The mesenchymal stromal cells breakthrough. Stem Cells Int. 2014:340257; 2014.
170. Utech, M.; Ivanov, A. I.; Samarin, S. N.; Bruewer, M.; Turner, J. R.; Mrsny, R. J.; Parkos, C. A.; Nusrat, A. Mechanism of IFN-gamma-induced endocytosis of tight junction proteins: Myosin II-dependent vacuolarization of the apical plasma membrane. Mol. Biol. Cell 16(10):5040–5052; 2005.
171. Vagianos, C.; Karatzas, T.; Scopa, C. D.; Panagopoulos, C.; Tsoni, I.; Spiliopoulou, I.; Kalfarentzos, F. Neurotensin reduces microbial translocation and improves intestinal mucosa integrity after abdominal radiation. Eur. Surg. Res. 24(2):77–83; 1992.
172. van de Wetering, M.; Sancho, E.; Verweij, C.; de Lau, W.; Oving, I.; Hurlstone, A.; van der Horn, K.; Batlle, E.; Coudreuse, D.; Haramis, A. P.; Tjon-Pon-Fong, M.; Moerer, P.; van den Born, M.; Soete, G.; Pals, S.; Eilers, M.; Medema, R.; Clevers, H. The beta-catenin/TCF-4 complex imposes a crypt progenitor phenotype on colorectal cancer cells. Cell 111(2):241–250; 2002.
173. Voswinkel, J.; Francois, S.; Simon, J. M.; Benderitter, M.; Gorin, N. C.; Mohty, M.; Fouillard, L.; Chapel, A. Use of mesenchymal stem cells (MSC) in chronic inflammatory fistulizing and fibrotic diseases: A comprehensive review. Clin. Rev. Allergy Immunol. 45(2):180–192; 2013.
174. Wada, M.; Nagata, S.; Saito, M.; Shimizu, T.; Yamashiro, Y.; Matsuki, T.; Asahara, T.; Nomoto, K. Effects of the enteral administration of Bifidobacterium breve on patients undergoing chemotherapy for pediatric malignancies. Support Care Cancer 18(6):751–759; 2010.
175. Wagner, W.; Wein, F.; Seckinger, A.; Frankhauser, M.; Wirkner, U.; Krause, U.; Blake, J.; Schwager, C.; Eckstein, V.; Ansorge, W.; Ho, A. D. Comparative characteristics of mesenchymal stem cells from human bone marrow, adipose tissue, and umbilical cord blood. Exp. Hematol. 33(11):1402–1416; 2005.
176. Wang, A.; Ling, Z.; Yang, Z.; Kiela, P. R.; Wang, T.; Wang, C.; Cao, L.; Geng, F.; Shen, M.; Ran, X.; Su, Y.; Cheng, T.; Wang, J. Gut microbial dysbiosis may predict

diarrhea and fatigue in patients undergoing pelvic cancer radiotherapy: A pilot study. PLoS One 10(5):e0126312; 2015.
177. Wang, F.; Graham, W. V.; Wang, Y.; Witkowski, E. D.; Schwarz, B. T.; Turner, J. R. Interferon-gamma and tumor necrosis factor-alpha synergize to induce intestinal epithelial barrier dysfunction by up-regulating myosin light chain kinase expression. Am. J. Pathol. 166(2):409–419; 2005.
178. Wang, J.; Boerma, M.; Fu, Q.; Hauer-Jensen, M. Significance of endothelial dysfunction in the pathogenesis of early and delayed radiation enteropathy. World J. Gastroenterol. 13(22):3047–3055; 2007.
179. Wang, J.; Hauer-Jensen, M. Neuroimmune interactions: Potential target for mitigating or treating intestinal radiation injury. Br. J. Radiol. 80 Spec. No. 1(S41–48); 2007.
180. Wang, J.; Zheng, H.; Hollenberg, M. D.; Wijesuriya, S. J.; Ou, X.; Hauer-Jensen, M. Up-regulation and activation of proteinase-activated receptor 2 in early and delayed radiation injury in the rat intestine: Influence of biological activators of proteinase-activated receptor 2. Radiat. Res. 160(5):524–535; 2003.
181. Wang, J.; Zheng, H.; Ou, X.; Albertson, C. M.; Fink, L. M.; Herbert, J. M.; Hauer-Jensen, M. Hirudin ameliorates intestinal radiation toxicity in the rat: Support for thrombin inhibition as strategy to minimize side-effects after radiation therapy and as countermeasure against radiation exposure. J. Thromb. Haemost. 2(11):2027–2035; 2004.
182. Wang, J.; Zheng, H.; Sung, C. C.; Richter, K. K.; Hauer-Jensen, M. Cellular sources of transforming growth factor-beta isoforms in early and chronic radiation enteropathy. Am. J. Pathol. 153(5):1531–1540; 1998.
183. Waszak, P.; Alphonse, R.; Vadivel, A.; Ionescu, L.; Eaton, F.; Thebaud, B. Preconditioning enhances the paracrine effect of mesenchymal stem cells in preventing oxygen-induced neonatal lung injury in rats. Stem Cells Dev. 21(15):2789–2797; 2012.
184. Weigel, C.; Schmezer, P.; Plass, C.; Popanda, O. Epigenetics in radiation-induced fibrosis. Oncogene 34(17):2145–2155; 2015.
185. Wilke, V. L.; Nettleton, D.; Wymore, M. J.; Gallup, J. M.; Demirkale, C. Y.; Ackermann, M. R.; Tuggle, C. K.; Ramer-Tait, A. E.; Wannemuehler, M. J.; Jergens, A. E. Gene expression in intestinal mucosal biopsy specimens obtained from dogs with chronic enteropathy. Am. J. Vet. Res. 73(8):1219–1229; 2012.
186. Wolfrum, S.; Jensen, K. S.; Liao, J. K. Endothelium-dependent effects of statins. Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol. 23(5):729–736; 2003.
187. Wu, C. T.; Chen, W. C.; Lin, P. Y.; Liao, S. K.; Chen, M. F. Androgen deprivation modulates the inflammatory response induced by irradiation. BMC Cancer 9:92; 2009.
188. Wynn, T. A.; Ramalingam, T. R. Mechanisms of fibrosis: Therapeutic translation for fibrotic disease. Nat. Med. 18(7):1028–1040; 2012.
189. Xue, X.; Liu, Y.; Zhang, J.; Liu, T.; Yang, Z.; Wang, H. Bcl-xL genetic modification enhanced the therapeutic efficacy of mesenchymal stem cell transplantation in the treatment of heart infarction. Stem Cells Int. 2015:176409; 2015.
190. Yan, K. S.; Chia, L. A.; Li, X.; Ootani, A.; Su, J.; Lee, J. Y.; Su, N.; Luo, Y.; Heilshorn, S. C.; Amieva, M. R.; Sangiorgi, E.; Capecchi, M. R.; Kuo, C. J. The intestinal stem cell markers Bmi1 and Lgr5 identify two functionally distinct populations. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 109(2):466–471; 2012.
191. Yang, C.; Chen, H. X.; Zhou, Y.; Liu, M. X.; Wang, Y.; Wang, J. X.; Ren, S. P.; Han, Y.; Wu, B. Y. Manganese superoxide dismutase gene therapy protects against irradiation-induced intestinal injury. Curr. Gene Ther. 13(5):305–314; 2013.
192. Yang, Y. J.; Qian, H. Y.; Huang, J.; Geng, Y. J.; Gao, R. L.; Dou, K. F.; Yang, G. S.; Li, J. J.; Shen, R.; He, Z. X.; Lu, M. J.; Zhao, S. H. Atorvastatin treatment improves survival and effects of implanted mesenchymal stem cells in post-infarct swine hearts. Eur. Heart J. 29(12):1578–1590; 2008.
193. Yeoh, E. Radiotherapy: Long-term effects on gastrointestinal function. Curr. Opin. Support. Palliat. Care 2(1):40–44; 2008.
194. Yui, S.; Nakamura, T.; Sato, T.; Nemoto, Y.; Mizutani, T.; Zheng, X.; Ichinose, S.; Nagaishi, T.; Okamoto, R.; Tsuchiya, K.; Clevers, H.; Watanabe, M. Functional engraftment of colon epithelium expanded in vitro from a single adult Lgr5(+) stem cell. Nat. Med. 18(4):618–623; 2012.
195. Zhang, J.; Gong, J. F.; Zhang, W.; Zhu, W. M.; Li, J. S. Effects of transplanted bone marrow mesenchymal stem cells on the irradiated intestine of mice. J. Biomed. Sci. 15(5):585–594; 2008.
196. Zhang, Y. G.; Wu, S.; Xia, Y.; Sun, J. Salmonella infection upregulates the leaky protein claudin-2 in intestinal epithelial cells. PLoS One 8(3):e58606; 2013.
197. Zheng, H.; Wang, J.; Koteliansky, V. E.; Gotwals, P. J.; Hauer-Jensen, M. Recombinant soluble transforming growth factor beta type II receptor ameliorates radiation enteropathy in mice. Gastroenterology 119(5):1286–1296; 2000.
198. Zigdon-Giladi, H.; Bick, T.; Lewinson, D.; Machtei, E. E. Mesenchymal stem cells and endothelial progenitor cells stimulate bone regeneration and mineral density. J. Periodontol. 85(7):984–990; 2014.

Hindawi Publishing Corporation
Stem Cells International
Volume 2014, Article ID 340257, 26 pages
http://dx.doi.org/10.1155/2014/340257

Review Article

Management of Fibrosis: The Mesenchymal Stromal Cells Breakthrough

Benoît Usunier, Marc Benderitter, Radia Tamarat, and Alain Chapel

Radioprotection and Human Health Division, Institute of Radioprotection and Nuclear Safety, PRP-HOM/SRBE/LR2I, 92260 Fontenay-aux-Roses, France

Correspondence should be addressed to Alain Chapel; alain.chapel@irsn.fr

Received 28 March 2014; Revised 5 June 2014; Accepted 5 June 2014; Published 14 July 2014

Academic Editor: Katherine Athayde Teixeira de Carvalho

Copyright © 2014 Benoît Usunier et al. This is an open access article distributed under the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Fibrosis is the endpoint of many chronic inflammatory diseases and is defined by an abnormal accumulation of extracellular matrix components. Despite its slow progression, it leads to organ malfunction. Fibrosis can affect almost any tissue. Due to its high frequency, in particular in the heart, lungs, liver, and kidneys, many studies have been conducted to find satisfactory treatments. Despite these efforts, current fibrosis management therapies either are insufficiently effective or induce severe adverse effects. In the light of these facts, innovative experimental therapies are being investigated. Among these, cell therapy is regarded as one of the best candidates. In particular, mesenchymal stromal cells (MSCs) have great potential in the treatment of inflammatory diseases. The value of their immunomodulatory effects and their ability to act on profibrotic factors such as oxidative stress, hypoxia, and the transforming growth factor-β1 pathway has already been highlighted in preclinical and clinical studies. Furthermore, their propensity to act depending on the microenvironment surrounding them enhances their curative properties. In this paper, we review a large range of studies addressing the use of MSCs in the treatment of fibrotic diseases. The results reported here suggest that MSCs have antifibrotic potential for several organs.

1. Introduction

Healthy tissues can be damaged under various conditions by acute or chronic stimuli such as mechanical or chemical injuries, infections, or autoimmune reactions. In most cases, the repair process consists of dead and damaged cells replacement, thus restoring the organ's unimpaired functionality. The first stage of this mechanism, known as the regenerative phase, corresponds to the replacement of damaged cells by cells of the same type, thus ensuring organ functionality. During the second phase, known as fibroplasia or fibrosis, connective tissue replaces degraded normal parenchymal tissue. Unchecked fibrosis leads to substantial remodeling of the ECM (extracellular matrix) with pathological features which results in the formation of permanent scar tissue. Fibrosis may ultimately lead to organ malfunction and death. It mainly originates from chronic inflammation, tissue ischemia, and imbalance in the ECM accumulation/degradation ratio [1].

Most organs are susceptible to fibrotic diseases, generally as a consequence or feature of a preexisting pathology (Figure 1). Obesity, aging, and environmental aggressions are the main causes of fibrogenesis. Fibroproliferative diseases are believed to be responsible for around 45% of deaths in developed countries [2]. Although considerable efforts are being devoted to the search for antifibrotic treatments, there are currently few effective therapies for fibrotic diseases that do not result in severe secondary effects. Anti-inflammatory drugs have been considered as the most promising candidates in clinical trials. A wide range of antioxidants have also been tested. Nevertheless, most drug therapy protocols have failed in achieving sufficient antifibrotic effect.

Thus, cell therapy has recently been put forward as a possibility. In particular, mesenchymal stromal cell (MSC) therapy seems to be a promising treatment. Indeed, preclinical and clinical trials have shown MSCs' ability to improve outcomes in various diseases such as the consequences of radiotherapy [3], autoimmune pathologies [4], neurodegenerative disorders [5], and other etiological agents. Preclinical and clinical studies have also put forward the ability of MSCs to adapt to their environment. Indeed, the regulation of MSCs' secretome is highly influenced by the surrounding

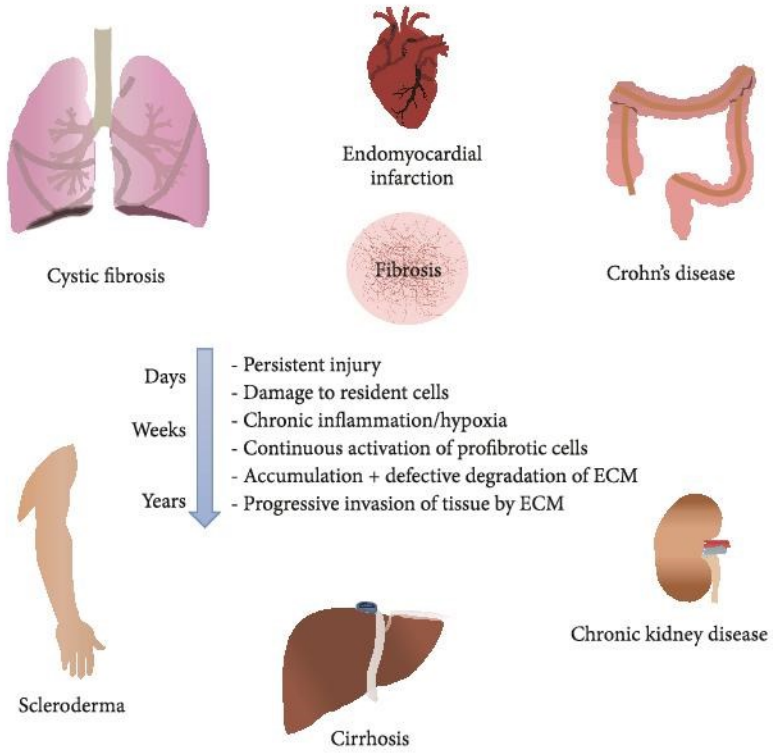


FIGURE 1: Fibrotic pathologies in various organs. Common features of fibrosis development and progression in various organs and related diseases (ECM: extracellular matrix).

tissue. Therefore, MSC therapy yields different results with different pathologies. Consequently, these effects have led several laboratories to investigate the antifibrotic potential of MSCs.

2. Common Cellular and Molecular Mechanisms of Fibrotic Diseases

2.1. Wound Healing: The Initiation of Fibrosis. Tissue injuries induce damages to resident cells which secrete inflammatory mediators which initiate an antifibrinolytic-coagulation cascade associated with vascular congestion. A temporary ECM is formed to serve as a scaffold for dead cells replacement. Subsequent platelet activation causes the release of various mediators including vasoactive factors (vasodilatation, increased vascular permeability, and edema by plasma exudation), cytokines, and chemokines that enable the recruitment of leukocytes. The formation of a fibrin clot serves as a matrix for cell migration and platelet adhesion. Fibrinolysis is later activated and leads to the dissolution of the fibrin clot replaced by a granulation tissue. Plasmin is released from the fibrin clot and activates the complement system, triggering the release of chemotactic and vasoactive anaphylatoxins [1, 6].

Next, recruited leukocytes home by adhesion to molecules such as selectins, integrins, and immunoglobulins. Phagocytosis of tissue debris, dead cells, and any exogenous organisms is carried out by macrophages and neutrophils. They also produce cytokines and chemokines to recruit endothelial cells necessary for neovascularization. The interaction of fibroblasts, fibrocytes, or other resident cells, such as hepatic stellate cells (HSCs), with the microenvironment induces their differentiation into myofibroblasts which synthesize ECM and growth factors including profibrotic TGF-β1 (transforming growth factor-β1). The secretion of autocrine hormones enables the maturation of myofibroblasts. α-SMA (α-smooth muscle actin) and vimentin expression by myofibroblasts are responsible for their contractile activity [7]. This contractibility is required for the closure of the wound. The formation of this so-called granulation tissue is characterized by the presence of many blood capillaries allowing the supply of nutrients, hormones, and respiratory gas [1, 2, 6].

Finally, the migration and maturation of epithelial and endothelial cells then allow the formation of scar tissue and neovascularization. The provisional ECM is degraded by matrix metalloproteinases (MMPs) once complete tissue replacement is achieved. The subtle equilibrium between MMPs and their inhibitors, tissue inhibitors of metalloproteinases (TIMPs), controls ECM accumulation and degradation throughout the repair process. Thus, it guarantees proper ECM remodeling by inducing a shift in matrix composition. Next, myofibroblasts disappear by apoptosis, triggered by the establishment of a negative activation loop indicating regeneration of the injured tissue [1, 2, 6].

2.2. Specific Fibrosis Mechanisms. Various fibroproliferative pathologies share common features. Fibrosis begins as a normal tissue regeneration process. Resident and recruited cells are activated to produce a provisional ECM facilitating

repair. However, in the case of bacterial infection, ischemia, chronic inflammation, or other persistent stimuli, a constant loop of myofibroblast activation sets in, leading to excessive ECM accumulation. Activated myofibroblasts also produce chemokines to recruit cells from the immune system (macrophages, T- and B-cells, neutrophils, and eosinophils), thus perpetuating chronic inflammation. The pathologic matrix progressively invades the tissue, eventually ending in the presence of a permanent fibrotic scar. Histologically, fibrosis can be defined by two distinct stages. Development corresponds to the onset of matrix accumulation where only scattered fibrosis areas are seen in the tissue, whereas the endpoint is characterized by diffused spans of ECM possibly distributed through the entire tissue. The progressive replacement of dead cells by ECM suppresses organ function and induces stiffness. Ultimately, the best course of treatment for advanced fibrosis is often organ transplantation.

Fibrosis is a complex pathology driven by numerous biological factors such as chronic inflammation and hypoxia. Ionizing radiation, for example, induces endothelial cell death and oxidative stress, resulting in prolonged inflammation and potentially fibrosis. The constant recruitment of inflammatory cells generates an activation loop of myofibroblasts and maintains a steady pool of profibrotic cells.

One of the main molecular agents inducing fibrosis is TGF-β1, mainly synthesized by T-cells during the healing process [8]. TGF-β1 is secreted in a latent form associated with LAP (latency associated peptide). LAP is cleaved to allow the activation of TGF-β1 which is able to bind its receptors TGF-βR1 (transforming growth factor receptor-β1) and TGF-βR2. Therefore, there is a large pool of inactive TGF-β1 in the extracellular environment. Various agents can induce TGF-β1 activation: MMPs [9], reactive oxygen and nitrogen species (ROS and RNS) [10], cytokines [11], or other stimuli such as ionizing radiation [12]. The binding of TGF-β1 to its receptors activates the Smad (small mothers against decapentaplegic homolog) signaling pathway which induces the transcription of various genes, including genes encoding members of the extracellular matrix (collagens mostly) [13]. It also activates the differentiation of fibrocytes toward functional fibroblasts.

EMT (epithelial-to-mesenchymal transition) and EndMT (endothelial-to-mesenchymal transition) are also described as important sources of fibroblasts. Epithelial or endothelial cells assume a spindle shape, lose their cell markers, and express typical fibroblast markers such as FSP-1 (fibroblast specific protein-1), α-SMA, and vimentin [14, 15]. They also acquire the ability to produce collagen and fibronectin (extracellular matrix components) [16]. TGF-β1 has also been shown to decrease the expression and activity of MMPs and increase the expression of TIMPs [17]. Thus, TGF-β1 is considered to be one of the major factors in fibrosis development.

Other growth factors take part in prolonged fibrogenesis. CTGF (connective tissue growth factor) acts synergistically with TGF-β1 to stimulate the signal transduction pathway dependent on TGF-β1 [18]. CTGF can also stimulate the proliferation, migration, and adhesion of fibroblasts and the production of the extracellular matrix [19, 20].

Thus, fibrosis is a multicomponent pathology driven by multiple factors (Figure 2). One of the main issues in treating fibrosis lies in its self-maintenance. Hence, various therapies might be considered depending on the stage of fibrogenesis. Indeed, preventive or curative strategies should differ based on the ECM components and the mechanisms involved. Moreover, combined therapies should be used to simultaneously act on various profibrotic mechanisms and enhance treatment efficacy.

3. Fibrosis Models

Over the years, many models of fibrosis in animals have been developed. Mechanical or chemical procedures are used to mimic damage observed in patients.

Heart. Cardiac fibrosis is characteristic of many heart diseases. Doxorubicin (DOX) or isoproterenol (ISO) is widely used to induce myocardial infarction (MI). It is hypothesized that DOX-induced cardiac damage increases the concentration of reactive oxygen species, thus causing injury to mitochondria, leading to apoptosis and fibrosis [21]. ISO injection directly into the heart produces diffuse myocardial cell death and fibrosis, leading to progressive heart failure [22]. Finally, ligation of the interventricular artery results in ischemia and eventually leads to fibrosis [23].

Kidney. Interstitial fibrosis and glomerulosclerosis are common features of kidney pathologies such as chronic kidney disease (CKD), chronic allograft nephropathy (CAN), or ureteral obstruction. In the reversible unilateral ureteral obstruction (UUO), fibrosis is induced by oxidative stress [24]. Atherosclerotic renal artery stenosis (ARAS) is found among 50% of atherosclerotic patients with other atherosclerotic diseases [25]. In preclinical studies, ARAS is modeled by placing an irritant coil in one of the main renal arteries to induce chronic inflammation [26]. Removal of one or both kidneys and kidney allograft can be performed to create a CAN model [27]. "Nephrectomy + ischemia-reperfusion + cyclosporine" (NIRC) is a recent model mimicking CKD. Oxidative stress caused by ischemia, exacerbated by the immunosuppressive effect of cyclosporine, induces interstitial fibrosis following ischemia-reperfusion [28]. Lastly, in the remnant kidney model (RKM), also called 5/6 nephrectomy (5/6 NX), interstitial fibrosis is induced by removing one kidney and two-thirds of the second. It is hypothesized that subsequent oxidative stress and inflammatory reaction generate fibrosis [29].

Liver. Fibrosis in the liver, or cirrhosis, is the common endpoint of chronic liver diseases. It originates from not only numerous pathologies such as alcoholic liver disease and viral or autoimmune hepatitis but also hepatotoxic drugs and toxins. Carbon tetrachloride (CCl_4) induces irreversible pathologies such as fatty liver, fibrosis, cirrhosis, and cancer and is mainly used in liver damage models [30].

Lungs. Pulmonary fibrosis is an increasingly frequent pathology due to the growing number of smokers and the pollution

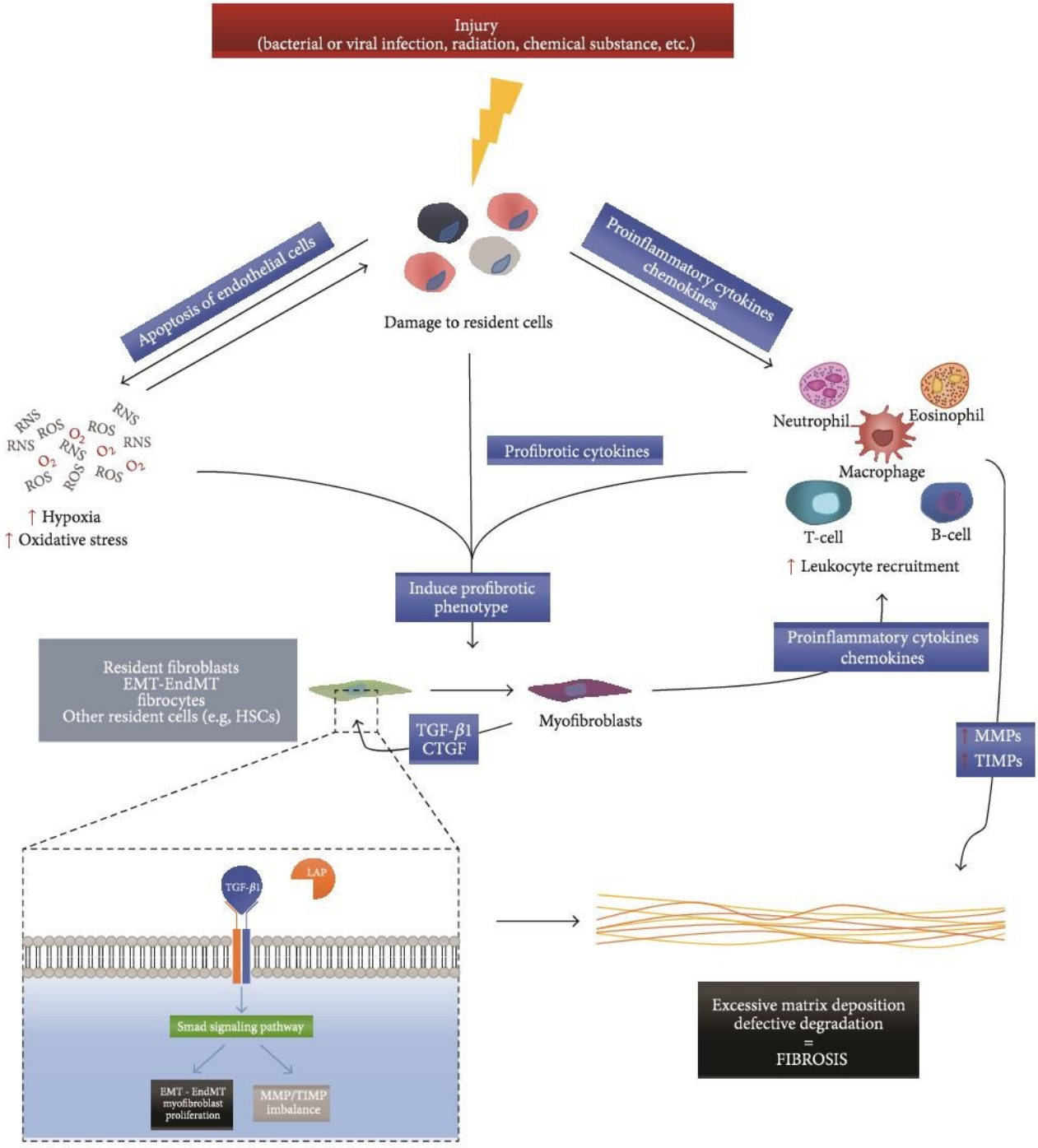


FIGURE 2: Fibrosis is a multicomponent pathology driven by multiple factors. Fibrotic diseases are driven by multiple factors such as inflammatory reaction, hypoxia, and oxidative stress leading to the activation of the TGF-β1 pathway (DC: dendritic cell, EMT: epithelial-to-mesenchymal transition, LAP: latency associated protein, MMP: matrix metalloproteinase, RNS: reactive nitrogen species, ROS: reactive oxygen species, Smad: small mothers against decapentaplegic homolog, TGF: transforming growth factor, and TIMP: tissue inhibitor of metalloproteinases).

resulting from current lifestyles. The onset of fibrosis in the bleomycin, mainly originating from DNA single and double strand breaks, is a major side effect of this drug which is now widely used in the development of animal models of pulmonary fibrosis [31]. Exposure to silica also induces fibrotic responses. The resulting persistent toxic effect causes chronic inflammation resulting in fibrogenesis [32].

Peritoneum. Peritoneal fibrosis can be initiated by toxins, infectious peritonitis, or incompatible dialysate products.

Chlorhexidine gluconate (CG) was one of the first compounds believed to cause encapsulating peritoneal sclerosis (EPS) during dialysis. Peritoneal exposure to CG leads to an inflammatory reaction causing fibrosis in animal models [33].

Skin. Skin fibrosis is part of a wide range of human disorders including keloids, hypertrophic scars, and scleroderma. Subcutaneous injections of bleomycin produce lesions mimicking scleroderma [34]. Radiation exposure can lead to fibrosis in a number of different organs. Cutaneous radiation-induced fibrosis is caused by a strong inflammatory reaction, apoptosis, and oxidative stress and is a commonly used animal model [35]. Another *in vivo* cutaneous fibrosis model has been developed in mice by producing full-thickness wounds which consequently lead to chronic inflammation [36, 37].

Pancreas. The incidence of chronic pancreatitis is approximately 30 per 100,000 and is increasing over time [38]. Since existing treatments are limited, continuous efforts are being devoted to preclinical studies in animal models. Intravenous administration of dibutyltin dichloride (DBTC) induces damage to the bile duct epithelium. Subsequent inflammation causes fibrosis in the pancreas [39].

Colon-Rectum. 5 to 10% of patients receiving pelvic radiotherapy develop chronic radiation proctopathy due to the high radiosensibility of organs in the radiation field (colon, rectum, and bladder) [3]. Radiation proctopathy is modeled in animals by delivering a high radiation dose to the rectum [40]. Radiation-induced damage to the tissue as well as oxidative stress induces fibrosis in this model.

Common features are characteristic of these animal models of fibrosis. Chemical compounds, physical agents, or surgery procedures are used to induce the initial injury. This protocol is often repeated periodically or maintained over a prolonged time. Subsequent damage to the tissue induce chronic inflammation, oxidative stress, and/or hypoxia necessary to activate resident and recruited cells toward a profibrotic phenotype. In most cases, fibrotic features appear weeks to months after the initial stimulus.

4. Antifibrotic Effects of Mesenchymal Stromal Cells Therapy

MSCs are widely described for their immunoregulatory properties. Nevertheless MSCs' antifibrotic functions are poorly described. Syntheses of *in vivo* study outcomes are described in Table 1 (heart), Table 2 (liver), Table 3 (kidneys), Table 4 (lungs), Table 5 (peritoneum), Table 6 (pancreas), Table 7 (skin), and Table 8 (rectum). The synthesis of *in vitro* study outcomes is shown in Table 9.

4.1. Immunological Aspects. Pathogenic fibrosis results from chronic inflammatory reactions. Recent advances in the immunobiology of MSCs have led to increased interest in their use as a new therapeutic modality to address chronic inflammation associated with fibrosis (Figure 3) [78, 79]. The immunosuppressive effect of MSCs has been extensively studied and documented, particularly because of its value in organ transplantation. MSCs operate on the T and B lymphocytes by blocking them in the G0/G1 phase of the cell cycle, inhibiting the production of immunoglobulins (IgA, IgG, and IgM) and the differentiation of B lymphocytes. MSCs induce a change in polarity in T lymphocytes from a proinflammatory Th1 state to an anti-inflammatory Th2 condition [80, 81]. They act in the differentiation and maturation of dendritic cells and make them tolerogenic [82]. Furthermore, MSCs inhibit the cytotoxic activity of natural killer cells on HLA-1 (human leukocyte antigen-1) negative cells and reduce the production of cytokines: TNF-α (tumor necrosis factor-α), IFN-γ (interferon-γ), and IL-10 (interleukin-10) [83]. Therefore, MSCs are of value for the treatment of diseases with an inflammatory component.

Numerous studies have highlighted the benefits of immunomodulation by MSCs in the treatment of fibrosis. MSC-induced decreased TLR (toll-like receptor) expression suggests their ability to limit chronic inflammation [40]. After the transplantation of MSCs, a decreased infiltration of monocytes/macrophages, neutrophils, and lymphocytes in the tissue was observed in various models [40, 69, 70, 73, 74]. This correlates with the decreased expression of MCP-1 (monocyte chemoattractant protein-1) in some cases [74]. Additionally, underexpression of VCAM-1 (vascular cell adhesion molecule-1) and ICAM-1 (intercellular adhesion molecule-1), involved in leukocyte-endothelial cell interactions, suggests reduced inflammatory cell infiltration [74]. In a model of radiation-induced skin fibrosis, MSCs induced macrophage transition toward a regulatory phenotype, thus limiting chronic inflammation causing fibrosis [76]. Decreased iNOS (nitric oxide synthase) expression after MSC transplantation suggests a reduction of M1 macrophage activity [40]. An increased proportion of anti-inflammatory M2 macrophages were reported after MSC transplantation in a heart fibrosis model [45] and a radiation-induced proctitis model [40]. Microvesicles purified from MSC-conditioned medium, while significantly decreasing the amount of inflammatory cells, produced lower effects compared to MSC transplantation in the lung [69].

MSCs inhibit the expression of IFN-γ, which exerts a proinflammatory effect by inducing overexpression of IL-6 and TNF-α [67]. The decrease in mRNA expression and protein concentration of TNF-α, a profibrotic cytokine, was detected in the tissue after MSC transplantation [40, 58, 60, 65–67, 70, 74, 76, 77]. IL-1α [76], IL-1β [70, 76], and IL-6 [40, 63, 65, 70, 74] are underexpressed in several fibrosis models following MSC injection. Increased expression of anti-inflammatory cytokines IL-4 and IL-10 after MSC transplantation was observed, suggesting the transition of T lymphocytes to a Th2 profile [65]. Similarly, MSCs induced increased IL-10 expression and concentration in a model of cutaneous and rectal radiation-induced fibrosis [40, 76].

Antiapoptotic effects of MSC therapy can also be discussed, as fewer apoptotic events correlate with reduced inflammation. In fibrotic tissues following MSC transplantation, a decrease in apoptotic events was observed [41, 42, 52, 65]. Accordingly, MSCs may protect resident cells, increasing functionality and recovery.

Table 1: MSC treatment on preclinical heart fibrosis models.

References	Organism	Model	Treatment	MSC source	Timing	Quantity	Route	Outcome
[41]	Pig	Ligation	Ligation of the left coronary artery for 90 minutes before reperfusion	BM	30 minutes after reperfusion	3.10^7 cells + atorvastatin	Infarction and peri-infarction zone	(i) Reduced fibrotic area (ii) Reduced inflammation score (iii) Decreased apoptosis (iv) Increased cNOS activity (v) Atorvastatin increases MSC survival
[42]	Rat	DOX	2.5 mg/kg 6 times in 2 weeks	BM	1 week after the first DOX injection	-5.10^6 cells or -1 mL of MSC-conditioned medium	Tail vein	(i) Reduced fibrotic area (similar effect with MSC-conditioned medium) (ii) Increased Bcl-2/Bax ratio (similar effect with MSC-conditioned medium) (iii) High concentration of HGF and IGF-1 in MSC-conditioned medium
[43]	Rat	ISO	170 mg/kg every day for 4 days	BM	4 weeks after the final ISO injection	3.10^6 cells	Intramyocardial	(i) Reduced fibrotic area. (ii) Decreased expression of type I collagen (iii) Decreased expression of pro-MMP-2, active MMP-2, and MMP-9 (iv) Decreased concentration of MMP-2 and MMP-9 (v) Increased concentration of HGF (vi) Increased expression of HGF (sham level)
[44]	Rat	Ligation	Ligation of the interventricular artery	BM (wild type or melatonin treated)	2 weeks after ligation	3 injections of 2.10^6 cells or 3 injections of 50 μL of MSC-conditioned medium	Intramyocardial	(i) Reduced fibrotic area (improved effect with melatonin) (ii) Stimulation of angiogenesis (iii) Increased concentration of HGF (improved effect with melatonin)
[45]	Rat	Ligation	Ligation of the left coronary artery	FM or BM	4 weeks after ligation	Two-layered MSC sheets	Anterior heart wall	(i) Reduced fibrotic area (ii) Increased proportion of M2 macrophages (iii) Increased concentration of VEGF (iv) Increased capillary density in peri-infarct area (v) Some MSCs engrafted 28 days after transplantation (vi) Some engrafted MSCs express α-SMA and/or lectin-I (vii) No significant difference between FM and BM-MSCs

Influence of fibrosis induction methods, MSC source, timing of injection, quantity of MSCs transplanted, and transplantation route. Outcomes are expressed compared to control groups (i.e., groups treated but not transplanted with MSCs) unless stated otherwise (α-SMA: α-smooth muscle actin; BAX: Bcl-2-associated X protein; Bcl-2: B-cell lymphoma 2; BM: bone marrow; DOX: doxorubicin; FM: fetal membrane; HGF: hepatocyte growth factor; IGF: insulin-like growth factor; ISO: isoproterenol; MMP: matrix metalloproteinase; MSC: mesenchymal stromal cell; NOS: nitric oxide synthase; VEGF: vascular endothelial growth factor).

Table 2: MSC treatment on preclinical liver fibrosis models.

References	Organism	Model	Treatment	MSC source	Timing	Quantity	Route	Outcome
[46]	Mouse	CCl_4	1 mL/kg twice a week for 8 weeks + 100 μg/kg IL-6 24 and 48 hours after completion of CCl_4 treatment	BM	52 hours after CCl_4 treatment completion	5 injections of 10^6 cells	Local (liver lobes)	(i) Reduced fibrotic area (ii) Decreased apoptosis (improved by IL-6 treatment) (iii) Decreased expression of markers of apoptosis (Bax, capsase-3, and NF-κB)
[47]	Mouse	CCl_4	0.6 mL/kg twice a week in 1 week	UC	6 weeks after CCl^4 treatment	250 μg of MSC-secreted exosomes		(i) Reduced fibrotic area (ii) Decreased expression of collagens I and III (iii) Decreased expression of TGF-β1 (iv) Decreased concentration of TGF-β1 in serum (v) Decreased phosphorylation of Smad2 (vi) Decreased EMT as evidenced by the decrease in N-cadherin and vimentin positive cells
[48]	Mouse	CCl_4	1 mL/kg twice a week for 8 weeks	BM	4 weeks after the beginning of the CCl_4 treatment	10^6 cells	Tail vein	(i) Reduced fibrotic area (ii) Decreased expression of α-SMA (iii) Decreased expression of collagen type I (iv) Increased expression of MMP-13
[49]	Mouse	CCl_4	1 mL/kg twice a week for 2 or 5 weeks	BM	Immediately following or 1 week after CCl_4 treatment	10^6 cells	Tail vein	(i) Reduced fibrotic area (ii) Decreased expression of TGF-β1 and α-SMA
[50]	Mouse	CCl_4	4 weeks CCl4 treatment followed by 4-week SNP treatment	BM	Following CCl_4 treatment	10^6 cells	Local	(i) Reduced fibrotic area (ii) Decreased expression of NF-kB (iii) Decreased expression of α-SMA (iv) Decreased expression of collagen 1α1 and TIMP-1 (v) Effect improved by SNP treatment
[51]	Mouse	CCl_4	20 mL/kg twice over a 48-hour period	BM		10^6 cells	Tail vein	(i) Reduced fibrotic area (ii) Decreased expression of α-SMA and collagen 1α1 (iii) Injection of FGF2 partially reproduces the effects of MSCs
[52]	Mouse	CCl_4	1 mL/kg twice a week for 8 weeks	AM	After 4 weeks of CCl_4 treatment	10^5 cells	Spleen	(i) Reduced fibrotic area (ii) Increased hepatocyte proliferation (iii) Increased expression of Bcl-2 (iv) Decreased hepatocyte apoptosis (v) Reduced number of α-SMA-positive cells (vi) Increased SOD activity (vii) Increased expression of HGF and Bcl-2

Table 2: Continued.

References	Organism	Model	Treatment	MSC source	Timing	Quantity	Route	Outcome
[53]	Rat	CCl_4	5 mL/kg (first injection) followed by 3 mL/kg twice a week for 12 weeks	AT	2 days after CCl_4 treatment	2.10^6 cells	Tail vein or hepatic portal vein	(i) Reduced fibrotic area (ii) Improvement of the microvasculature (iii) Decreased expression of VEGF
[54]	Rat	CCl_4	0.5 mg/kg twice a week for 4 weeks	BM (wild type or HGF-treated)	Following the first CCl_4 injection	3.10^6 cells	Tail vein	(i) Reduced fibrotic area (improved effect after MSC pretreatment with HGF) (ii) Decreased inflammation
[55]	Rat	CCl_4	0.08 mL/kg twice a week for 6 weeks	BM	Following CCl_4 treatment	3.10^6 cells	IV	Decreased collagen concentration
[56]	Rat	CCl_4	0.5 mg/kg twice a week for 4 weeks	BM	Following CCl_4 treatment	10^6 cells	Hepatic portal vein	Reduced fibrotic area
[57]	Rat	CCl_4	1 mL/kg twice a week for 8 weeks	BM (wild type or adipogenic or hepatogenic differentiation)	4 weeks after the beginning of the CCl_4 treatment	3.10^7 cells	Spleen injection	(i) Reduced fibrotic area (best outcome with undifferentiated MSCs) (ii) Highest expression of MMP-2 and MMP-9 after undifferentiated MSC transplantation
[58]	Rat	CCl_4	1 mL/kg twice a week for 8 weeks	BM (wild type or hepatogenic differentiation)	4 weeks after the beginning of the CCl_4 treatment	5.10^6 cells	Tail vein	(i) Decreased fibrotic area (best effect with predifferentiated MSC + baicalin) (ii) Decreased concentration of TNF-α (best effect with predifferentiated MSC + baicalin) (iii) Decreased concentration of TGF-β1 (best effect with predifferentiated MSC + baicalin) (iv) Decreased collagen concentration (best effect with predifferentiated MSC + baicalin)
[59]	Rat	CCl_4	0.5 mL/kg (first administration) followed by 1 mL/kg twice a week for 8 weeks (gavage)	UC	4 weeks after the beginning of the CCl_4 treatment	5.10^5 cells	Local	(i) Reduced collagen deposition (ii) Decreased concentration of TGF-β1 (iii) Decreased concentration of α-SMA (iv) Increased expression of HGF

Influence of fibrosis induction methods, MSC source, timing of injection, quantity of MSCs transplanted, and transplantation route. Outcomes are expressed compared to control groups (i.e., groups treated but not transplanted with MSCs) unless stated otherwise (α-SMA: α-smooth muscle actin; AM: amniotic membrane; AT: adipose tissue; BAX: Bcl-2-associated X protein; Bcl-2: B-cell lymphoma 2; BM: bone marrow; CCl_4: carbon tetrachloride; EMT: epithelial-to-mesenchymal transition; FGF: fibroblast growth factor; HGF: hepatocyte growth factor; IV: intravenous; MMP: matrix metalloproteinase; MSC: mesenchymal stromal cell; NF-κB: nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B-cells; SNP: sodium nitroprusside; SOD: superoxide dismutase; TGF-β: transforming growth factor-β; TIMP: tissue inhibitor of metalloproteinase; TNF-α: tumor necrosis factor-α; UC: umbilical cord; VEGF: vascular endothelial growth factor).

Table 3: MSC treatment on preclinical kidney fibrosis models.

References	Organism	Model	Treatment	MSC source	Timing	Quantity	Route	Outcome
[60]	Mouse	R-UUO	10 days UUO	BM	10 days after UUO	10^6 cells	Renal artery	(i) Decreased expression of TNF-α, TGF-β1, and α-SMA (ii) Increased expression of E-cadherin
[61]	Pig	ARAS	Irritant coil placed in the main renal artery	AT	6 weeks after ARAS	10^6 cells	Local	(i) Reduced fibrotic area (ii) Reduced number of CD163 + macrophages (iii) Increased number of regulatory macrophages (iv) Increased expression of IL-10 (v) Decreased expression of TNF-α (vi) Reduced concentration of MMP-2 (vii) Increased expression of VEGF, FLK-1, and HIF1-α (viii) Reduced MCP-1 positive area
[62]	Rat	Albumin-overload + uninephrectomy	Nephrectomy followed by 5 intraperitoneal injections of BSA (10 mg/g) per weeks during 4 weeks	BM	7 days after the first BSA injection	10^6 cells weekly for 4 weeks	IV	(i) Reduced expression and concentration of MCP-1 and CCL-5 (ii) Reduced expression and concentration of α-SMA (iii) Reduced expression and concentration of collagen IV
[63]	Rat	Allograft	Bi-nephrectomization and single kidney allograft	BM (melatonin treated)	11 weeks after graft	5.10^5 cells	Tail vein	(i) Decreased expression of IL-6, IL-7r, IL-23a, and IL-10 (ii) Decreased concentration of CTGF and α-SMA (iii) Decreased expression of fibronectin (iv) Decreased expression of bFGF
[64]	Rat	NIRC	Excision of the right kidney, 45-minutes ischemia in the left kidney followed by 28-day cyclosporine A treatment	BM	7 or 14 days after ischemia-reperfusion	3.10^6 cells	Local	MSC transplantation 7 days after ischemia reperfusion: (i) Decreased fibrotic area (ii) Decreased expression of collagen types I, III, and IV (iii) Reduced number of α-SMA-positive cells (iv) Decreased activity of MMP-2 (sham level) MSC transplantation 14 days after ischemia reperfusion showed no significant improvement
[65]	Rat	RKM	5/6 nephrectomy	BM	2 weeks after surgical procedure	-2.10^5 cells or -2.10^5 cells every other week (weeks 2, 4, and 6)	IV	(i) Reduced fibrotic area (ii) Increased expression of IL-4 and IL-10 (iii) Decreased expression of IL-6 and TNF-α (iv) Decreased expression of TGF-β1, Smad3, α-SMA, FSP-1, and vimentin (v) Decreased expression of collagen type I, collagen type III, fibronectin, and TIMP-1/MMP-9 ratio (vi) Increased expression of HO-1 (vii) Decreased expression of MCP-1 (viii) Increased expression of HGF

Table 3: Continued.

References	Organism	Model	Treatment	MSC source	Timing	Quantity	Route	Outcome
[66]	Rat	UUO	1 to 4 weeks obstruction	BM	Prior to UUO	10^6 cells	Renal artery	(i) Decreased collagen concentration (ii) Decreased expression of TNF-α (iii) Decreased concentration of TNF-α (iv) Decreased expression of α-SMA (v) Decreased number of FSP-1 positive cells (vi) Increased expression of E-cadherin

Influence of fibrosis induction methods, MSC source, timing of injection, quantity of MSCs transplanted, and transplantation route. Outcomes are expressed compared to control groups (i.e., groups treated but not transplanted with MSCs) unless stated otherwise (α-SMA: α-smooth muscle actin; ARAS: atherosclerotic renal artery stenosis; AT: adipose tissue; BSA: bovine serum albumin; CCL: chemokine ligand; CTGF: connective tissue growth factor; FGF: fibroblast growth factor; FLK: fetal liver kinase; FSP: fibroblast specific protein; HGF: hepatocyte growth factor; HIF: hypoxia-inducible factor; HO-1: heme oxygenase 1; IL: interleukin; IV: intravenous; MCP: monocyte chemoattractant protein; MMP: matrix metalloproteinase; MSC: mesenchymal stromal cell; NIRC: nephrectomy + ischemia-reperfusion + cyclosporine; R-UUO: reversible unilateral ureteral obstruction; TGF-β: transforming growth factor-β; TIMP: tissue inhibitor of metalloproteinase; TNF-α: tumor necrosis factor-α; UUO: unilateral ureteral obstruction; VEGF: vascular endothelial growth factor).

Table 4: MSC treatment on preclinical pulmonary fibrosis models.

References	Organism	Model	Treatment	MSC source	Timing	Quantity	Route	Outcome
[67]	Mouse	Bleomycin	0.15 mg bleomycin administered intranasally	UC	24 h after bleomycin inhalation	10^6 cells	Tail vein	(i) Decreased expression of IL-10, IFN-γ, and TNF-α (ii) Decreased concentration of TGF-β1 (iii) Decreased concentration of pSmad2 (iv) Decreased expression of collagen 1α1 (v) Increased concentration of active MMP-2 (vi) Decreased expression of TIMP-1, TIMP-2, TIMP-3, and TIMP-4
[68]	Mouse	Bleomycin	4 U/kg bleomycin instilled in the tracheal lumen	BM	Immediately following or 1 week after bleomycin inhalation	5.10^5 cells	Jugular vein	(i) Reduced collagen concentration (best effect when MSCs are transplanted immediately after bleomycin treatment) (ii) Decreased expression of MMP-2, MMP-9, and MMP-13
[69]	Mouse	Silica	200 μg/kg twice (day 1 and 4 weeks later) by intratracheal injection	Human BM	12 and 14 weeks after first silica injection	2.10^5 cells or 10 μg of MSC microvesicles	Tail vein	Bronchoalveolar lavage: (i) Reduced number of neutrophils (ii) Reduced number of lymphocytes (iii) Reduced number of macrophages (not significant after microvesicle injection) Lung samples: (i) Reduced fibrotic area (not significant after microvesicle injection) (ii) Reduced concentration of collagen I (iii) Reduced concentration of α-SMA (not significant after microvesicle injection)
[70]	Rat	Bleomycin	3 mg/kg bleomycin instilled intranasally	BM	4 days after bleomycin inhalation	10^6 cells	Tail vein	Bronchoalveolar lavage: (i) Reduced number of neutrophils (ii) Reduced number of lymphocytes (iii) Reduced number of macrophages (iv) Decreased expression of IL-6 and TNF-α Lung samples: (i) Reduced fibrotic area (ii) Decreased expression of IL-1β (iii) Decreased expression of TGF-β (iv) Decreased expression of VEGF (v) Decreased concentration of RNS
[71]	Rat	Bleomycin	5 mg/kg intratracheal perfusion	BM	12 h after bleomycin inhalation	5.10^6 cells	Tail vein	(i) Reduced fibrotic area (ii) Decreased expression of TGF-β1 (iii) Decreased expression of PDGF-A (/1.4) and PDGF-B (iv) Decreased expression of IGF-1 (v) MSCs differentiated in alveolar epithelial cells

Table 4: Continued.

References	Organism	Model	Treatment	MSC source	Timing	Quantity	Route	Outcome
[72]	Rat	Bleomycin	1.28 U instilled intratracheally	BM transfected with HGF expression plasmid	7 days after bleomycin instillation	3.10^6 cells	Intratracheal instillation	(i) Reduced Ashcroft score (fibrosis scoring) (ii) Reduced collagen concentration (iii) Transfected cells yield better results

Influence of fibrosis induction methods, MSC source, timing of injection, quantity of MSCs transplanted, and transplantation route. Outcomes are expressed compared to control groups (i.e. groups treated but not transplanted with MSCs) unless stated otherwise (α-SMA: α-smooth muscle actin; BM: bone marrow; HGF: hepatocyte growth factor; IGF: insulin-like growth factor; IL: interleukin; MMP: matrix metalloproteinase; MSC: mesenchymal stromal cell; PDGF: platelet-derived growth factor; RNS: reactive nitrogen species; pSmad: phosphorylated small mothers against decapentaplegic homolog; TGF-β: transforming growth factor-β; TIMP: tissue inhibitor of metalloproteinase; TNF-α: tumor necrosis factor-α; UC: umbilical cord; VEGF: vascular endothelial growth factor).

Table 5: MSC treatment on preclinical peritoneum fibrosis model.

References	Organism	Model	Treatment	MSC source	Timing	Quantity	Route	Outcome
[73]	Rat	CG	0.1% CG in 2 mL saline injected intraperitoneally	BM	30 minutes after CG injection	10^7 cells	Intraperitoneal	(i) Decreased infiltration of monocytes/macrophages (ii) Reduced number of pSmad2 positive cells (iii) Decreased number of α-SMA and FSP-1 positive cells (iv) Decreased concentration of collagen I and collagen III

Outcomes are expressed compared to control groups (i.e. groups treated but not transplanted with MSCs) unless stated otherwise (α-SMA: α-Smooth Muscle Actin; BM: Bone Marrow; CG: Chlorhexidine Gluconate; FSP: Fibroblast Specific Protein; pSmad: phosphorylated Small Mothers Against Decapentaplegic Homolog).

Table 6: MSC treatment on a preclinical pancreas fibrosis model.

References	Organism	Model	Treatment	MSC source	Timing	Quantity	Route	Results
[74]	Rat	DBTC	8 mg/kg DBTC injected in the tail vein	UC	5 days after DBTC injection	2.10^6 cells	Jugular vein	(i) Reduced inflammatory cell infiltration score (ii) Reduced monocyte/macrophage infiltration (iii) Reduced expression of MCP-1, VCAM-1, ICAM-1, IL-6, and TNF-α (iv) Reduced fibrosis score (v) Reduced expression of TGF-β1 (vi) Reduced concentration of collagen (vii) Reduced number of α-SMA-positive cells

Outcomes are expressed compared to control groups (i.e., groups treated but not transplanted with MSCs) unless stated otherwise (α-SMA: α-smooth muscle actin; DBTC: dibutyltin dichloride; ICAM: intercellular adhesion molecule; IL: interleukin; MCP: monocyte chemoattractant protein; TGF-β: transforming growth factor-β; TNF-α: tumor necrosis factor-α; VCAM: vascular cell adhesion molecule).

MSCs may induce regression in pathophysiological processes associated with fibrosis. These effects are in part mediated by a reduction in chronic inflammation. MSCs likely proceed by a change in immune cell function, an increase in anti-inflammatory cytokines, and a decrease in proinflammatory cytokines and cell apoptosis. These immune mechanisms contribute to a modification of the microenvironment, thus diminishing tissue fibrosis, increasing resident stem cell proliferation, and eventually leading to tissue regeneration.

4.2. The TGF-β1 Pathway. TGF-β1 has been described as one of the major players in fibrosis. Its binding to receptors induces the activation of a signaling cascade leading to the proliferation of phenotypically profibrotic cells such as myofibroblasts. In particular, it induces the EMT and EndMT in part responsible for the proliferation of cells synthesizing ECM. The TGF-β1 signaling pathway is one of the prime targets for antifibrotic therapies and its regulation has been abundantly studied in treatment trials with MSCs. Generally, MSC transplantation reduces the expression and concentration of TGF-β1 [40, 49, 59, 60, 65, 67, 70, 71, 73–76]. The same effect is induced by transplanting exosomes isolated from MSC-conditioned medium [47]. *In vitro*, Ueno et al. showed the inhibition of TGF-β1 overexpression induced by glucose in a coculture model of MSCs and peritoneal mesothelial cells [73]. This effect was associated with the decrease in the phosphorylation of Smad-2, as also shown in an exosome transplantation model [47, 73]. Reduced expression of α-SMA [44, 48, 50, 51, 60, 65, 66, 73] and the lower number of α-SMA positive cells [52, 53, 59, 64, 74, 75] suggest a decrease in the proliferation of myofibroblasts and, to a lesser extent, of TGF-β1-mediated EMT. *In vitro*, a reduced concentration of α-SMA in a coculture of MSCs and HK2 (human kidney 2) cells pretreated with TGF-β1 suggests a direct effect by MSCs on phenotypic changes leading to the accumulation of profibrotic cells [64]. A decreased expression and concentration of CTGF in several models also participate in diminishing profibrotic cells proliferation [40, 63].

Interestingly, several studies have underlined the importance of HGF (hepatocyte growth factor) secreted by MSCs for their antifibrotic effects [44, 47, 73]. MSCs transfected with an HGF expression plasmid yielded better results than nontransfected MSCs in a pulmonary fibrosis model [72]. The use of recombinant HGF partially reproduced the effects of MSCs in a coculture model with albumin-treated proximal tubular epithelial cells (PTECs) [62]. The inhibition of TGF-β1 expression by HGF and its ability to ameliorate the degradation of collagen through the increase in MMP-1 concentration highlights the value of such therapy [84]. Moreover, the increased expression of p-Met, which induces the phosphorylation of c-Met, the HGF membrane receptor, is also part of the action mechanisms of MSCs [59].

Recently, Qi et al. highlighted the importance of TSG-6 (TNF-stimulated gene 6) in the antifibrotic effect of MSCs. In addition to suppressing the secretion of TNF-α by activated

Table 7: MSC treatment on preclinical cutaneous fibrosis models.

References	Organism	Model	Treatment	MSC source	Timing	Quantity	Route	Outcome
[75]	Mouse	Bleomycin	Daily subcutaneous injection of 0.5, 1, 3, or 5 mg/mL bleomycin during 4 weeks	BM	3 hr after bleomycin injection	10^6 cells	Local	(i) Reduced number of macrophages and neutrophils (ii) Decreased expression of TGF-β1 (iii) Reduced number of α-SMA-positive cells (iv) Decreased expression of collagen type I (v) Increased expression of MMP-2, MMP-9, and MMP-13
[76]	Mouse	Radiation-induced	35 grays irradiation	BM (autologous or allogenic)	6 weeks after irradiation	5.10^5 cells	Tail vein	(i) No difference between autologous and allogeneic cells (ii) Reduced fibrotic area (iii) Reduced number of CD68 positive cells and CD80 positive cells (iv) Increased number of CD163 positive cells (v) Modification of macrophages toward a regulatory phenotype (vi) Increased expression of IL-10 (vii) Increased concentration of IL-10 (viii) Decreased expression of IL-1β and Serpine1 (ix) Decreased concentration of IL-1α, IL-1β, and TNF-α (x) Increased expression of PDGF-a
[77]	Mouse	Surgery	Four 6 mm full-thickness wounds on the back	BM	24 hr after surgery	10^6 cells	Local (around the wound)	(i) Decreased concentration of TNF-α (sham level with TSG-6 silenced MSCs) (ii) Decreased secretion of TNF-α by macrophages (no change in the number of macrophages) (iii) TGF-β1 concentration: increased on day 2; decreased on day 5; sham level with TSG-6 silenced MSCs (iv) Increased concentration of TGF-β3 (sham level with TSG-6 silenced MSCs) (v) Decreased α-SMA expression (vi) Decreased concentration of collagens 1α1, 1α2, and 3α1

Influence of fibrosis induction methods, MSC source, timing of injection, quantity of MSCs transplanted, and transplantation route. Outcomes are expressed compared to control groups (i.e., groups treated but not transplanted with MSCs) unless stated otherwise (α-SMA: α-smooth muscle actin; BM: bone marrow; IL: interleukin; MMP: matrix metalloproteinase; MSC: mesenchymal stromal cell; PDGF: platelet-derived growth factor; TGF-β: transforming growth factor-β; TNF-α: tumor necrosis factor-α; TSG-6: TNF-stimulated gene 6).

Table 8: MSC treatment on a preclinical colorectal fibrosis model.

References	Organism	Model	Treatment	MSC source	Timing	Quantity	Route	Results
[40]	Pig	Radiation-induced	High X-ray dose (21 to 29 Grays)	BM	27, 34, and 41 days after irradiation	2.10^6 cells	Ear vein	(i) Reduced fibrotic area (ii) Reduced leukocyte infiltration (iii) Reduced macrophages infiltration (iv) Increased M2 macrophages proportion (v) Reduced expression of iNOS (vi) Reduced expression of TNF-α, IL-6, and IL-8 (vii) Reduced expression of TLR-4 and TLR-5 (viii) Increased expression of IL-10 (ix) Reduced expression of col1a2 and col3a1 (x) Reduced expression of TGF-β1 and CTGF (xi) Decreased collagen-to-MMP-to-TIMP ratio (xii) Increased expression of VEGF in the rectal mucosa (xiii) Reduced expression of angiopoietin and PDGF in the rectal mucosa (xiv) Increased expression of eNOS, VEGF, VEGFR1, and PDGF in the colon

Outcomes are expressed compared to control groups (i.e., groups treated but not transplanted with MSCs) unless stated otherwise (BM: bone marrow; Col: collagen; CTGF: connective tissue growth factor; IL: interleukin; MMP: matrix metalloproteinase; NOS: nitric oxide synthase; PDGF: platelet-derived growth factor; TGF-β: transforming growth factor-β; TGF-βR: transforming growth factor-β receptor; TIMP: tissue inhibitor of metalloproteinase; TLR: toll-like receptor; TNF-α: tumor necrosis factor-α; VEGF: vascular endothelial growth factor; VEGFR: vascular endothelial growth factor receptor).

Table 9: Summary of various *in vitro* studies using MSC-conditioned medium or MSCs cocultured with cells of interest.

References	Culture conditions	Cell type	MSC source	Outcome
[44]	MSC-conditioned medium	Cardiac fibroblasts	BM	(i) Reduced collagens I and III deposit (ii) Decreased viability (iii) Decreased expression of α-SMA (iv) Increased of MMP-2 and MMP-9 activity (v) Increased expression of MT1-MMP (vi) Decreased expression of TIMP-2 MMP-2 −/− MSC-conditioned medium: (i) No change in collagen concentration Incubation with anti-HGF antibody: (i) Reduced MMP-2 and MMP-9 activity (ii) Decreased expression of MMP-2 (iii) Increased expression of TIMP-2
[64]	MSC-conditioned medium	TGF-β1-treated HK2	BM	(i) Decreased concentration of α-SMA (ii) Increased concentration of E-cadherin
[51]	Coculture: MSCs	Fibrotic hepatocytes	BM	Increased secretion of FGF2
[73]	Coculture: MSCs in Transwell	HPMCs	BM	(i) Decreased expression of TGF-β1 (ii) Decreased expression of fibronectin (iii) Decreased concentration of pSmad2 (iv) Decreased expression of α-SMA
[77]	Coculture LPS + IFN-γ-treated MSCs	Activated macrophages	BM	(i) Reduced concentration of TNF-α and IL-12 (ii) Reduced concentration of NO
[62]	MSCs in Transwell Pretreatment of one or both cell types with HSA	PTECs	BM	(i) Reduced expression of TNF-α, IL-6, IL-8, MCP-1, and CCL-5 (ii) Inhibition of NF-κB nuclear translocation (iii) Reduced EMT (iv) Increased expression and concentration of HGF and TSG-6 by MSCs exposed to HSA (v) Recombinant HGF or TSG-6 partially reproduces MSCs'effects

Influence of culture conditions on the outcome. Outcomes are expressed compared to control groups (i.e., groups treated without the use of MSC treatment) unless stated otherwise (α-SMA: α-smooth muscle actin; BM: bone marrow; CCL: chemokine ligand; EMT: epithelial-to-mesenchymal transition; FGF: fibroblast growth factor; HGF: hepatocyte growth factor; HK2: human kidney 2; HPMC: human peritoneal mesothelial cells; HAS: human serum albumin; HGF: hepatocyte growth factor; IFN-γ: interferon-γ; IL: interleukin; LPS: lipopolysaccharide; MCP: monocyte chemoattractant protein; MMP: matrix metalloproteinase; MSC: mesenchymal stromal cell; NF-κB: nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B-cells; NO: nitric oxide; proximal tubular epithelial cell; pSmad: phosphorylated small mothers against decapentaplegic homolog; TGF-β: transforming growth factor-β; TIMP: tissue inhibitor of metalloproteinase; TNF-α: tumor necrosis factor-α; TSG-6: TNF-stimulated gene 6).

macrophages, this protein induces a change in the TGF-β1/TGF-β3 balance, from a profibrotic high ratio to an antifibrotic low ratio [77]. These results are confirmed in a coculture model in which recombinant TSG-6 partially reproduced the effects of MSCs [62].

4.3. Hypoxia/Oxidative Stress. Accumulation of ECM in the tissue, death of endothelial cells, and increased levels of reactive oxygen and nitrogen species (ROS and RNS, resp.) result in hypoxia and oxidative stress during fibrosis. These factors lead to increased apoptosis and activation of TGF-β1. The improved vascularization of tissue and a more effective neutralization of oxidizing radicals would therefore enhance the effectiveness of antifibrotic therapies.

MSCs' ability to relieve oxidative stress has already been shown in several works. First, they seem to increase the expression and concentration of enzymes responsible for scavenging free radicals, such as NQO1 (NADPH quinone oxidoreductase 1), Gr (glutathione reductase), GPx (glutathione peroxidase), and HO-1 (heme oxygenase 1) [85, 86]. Nrf2 (nuclear factor (erythroid-derived 2)-like 2) activation is protective against oxidative stress and induces SOD (superoxide dismutase) production which decreases ROS concentration in the liver. MSC treatment correlates with an increase in Nrf2 and SOD which might reduce ROS accumulation, thus decreasing oxidative stress [87]. In a coculture model, an increased survival of cerebellar neurons is correlated with the secretion of SOD3 by MSCs [88].

MSC-mediated angiogenesis has also been demonstrated. MSCs are able to secrete a large range of angiogenic factors such as VEGF (vascular endothelial growth factor), FGF-2 (fibroblast growth factor-2), and MCP-1 [89–91]. Some studies also suggest their ability to promote endothelial cell proliferation [92, 93]. The reduced expression of VEGF, associated with improved microcirculation in the tissue after MSC transplantation, was observed [53]. Mias et al. showed a stimulation of angiogenesis following treatment with MSCs

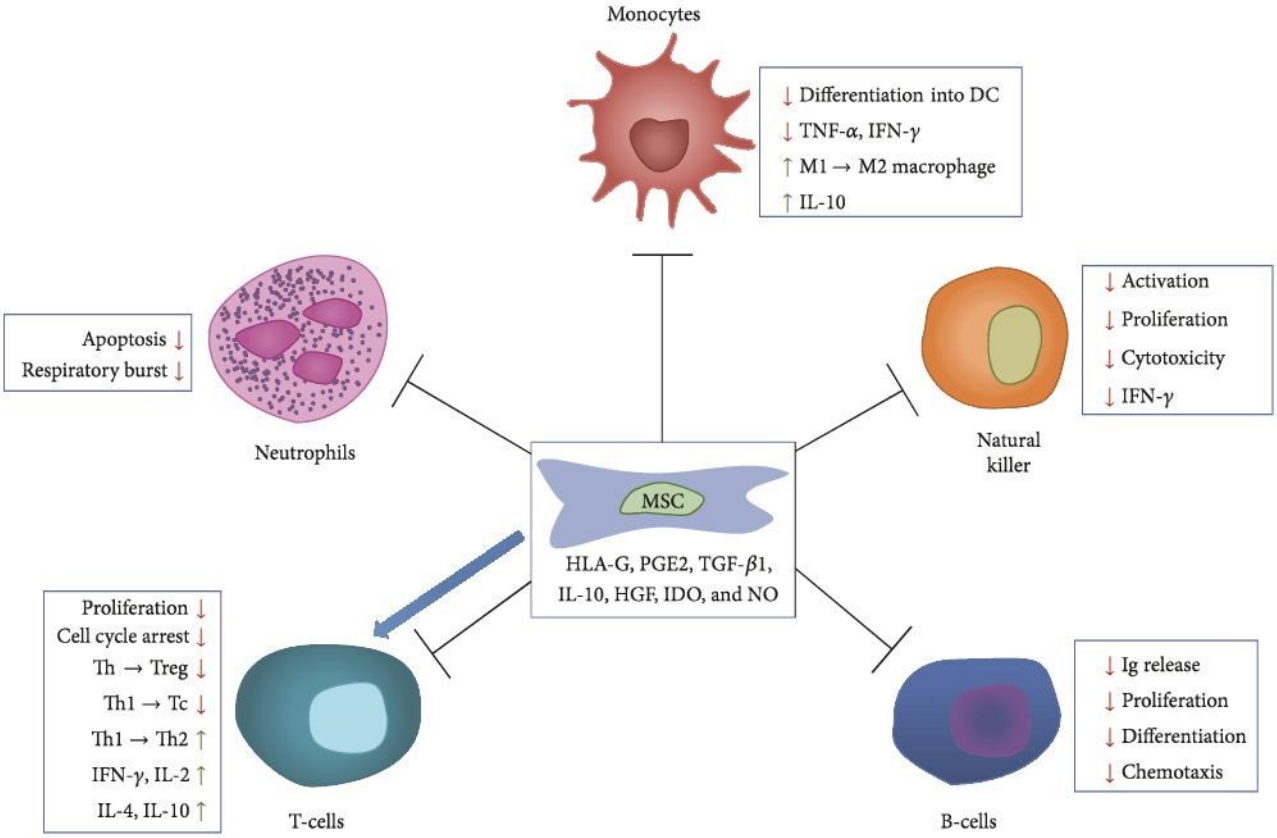


FIGURE 3: MSCs exert various effects on immune cells. A summary of MSC-mediated effects on the immune response. Various factors secreted by MSC exert an inhibitory effect on cells of the immune system which are involved in the fibrotic process (HGF: hepatocyte growth factor, HLA: human leukocyte antigen, IDO: indoleamine 2,3-dioxygenase, IFN-γ: interferon-γ, Ig: immunoglobulin, IL: interleukin, MSC: mesenchymal stromal cell, NO: nitric oxide, PGE2: prostaglandin E2, Tc: cytotoxic T-cell, TGF-β: transforming growth factor-β, TNF-α: tumor necrosis factor-α, Th: helper T-cell, and Treg: regulatory T-cell).

[44]. The transplantation of MSC sheets into the scarred myocardium increased neovascularization in a myocardial infarction model [45]. The authors also reported evidences of MSCs differentiating to participate in the formation of new vascular structures.

Conversely, an increased expression of VEGF posttreatment, with the concomitant overexpression of HIF-1α, was shown in a renal fibrosis model, indicating elevated tissue hypoxia [61]. HIF-1α (hypoxia-inducible factor-1α) stimulates the expression of VEGF under hypoxic conditions. In the same way, in a radiation-induced proctitis model, the overexpression of VEGF was accompanied by a reduction in angiopoietin and PDGF expression [40]. It can be hypothesized that insufficient angiogenesis in these models induces these variations. This gene expression profile may reflect proangiogenic signals mediated by MSCs. The evaluation of tissue vascularization would give better insights into MSCs effect on angiogenesis in these models.

MSCs may therefore act in different ways on hypoxia and oxidative stress by increasing angiogenesis in the tissue and by improving the inactivation of ROS and RNS. This feature, contributing to the inhibition of LAP cleavage from TGF-β1 and reduction of apoptosis, could contribute to MSCs' antifibrotic effects.

4.4. Matrix Remodeling. Excess production of ECM and the failure to degrade it are the hallmark of fibrosis. Thus, the ultimate goal in case of fibrotic diseases is to restore a nonpathological healing process, by inhibiting ECM production and enabling the degradation of its various components. Indeed, the imbalance of MMPs, responsible for the degradation of ECM, and TIMPs, their inhibitor, results in improper ECM remodeling, hence preventing restoration to a nonpathological matrix.

In different fibrosis models, a decreased expression and concentration of collagen, the main component of the ECM, were found after MSC transplantation [41, 43–46, 48–53, 56, 58, 59, 64–68, 71, 73, 76]. This effect is also obtained after transplanting microvesicles or exosomes secreted into an MSC culture, suggesting a paracrine control of MSCs on ECM degradation [47, 69].

Changes in the expression and concentration of MMPs and TIMPs have also been studied. After MSC transplantation, the increased expression of MMP-2, MMP-9, MMP-13, and MMP-14 has been observed in several fibrosis models [48, 65, 75]. Following the addition of MSC-conditioned culture medium to a culture of heart fibroblasts, an increase in the activity of MMP-2 and MMP-9 was found [44]. Conversely, several studies have shown reduced expression,

concentration, or activity of MMPs. Accordingly, Alfrano et al. noted the decreased activity of MMP-2 after transplantation in the NIRC model [64]. In some fibrosis models, MMP-2, MMP-9, and MMP-13 have a lower expression and concentration following treatment with MSCs [43, 61, 68]. However, these variations suggest restoration to levels similar to untreated controls.

MSCs seem to have a repressive effect on the expression of TIMPs such as TIMP-1 [50, 65]. A reduction in the concentration of TIMP 1 to 4 was shown after MSC transplantation [67]. In an *in vitro* model, a decrease in the expression of TIMP-2 was observed, suggesting that MSCs have a paracrine effect [44]. Finally, Linard et al. demonstrated a tendency toward the resolution of fibrosis by calculating the collagen-to-MMP-to-TIMP ratio, a marker of fibrosis evolution [40, 94].

MMP and TIMP expression are impaired in fibrotic pathologies. In fact, lower TIMP expression is generally associated with fibrosis resolution. In cases of heart failure, an increased expression of MMPs has been observed in the initial and final phase [95, 96]. It has been shown that increased MMP-2 activity is associated with pathological ECM remodeling in the kidney [97]. Thus, decreased activity following MSC therapy suggests a transition to a nonpathological state. On the contrary, it has been shown that MMP-2 is implicated in alveolar regeneration, which could explain its increased activity after transplantation in a pulmonary fibrosis model [98]. Finally, as certain MMPs activate latent TGF-β1, a decrease in their concentration would result in a lesser activation of downstream effectors. Taken together with a decreased fibrotic area and ECM component (collagen, fibronectin, etc.) expression, these results indicate a change in ECM composition, close to that observed in nonpathological animals. Hence, MSCs seem to improve ECM quality, allowing the appearance of a microenvironment favorable to tissue regeneration.

4.5. Transplantation Conditions. Various transplantation conditions have been assessed in the studies reported in this work including MSC activation and the optimization of MSC delivery. First, melatonin has been shown to improve MSC survival after transplantation, as well as having proangiogenic abilities [99, 100]. In both occurrences of this treatment, melatonin-treated MSCs exerted increased beneficial effects compared to nontreated cells, as evidenced by reduced ECM deposit and inflammation [44, 63]. Qiao et al. showed potentiation in predifferentiated MSCs treated with baicalin, which possesses anti-inflammatory and antioxidant properties [58]. Cotreatment with atorvastatin increased the survival and efficacy of MSCs [41].

Multiple transplantation timings have been compared to investigate their respective effect. Alfarano et al. showed that transplantation 7 days after ischemia-reperfusion was more effective on ECM deposition, myofibroblast proliferation, and MMP activity in their model compared to transplantation after 14 days [64]. In bleomycin-induced lung fibrosis, Ortiz et al. also observed greater effectiveness from MSCs when transplanted earlier [68].

Interestingly, Ishikane et al. demonstrated that the transplantation of fetal membrane or bone-marrow-derived MSCs yielded similar results on myocardial infarction [45].

In two different studies, the value of MSC differentiation before transplantation was observed. In the rat model of CCl_4-induced fibrosis, opposite effects were reported. Hardjo et al. showed a higher potential for nondifferentiated MSCs, compared to adipogenic and hepatogenic differentiation, on ECM accumulation and MMP expression [57]. Conversely, in the exact same model, Qiao et al. found that hepatogenic predifferentiation had no significant influence on the effect of MSCs [58].

Recently, new delivery procedures have been studied to improve MSCs engraftment in fibrotic tissues. MSCs grown in two-layered sheets and transplanted in a rat model of myocardial infarction were found in significant number 28 days after transplantation. Part of these cells showed evidences of differentiation, participating in neovascularization of the infarct [45]. Indeed, MSC homing in the damaged tissue is generally transient, which could explain the decreased long-term benefit often observed. Embedding MSCs in scaffolds or biomaterials could improve their beneficial effects [101, 102].

5. MSC Clinical Trials

In clinical settings, the transplantation of MSCs has been studied on numerous pathologies. A systematic review of clinical trials evaluated the safety of MSC injections. Thirty-six studies were included representing 1012 patients. The meta-analysis did not reflect any serious complications related to MSC injections. Only a transient fever was highlighted (reviewed in [103]). Around 30 clinical trials are currently registered worldwide for evaluating MSC therapy for fibrosis (http://clinicaltrials.gov). Liver and pulmonary fibrosis are most widely represented, but some occurrences of renal and vocal fold treatment exist. MSCs engraft preferentially in the lungs and liver which is the reason for a higher number of clinical trials on these organs [104]. In most of these studies, only organ functionality is evaluated but not fibrosis markers. Thus, it is not clear whether the improvement of the symptoms and quality of life is due to fibrosis reduction or the amelioration of other pathological features.

Bone-marrow-derived MSCs improve liver function in patients with liver cirrhosis as evidenced by phase I clinical trials [105–107]. The Model for End-stage Liver Disease (MELD) score is used to evaluate the mortality risk in patients with end-stage liver disease (reviewed in [108]). The mean MELD score is significantly lower after MSC injection compared to placebo controls. In patients with decompensated liver fibrosis, MSCs significantly improved quality of life as evidenced by the increase in physical and mental component scales [105] and through the SF-36 questionnaire [109]. Inducing hepatic differentiation prior to MSC injection improved liver function in treated patients [106]. Finally, fibrosis markers were measured on 30 patients during a phase I trial [107]. Laminin, hyaluronic acid, and type IV collagen

were significantly decreased 48 weeks after intervention. On the other hand, HGF, an antifibrotic growth factor, was increased after 48 weeks, as compared to nontreated patients. Based on these clinical trials [107], it appears that MSCs may exert an antifibrotic effect on liver cirrhosis.

The results of a phase I study show the ability of MSCs to reduce allograft rejection after renal transplantation [110]. MSCs decreased graft rejection by exerting immunosuppression and probably by preventing interstitial fibrosis. The absence of a placebo control in this trial did not permit the comparison and identification of the specific effect of MSCs. Thus, it is necessary to gather additional clinical data.

MSC therapy has proven to be effective in patients suffering from complications following acute myocardial infarction [111, 112]. In the first trial, functional testing showed an improvement in both heart and lung functions. There was evidence that MSC treatment led to reverse remodeling, which could be correlated with fibrosis reduction [113]. Six months after treatment, global symptom scores were significantly better in the MSC group versus the placebo group [111]. In the second study, MSC treatment reduced symptoms associated with ischemic cardiomyopathy. There was also evidence of reverse remodeling concomitant with infarct size reduction, probably linked to reduced fibrosis [112].

Pelvic radiation disease (PRD) is induced in 5 to 10% of patients within 10 years after abdominopelvic radiotherapy. Fibrosis to the colon and rectum is the main characteristic of late complications of radiotherapy. Since no satisfactory treatment exists for PRD and given the results of MSC therapy on radiation-induced burns [114], the curative potential of MSCs is being evaluated in clinical trials for PRD treatment. In particular, 4 patients suffering from serious intestinal radiation-induced lesions following overdosage of radiotherapy have been treated. The systemic administration of MSCs resulted in efficient analgesic and anti-inflammatory effects as well as hemorrhage reduction [3]. These results indicate the potential of MSC to diminish the adverse effect of radiotherapy and possibly radiation-induced fibrosis.

Based on these clinical trials, MSC therapy has proven to be safe and effective in patients suffering from diseases associated with fibrosis without the adverse effect of MSC transplantation. Nevertheless, there is a need for randomized trials (phase 3) to gather statistically significant data and to demonstrate MSCs' efficacy in limiting fibrosis.

6. MSC Therapy versus the Current Management of Fibrosis

The future of MSC therapy for fibrotic diseases mostly relies on a comparison with current management strategies. Results from preclinical and clinical trials highlight the ability of MSCs to act on fibrosis through different mechanisms: (i) immunosuppression, (ii) inhibition of the TGF-β1 pathway, (iii) reduction of hypoxia and oxidative stress, and (iv) restoration of ECM degradation. Thus, the potential of MSC therapy lies in the ability to act simultaneously on various fibrogenesis parameters. There are currently several therapy protocols for fibrotic therapies under assessment in clinical trials. Most of those treatments are designed to act on a single pathway underlying fibrosis development and progression, unlike cell therapy.

Presently, therapy protocols for fibroproliferative diseases mostly consist of symptomatic treatments. For example, patients with idiopathic pulmonary fibrosis (IPF) are often prescribed oxygen therapy and vaccination against viral and bacterial infections of the airways is recommended, if any exists. Likewise, antifibrotic strategies in the liver are most effective when they are able to cure the underlying disease. Many anti-inflammatories and antioxidants have been unsuccessful candidates for fibrosis treatment [115]. Ultimately, organ transplantation is required to ensure the survival of patients with fibrosis.

The first example of clinically used pharmacological antifibrotic agent is pirfenidone, which acts on TGF-β1 activity and inflammation and which has antioxidative properties [116]. It has been approved for the treatment of IPF in Europe, Canada, South Korea, and Japan. Preclinical studies have shown its ability to suppress TGF-β1 gene expression and to significantly reduce its concentration in lavage fluid in models of pulmonary fibrosis [117]. Pirfenidone is also effective in animal models of heart [118], kidney [119], liver [120], and radiation-induced fibrosis [121]. The FDA has not yet approved pirfenidone for pulmonary fibrosis based on a lack of efficacy and survival benefit, especially in long-term clinical trials [122]. Moreover, a meta-analysis of clinical trial results shows that pirfenidone induces adverse gastrointestinal, neurological, and dermatological adverse effects [123].

Other antifibrotic drugs are currently being examined for clinical use (reviewed in [6, 124]). Those pharmacological agents are mainly anti-inflammatory drugs and inhibitors of the TGF-β1 signaling pathway acting on different molecular targets. Despite the fact that some of these drugs have been evidenced to exert antifibrotic effects in animal models, there is a lack of clinical data that may lead to their approval.

Although some pharmacological compounds have proven to be effective, the necessity to use multiple drugs for the treatment of fibrosis is increasingly recognized. Furthermore, MSCs specifically home to damaged tissues and are able to behave depending on the surrounding environment, delivering transiently and locally specific molecules necessary for restoring tissue homeostasis. Conversely, drugs affect every organ, regardless of its pathological state. There is a need for more clinical data on MSC therapy to ascertain its effectiveness and safety. However, while inducing minor side effects, MSCs have shown promising antifibrotic effects, regardless of the organ, and should be considered as a major candidate.

7. Conclusion

Altogether, the objective analysis of the literature supports the antifibrotic effect of MSCs. It is sometimes argued that MSCs could have profibrotic properties because they are likely to acquire a myofibroblastic phenotype *in vitro* [125]

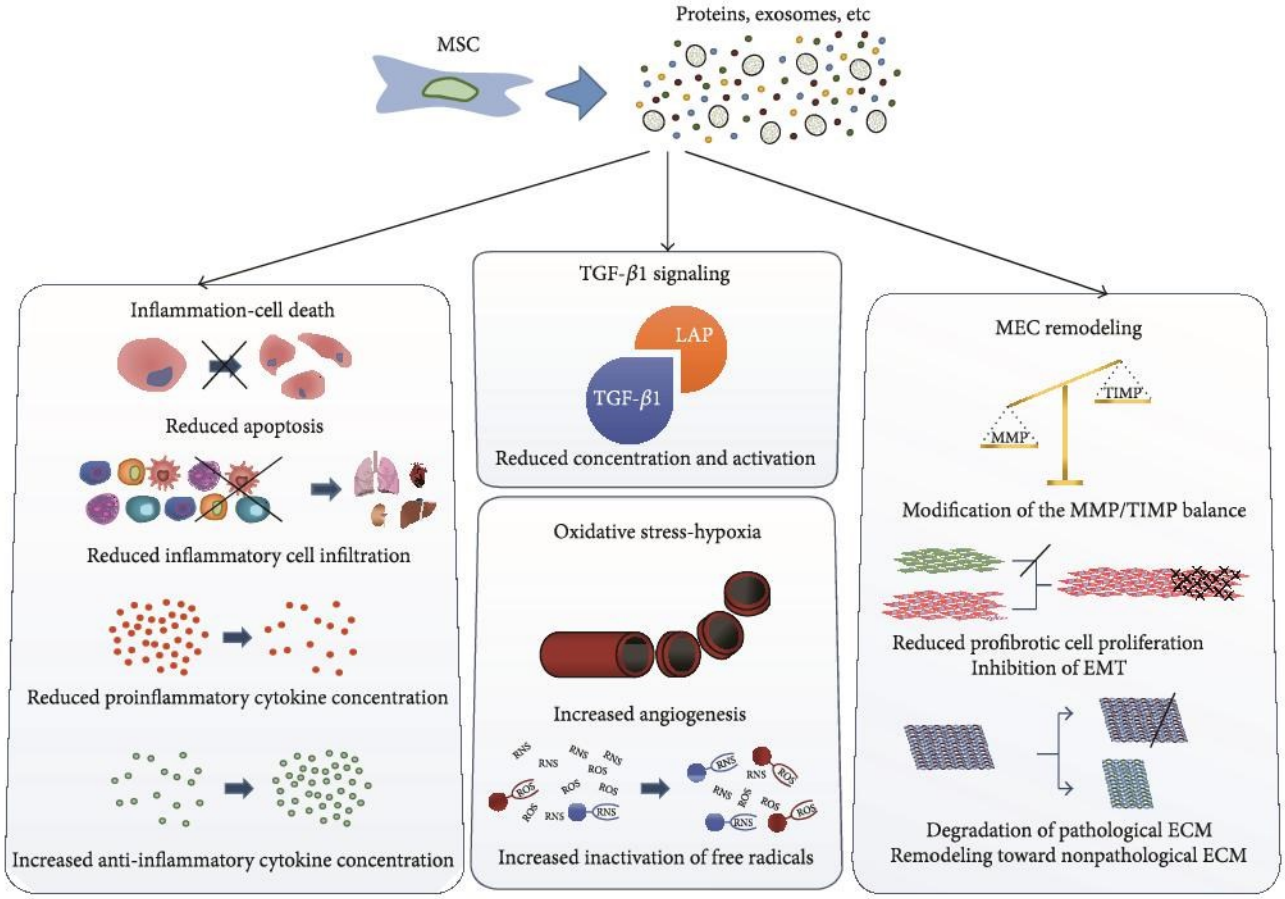


FIGURE 4: Common outcome of MSC therapy for various fibrotic diseases. Based on the studies reported in this work, several mechanisms have been underlined, mostly concerning inflammatory reaction and apoptosis, oxidative stress/hypoxia modulation, and extracellular matrix remodeling. It appears that MSC secretome activates a wide range of antifibrotic pathways (ECM: extracellular matrix, EMT: epithelial-to-mesenchymal transition, LAP: latency associated protein, MMP: matrix metalloproteinase, MSC: mesenchymal stromal cell, TGF-β: transforming growth factor-β, and TIMP: tissue inhibitor of metalloproteinase).

or that the mesenchymal origin of myofibroblasts [126] indicates profibrotic properties. Nevertheless, there is, to our knowledge, no example showing MSC transplantation to have a profibrotic effect on a developing or established disease.

Since fibrosis is a very complex multicomponent process, it can be hypothesized that MSCs act through different secreted factors on multiple pathways (Figure 4). This assumption is supported by the fact that the role of transplanted MSC depends mainly on the surrounding environment.

The principal mode of action of MSCs may be exerted mainly through inhibition of the TGF-β1 signaling pathway, mainly by blocking the passage from its latent form to its active form. The reduction of inflammation in the tissue, the improvement of angiogenesis, and the reduced oxidative stress seem to be responsible for this effect. The decrease in the concentration of activated TGF-β1 would lead to reduced EMT and myofibroblast proliferation, consequently shifting the balance between synthesis and degradation of the ECM. Furthermore, results suggest that MSCs possess the ability to inhibit TGF-β1 mRNA as well as protein synthesis [47, 58]. Thus, they would act on two different levels, preventing injury-triggered TGF-β1 overexpression and modifying the surrounding microenvironment to lessen the concentration of TGF-β1-activating factors.

Another interesting and extensively studied feature of MSC therapy against fibrotic diseases is their immunomodulatory ability. In numerous studies reported here, MSCs seem to reduce immune cell homing in the damaged tissue [61, 70]. This could in part explain the decrease in proinflammatory cytokines mRNA expression and production. Most notably, TNF-α and IFN-γ, two major profibrotic cytokines, were underexpressed in several studies reported here [66, 67]. These observations are consistent with the implementation of an antifibrotic "virtuous circle" in which fewer immune cells migrate to damaged tissues, hence reducing proinflammatory cytokines production. By inhibiting the acute inflammatory reaction, it is conceivable that MSCs reduce the consequent chronic inflammation.

Reduced hypoxia and oxidative stress are also an important effect of MSCs in this context [52, 77]. In fact, high ROS and RNS concentrations, combined with low oxygen

intake, further increase TGF-β1 activation. It also induces apoptosis in resident cells, resulting in increasingly elevated inflammation. The ability of MSCs to improve the neutralization of free radicals, already described in other models, is supplemented by indications of improved angiogenesis [44, 45]. The resulting improvement in tissue vasculature reduces ischemia, allowing better regeneration of the injured organ.

As expected, the inhibition of the TGF-β1 signaling pathway induces a substantial remodeling of the ECM toward a nonpathological state. The decreased expression and concentration of ECM components, associated with the restoration of the MMP/TIMP balance, improve the quality of the connective tissue [43, 64]. This can mostly be explained by a lower profibrotic cell population (myofibroblasts mainly). This allows for better homing of the cell types necessary for regeneration of the damaged tissue, suggesting the possibility of reversing fibrosis under the influence of MSCs.

MSCs seem to have a paracrine effect highlighted by the results obtained in studies using MSC-conditioned medium [42, 44]. Several factors have been put forward as mediating this effect. First, HGF, an antifibrotic mediator which also has antiapoptotic properties, should be mentioned. MSC therapy combined with antibodies against HGF greatly reduces the effects of the treatment and recombinant HGF administration partially reproduces the effects of MSCs [44, 62]. The treatment of fibrosis by HGF has already been assessed in earlier studies and has shown great potential [127]. Moreover, TSG-6, a recently discovered protein highlighted for its immunosuppressant effect, seems to play a major role in the antifibrotic action of MSCs [62]. The use of antibodies or gene silencing methods significantly reduces MSCs' ability to alleviate fibrosis. Indeed, TSG-6 has been demonstrated to inhibit the secretion of TNF-α by macrophages and to alter the TGF-β1/TGF-β3 balance toward an antifibrotic ratio [77].

The study of MSC transplantation conditions also needs extensive investigation. Data reported in this paper indicate that the pretreatment of MSCs to potentiate their effect may yield better outcomes. Equally, transplantation timing after injury is of great importance. In fact, results suggest that earlier therapies improve the efficacy of MSCs on fibrosis [49, 64]. This is to be expected, as inhibition of the acute inflammatory reaction by MSCs would prevent the onset of chronic inflammation. MSC source is also an important factor to be considered. It has been reported in this paper that fetal membrane and bone-marrow-derived MSCs were equally effective [45]. The comparison between different sources of MSCs is an important matter considering the fact that some tissues, such as adipose tissue, are easier to harvest and/or contain higher numbers of stem cells. Moreover, the value of predifferentiation is to be further investigated as contrary data have been gathered. In any case, supplementary studies need to be conducted to confirm these effects. Finally, although preclinical data suggest the strong antifibrotic effect of MSCs [41, 57, 70], most studies were carried on the early stages of fibrosis development. Since fibrosis is often diagnosed in more advanced phases, assessment of the effects of MSCs on established fibrosis is required in order to consider the routine use of MSC therapy on such pathologies.

These observations highlight the great potential of MSCs in the treatment of fibrotic diseases. Given these results, MSCs seem to act in the same way, regardless of the organ, and no occurrence of profibrotic effects has been reported. However, the mechanisms by which MSCs act on fibrosis have not yet been clearly elucidated and additional studies are needed. Besides, concerns about effects promoting certain pathologies, such as cancer, are still preventing their routine clinical use. Thus, emphasizing many pathways triggered by MSC homing is of great importance. Furthermore, the regulation of phenotypic changes in MSCs needs to be thoroughly evaluated. As described previously, exposing MSCs to profibrotic stimuli may trigger various changes in their secretome, probably leading to variable responses. Understanding the relative implication of the factors influencing MSC phenotype would provide valuable insight into potentiation and possible adverse effects. In addition, it has been shown that microvesicles or exosomes secreted by MSCs partially reproduce their effect [47, 69]. Describing their composition and elucidating the triggers influencing their content are essential. The importance of MSC homing to damaged tissues also needs to be addressed, mostly in terms of cell-to-cell contacts and microenvironment influence. Although few reports show the importance of engraftment and the differentiation of MSCs [45], these processes are likely to play a role in the beneficial effects of cell therapy. Also, optimal treatment protocols remain to be established. First, the timing of MSC transplantation surely influences the success of the therapy. The immunomodulatory effect of MSCs should in fact be most effective when transplantation is undergone during the acute inflammatory reaction to prevent the installation of chronic inflammation. Based on the results reported in this review, it is unclear whether MSCs could reverse fibrosis in its more advanced stage and fully restore tissue homeostasis. Nonetheless, MSC therapy for the treatment of fibrosis in any organ should be strongly considered and studied as it shows promising potential.

Abbreviations

5/6 NX: 5/6 nephrectomy
α-SMA: α-Smooth muscle actin
AM: Amniotic membrane
ARAS: Atherosclerotic renal artery stenosis
AT: Adipose tissue
BAX: Bcl-2-associated X protein
Bcl-2: B-cell lymphoma 2
BM: Bone marrow
BSA: Bovine albumin serum
CAN: Chronic allograft nephropathy
CCL: Chemokine ligand
CCl_4: Carbon tetrachloride
CG: Chlorhexidine gluconate
CKD: Chronic kidney disease
Col: Collagen
CsA: Cyclosporine A
CTGF: Connective tissue growth factor
DBTC: Dibutyltin dichloride
DC: Dendritic cell

DOX: Doxorubicin
ECM: Extracellular matrix
EMT: Epithelial-to-mesenchymal transition
EndMT: Endothelial-to-mesenchymal transition
EPS: Encapsulating peritoneal sclerosis
FGF: Fibroblast growth factor
FLK: Fetal liver kinase
FM: Fetal membrane
FSP: Fibroblast specific protein
GPx: Glutathione peroxidase
Gr: Glutathione reductase
HGF: Hepatocyte growth factor
HIF: Hypoxia-inducible factor
HK2: Human kidney 2
HLA: Human leukocyte antigen
HO-1: Heme oxygenase 1
HPMC: Human peritoneal mesothelial cells
HSA: Human serum albumin
HSC: Hepatic stellate cell
ICAM: Intercellular adhesion molecule
IDO: Indoleamine 2,3-dioxygenase
IFN-γ: Interferon-γ
Ig: Immunoglobulin
IGF: Insulin-like growth factor
IL: Interleukin
IPF: Idiopathic pulmonary fibrosis
ISO: Isoproterenol
IV: Intravenous
LAP: Latency associated protein
LPS: Lipopolysaccharide
MCP: Monocyte chemoattractant protein
MI: Myocardial infarction
MMP: Matrix metalloproteinase
MSC: Mesenchymal stromal cell
NF-κB: Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B-cells
NIRC: Nephrectomy + ischemia-reperfusion + cyclosporine
NK: Natural killer
NO: Nitric oxide
NOS: Nitric oxide synthase
NQO1: NADPH quinone oxidoreductase 1
Nrf2: Nuclear factor (erythroid-derived 2)-like 2
PDGF: Platelet-derived growth factor
pSmad: Phosphorylated small mothers against decapentaplegic homolog
PGE2: Prostaglandin E2
PTEC: Proximal tubular epithelia cell
RKM: Remnant kidney model
RNS: Reactive nitrogen species
ROS: Reactive oxygen species
R-UUO: Reversible unilateral ureteral obstruction
Smad: Small mothers against decapentaplegic homolog
SNP: Sodium nitroprusside
SOD: Superoxide dismutase
Tc: Cytotoxic T-cell
TGF-β: Transforming growth factor-β
Th: Helper T-cell
TGF-βR: Transforming growth factor-β receptor
TIMP: Tissue inhibitor of metalloproteinase
TLR: Toll-like receptor
TNF-α: Tumor necrosis factor-α
Treg: Regulatory T-cell
TSG-6: TNF-stimulated gene 6
UC: Umbilical cord
UUO: Unilateral ureteral obstruction
VCAM: Vascular cell adhesion molecule
VEGF: Vascular endothelial growth factor
VEGFR: Vascular endothelial growth factor receptor.

Conflict of Interests

The authors declare that they have no conflict of interests regarding the publication of this paper.

References

[1] V. Kumar, A. K. Abbas, and N. Fausto, "Tissue renewal and repair: regeneration, healing, and fibrosis," in *Pathologic Basis of Disease*, V. K. A. K. Abbas and N. Fausto, Eds., Elsevier Saunders, Philadelphia, Pa, USA, 2005.

[2] T. A. Wynn, "Cellular and molecular mechanisms of fibrosis," *Journal of Pathology*, vol. 214, no. 2, pp. 199–210, 2008.

[3] A. Chapel, S. Francois, L. Douay, M. Benderitter, and J. Voswinkel, "New insights for pelvic radiation disease treatment: multipotent stromal cell is a promise mainstay treatment for the restoration of abdominopelvic severe chronic damages induced by radiotherapy," *World Journal of Stem Cells*, vol. 5, no. 4, pp. 106–111, 2013.

[4] J. Voswinkel, S. Francois, N. Gorin, and A. Chapel, "Gastrointestinal autoimmunity: Preclinical experiences and successful therapy of fistulizing bowel diseases and gut Graft versus host disease by mesenchymal stromal cells," *Immunologic Research*, vol. 56, no. 2-3, pp. 241–248, 2013.

[5] S. C. Schwarz and J. Schwarz, "Translation of stem cell therapy for neurological diseases," *Translational Research*, vol. 156, no. 3, pp. 155–160, 2010.

[6] T. A. Wynn and T. R. Ramalingam, "Mechanisms of fibrosis: therapeutic translation for fibrotic disease," *Nature Medicine*, vol. 18, no. 7, pp. 1028–1040, 2012.

[7] G. Gabbiani, "The biology of the myofibroblast," *Kidney International*, vol. 41, no. 3, pp. 530–532, 1992.

[8] T. A. Wynn, "Common and unique mechanisms regulate fibrosis in various fibroproliferative diseases," *Journal of Clinical Investigation*, vol. 117, no. 3, pp. 524–529, 2007.

[9] Q. Yu and I. Stamenkovic, "Cell surface-localized matrix metalloproteinase-9 proteolytically activates TGF-β and promotes tumor invasion and angiogenesis," *Genes and Development*, vol. 14, no. 2, pp. 163–176, 2000.

[10] M. H. Barcellos-Hoff and T. A. Dix, "Redox-mediated activation of latent transforming growth factor-β1," *Molecular Endocrinology*, vol. 10, no. 9, pp. 1077–1083, 1996.

[11] R. M. Lyons, J. Keski-Oja, and H. L. Moses, "Proteolytic activation of latent transforming growth factor-β from fibroblast-conditioned medium," *Journal of Cell Biology*, vol. 106, no. 5, pp. 1659–1665, 1988.

[12] E. J. Ehrhart, P. Segarini, M. L.-S. Tsang, A. G. Carroll, and M. H. Barcellos-Hoff, "Latent transforming growth factor β1 activation in situ: quantitative and functional evidence after low-dose γ-irradiation," *The FASEB Journal*, vol. 11, no. 12, pp. 991–1002, 1997.

[13] F. Verrecchia, M. Chu, and A. Mauviel, "Identification of Novel TGF-β/Smad Gene Targets in Dermal Fibroblasts using a Combined cDNA Microarray/Promoter Transactivation Approach," *Journal of Biological Chemistry*, vol. 276, no. 20, pp. 17058–17062, 2001.

[14] S. N. Flier, H. Tanjore, E. G. Kokkotou, H. Sugimoto, M. Zeisberg, and R. Kalluri, "Identification of epithelial to mesenchymal transition as a novel source of fibroblasts in intestinal fibrosis," *Journal of Biological Chemistry*, vol. 285, no. 26, pp. 20202–20212, 2010.

[15] E. M. Zeisberg, O. Tarnavski, M. Zeisberg et al., "Endothelial-to-mesenchymal transition contributes to cardiac fibrosis," *Nature Medicine*, vol. 13, no. 8, pp. 952–961, 2007.

[16] F. Rieder and C. Fiocchi, "Intestinal fibrosis in IBD—a dynamic, multifactorial process," *Nature Reviews Gastroenterology and Hepatology*, vol. 6, no. 4, pp. 228–235, 2009.

[17] S. Barrientos, O. Stojadinovic, M. S. Golinko, H. Brem, and M. Tomic-Canic, "Growth factors and cytokines in wound healing," *Wound Repair and Regeneration*, vol. 16, no. 5, pp. 585–601, 2008.

[18] J. G. Abreu, N. I. Ketpura, B. Reversade, and E. M. De Robertis, "Connective-tissue growth factor (CTGF) modulates cell signalling by BMP and TGF-β," *Nature Cell Biology*, vol. 4, no. 8, pp. 599–604, 2002.

[19] M. R. Duncan, K. S. Frazier, S. Abramson et al., "Connective tissue growth factor mediates transforming growth factor β-induced collagen synthesis: Downregulation by cAMP," *FASEB Journal*, vol. 13, no. 13, pp. 1774–1786, 1999.

[20] B. S. Weston, N. A. Wahab, and R. M. Mason, "CTGF mediates TGF-β-induced fibronectin matrix deposition by upregulating active $\alpha 5\beta 1$ integrin in human mesangial cells," *Journal of the American Society of Nephrology*, vol. 14, no. 3, pp. 601–610, 2003.

[21] E. H. Choi, N. Lee, H. J. Kim et al., "Schisandra fructus extract ameliorates doxorubicin-induce cytotoxicity in cardiomyocytes: altered gene expression for detoxification enzymes," *Genes and Nutrition*, vol. 2, no. 4, pp. 337–345, 2008.

[22] J. R. Teerlink, J. M. Pfeffer, and M. A. Pfeffer, "Progressive ventricular remodeling in response to diffuse isoproterenol-induced myocardial necrosis in rats," *Circulation Research*, vol. 75, no. 1, pp. 105–113, 1994.

[23] T. Nishikimi, K. Uchino, and E. D. Frohlich, "Effects of α1-adrenergic blockade on intrarenal hemodynamics in heart failure rats," *The American Journal of Physiology: Regulatory Integrative and Comparative Physiology*, vol. 262, no. 2, part 2, pp. R198–R203, 1992.

[24] A. L. Cochrane, M. M. Kett, C. S. Samuel et al., "Renal structural and functional repair in a mouse model of reversal of ureteral obstruction," *Journal of the American Society of Nephrology*, vol. 16, no. 12, pp. 3623–3630, 2005.

[25] V. H. Urbieta-Caceres, R. Lavi, X.-Y. Zhu et al., "Early atherosclerosis aggravates the effect of renal artery stenosis on the swine kidney," *The American Journal of Physiology*, vol. 299, no. 1, pp. F135–F140, 2010.

[26] L. O. Lerman, R. S. Schwartz, J. P. Grande, P. F. Sheedy II, and J. C. Romero, "Noninvasive evaluation of a novel swine model of renal artery stenosis," *Journal of the American Society of Nephrology*, vol. 10, no. 7, pp. 1455–1465, 1999.

[27] I. Herrero-Fresneda, J. Torras, A. Vidal, N. Lloberas, J. M. Cruzado, and J. M. Grinyó, "Reduction of postischemic immune inflammatory response: an effective strategy for attenuating chronic allograft nephropathy," *Transplantation*, vol. 79, no. 2, pp. 165–173, 2005.

[28] R. Chaaya, C. Alfarano, C. Guilbeau-Frugier et al., "Pargyline reduces renal damage associated with ischaemia-reperfusion and cyclosporin," *Nephrology Dialysis Transplantation*, vol. 26, no. 2, pp. 489–498, 2011.

[29] C. Fleck, D. Appenroth, P. Jonas et al., "Suitability of 5/6 nephrectomy (5/6NX) for the induction of interstitial renal fibrosis in rats: influence of sex, strain, and surgical procedure," *Experimental and Toxicologic Pathology*, vol. 57, no. 3, pp. 195–205, 2006.

[30] L. W. D. Weber, M. Boll, and A. Stampfl, "Hepatotoxicity and mechanism of action of haloalkanes: carbon tetrachloride as a toxicological model," *Critical Reviews in Toxicology*, vol. 33, no. 2, pp. 105–136, 2003.

[31] C. A. Claussen and E. C. Long, "Nucleic acid recognition by metal complexes of bleomycin," *Chemical Reviews*, vol. 99, no. 9, pp. 2797–2816, 1999.

[32] B. B. Moore and C. M. Hogaboam, "Murine models of pulmonary fibrosis," *The American Journal of Physiology—Lung Cellular and Molecular Physiology*, vol. 294, no. 2, pp. L152–L160, 2008.

[33] B. J. R. Junor, J. D. Briggs, and M. A. Forwell, "Sclerosing peritonitis–the contribution of chlorhexidine in alcohol," *Peritoneal Dialysis Bulletin*, vol. 5, no. 2, pp. 101–104, 1985.

[34] T. Yamamoto, S. Takagawa, I. Katayama et al., "Animal model of sclerotic skin. I: Local injections of bleomycin induce sclerotic skin mimicking scleroderma," *Journal of Investigative Dermatology*, vol. 112, no. 4, pp. 456–462, 1999.

[35] J. A. Horton, E. J. Chung, K. E. Hudak et al., "Inhibition of radiation-induced skin fibrosis with imatinib," *International Journal of Radiation Biology*, vol. 89, no. 3, pp. 162–170, 2013.

[36] T. Peters, A. Sindrilaru, B. Hinz et al., "Wound-healing defect of $CD18^{-/-}$ mice due to a decrease in TGF-β_1 and myofibroblast differentiation," *The EMBO Journal*, vol. 24, no. 19, pp. 3400–3410, 2005.

[37] R. J. Berry, G. Wiernik, T. J. S. Patterson, and J. W. Hopewell, "Excess late subcutaneous fibrosis after irradiation of pig skin, consequent upon the application of the NSD formula," *British Journal of Radiology*, vol. 47, no. 557, pp. 277–281, 1974.

[38] N. Hazra and M. Gulliford, "Evaluating pancreatitis in primary care: a population-based cohort study," *The British Journal of General Practice*, vol. 64, no. 622, pp. e295–e301, 2014.

[39] J. Merkord, L. Jonas, H. Weber, G. Kröning, H. Nizze, and G. Hennighausen, "Acute interstitial pancreatitis in rats induced by dibutyltin dichloride (DBTC): pathogenesis and natural course of lesions," *Pancreas*, vol. 15, no. 4, pp. 392–401, 1997.

[40] C. Linard, E. Busson, V. Holler et al., "Repeated autologous bone marrow-derived mesenchymal stem cell injections improve radiation-induced proctitis in pigs," *Stem Cells Translational Medicine*, vol. 2, no. 11, pp. 916–927, 2013.

[41] L. Song, Y. J. Yang, Q. T. Dong et al., "Atorvastatin enhance efficacy of mesenchymal stem cells treatment for swine myocardial infarction via activation of nitric oxide synthase," *PLoS ONE*, vol. 8, no. 5, Article ID e65702, 2013.

[42] S. M. Gorji, A. A. K. Malekshah, M. B. Hashemi-Soteh, A. Rafiei, K. Parivar, and N. Aghdami, "Effect of mesenchymal stem cells on doxorubicin-induced fibrosis," *Cell Journal*, vol. 14, no. 2, pp. 142–151, 2012.

[43] L. Li, Y. Zhang, Y. Li et al., "Mesenchymal stem cell transplantation attenuates cardiac fibrosis associated with isoproterenol-induced global heart failure," *Transplant International*, vol. 21, no. 12, pp. 1181–1189, 2008.

[44] C. Mias, O. Lairez, E. Trouche et al., "Mesenchymal stem cells promote matrix metalloproteinase secretion by cardiac fibroblasts and reduce cardiac ventricular fibrosis after myocardial infarction," *Stem Cells*, vol. 27, no. 11, pp. 2734–2743, 2009.

[45] S. Ishikane, H. Hosoda, K. Yamahara et al., "Allogeneic transplantation of fetal membrane-derived mesenchymal stem cell sheets increases neovascularization and improves cardiac function after myocardial infarction in rats," *Transplantation*, vol. 96, no. 8, pp. 697–706, 2013.

[46] G. A. Nasir, S. Mohsin, M. Khan et al., "Mesenchymal stem cells and Interleukin-6 attenuate liver fibrosis in mice," *Journal of Translational Medicine*, vol. 11, no. 1, article 78, 2013.

[47] T. Li, Y. Yan, B. Wang et al., "Exosomes derived from human umbilical cord mesenchymal stem cells alleviate liver fibrosis," *Stem Cells and Development*, vol. 22, no. 6, pp. 845–854, 2013.

[48] V. Rabani, M. Shahsavani, M. Gharavi, A. Piryaei, Z. Azhdari, and H. Baharvand, "Mesenchymal stem cell infusion therapy in a carbon tetrachloride-induced liver fibrosis model affects matrix metalloproteinase expression," *Cell Biology International*, vol. 34, no. 6, pp. 601–605, 2010.

[49] B. Fang, M. Shi, L. Liao, S. Yang, Y. Liu, and R. C. Zhao, "Systemic infusion of FLK1+ mesenchymal stem cells ameliorate carbon tetrachloride-induced liver fibrosis in mice," *Transplantation*, vol. 78, no. 1, pp. 83–88, 2004.

[50] G. Ali, S. Mohsin, M. Khan et al., "Nitric oxide augments mesenchymal stem cell ability to repair liver fibrosis," *Journal of Translational Medicine*, vol. 10, no. 1, article 75, 2012.

[51] R. Pan, P. Wang, L. Xiang, and J. Shao, "Delta-like 1 serves as a new target and contributor to liver fibrosis down-regulated by mesenchymal stem cell transplantation," *Journal of Biological Chemistry*, vol. 286, no. 14, pp. 12340–12348, 2011.

[52] D. Zhang, M. Jiang, and D. Miao, "Transplanted human amniotic membrane-derived mesenchymal stem cells ameliorate carbon tetrachloride-induced liver cirrhosis in mouse," *PLoS ONE*, vol. 6, no. 2, Article ID e16789, 2011.

[53] Y. Wang, F. Lian, J. Li et al., "Adipose derived mesenchymal stem cells transplantation via portal vein improves microcirculation and ameliorates liver fibrosis induced by CCl4 in rats," *Journal of Translational Medicine*, vol. 10, no. 1, article 133, 2012.

[54] S. Oyagi, M. Hirose, M. Kojima et al., "Therapeutic effect of transplanting HGF-treated bone marrow mesenchymal cells into CCl4-injured rats," *Journal of Hepatology*, vol. 44, no. 4, pp. 742–748, 2006.

[55] M. T. Abdel Aziz, H. M. Atta, S. Mahfouz et al., "Therapeutic potential of bone marrow-derived mesenchymal stem cells on experimental liver fibrosis," *Clinical Biochemistry*, vol. 40, no. 12, pp. 893–899, 2007.

[56] Y. Chang, J. Liu, P. Lin et al., "Mesenchymal stem cells facilitate recovery from chemically induced liver damage and decrease liver fibrosis," *Life Sciences*, vol. 85, no. 13-14, pp. 517–525, 2009.

[57] M. Hardjo, M. Miyazaki, M. Sakaguchi et al., "Suppression of carbon tetrachloride-induced liver fibrosis by transplantation of a clonal mesenchymal stem cell line derived from rat bone marrow," *Cell Transplantation*, vol. 18, no. 1, pp. 89–99, 2009.

[58] H. Qiao, Y. Tong, H. Han et al., "A novel therapeutic regimen for hepatic fibrosis using the combination of mesenchymal stem cells and baicalin," *Pharmazie*, vol. 66, no. 1, pp. 37–43, 2011.

[59] P. Tsai, T. Fu, Y. A. Chen et al., "The therapeutic potential of human umbilical mesenchymal stem cells from Wharton's jelly in the treatment of rat liver fibrosis," *Liver Transplantation*, vol. 15, no. 5, pp. 484–495, 2009.

[60] Z. M. Bai, X. D. Deng, J. D. Li et al., "Arterially transplanted mesenchymal stem cells in a mouse reversible unilateral ureteral obstruction model: in vivo bioluminescence imaging and effects on renal fibrosis," *Chinese Medical Journal*, vol. 126, no. 10, pp. 1890–1894, 2013.

[61] B. Ebrahimi, A. Eirin, Z. Li et al., "Mesenchymal stem cells improve medullary inflammation and fibrosis after revascularization of swine atherosclerotic renal artery stenosis," *PLoS ONE*, vol. 8, no. 7, Article ID e67474, 2013.

[62] H. J. Wu, W. H. Yiu, R. X. Li et al., "Mesenchymal stem cells modulate albumin-induced renal tubular inflammation and fibrosis," *PLoS One*, vol. 9, no. 3, Article ID e90883, 2014.

[63] M. Franquesa, E. Herrero, J. Torras et al., "Mesenchymal stem cell therapy prevents interstitial fibrosis and tubular atrophy in a rat kidney allograft model," *Stem Cells and Development*, vol. 21, no. 17, pp. 3125–3135, 2012.

[64] C. Alfarano, C. Roubeix, R. Chaaya et al., "Intraparenchymal Injection of bone marrow mesenchymal stem cells reduces kidney fibrosis after ischemia-reperfusion in cyclosporine-immunosuppressed rats," *Cell Transplantation*, vol. 21, no. 9, pp. 2009–2019, 2012.

[65] P. Semedo, M. Correa-Costa, M. A. Cenedeze et al., "Mesenchymal stem cells attenuate renal fibrosis through immune modulation and remodeling properties in a rat remnant kidney model," *Stem Cells*, vol. 27, no. 12, pp. 3063–3073, 2009.

[66] H. Asanuma, B. A. Vanderbrink, M. T. Campbell et al., "Arterially delivered mesenchymal stem cells prevent obstruction-induced renal fibrosis," *Journal of Surgical Research*, vol. 168, no. 1, pp. e51–e59, 2011.

[67] Y. Moodley, D. Atienza, U. Manuelpillai et al., "Human umbilical cord mesenchymal stem cells reduce fibrosis of bleomycin-induced lung injury," *American Journal of Pathology*, vol. 175, no. 1, pp. 303–313, 2009.

[68] L. A. Ortiz, F. Gambelli, C. McBride et al., "Mesenchymal stem cell engraftment in lung is enhanced in response to bleomycin exposure and ameliorates its fibrotic effects," *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 100, no. 14, pp. 8407–8411, 2003.

[69] M. Choi, T. Ban, and T. Rhim, "Therapeutic use of stem cell transplantation for cell replacement or cytoprotective effect of microvesicle released from mesenchymal stem cell," *Molecules and Cells*, vol. 37, no. 2, pp. 133–139, 2014.

[70] S. Lee, A. Jang, Y. Kim et al., "Modulation of cytokine and nitric oxide by mesenchymal stem cell transfer in lung injury/fibrosis," *Respiratory Research*, vol. 11, article 16, 2010.

[71] F. Zhao, Y. F. Zhang, Y. G. Liu et al., "Therapeutic effects of bone marrow-derived mesenchymal stem cells engraftment on bleomycin-induced lung injury in rats," *Transplantation Proceedings*, vol. 40, no. 5, pp. 1700–1705, 2008.

[72] A. Gazdhar, N. Susuri, K. Hostettler et al., "HGF expressing stem cells in usual interstitial pneumonia originate from the bone marrow and are antifibrotic," *PLoS ONE*, vol. 8, no. 6, Article ID e65453, 2013.

[73] T. Ueno, A. Nakashima, S. Doi et al., "Mesenchymal stem cells ameliorate experimental peritoneal fibrosis by suppressing

inflammation and inhibiting TGF-β1 signaling," *Kidney International*, vol. 84, no. 2, pp. 297–307, 2013.

[74] C. H. Zhou, M. L. Li, A. L. Qin et al., "Reduction of fibrosis in dibutyltin dichloride-induced chronic pancreatitis using rat umbilical mesenchymal stem cells from Wharton's jelly," *Pancreas*, vol. 42, no. 8, pp. 1291–1302, 2013.

[75] Y. Wu, S. Huang, J. Enhe et al., "Bone marrow-derived mesenchymal stem cell attenuates skin fibrosis development in mice," *International Wound Journal*, 2013.

[76] J. A. Horton, K. E. Hudak, E. J. Chung et al., "Mesenchymal stem cells inhibit cutaneous radiation-induced fibrosis by suppressing chronic inflammation," *Stem Cells*, vol. 31, no. 10, pp. 2231–2241, 2013.

[77] Y. Qi, D. Jiang, A. Sindrilaru et al., "TSG-6 Released from intradermally injected mesenchymal stem cells accelerates wound healing and reduces tissue fibrosis in murine full-thickness skin wounds," *Journal of Investigative Dermatology*, vol. 134, no. 2, pp. 526–537, 2014.

[78] P. Mok, C. Leong, and S. Cheong, "Cellular mechanisms of emerging applications of mesenchymal stem cells," *Malaysian Journal of Pathology*, vol. 35, no. 1, pp. 17–32, 2013.

[79] N. G. Singer and A. I. Caplan, "Mesenchymal stem cells: Mechanisms of inflammation," *Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease*, vol. 6, pp. 457–478, 2011.

[80] A. Corcione, F. Benvenuto, E. Ferretti et al., "Human mesenchymal stem cells modulate B-cell functions," *Blood*, vol. 107, no. 1, pp. 367–372, 2006.

[81] A. Keating, "How do mesenchymal stromal cells suppress T cells?" *Cell Stem Cell*, vol. 2, no. 2, pp. 106–108, 2008.

[82] F. Bifari, V. Lisi, E. Mimiola, A. Pasini, and M. Krampera, "Immune modulation by mesenchymal stem cells," *Transfusion Medicine and Hemotherapy*, vol. 35, no. 3, pp. 194–204, 2008.

[83] P. A. Sotiropoulou, S. A. Perez, A. D. Gritzapis, C. N. Baxevanis, and M. Papamichail, "Interactions between human mesenchymal stem cells and natural killer cells," *Stem Cells*, vol. 24, no. 1, pp. 74–85, 2006.

[84] Y. Taniyama, R. Morishita, M. Aoki et al., "Angiogenesis and antifibrotic action by hepatocyte growth factor in cardiomyopathy," *Hypertension*, vol. 40, no. 1, pp. 47–53, 2002.

[85] Y. T. Chen, C. K. Sun, Y. C. Lin et al., "Adipose-derived mesenchymal stem cell protects kidneys against ischemia-reperfusion injury through suppressing oxidative stress and inflammatory reaction," *Journal of Translational Medicine*, vol. 9, article 51, 2011.

[86] C. K. Sun, C. H. Yen, Y. C. Lin et al., "Autologous transplantation of adipose-derived mesenchymal stem cells markedly reduced acute ischemia-reperfusion lung injury in a rodent model," *Journal of Translational Medicine*, vol. 9, no. 1, article 118, 2011.

[87] S. Francois, M. Mouiseddine, B. Allenet-Lepage et al., "Human mesenchymal stem cells provide protection against radiation-induced liver injury by antioxidative process, vasculature protection, hepatocyte differentiation, and trophic effects," *BioMed Research International*, vol. 2014, Article ID 151679, 14 pages, 2014.

[88] K. Kemp, K. Hares, E. Mallam, K. J. Heesom, N. Scolding, and A. Wilkins, "Mesenchymal stem cell-secreted superoxide dismutase promotes cerebellar neuronal survival," *Journal of Neurochemistry*, vol. 114, no. 6, pp. 1569–1580, 2010.

[89] T. Kinnaird, E. Stabile, M. S. Burnett et al., "Marrow-derived stromal cells express genes encoding a broad spectrum of arteriogenic cytokines and promote in vitro and in vivo arteriogenesis through paracrine mechanisms," *Circulation Research*, vol. 94, no. 5, pp. 678–685, 2004.

[90] S. C. Hung, R. R. Pochampally, S. C. Chen, S. C. Hsu, and D. J. Prockop, "Angiogenic effects of human multipotent stromal cell conditioned medium activate the PI3K-Akt pathway in hypoxic endothelial cells to inhibit apoptosis, increase survival, and stimulate angiogenesis," *Stem Cells*, vol. 25, no. 9, pp. 2363–2370, 2007.

[91] J. Niu, A. Azfer, O. Zhelyabovska, S. Fatma, and P. E. Kolattukudy, "Monocyte chemotactic protein (MCP)-1 promotes angiogenesis via a novel transcription factor, MCP-1-induced protein (MCPIP)," *The Journal of Biological Chemistry*, vol. 283, no. 21, pp. 14542–14551, 2008.

[92] T. Kinnaird, E. S. Burnett, M. Shou et al., "Local delivery of marrow-derived stromal cells augments collateral perfusion through paracrine mechanisms," *Circulation*, vol. 109, no. 12, pp. 1543–1549, 2004.

[93] J. Rehman, D. Traktuev, J. Li et al., "Secretion of angiogenic and antiapoptotic factors by human adipose stromal cells," *Circulation*, vol. 109, no. 10, pp. 1292–1298, 2004.

[94] C. Strup-Perrot, D. Mathé, C. Linard et al., "Global gene expression profiles reveal an increase in mRNA levels of collagens, MMPs, and TIMPs in late radiation enteritis," *American Journal of Physiology: Gastrointestinal and Liver Physiology*, vol. 287, no. 4, pp. G875–G885, 2004.

[95] D. Reinhardt, H. H. Sigusch, J. Henße, S. C. Tyagi, R. Körfer, and H. R. Figulla, "Cardiac remodelling in end stage heart failure: Upregulation of matrix metalloproteinase (MMP) irrespective of the underlying disease, and evidence for a direct inhibitory effect of ACE inhibitors on MMP," *Heart*, vol. 88, no. 5, pp. 525–530, 2002.

[96] D. Vanhoutte, M. Schellings, Y. Pinto, and S. Heymans, "Relevance of matrix metalloproteinases and their inhibitors after myocardial infarction: a temporal and spatial window," *Cardiovascular Research*, vol. 69, no. 3, pp. 604–613, 2006.

[97] S. Cheng, A. S. Pollock, R. Mahimkar, J. L. Olson, and D. H. Lovett, "Matrix metalloproteinase 2 and basement membrane integrity: a unifying mechanism for progressive renal injury," *The FASEB Journal*, vol. 20, no. 11, pp. 1898–1900, 2006.

[98] T. Yaguchi, Y. Fukuda, M. Ishizaki, and N. Yamanaka, "Immunohistochemical and gelatin zymography studies for matrix metalloproteinases in bleomycin-induced pulmonary fibrosis," *Pathology International*, vol. 48, no. 12, pp. 954–963, 1998.

[99] C. Mias, E. Trouche, M. H. Seguelas et al., "Ex vivo pretreatment with melatonin improves survival, proangiogenic/ mitogenic activity, and efficiency of mesenchymal stem cells injected into ischemic kidney," *Stem Cells*, vol. 26, no. 7, pp. 1749–1757, 2008.

[100] H. K. Yip, Y. C. Chang, C. G. Wallace et al., "Melatonin treatment improves adipose-derived mesenchymal stem cell therapy for acute lung ischemia-reperfusion injury," *Journal of Pineal Research*, vol. 54, no. 2, pp. 207–221, 2013.

[101] C. L. Visage, O. Gournay, N. Benguirat et al., "Mesenchymal stem cell delivery into rat infarcted myocardium using a porous polysaccharide-based scaffold: a quantitative comparison with endocardial injection," *Tissue Engineering A*, vol. 18, no. 1-2, pp. 35–44, 2012.

[102] C. Ceccaldi, R. Bushkalova, C. Alfarano et al., "Evaluation of polyelectrolyte complex-based scaffolds for mesenchymal stem cell therapy in cardiac ischemia treatment," *Acta Biomaterialia*, vol. 10, no. 2, pp. 901–911, 2014.

[103] M. M. Lalu, L. McIntyre, C. Pugliese et al., "Safety of cell therapy with mesenchymal stromal cells (SafeCell): a systematic review and meta-analysis of clinical trials," *PLoS ONE*, vol. 7, no. 10, Article ID e47559, 2012.

[104] K. C. Rustad and G. C. Gurtner, "Mesenchymal stem cells home to sites of injury and inflammation," *Advances in Wound Care*, vol. 1, no. 4, pp. 147–152, 2012.

[105] M. Mohamadnejad, K. Alimoghaddam, M. Mohyeddin-Bonab et al., "Phase 1 trial of autologous bone marrow mesenchymal stem cell transplantation in patients with decompensated liver cirrhosis," *Archives of Iranian Medicine*, vol. 10, no. 4, pp. 459–466, 2007.

[106] P. Kharaziha, P. M. Hellström, B. Noorinayer et al., "Improvement of liver function in liver cirrhosis patients after autologous mesenchymal stem cell injection: a phase I-II clinical trial," *European Journal of Gastroenterology and Hepatology*, vol. 21, no. 10, pp. 1199–1205, 2009.

[107] Z. Zhang, H. Lin, M. Shi et al., "Human umbilical cord mesenchymal stem cells improve liver function and ascites in decompensated liver cirrhosis patients," *Journal of Gastroenterology and Hepatology*, vol. 27, supplement 2, pp. 112–120, 2012.

[108] P. S. Kamath, R. H. Wiesner, M. Malinchoc et al., "A model to predict survival in patients with end-stage liver disease," *Hepatology*, vol. 33, no. 2, pp. 464–470, 2001.

[109] J. E. Ware Jr. and C. D. Sherbourne, "The MOS 36-item short-form health survey (SF-36). I. Conceptual framework and item selection," *Medical Care*, vol. 30, no. 6, pp. 473–483, 1992.

[110] M. E. J. Reinders, J. W. de Fijter, H. Roelofs et al., "Autologous bone marrow-derived mesenchymal stromal cells for the treatment of allograft rejection after renal transplantation:Results of a phase I study," *Stem Cells Translational Medicine*, vol. 2, no. 2, pp. 107–111, 2013.

[111] J. M. Hare, J. H. Traverse, T. D. Henry et al., "A randomized, double-blind, placebo-controlled, dose-escalation study of intravenous adult human mesenchymal stem cells (prochymal) after acute myocardial infarction," *Journal of the American College of Cardiology*, vol. 54, no. 24, pp. 2277–2286, 2009.

[112] J. M. Hare, J. E. Fishman, G. Gerstenblith et al., "Comparison of allogeneic vs autologous bone marrow-derived mesenchymal stem cells delivered by transendocardial injection in patients with ischemic cardiomyopathy: the POSEIDON randomized trial," *JAMA*, vol. 308, no. 22, pp. 2369–2379, 2012.

[113] S. Saito, G. Matsumiya, T. Sakaguchi et al., "Cardiac fibrosis and cellular hypertrophy decrease the degree of reverse remodeling and improvement in cardiac function during left ventricular assist," *Journal of Heart and Lung Transplantation*, vol. 29, no. 6, pp. 672–679, 2010.

[114] J. J. Lataillade, C. Doucet, E. Bey et al., "New approach to radiation burn treatment by dosimetry-guided surgery combined with autologous mesenchymal stem cell therapy," *Regenerative Medicine*, vol. 2, no. 5, pp. 785–794, 2007.

[115] R. Rafii, M. M. Juarez, T. E. Albertson, and A. L. Chan, "A review of current and novel therapies for idiopathic pulmonary fibrosis," *Journal of Thoracic Disease*, vol. 5, no. 1, pp. 48–73, 2013.

[116] A. Salazar-Montes, L. Ruiz-Corro, A. López-Reyes, E. Castrejón-Gómez, and J. Armendáriz-Borunda, "Potent antioxidant role of Pirfenidone in experimental cirrhosis," *European Journal of Pharmacology*, vol. 595, no. 1–3, pp. 69–77, 2008.

[117] S. N. Iyer, G. Gurujeyalakshmi, and S. N. Giri, "Effects of pirfenidone on transforming growth factor-β gene expression at the transcriptional level in bleomycin hamster model of lung fibrosis," *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, vol. 291, no. 1, pp. 367–373, 1999.

[118] S. Mirkovic, A. L. Seymour, A. Fenning et al., "Attenuation of cardiac fibrosis by pirfenidone and amiloride in DOCA-salt hypertensive rats," *British Journal of Pharmacology*, vol. 135, no. 4, pp. 961–968, 2002.

[119] K. Takakuta, A. Fujimori, T. Chikanishi et al., "Renoprotective properties of pirfenidone in subtotally nephrectomized rats," *European Journal of Pharmacology*, vol. 629, no. 1–3, pp. 118–124, 2010.

[120] A. di Sario, E. Bendia, G. Macarri et al., "The anti-fibrotic effect of pirfenidone in rat liver fibrosis is mediated by downregulation of procollagen α1(I), TIMP-1 and MMP-2," *Digestive and Liver Disease*, vol. 36, no. 11, pp. 744–751, 2004.

[121] N. L. Simone, B. P. Soule, L. Gerber et al., "Oral pirfenidone in patients with chronic fibrosis resulting from radiotherapy: a pilot study," *Radiation Oncology*, vol. 2, no. 1, article 19, 2007.

[122] *Pulmonary-Allergy Drugs Advisory Committee Complete Response on Pirfenidone*, Food and Drug Administration Center for Drug Evaluation and Research, March 2010, http://www.fda.gov/downloads/AdvisoryCommittees/CommitteesMeetingMaterials/Drugs/Pulmonary-AllergyDrugsAdvisoryCommittee/UCM206399.pdf.

[123] C. Jiang, H. Huang, J. Liu, Y. Wang, Z. Lu, and Z. Xu, "Adverse events of pirfenidone for the treatment of pulmonary fibrosis: a meta-analysis of randomized controlled trials," *PLoS ONE*, vol. 7, no. 10, Article ID e47024, 2012.

[124] J. Rosenbloom, F. A. Mendoza, and S. A. Jimenez, "Strategies for anti-fibrotic therapies," *Biochimica et Biophysica Acta: Molecular Basis of Disease*, vol. 1832, no. 7, pp. 1088–1103, 2013.

[125] M. A. Ngo, A. Muller, Y. Li et al., "Human mesenchymal stem cells express a myofibroblastic phenotype in vitro: comparison to human cardiac myofibroblasts," *Molecular and Cellular Biochemistry*, vol. 392, no. 1-2, pp. 187–204, 2014.

[126] L. Yang, N. Chang, X. Liu et al., "Bone marrow-derived mesenchymal stem cells differentiate to hepatic myofibroblasts by transforming growth factor-β1 via sphingosine kinase/sphingosine 1-phosphate (S1P)/S1P receptor axis," *The American Journal of Pathology*, vol. 181, no. 1, pp. 85–97, 2012.

[127] S. Chakraborty, P. Chopra, A. Hak, S. G. Dastidar, and A. Ray, "Hepatocyte growth factor is an attractive target for the treatment of pulmonary fibrosis," *Expert Opinion on Investigational Drugs*, vol. 22, no. 4, pp. 499–515, 2013.

STEM CELLS AND DEVELOPMENT
Volume 23, Number 24, 2014
© Mary Ann Liebert, Inc.
DOI: 10.1089/scd.2014.0171

Generation of Multipotent Early Lymphoid Progenitors from Human Embryonic Stem Cells

Aniya Larbi,[1] Maria Teresa Mitjavila-Garcia,[1] Stéphane Flamant,[1,2] Yannick Valogne,[1] Denis Clay,[3] Benoît Usunier,[2] Bruno l'Homme,[2] Olivier Féraud,[1] Ibrahim Casal,[4] Emilie Gobbo,[1] Dominique Divers,[1] Alain Chapel,[2] Ali G. Turhan,[1,5,6] Annelise Bennaceur-Griscelli,[1,6,7] and Rima Haddad[1,6]

During human embryonic stem cell (ESC) hematopoietic differentiation, the description of the initial steps of lymphopoiesis remains elusive. Using a two-step culture procedure, we identified two original populations of ESC-derived hematopoietic progenitor cells (HPCs) with $CD34^+CD45RA^+CD7^-$ and $CD34^+CD45RA^+CD7^+$ phenotypes. Bulk cultures and limiting dilution assays, culture with MS5 cells in the presence of Notch ligand Delta-like-1 (DL-1), and ex vivo colonization tests using fetal thymic organ cultures showed that although $CD34^+CD45RA^+CD7^-$ HPCs could generate cells of the three lymphoid lineages, their potential was skewed toward the B cell lineages. In contrast, $CD34^+CD45RA^+CD7^+$ HPCs predominantly exhibited a T/natural killer (NK) cell differentiation potential. Furthermore these cells could differentiate equivalently into cells of the granulo-macrophagic lineage and dendritic cells and lacked erythroid potential. Expression profiling of 18 markers by quantitative reverse transcription-polymerase chain reaction (qRT-PCR) revealed that $CD34^+CD45RA^+CD7^-$ and $CD34^+CD45RA^+CD7^+$ HPCs express genes of the lymphoid specification and that $CD34^+CD45RA^+CD7^-$ cells express B-cell-associated genes, while $CD34^+CD45RA^+CD7^+$ HPCs display a T-cell molecular profile. Altogether, these findings indicate that $CD34^+CD45RA^+CD7^-$ and $CD34^+CD45RA^+CD7^+$ HPCs correspond to candidate multipotent early lymphoid progenitors polarized toward either the B or T/NK lineage, respectively. This work should improve our understanding of the early steps of lymphopoiesis from pluripotent stem cells and pave the way for the production of lymphocytes for cell-based immunotherapy and lymphoid development studies.

Introduction

THE ARCHITECTURE OF THE IMMUNE SYSTEM (ie, the developmental and phyletic relationships between diverse leukocyte populations) remains subject to debate [1–4]. Regarding the early stages of human lymphocytes' development in the fetus and adult, rare intermediate candidate cell populations were proposed to represent *via* their phenotypes and function pathways of development into T, B, and natural killer (NK) cells [3,5–12].

Human embryonic stem cells (ESCs) are pluripotent stem cells that are capable of indefinite self-renewal in vitro and differentiation into all cell types of the body, making them uniquely valuable for the development of novel research tools and, potentially, cell-based therapies [13,14]. Hematopoietic differentiation of ESCs reproduces many aspects of embryonic hematopoiesis and provides a powerful in vitro model to elucidate the mechanisms of early hematopoietic commitment [15–23] that is otherwise practically inaccessible in the human embryo [24]. In recent years, a number of protocols have been successfully developed to promote ESC differentiation into cells of the lymphoid system [25–31]. However, while these studies provided important guidelines, enabling final production of T, B, or NK cells starting from ESCs, the initial steps of lymphopoiesis from ESCs remain an elusive issue, and the description of multipotent lymphoid progenitors emerging from ESCs has not been addressed so far.

Regarding human fetal and adult early lymphopoiesis, we previously characterized umbilical cord blood (UCB)- and bone

[1]Inserm UMR 935, "ESTeam Paris Sud", Stem Cell Core Facility SFR André Lwoff, Paul Brousse Hospital, University Paris Sud, Villejuif, France.
[2]IRSN, PRP-HOM, SRBE, Laboratory of Radiopathology and Experimental Therapies, Fontenay aux Roses, France.
[3]SFR André Lwoff, Inserm UMR 972, Paul Brousse Hospital, University Paris Sud, Villejuif, France.
[4]SFR André Lwoff, Inserm UMR 1004, Paul Brousse Hospital, University Paris Sud, Villejuif, France.
[5]Inserm UMR 935, University of Poitiers, CHU Poitiers, Poitiers, France.
[6]Faculty of Medicine, University Paris Sud, Kremlin-Bicêtre, France.
[7]AP-HP, Laboratory of Hematology, Paul Brousse Hospital, University Hospitals Paris Sud, Villejuif, France.

STEM CELLS AND DEVELOPMENT
Volume 23, Number 24, 2014
© Mary Ann Liebert, Inc.
DOI: 10.1089/scd.2014.0171

Generation of Multipotent Early Lymphoid Progenitors from Human Embryonic Stem Cells

Aniya Larbi,[1] Maria Teresa Mitjavila-Garcia,[1] Stéphane Flamant,[1,2] Yannick Valogne,[1] Denis Clay,[3] Benoît Usunier,[2] Bruno l'Homme,[2] Olivier Féraud,[1] Ibrahim Casal,[4] Emilie Gobbo,[1] Dominique Divers,[1] Alain Chapel,[2] Ali G. Turhan,[1,5,6] Annelise Bennaceur-Griscelli,[1,6,7] and Rima Haddad[1,6]

During human embryonic stem cell (ESC) hematopoietic differentiation, the description of the initial steps of lymphopoiesis remains elusive. Using a two-step culture procedure, we identified two original populations of ESC-derived hematopoietic progenitor cells (HPCs) with $CD34^+CD45RA^+CD7^-$ and $CD34^+CD45RA^+CD7^+$ phenotypes. Bulk cultures and limiting dilution assays, culture with MS5 cells in the presence of Notch ligand Delta-like-1 (DL-1), and ex vivo colonization tests using fetal thymic organ cultures showed that although $CD34^+CD45RA^+CD7^-$ HPCs could generate cells of the three lymphoid lineages, their potential was skewed toward the B cell lineages. In contrast, $CD34^+CD45RA^+CD7^+$ HPCs predominantly exhibited a T/natural killer (NK) cell differentiation potential. Furthermore these cells could differentiate equivalently into cells of the granulo-macrophagic lineage and dendritic cells and lacked erythroid potential. Expression profiling of 18 markers by quantitative reverse transcription-polymerase chain reaction (qRT-PCR) revealed that $CD34^+CD45RA^+CD7^-$ and $CD34^+CD45RA^+CD7^+$ HPCs express genes of the lymphoid specification and that $CD34^+CD45RA^+CD7^-$ cells express B-cell-associated genes, while $CD34^+CD45RA^+CD7^+$ HPCs display a T-cell molecular profile. Altogether, these findings indicate that $CD34^+CD45RA^+CD7^-$ and $CD34^+CD45RA^+CD7^+$ HPCs correspond to candidate multipotent early lymphoid progenitors polarized toward either the B or T/NK lineage, respectively. This work should improve our understanding of the early steps of lymphopoiesis from pluripotent stem cells and pave the way for the production of lymphocytes for cell-based immunotherapy and lymphoid development studies.

Introduction

THE ARCHITECTURE OF THE IMMUNE SYSTEM (ie, the developmental and phyletic relationships between diverse leukocyte populations) remains subject to debate [1–4]. Regarding the early stages of human lymphocytes' development in the fetus and adult, rare intermediate candidate cell populations were proposed to represent *via* their phenotypes and function pathways of development into T, B, and natural killer (NK) cells [3,5–12].

Human embryonic stem cells (ESCs) are pluripotent stem cells that are capable of indefinite self-renewal in vitro and differentiation into all cell types of the body, making them uniquely valuable for the development of novel research tools and, potentially, cell-based therapies [13,14]. Hematopoietic differentiation of ESCs reproduces many aspects of embryonic hematopoiesis and provides a powerful in vitro model to elucidate the mechanisms of early hematopoietic commitment [15–23] that is otherwise practically inaccessible in the human embryo [24]. In recent years, a number of protocols have been successfully developed to promote ESC differentiation into cells of the lymphoid system [25–31]. However, while these studies provided important guidelines, enabling final production of T, B, or NK cells starting from ESCs, the initial steps of lymphopoiesis from ESCs remain an elusive issue, and the description of multipotent lymphoid progenitors emerging from ESCs has not been addressed so far.

Regarding human fetal and adult early lymphopoiesis, we previously characterized umbilical cord blood (UCB)- and bone

[1]Inserm UMR 935, "ESTeam Paris Sud", Stem Cell Core Facility SFR André Lwoff, Paul Brousse Hospital, University Paris Sud, Villejuif, France.
[2]IRSN, PRP-HOM, SRBE, Laboratory of Radiopathology and Experimental Therapies, Fontenay aux Roses, France.
[3]SFR André Lwoff, Inserm UMR 972, Paul Brousse Hospital, University Paris Sud, Villejuif, France.
[4]SFR André Lwoff, Inserm UMR 1004, Paul Brousse Hospital, University Paris Sud, Villejuif, France.
[5]Inserm UMR 935, University of Poitiers, CHU Poitiers, Poitiers, France.
[6]Faculty of Medicine, University Paris Sud, Kremlin-Bicêtre, France.
[7]AP-HP, Laboratory of Hematology, Paul Brousse Hospital, University Hospitals Paris Sud, Villejuif, France.

marrow (BM)-derived $CD34^+CD45RA^{hi}CD7^+$ and $CD34^+CD45RA^{hi}CD10^+$Lineage $(Lin)^-$ hematopoietic progenitor cells (HPCs) as being multipotent early lymphoid progenitors (MELPs) polarized toward T/NK and B cell lineages, respectively [7]. We provided evidence for their in vitro independent emergence from $CD34^+CD45RA^{lo}CD7^-$ lympho-myeloid progenitors and shed light on the physiological mechanisms by which these cells contribute to early lymphopoiesis during human hematopoietic ontogeny [7,8]. Later, Doulatov et al. provided a comprehensive analysis of the human hematopoietic hierarchy and identified from UCB and BM multi-lymphoid progenitors, as a distinct population of $CD45RA^+$ cells within the $CD34^+CD38^-$ adult stem cell compartment. This population was shown to give rise to all lymphoid cell types, as well as to monocytes, macrophages, and dendritic cells (DCs) [10]. These results indicated that the lymphoid lineage arises concomitantly with the myeloid lineage within early lymphoid progenitors specified by the cell surface acquisition of CD45RA. Furthermore, Kohn et al. recently identified the earliest stage of lymphoid priming in human BM based especially on the cell surface expression of CD45RA [12]. Interestingly, we have recently shown that embryoid body (EB) cells co-cultured with MS5 stromal cells could generate hematopoietic cells, comprising $CD34^+CD45RA^+$ HPCs, which were endowed with a strong NK cell differentiation potential [32].

Building on these findings, we identified $CD34^+CD45RA^+CD7^-$ and $CD34^+CD45RA^+CD7^+$ cells as two original populations of ESC-derived HPCs. Here, ESC-derived $CD34^+CD45RA^+CD7^-$ and $CD34^+CD45RA^+CD7^+$ HPCs were compared for their lymphoid potentials and gene expression profiles. We show that, although both populations retain some degree of multipotency, the $CD34^+CD45RA^+CD7^+$ HPCs are skewed toward the T- and NK-cell lineages, whereas the $CD34^+CD45RA^+CD7^-$ HPCs are enriched in pro-B cells. Our study provides evidence with regard to the development of early multi-lymphoid progenitors from ESCs, thereby establishing valuable tools to explore early ontogenetic events that direct the initiation of lympho-hematopoietic cell fate and enabling efforts to generate therapeutically useful cell types.

Materials and Methods

Cell lines

ESCs from H1 cell line (WiCell Research Institute, www.wicell.org; Biomedicine Agency authorization number: RE10-035R/C) were cultured as described [32]. The MS5 stromal cells [33,34] were grown in complete α-minimal essential medium (MEM) (Invitrogen) containing 10% fetal calf serum (FCS; Biowest).

Human UCB cells

Normal UCB samples were collected with the informed consent of the mother, according to approved institutional guidelines. After Pancoll (Dutscher) centrifugation, $CD34^+$ cells were purified by immunomagnetic selection using a CD34 MicroBeads kit (Myltenyi Biotec).

Mice

Experiments of thymus colonization were carried out with NOD.Cg-*Prkdc*^{scid}*Il2rg*^{tm1Wjl}/SzJ (NOG) mice embryos (Charles River Laboratories) in accordance with European Directives (86/609/CEE), and with French regulations for animal experimentations following Inserm guidelines. NOG mice were maintained in Animal Core Facility in microisolator cages.

Formation of EBs

As described [32], H1 colonies were harvested and cultured in ultra-low attachment six-well plates (Costar) in Iscove's modified Dulbecco's medium (IMDM) (Invitrogen) supplemented with 15% FCS (Biowest), 1% penicillin/streptomycin, 1 mM L-glutamine, 1% nonessential amino-acids, 100 μM 2-ME, and 10 ng/mL basic fibroblast growth factor (bFGF; Miltenyi Biotec). After 24 h, mesoderm specification and generation of HPCs was achieved by replacing the bFGF by the following cytokine cocktails [17,32]: stem cell factor (SCF, 100 ng/mL), fms-like tyrosine kinase 3 ligand (Flt3-L, 10 ng/mL), IL-3 and IL-6 (10 ng/mL), granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF, 50 ng/mL), vascular endothelial growth factor (10 ng/mL), and bone morphogenetic protein-4 (BMP4, 10 ng/mL; all from Peprotech). The culture was maintained during 19 days at 37°C in a humidified atmosphere, 5% CO_2 and the medium was changed every 4–5 days.

Generation of ESC-derived lymphoid progenitor cells

EBs were dissociated at culture day 19 by collagenase IV (Invitrogen) treatment. EB-derived cells were co-cultured during 2 weeks at 37°C in a humidified atmosphere, 5% CO_2 with the mouse stromal cell line MS5 (15×10^3–50×10^3 cells/cm^2). The cells were cultured in EB medium supplemented with 50 ng/mL SCF, 50 ng/mL Flt3-L, and 50 ng/mL recombinant human thymic stromal lymphopoietin (TSLP; Peprotech) to generate lymphoid progenitor cells as described [7].

Flow cytometry analysis and cell sorting

Immunolabeling of cells was performed by incubating the cells for 30 min at 4°C in PBS containing 2% FCS with the following mAbs (1:50 final): CD34-allophycocyanin (APC, clone 581), CD7-FITC (clone 8H8.1), CD7-PE (clone 8H8.1), CD10- phycoerythrocyanin 5 (PECy5, clone ALB1), CD127-PE (clone R34.34,) CD4-PECy5 (clone 13B8.2), CD8-APC (clone B9.11), TCRαβ-PE (clone IP26A), CD56-PE/CD3-FITC (clones NKH-1/UCHT1), IgM-PE (clone UHB), HLA-DR-APC (clone Immu-357), CD62L-FITC (clone DREG56), CD207-PE (clone DCGM4; all from Beckman Coulter), CD14-FITC (clone M5E2), CD15-FITC (clone HI98), CD45RA-PE (clone HI100), CD45RA-PECy5 (clone HI100), CD19-APC (clone HIB19), CD64-FITC (clone 10.1), CD1a-APC (clone HI149; all from BD Biosciences), and CD1a-PE (clone WM-35; ImmunoTools). Cells were then washed and analyzed with an FACScalibur flow cytometer (Becton Dickinson) using CellQuest software. After 14 days of primary co-culture (Fig. 1A, step II), HPC subsets were sorted based on CD34, CD45RA, CD7 expression (purity > 93%), using the FACSDiva instrument (Becton Dickinson). Dead cells were excluded using 7AAD (BD Biosciences) staining. Isotype-matched FITC-, PE-, PECy5-, and APC-conjugated irrelevant mAbs were from BD Biosciences and Beckman Coulter.

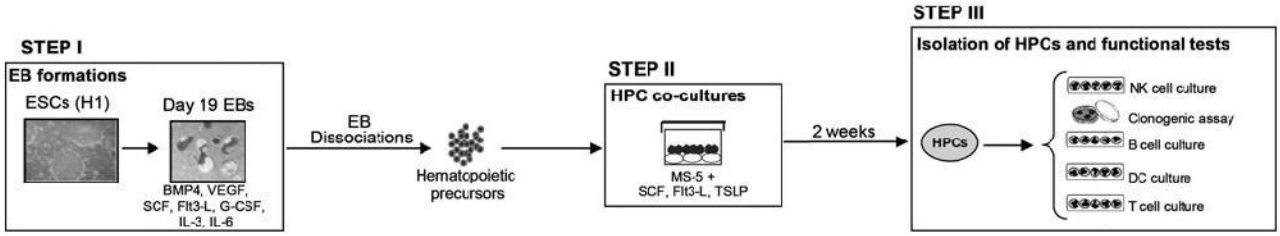


FIG. 1. Schematic representation of the protocol for lympho-hematopoietic differentiation of ESC-derived HPCs. EB cells derived from H1 ESC line (Step I) were co-cultured with MS5 cells during 2 weeks in the presence of SCF/Flt3-L/TSLP (Step II). Cell-sorted HPC subsets derived from the second step of co-culture were then submitted to specific lymphoid or myeloid culture conditions (Step III). BMP4, bone morphogenetic protein-4; DC, dendritic cell; EB, embryoid body; ESC, embryonic stem cell; Flt3-L, fms-like tyrosine kinase 3 ligand; G-CSF, granulocyte colony stimulating factor; HPC, hematopoietic progenitor cell; NK, natural killer; SCF, stem cell factor; TSLP, thymic stromal lymphopoietin; VEGF, vascular endothelial growth factor.

Gene expression analysis by real-time quantitative reverse transcription-polymerase chain reaction

RNA samples were treated with RNAse-free DNAse (Qiagen) and reverse transcribed into cDNA with oligo-dT primer using Superscript III reverse transcriptase (Invitrogen). One part of the quantitative reverse transcription-polymerase chain reaction (qRT-PCR) was performed using SYBR-Green I Master Mix (Roche diagnostics) on an Mx3005P instrument (Stratagene). The other part of qRT-PCR was performed using TaqMan reagents (LifeTechnolgies) according to the recommendation of the provider. Reverse and forward primer sequences are shown in Supplementary Table S1 (Supplementary Data are available online at www.liebertpub.com/scd). Supplementary tested genes were the following ones: *RAG2* (Cat. No. Hs01851142_s1), *RORC* (Cat. No. Hs01076122_m1), *DNTT* (Cat. No. Hs00172743_m1), *TCRγ* (*TRGC2,* Cat. No. Hs00827007_m1), *TCRβ* (*TRBC1,* Cat. No. Hs01588269_g1), *EPOR* (Cat. No. Hs00959427_m1), *KLF1* (Cat. No. Hs00610592_m1), *GATA1* (CAT. No. Hs01085823_m1), *RUNX1/AML1* (Cat. No. Hs04186042_m1), and *MPL/TPOR* (Cat. No. Hs00180489_m1). Gene expressions were normalized using 3 control endogenous genes as previously described [35]: Ubiqitin C (*UBC,* Cat. No. Hs01871556_s1), glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (*GAPD,* Cat. No. Hs00266705_g1), and Hypoxanthine phosphoribosyltransferase 1 (*HPRT,* Cat. No. *Hs99999909_m1*). Positive controls for gene expression included Jurkat cell line (for *IKAROS*), human BM cells (for *MPO*, *PU.1*), fetal human thymocytes (for *RAG1, RAG2, DNTT, Pre-Tα*, *CD127*, *TCRγ*, *TCRβ*, and *RORC*), and Raji cell line (for *CD79a* and *PAX5*). qRT-PCR products for each target gene within the three cellular subsets were analyzed on a 2% agarose gel. Variations in gene expressions in EB-derived HPCs relative to control EB-derived $CD34^+CD45RA^-$ HPCs were calculated using the ΔCt method [36].

Assessment of NK, B, and DC differentiation potentials in bulk cultures

For NK cell culture conditions, HPCs (1,000 cells/cm^2) were co-cultured for 3 weeks as described [7,8], in 48-well plates (Dutscher) with MS5 cells, in RPMI 1640 (Invitrogen), 1% penicillin/streptomycin, 1% L-glutamine, 5% FCS (StemCell Technologies), 10% human AB serum (Jack Boy), 0.1 mM 2-ME with human recombinant cytokines: 50 ng/mL SCF, 50 ng/mL Flt3-L, 5 ng/mL IL-2, 20 ng/mL IL-7, and 20 ng/mL IL-15 (Peprotech). B-cell differentiation of HPCs was assessed, as described [7,8], by growing cells (10^4 cells/cm^2) for 2 weeks in MS5 cell-coated plates in IMDM complemented with 3% FCS, 1% penicillin/streptomycin, 1% L-glutamine, 0.1 mM 2-ME, plus 50 ng/mL SCF, 100 ng/mL human thrombopoietin, and 20 ng/mL IL-7. Half of the complete medium was replaced weekly. Finally, to achieve DC differentiation of the two HPC populations, cells were cultured for 10 days as described [37], in RPMI medium supplemented with 10% FCS, 1% penicillin/streptomycin, 1% L-glutamine, and the following cytokines: 50 ng/mL SCF, 50 ng/mL Flt3-L, 50 ng/mL TNF-α, and 20 ng/mL granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF, Peprotech). Half of the culture medium was changed every 3 days. Cultures in NK, B, and DC conditions were conducted at 37°C in a humidified atmosphere, 5% CO_2.

Clonogenic assays

Erythroid and granulo-macrophagic potential of each HPC subset was assessed by seeding 1,000 cells in 35-mm duplicate dishes (Corning), in 1 mL complete Methocult GF+ H4435 medium (StemCell Technologies), supplemented with IL-3, IL-6, G-CSF, SCF, GM-CSF, and erythropoietin (EPO). Dishes were incubated at 37°C in a humidified atmosphere, 5% CO_2. The erythroid burst and colony-forming units (BFU/CFU-E), granulocyte, macrophage, and granulo-macrophagic (CFU-G/M/GM) colony-forming units were counted under an inverted microscope on culture day 14.

Limiting-dilution assays

To assess NK- and B-cell progenitor frequencies, cells were seeded at 300, 100, 30, 10, 3, and 1 cells/well into MS5 cell-coated 96-well plates (ATGC) and cultured as earlier. Cultures lasted for 2 to 3 weeks with half medium changes and fresh cytokines added every 6 to 7 days. Plates were examined weekly, and cell-containing wells were scored under the microscope as previously described [7]. At the end of the cultures, B and NK cells were identified by a fluorescence activated cell sorting analysis of CD19 and CD56 expression, respectively. The maximum likelihood estimate of NK-cell or B-cell precursors was calculated according to the single-hit Poisson model.

Assessment of T-cell differentiation potential

ESC-derived CD45RA$^+$CD7$^-$ and CD45RA$^+$CD7$^+$ HPCs were co-cultured with MS5 cells for 4 weeks in αMEM supplemented with 10% human AB serum, 5% FCS (StemCell Technologies), 1% penicillin/streptomycin, 1% L-glutamine, 0,1 mM 2-ME, 250 ng/mL Delta-like-1 (DL-1; R&D Systems Europe), 50 ng/mL SCF, and 50 ng/mL IL-7. Half of the culture medium was changed weekly. Cultures were conducted at 37°C in a humidified atmosphere, 5% CO_2. The MS5 stromal cells that express ectopic DL-1 (MS5/DL-1) were also used in some experiments as described [38–40].

Thymus colonization assays

ESC-derived CD45RA$^+$CD7$^-$ and CD45RA$^+$CD7$^+$ sorted populations were independently labeled in PBS with CFSE according to the manufacturer's instructions (Molecular Probes®; Invitrogen). CFSE-labeled cell populations were then resuspended in IMDM, 10% human AB serum. Hanging drops were prepared in Terasaki plates by adding 25 µL of cell suspension to individual thymic lobe freshly isolated from NOG mice embryos (5×10^2 cells/lobe). Inverted plates were subsequently incubated for 48 h at 37°C, 5% CO_2. Lobes were washed by gentle dipping in PBS, transferred onto floating Nucleopore filters (Millipore SA), and immediately processed for microscopy. Specimens were gently layered on glass coverslips that were subsequently inverted onto single concave microscope slides containing 50 µL RPMI 1640 without phenol red and maintained at 37°C throughout the experiment as previously described [8]. Two-photon excitation confocal analysis of samples was carried out with a Leica TCS SP2 AOBS multiphoton CLSM (Leica) as described [8].

Statistical analysis

Data are expressed as mean ± SEM. Statistical significance was assessed using the unpaired Student's *t*-test and Mann–Whitney Rank Sum test. Differences with $P<0.05$ were considered statistically significant.

Results

In vitro generation of ESC-derived CD34$^+$ HPC sub-populations by a two-step culture procedure

To assess whether ESCs give rise to HPCs endowed with lymphoid potential, we designed a multi-step culture procedure that first comprised the generation of EBs from ESCs (Fig. 1, step I) followed by a co-culture of EB-derived cells with MS5 cells, classically used to study human hemato-lymphopoiesis [41–43], in the presence of SCF, Flt3-L, and TSLP (Fig. 1, step II). Since the cell surface expression of CD45RA, CD7, CD127 (IL-7Rα), CD10, and CD62L could be considered as a relevant marker of early lymphoid specification of human CD34$^+$ HPCs [3,5,7,8,10,12,32], cells were harvested at the end of the 2-week co-culture period, and analyzed for the expression of these markers. As shown in Fig. 2, co-culture of EB-derived cells with MS5 cells in the presence of cytokines promoted the development, among the CD34$^+$ cells, of CD45RA$^+$ HPCs, and particularly that of CD45RA$^+$CD7$^-$ and CD45RA$^+$CD7$^+$ HPCs (Fig. 2A). As already shown [32], this step of co-culture of EB-derived cells with MS5 cells is indispensable to enhance the generation of CD34$^+$CD45RA$^+$ HPCs, as CD45RA$^+$CD7$^-$ HPCs derived from day-0 fresh EBs (that is w/o any co-culture) or from co-cultures represent 0.8% ± 0.6% and 26% ± 11% of CD34$^+$ cells, respectively (mean ± SEM, $P<0.001$). Similarly, CD45RA$^+$CD7$^+$ HPCs derived from fresh EBs or from co-cultures represented 1.5% ± 1.6% and 29% ± 7.8%, respectively ($P<0.001$) (Fig. 2B). This resulted in an increase of the absolute numbers of CD45RA$^+$CD7$^-$ and CD45RA$^+$CD7$^+$ HPCs after co-culture with MS5 cells (Fig. 2B). We next analyzed the expression of the CD10 and CD62L markers within CD34$^+$ CD45RA$^+$CD7$^-$ and CD34$^+$CD45RA$^+$CD7$^+$ HPCs and found that CD10 was expressed in 12.4% ± 2.3% of CD34$^+$ CD45RA$^+$CD7$^-$ HPCs and in 11.3% ± 3.6% of CD34$^+$ CD45RA$^+$CD7$^+$ HPCs (Fig. 2C). We also found that CD62L was expressed in 59.7% ± 0.5% of CD34$^+$CD45RA$^+$CD7$^-$ HPCs and in 42% ± 13.5% of CD34$^+$CD45RA$^+$CD7$^+$ HPCs (Fig. 2C). Moreover, it is noteworthy that CD45RA$^-$ population cells which represented 97.7% ± 2% of fresh EB-derived CD34$^+$ HPCs represented only 48% ± 14.7% after co-culture on MS5 cells ($P<0.001$), which led to a decrease in the absolute number of CD45RA$^-$ HPCs after co-culture (Fig. 2B). These CD34$^+$ CD45RA$^-$ HPCs comprised CD10$^+$ and CD62L$^+$ cells that represented, respectively, 26.4% ± 6.5% and 15.5% ± 0.5% of total CD34$^+$CD45RA$^-$ HPCs. Finally, HPCs derived from EB cell co-cultures with MS5 displayed a very weak cell surface expression of CD127 and never expressed CD19 (not shown). Taken together, the results show that in our conditions, co-culture of EB-derived cells with MS5 cells, in the presence of cytokines, fosters the emergence of CD34$^+$CD45RA$^+$CD7$^-$ and CD34$^+$CD45RA$^+$CD7$^+$ HPCs which express early lymphoid cell surface markers.

Molecular characterization of ESC-derived CD34$^+$ HPCs according to CD45RA and CD7 expression

We studied genes associated to early lymphoid lineage, such as *IKAROS*, *RAG1*, *RAG2*, *CD127*, and *DNTT*. We also studied B- and T-cell lineage-related genes such as *CD79a* *PAX5*, *Pre-Tα*, *TCRγ*, *TCRβ*, and *RORC*. Finally, we analyzed the expression of *PU.1* involved in early lympho-myeloid specification and that of the myeloid gene *MPO* (Fig. 3A). We compared gene expression levels in CD45RA$^-$, CD45RA$^+$ CD7$^-$, and CD45RA$^+$CD7$^+$ HPCs. The expression levels of *IKAROS*, *RAG2*, *DNTT*, and *RORC*, and in CD45RA$^+$CD7$^-$ and CD45RA$^+$CD7$^+$ cell populations were significantly increased in comparison to their expression levels in CD45RA$^-$ HPCs but no difference in gene expression level was observed when comparing CD45RA$^+$CD7$^-$ and CD45RA$^+$CD7$^+$ cell populations (Fig. 3B). We found no significant difference in the expression of *RAG1* when comparing CD45RA$^+$CD7$^-$ and CD45RA$^+$CD7$^+$ HPCs (Fig. 3A). The expression level of *CD127* in CD45RA$^+$CD7$^-$ cell populations was 2.5 ± 0.3 times more elevated than in CD45RA$^+$CD7$^+$ HPCs ($P<0.01$); inversely, the expression levels of *Pre-Tα*, *TCRβ*, and *TCRγ* in CD45RA$^+$CD7$^+$ HPCs were, respectively, 3.3 ± 0.5, 1.7 ± 0.8, and 1.8 ± 0.9 times more elevated than in CD45RA$^+$ CD7$^-$ HPCs ($P<0.01$) (Fig. 3B). *CD79a* and *PAX5* transcripts were detected in CD45RA$^+$CD7$^-$ HPCs (Fig. 3A). Furthermore, the relative expression level of *PU.1* in CD45RA$^+$CD7$^+$ HPCs was half as much as in CD45RA$^-$ HPCs (0.35 ± 0.28, $P<0.05$), while no significant difference was observed between CD45RA$^+$CD7$^-$ HPCs and

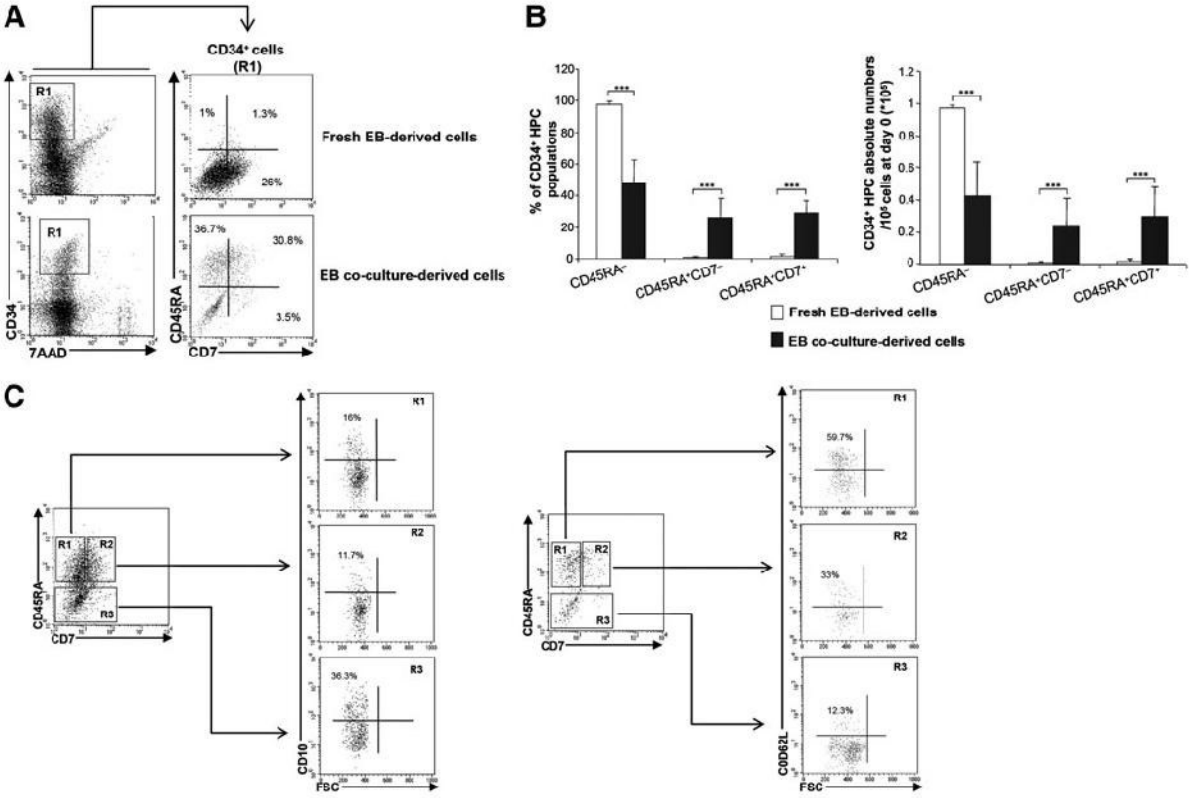


FIG. 2. Characterization of $CD34^+$ HPC populations according to CD45RA, CD7, CD10, and CD62L expression. **(A)** Representative FACS analysis of HPCs derived from EB cells co-cultured with MS5 cells in comparison with nonco-cultured EB cells (fresh EB cells). Cells were labeled with CD34, CD45RA, and CD7. Cells were gated based on CD34 expression (R1). **(B)** Percentages and absolute numbers of HPCs expressing CD45RA and CD7 at day 14 after EB cell co-culture with MS5 (mean ± SEM, $n = 12$), $^{***}P < 0.001$. **(C)** Phenotypic analysis of $CD34^+CD45RA^+CD7^-$ (R1), $CD34^+CD45RA^+CD7^+$ (R2), and $CD34^+CD45RA^-$ (R3) HPCs according to CD10 and CD62L expression (one representative experiment out of three). FACS, fluorescence activated cell sorting.

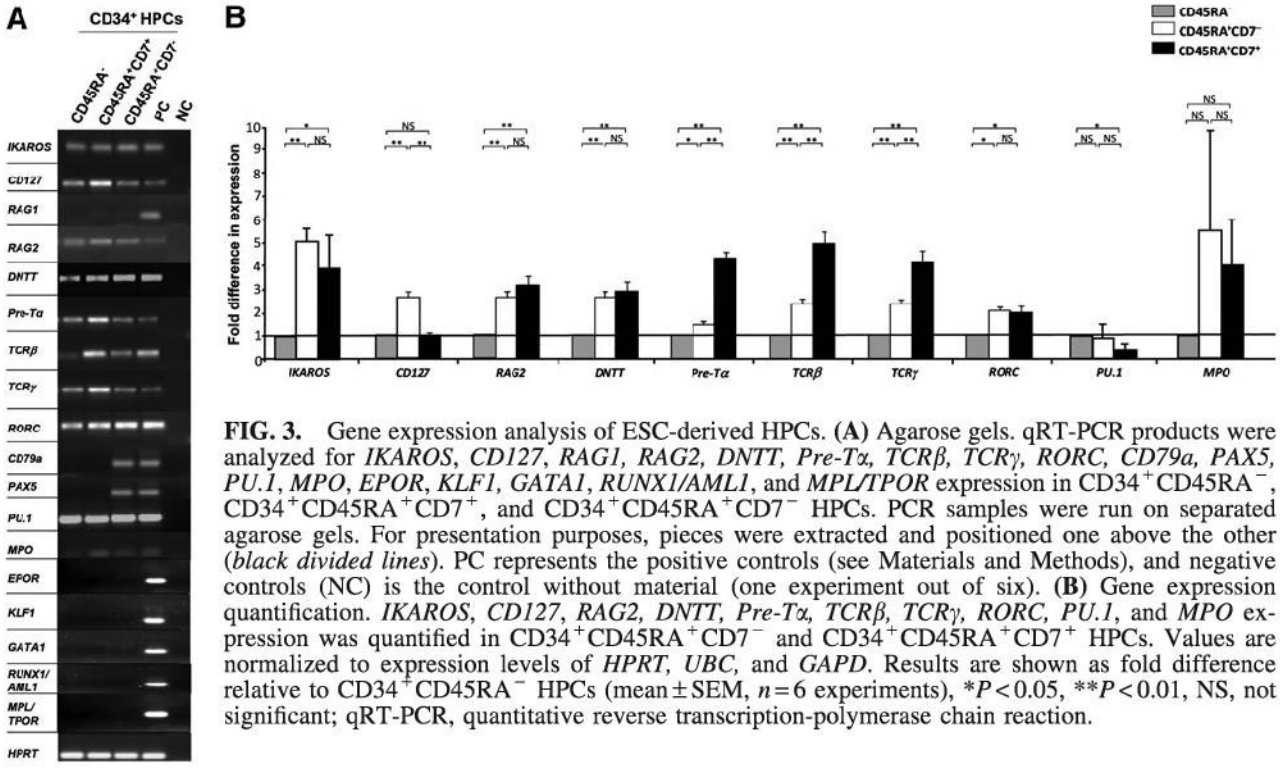


FIG. 3. Gene expression analysis of ESC-derived HPCs. **(A)** Agarose gels. qRT-PCR products were analyzed for *IKAROS*, *CD127*, *RAG1*, *RAG2*, *DNTT*, *Pre-Tα*, *TCRβ*, *TCRγ*, *RORC*, *CD79a*, *PAX5*, *PU.1*, *MPO*, *EPOR*, *KLF1*, *GATA1*, *RUNX1/AML1*, and *MPL/TPOR* expression in $CD34^+CD45RA^-$, $CD34^+CD45RA^+CD7^+$, and $CD34^+CD45RA^+CD7^-$ HPCs. PCR samples were run on separated agarose gels. For presentation purposes, pieces were extracted and positioned one above the other (*black divided lines*). PC represents the positive controls (see Materials and Methods), and negative controls (NC) is the control without material (one experiment out of six). **(B)** Gene expression quantification. *IKAROS*, *CD127*, *RAG2*, *DNTT*, *Pre-Tα*, *TCRβ*, *TCRγ*, *RORC*, *PU.1*, and *MPO* expression was quantified in $CD34^+CD45RA^+CD7^-$ and $CD34^+CD45RA^+CD7^+$ HPCs. Values are normalized to expression levels of *HPRT*, *UBC*, and *GAPD*. Results are shown as fold difference relative to $CD34^+CD45RA^-$ HPCs (mean ± SEM, $n = 6$ experiments), $^*P < 0.05$, $^{**}P < 0.01$, NS, not significant; qRT-PCR, quantitative reverse transcription-polymerase chain reaction.

$CD45RA^-$ HPCs (Fig. 3B). Regarding the expression level of *MPO*, no significant difference was observed between the three subpopulations. Finally, $CD45RA^-$, $CD45RA^+CD7^-$, and $CD45RA^+CD7^+$ HPCs did not express genes related to the erythro-megakaryocytic lineage such as *EPOR*, *KLF1*, *GATA1*, *RUNX1/AML1*, and *MPL/TPOR* (Fig. 3A) [44]. Absolute values of gene expressions are shown in Supplementary Fig. S1. Taken together, these data show that the ESC-derived $CD34^+$ HPCs expressing CD45RA carry a substantial lymphoid molecular profile. Our results show that $CD45RA^+CD7^+$ HPCs preferentially exhibit a T-cell molecular profile and that $CD45RA^+CD7^-$ HPCs are more related to the B-cell lineage. These findings led us to focus more specifically on the identity of $CD45RA^+CD7^-$ and $CD45RA^+CD7^+$ HPCs.

$CD34^+CD45RA^+CD7^-$ and $CD34^+CD45RA^+CD7^+$ ESC-derived HPCs differ in their capacity to generate NK cells

We first analyzed NK-cell differentiation potential of $CD45RA^+CD7^-$ and $CD45RA^+CD7^+$ HPCs (Fig. 1, step III and Fig. 4A, B). In bulk culture, $CD45RA^+CD7^+$ HPCs' capacity at generating $CD56^+$ NK cells was superior to that of $CD45RA^+CD7^-$ HPCs with $81.2\% \pm 17.5\%$ versus $51.1\% \pm 11.9\%$ ($P < 0.05$), with 0.6- to 11.6 and 1.4- to 7.5-fold expansion for $CD45RA^+CD7^-$ and $CD45RA^+CD7^+$ HPCs, respectively (Fig. 4A). In limiting-dilution analysis, NK cell precursor frequency varied between 1:89 and 1:75 among $CD45RA^+CD7^-$ HPCs relative to 1:338 and 1:264 for $CD45RA^+CD7^+$ HPCs (Fig. 4B). This difference was due to the overall cloning efficiency under NK condition that varied between 1:98 and 1:40 among $CD45RA^+CD7^-$ HPCs relative to 1:271 and 1:208. These results underline the fact that $CD45RA^+CD7^-$ HPCs are more enriched in clonogenic precursors when compared with $CD45RA^+CD7^+$, which means that $CD45RA^+CD7^-$ HPCs are more proliferative than $CD45RA^+CD7^+$ HPCs, leading to a higher NK cell precursors' frequency among $CD45RA^+CD7^-$ than among $CD45RA^+CD7^+$ HPCs. However, we found that almost all the clonogenic precursors in NK condition corresponded to NK precursors starting either from $CD45RA^+CD7^-$ or from $CD45RA^+CD7^+$ HPCs. However, the two populations markedly differed regarding their intrinsic capacity to generate NK cells. The analysis of the percentages of NK cells derived from $CD45RA^+CD7^-$ and $CD45RA^+CD7^+$ HPCs in limiting-dilution analysis enables the appreciation of the intrinsic NK-cell differentiation potential of these cells. As shown in Fig. 4B, NK-cell percentages were equal to $76\% \pm 13\%$ in wells seeded with 300 $CD45RA^+CD7^+$ HPCs relative to $55.7\% \pm 19.9\%$ in $CD45RA^+CD7^-$ HPC cultures ($P < 0.05$), which is in accordance with data obtained from bulk culture under NK condition (Fig. 4A). This analysis of the percentage of NK cells derived from $CD45RA^+CD7^-$ or $CD45RA^+CD7^+$ HPCs gives a qualitative approach of the NK-cell differentiation that enables a better appreciation of the NK polarization of $CD45RA^+CD7^+$ HPCs in comparison to $CD45RA^+CD7^-$ HPCs. Altogether, these data indicate that $CD45RA^+CD7^+$ HPCs display a better NK-cell differentiation potential than $CD45RA^+CD7^-$ HPCs. Interestingly, 100% of wells seeded with 300 $CD45RA^+CD7^-$ HPCs contained mixed cells (NK and non-NK cells), whereas 60% of cells seeded with 300 $CD45RA^+CD7^+$ HPCs contained NK cells only (Fig. 4C), which could suggest that $CD45RA^+CD7^-$ HPCs are enriched in more immature and proliferative precursors than $CD45RA^+CD7^+$.

$CD34^+CD45RA^+CD7^-$ and $CD34^+CD45RA^+CD7^+$ ESC-derived HPCs differ in their capacity to generate B cells

In bulk culture under B lymphoid conditions (Fig. 1, step III and Fig. 5A, B), the $CD45RA^+CD7^-$ and $CD45RA^+CD7^+$ HPCs displayed a similar capacity to generate $CD19^+$ B cells, representing $25.2\% \pm 11.7\%$ and $16\% \pm 8.4\%$ of cells, respectively ($P = 0.1$), with 0.8- to 3.5- and 1.9- to 11.4-fold expansion, respectively (Fig. 5A). In limiting-dilution analysis, B-cell precursor frequency varied between 1:163 and 1:57 among $CD45RA^+CD7^-$ HPCs relative to 1:5177 and 1:302 for $CD45RA^+CD7^+$ HPCs (Fig. 5B). This difference is also due to the overall cloning efficiency under B conditions that varied between 1:116 and 1:19 among $CD45RA^+CD7^-$ HPCs relative to 1:5177 and 1:19 for $CD45RA^+CD7^+$ HPCs, showing that under B condition, $CD45RA^+CD7^-$ HPCs could generate more clonogenic precursors that correspond to B precursors than $CD45RA^+CD7^+$ HPCs did. Furthermore, the two populations markedly differed regarding their intrinsic capacity to generate B cells: $CD19^+$ B cells represented $63\% \pm 23.2\%$ and $65.4\% \pm 20.8\%$ of the cells in wells seeded with 300 and 100 $CD45RA^+CD7^-$ HPCs as compared with $25.3\% \pm 18\%$ and $31.6\% \pm 22.2\%$ in $CD45RA^+CD7^+$ HPC cultures ($P < 0.01$and $P < 0.05$) (Fig. 5B). Furthermore, 83% of wells seeded with 300 $CD45RA^+CD7^-$ HPCs contained $CD19^+$ B cells, whose proportion varied between 50% and 96%; whereas only 33% of wells seeded with 300 $CD45RA^+CD7^+$ HPCs contained B cells, whose proportion varied between 21% and 60% (Fig. 5C). In the same way, 83% of wells seeded with 100 $CD45RA^+CD7^-$ HPCs contained $CD19^+$ B cells, whose proportion varied between 30% and 98%; whereas only 33% of wells seeded with 100 $CD45RA^+CD7^+$ HPCs contained B cells, whose proportion varied between 8% and 67% (not shown). These results show that $CD45RA^+CD7^-$ HPCs exhibit a major B-cell differentiation potential. However, the B cells generated from $CD45RA^+CD7^-$ HPCs were not mature, as they did not express IgM (Supplementary Fig. S2).

Finally, whether $CD45RA^+CD7^-$ cells represented precursors of $CD45RA^+CD7^+$ HPCs was examined. $CD45RA^+CD7^-$ HPCs were sorted and cultured onto MS-5 cells in the presence of Flt3-L, SCF, and TSLP [7]. After 1 week of coculture, we could identify the presence of $CD45RA^+CD7^+$ HPCs, which indicates that $CD7^+$ HPCs could derive from $CD7^-$ cells (Supplementary Fig. S3). This result suggests that $CD45RA^+CD7^-$ cells are more multipotent than $CD7^+$ HPCs, which is in accordance with the results presented in Fig. 4C.

Taken together, these data indicate that $CD45RA^+CD7^-$ and $CD45RA^+CD7^+$ HPCs are lymphoid progenitors which display mixed NK- and B-cell differentiation potential and that $CD45RA^+CD7^+$ HPCs are effectively endowed with an important NK-cell differentiation potential, whereas

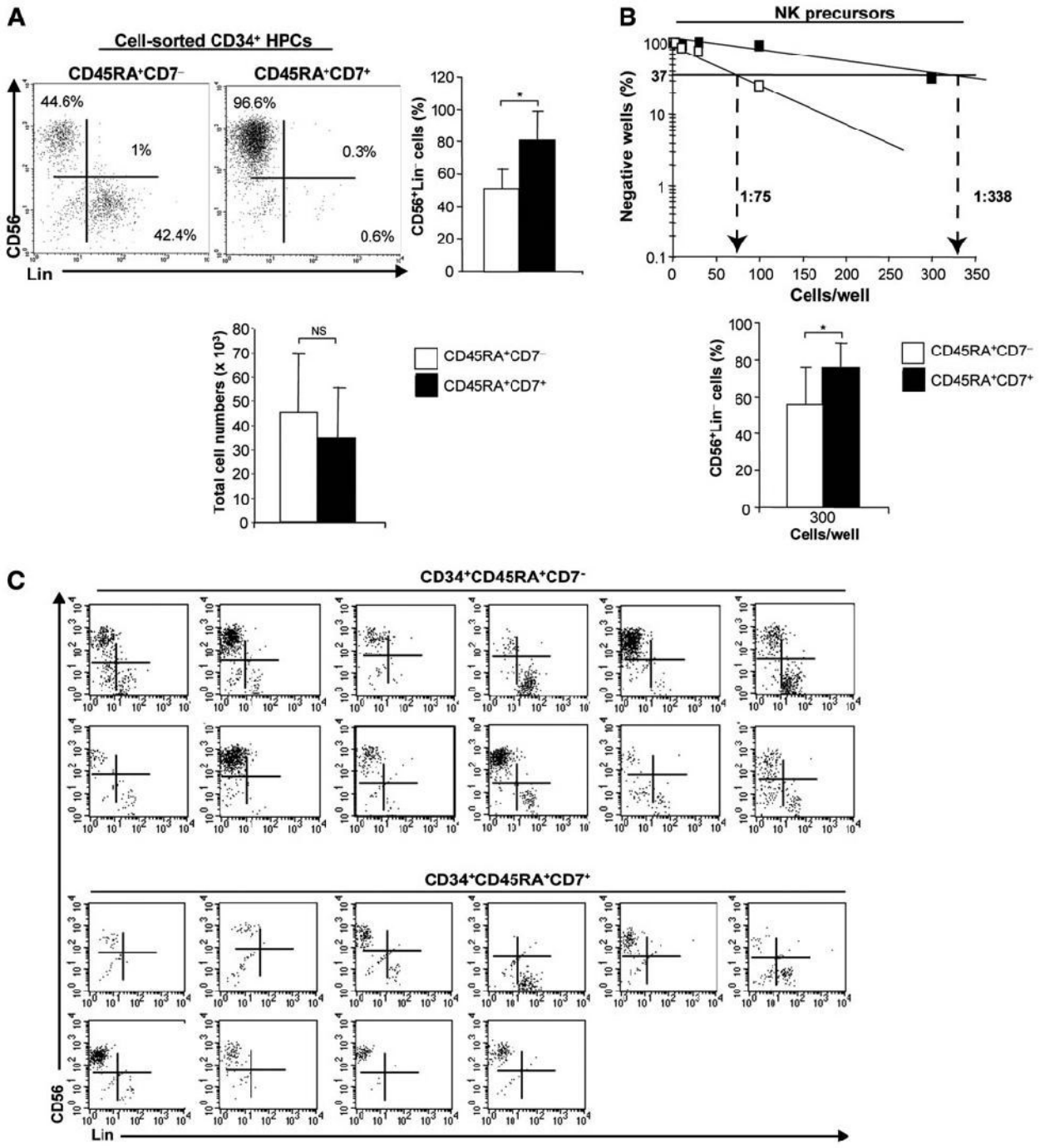


FIG. 4. NK-cell differentiation potential of $CD34^+CD45RA^+CD7^-$ and $CD34^+CD45RA^+CD7^+$ HPCs. **(A)** Comparative analysis of $CD34^+CD45RA^+CD7^-$ and $CD34^+CD45RA^+CD7^+$ HPCs in bulk culture under NK condition. Cells were cultured for 3 weeks on MS5 cells in the presence of cytokines and were labeled with CD56 and CD3/CD19/CD14/CD15/CD64/(Lin) mAbs. The *left upper panel* shows FACS analysis of $CD56^+Lin^-$ NK cells (one experiment out of six). Quadrants were set based on labeling with control mAbs. The *right upper panel* displays percentages of $CD56^+Lin^-$ cells (mean ± SEM, $n = 6$), and the *lower panel* indicates cell growth under NK condition reported to 10^4 cells seeded at day 0. **(B)** Comparative analysis of $CD34^+CD45RA^+CD7^-$ and $CD34^+CD45RA^+CD7^+$ HPCs in limiting-dilution assays under NK condition. Positive wells were scored, and FACS was analyzed after 3 weeks of culture. The *upper panel* shows NK cell precursor frequencies; whereas the *lower panel* displays percentages of $CD56^+Lin^-$ cells per well (mean ± SEM, $n = 12$, and $n = 8$ for $CD34^+CD45RA^+CD7^-$ and $CD34^+CD45RA^+CD7^+$ HPCs, respectively; results are from one experiment out of two), $*p < 0.05$. **(C)** Phenotypic analysis of cells under limiting dilution in NK condition. Wells seeded with 300 $CD34^+CD45RA^+CD7^-$ or $CD34^+CD45RA^+CD7^+$ HPCs in NK condition were analyzed for the presence of NK cells and non-NK hematopoietic cells. Twelve wells out of 12 seeded with $CD34^+CD45RA^+CD7^-$ HPCs (*upper panel*) were scored positive for the presence of hematopoietic cells, and 10 wells out of 12 seeded with $CD34^+CD45RA^+CD7^+$ HPCs (*lower panel*) were scored positive for the presence of hematopoietic cells. Cells were labeled with CD56, CD3, CD19, CD14, CD15, and CD64 mAbs (data are from one experiment out of two).

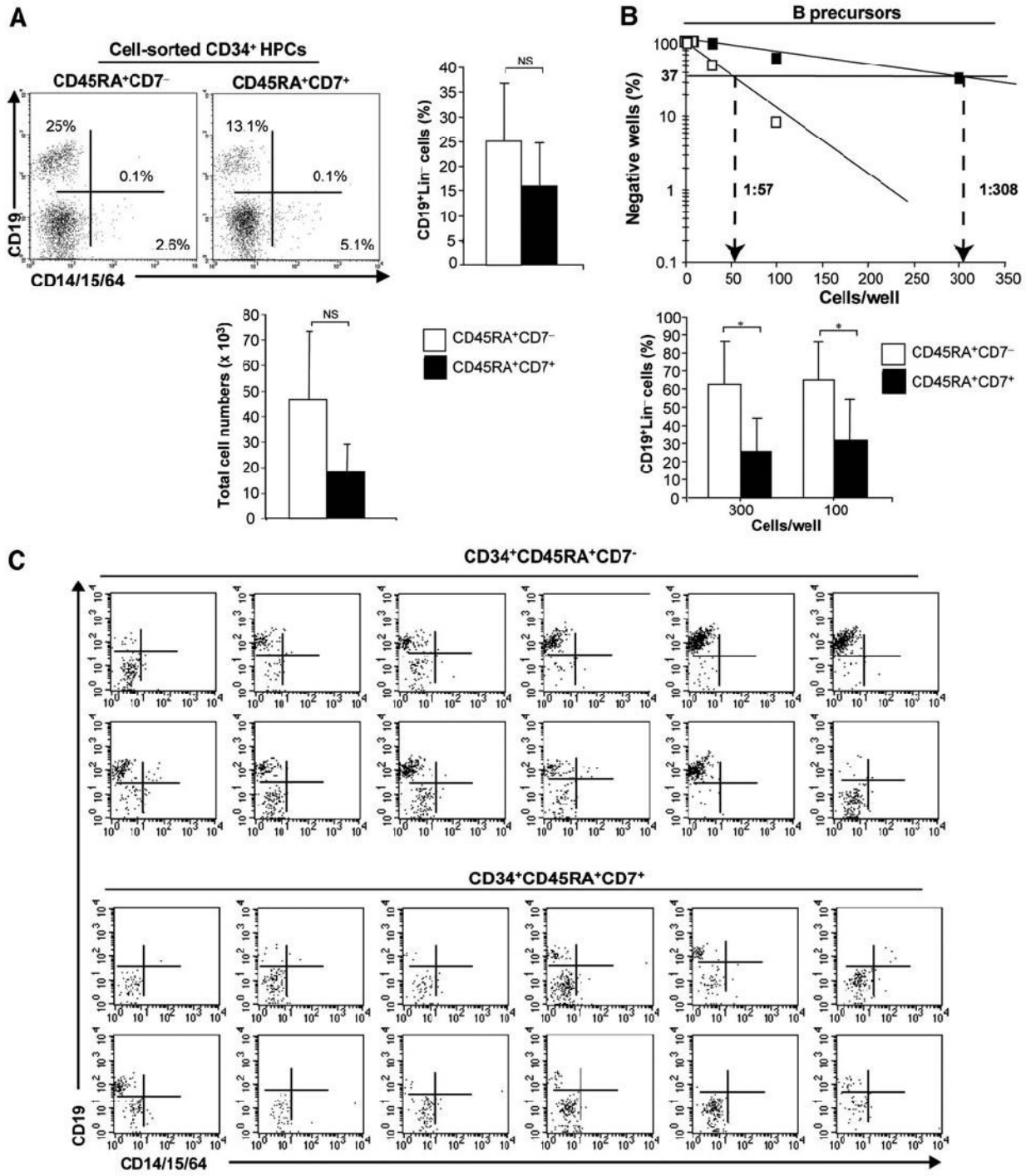


FIG. 5. B-cell differentiation potential of $CD34^+CD45RA^+CD7^-$ and $CD34^+CD45RA^+CD7^+$ HPCs. **(A)** Comparative analysis of $CD34^+CD45RA^+CD7^-$ and $CD34^+CD45RA^+CD7^+$ HPCs in bulk culture under B condition. Cells were cultured for 2 weeks on MS5 cells in the presence of cytokines and were then labeled with CD19 and CD14/CD15/CD64 mAbs. The *left upper panel* shows FACS analysis of $CD19^+Lin^-$ B cells (one experiment out of six). Quadrants were set based on labeling with control mAbs. The *upper right panel* displays percentages of $CD19^+$ $CD14^-CD15^-CD64^-$ cells (mean ± SEM, $n=6$), and the *lower panel* indicates cell growth under B condition reported to 10^4 cells seeded at day 0. **(B)** Comparative analysis of $CD34^+CD45RA^+CD7^-$ and $CD34^+CD45RA^+CD7^+$ HPCs in limiting-dilution assays under B condition. Positive wells were scored, and FACS was analyzed after 2 weeks of culture. The *upper panel* shows B-cell precursor frequencies; the *lower panel* indicates percentages of $CD19^+CD14^-CD15^-CD64^-$ cells per well (mean ± SEM, $n=4$, and $n=11$ for $CD34^+CD45RA^+CD7^-$ and $CD34^+CD45RA^+CD7^+$ HPCs, respectively; results are from one experiment out of two, $^*P<0.05$). **(C)** Phenotypic analysis of cells under limiting dilution in B condition. Wells seeded with 300 $CD34^+CD45RA^+CD7^-$ or $CD34^+CD45RA^+CD7^+$ HPCs in B condition were analyzed for the presence of B cells and non-B hematopoietic cells. Twelve wells out of 12 seeded with $CD34^+CD45RA^+CD7^-$ HPCs (*upper panel*) or $CD34^+CD45RA^+CD7^+$ HPCs (*lower panel*) were scored positive for the presence of hematopoietic cells. Cells were labeled with CD19, CD14, CD15, and CD64 mAbs (data are from one experiment out of 2).

$CD45RA^+CD7^-$ HPCs exhibit a high B-cell differentiation potential.

$CD34^+CD45RA^+CD7^-$ and $CD34^+CD45RA^+CD7^+$ ESC-derived HPCs do not differ in their capacity to generate myeloid cells and DCs

In clonogenic assays, $CD45RA^+CD7^-$ and $CD45RA^+CD7^+$ HPCs gave rise to an equivalent number of colony-forming cells (23 ± 6.7 and 21.8 ± 11.9 respectively, $P = 0.46$) (Fig. 1, step III and Fig. 6A) that corresponded to granulo-macrophagic or macrophagic colonies. In these conditions, no erythroid colonies could be detected, which is in accordance with the lack of erythroid gene expressions. We next examined their capacity to differentiate into classical DC and Langherans cell (LC)-type DCs (Fig. 1, step III and Fig. 6B, C) by monitoring cell surface expression of CD1a, HLA-DR, and CD207. Growth of $CD45RA^+CD7^-$ and $CD45RA^+CD7^+$ HPCs in DC culture condition was equivalent and limited (1.1- to 2.5- and 1.7- to 2-fold expansion, respectively). Furthermore, $CD45RA^+CD7^-$ and $CD45RA^+CD7^+$ HPCs could generate $CD1a^+HLA\text{-}DR^+$ DCs in the same proportions that is, $63.3\% \pm 24.5\%$ and $79\% \pm 12.5\%$, respectively ($P = 0.2$). The proportion of $CD1a^+CD207^+$ LCs that developed from $CD45RA^+CD7^-$ and $CD45RA^+CD7^+$ HPCs was also similar and represented $55.9\% \pm 7.2\%$ and $40.3\% \pm 19.8\%$, respectively ($P = 0.2$) (Fig. 6B). Finally, expansion of $CD45RA^+CD7^-$ and $CD45RA^+CD7^+$ HPCs in DC culture condition was equivalent (1.1- to 2.5- and 1.7- to 2-fold expansion, respectively) (Fig. 6C).

Taken together, these results show that $CD45RA^+CD7^-$ and $CD45RA^+CD7^+$ HPCs exhibit an equivalent differentiation potential toward myeloid and DC lineages.

$CD34^+CD45RA^+CD7^-$ and $CD34^+CD45RA^+CD7^+$ HPCs differ in their capacity to colonize embryonic thymus and to generate T cells

We used CFSE fluorochrome tracking to compare the capacity of $CD45RA^+CD7^-$ and $CD45RA^+CD7^+$ HPCs to enter alymphoid thymus lobes from NOG mice embryos. Two-photon confocal microscopy and reconstructions of serial optical sections showed a massive surface invasion of lobes seeded with $CD45RA^+CD7^+$ HPCs, which did not enter the thymus parenchyma; whereas only a few $CFSE^+$ cells were detected at the surface of $CD45RA^+CD7^-$ HPC-seeded lobes (Fig. 7A). T-cell generation assays were used to assess whether the differences noted between $CD45RA^+CD7^-$ and $CD45RA^+CD7^+$ HPCs extended to the capacity to generate thymocytes (Fig. 1, step III and Fig. 7B). Using MS5 co-culture in the presence of exogenously added DL-1, $CD45RA^+CD7^+$ HPCs displayed substantial T-cell potential, with $CD4^+CD8^+TCR\alpha\beta^-$, $CD4^+CD8^+TCR\alpha\beta^+$ and $CD4^+CD8^-$ $TCR\alpha\beta^+$ thymocytes representing on average of about $76.4\% \pm 11.5\%$ of hematopoietic cells recovered from co-culture as compared with $41.2\% \pm 24.7\%$ from cultures initiated with $CD45RA^+CD7^-$ HPCs (see representative results in Fig. 7B). However, cell expansion in cultures seeded with $CD45RA^+CD7^-$ and $CD45RA^+CD7^+$ HPCs was similar (1.7 vs. 0.9). Using MS5/DL-1 stromal cells,

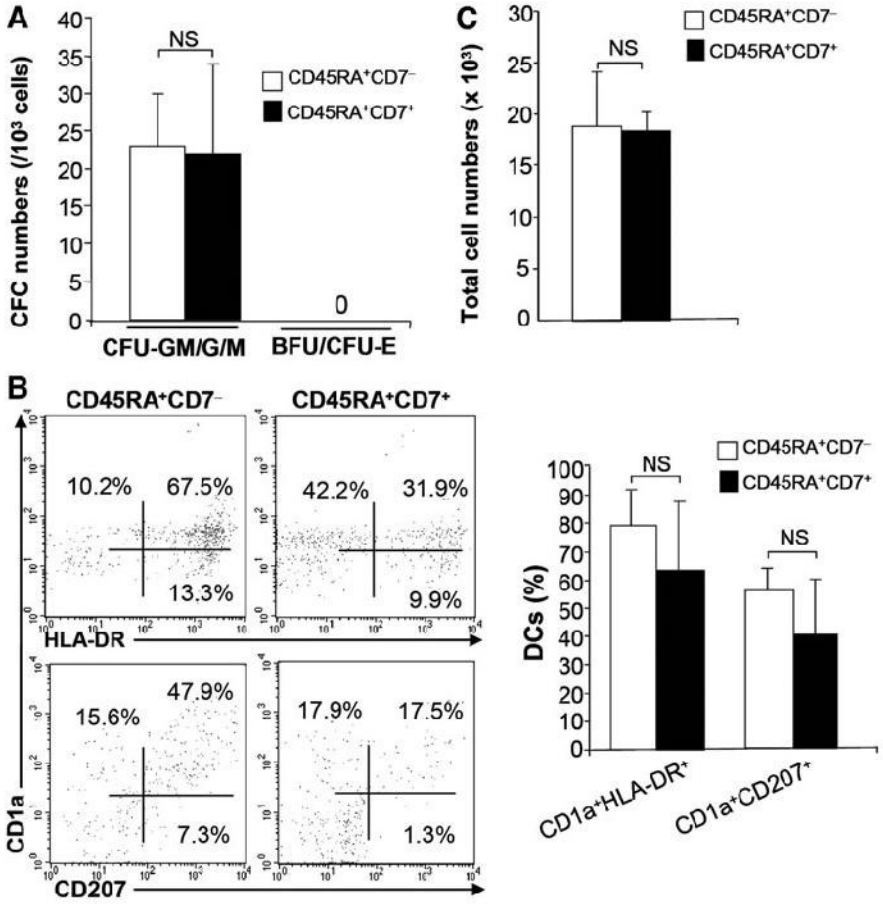


FIG. 6. Myeloid and dendritic cell differentiation potential of $CD34^+CD45RA^+CD7^-$ and $CD34^+CD45RA^+CD7^+$ HPCs. **(A)** Comparative analysis of $CD34^+CD45RA^+CD7^-$ and $CD34^+CD45RA^+CD7^+$ HPCs under myelo-erythroid condition. CFCs were scored after 14 days of culture in methylcellulose (mean ± SEM, $n = 5$). **(B)** Comparative analysis of $CD34^+CD45RA^+CD7^-$ and $CD34^+CD45RA^+CD7^+$ in bulk culture under DC condition. Cells were cultured for 10 days without MS5 in the presence of cytokines and were labeled with CD1a, HLA-DR, and CD207 mAbs. FACS analysis (one experiment out of three) and percentages of DCs and LCs derived from $CD34^+CD45RA^+CD7^-$ and $CD34^+CD45RA^+CD7^+$ HPCs are indicated (mean ± SEM, $n = 3$). **(C)** Histograms represent cell growth under DC condition reported to 10^4 cells seeded at day 0. BFU/CFU-E, erythroid burst and colony forming units; CFCs, colony forming cells; LCs, Langherans cells.

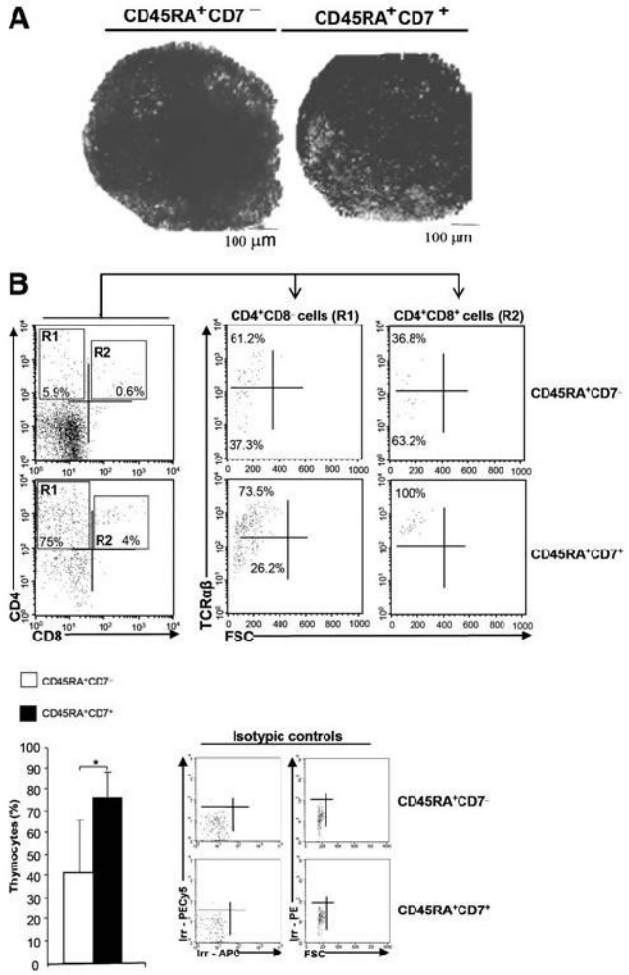


FIG. 7. T-cell differentiation potential of $CD34^+CD45RA^+CD7^-$ and $CD34^+CD45RA^+CD7^+$ HPCs. **(A)** Ex vivo thymus colonization assay of $CD34^+CD45RA^+CD7^-$ and $CD34^+CD45RA^+CD7^+$ HPCs. Cells were labeled with CFSE and cultured for 48 h in hanging drops in the presence of NOG fetal thymic lobes (500 cells/lobe) before analysis by two-photon excitation confocal microscopy. *Bright spots* correspond to CFSE staining (original magnification 25×). **(B)** Co-culture with MS5 and DL-1: sorted $CD34^+CD45RA^+CD7^-$ and $CD34^+CD45RA^+CD7^+$ cells were cultured for 4 weeks onto MS5 in the presence of exogenously added DL-1, SCF, Flt3-L, and IL-7 before FACS analysis. Cells gated on $CD4^+CD8^-$ (R1) and $CD4^+CD8^+$ (R2) cells were further analyzed (data are from one of three experiments). Histograms represent percentages of thymocytes obtained from either $CD34^+CD45RA^+CD7^-$ or $CD34^+CD45RA^+CD7^+$ HPCs (mean ± SEM, $n=3$, $^*P<0.05$). DL-1, Delta-like-1.

we confirmed that $CD45RA^+CD7^+$ HPCs disclosed a better capacity to generate $CD4^+CD8^+$ thymocytes, which were $TCR\alpha\beta^-$ in comparison to $CD45RA^+CD7^-$ HPCs that did not generate $CD4^+CD8^+$ thymocytes (Supplementary Fig. S4), UCB-derived $CD34^+$ HPCs were used as a positive control of T-cell differentiation (Supplementary Fig. S5). Finally, no $TCR\gamma\delta^+$ thymocytes could be detected in our experimental procedure (not shown). Altogether, these results demonstrate that $CD45RA^+CD7^+$ HPCs are preferentially endowed with a T-cell differentiation potential.

Discussion

This work gives new insights into the early steps of lymphopoiesis from human ESCs. Using the EB culture system followed by co-culture on MS5 stromal cells and based on the expression of CD34, CD45RA, and CD7 markers, we demonstrated here the development of two populations of ESC-derived $CD34^+$ early multi-lymphoid progenitors: the $CD45RA^+CD7^-$ and $CD45RA^+CD7^+$ cells, both of which expressed CD10 and CD62L cell surface markers and typical early lymphoid lineage genes such as *IKAROS*, *CD127*, *RAG1, RAG2,* and *DNTT*. Interestingly, $CD45RA^+CD7^-$ HPCs expressed B-cell-lineage associated genes such as *PAX5, CD79a*. Thus we cannot exclude that among the $CD45RA^+CD7^-$ HPCs, more committed HPCs such as $CD10^+(CD19^-)$ (Fig. 2C), which correspond to the phenotypic homologues of UCB and BM-derived $CD45RA^+CD10^+Lin^-$ multipotent early pro-B cells [5,7,8], might probably contribute to the substantial B-cell differentiation potential supported by the ESC-derived $CD45RA^+CD7^-$ HPCs. On the other hand, $CD45RA^+CD7^+$ HPCs express T-cell-lineage associated genes such as *Pre-Tα*, *TRGC1*, and *TRBC2*. It seems that the rearrangement machinery is operational in $CD45RA^+CD7^-$ and $CD45RA^+CD7^+$ HPCs, as we detected an increased expression of *RAG1* and *RAG2* genes (Fig. 3).

However, the expression of lymphoid-associated genes in $CD45RA^-$ cells (Fig. 3), even at a lower level than in $CD45RA^+$ cells, underlines the fact that ESC-derived $CD45RA^-$ cells correspond to heterogeneous cell populations, an observation in accordance with previous results on their mixed potential obtained from works on adult hematopoiesis [7,10]. Cell populations are never truly homogeneous; individual cells exist in biochemical states that define functional differences between them and qRT-PCR measure gene expression from pools of cells masking heterogeneities within cell populations, which may be important for understanding underlying biological processes. In contrast, single-cell qRT-PCR measurements would be preferable for the population analysis, because the control population being referenced is impure. New technology based on microfluidic arrays combined with multiplexed quantitative polymerase chain reactions now enables high-throughput single-cell gene expression measurement, enabling assessment of cellular heterogeneity [45,46].

Cell cultures under NK, B, and T conditions showed that although $CD45RA^+CD7^-$ and $CD45RA^+CD7^+$ HPCs could generate cells of the three lymphoid lineages, they were skewed toward B and T/NK cell lineages, respectively (Figs. 3–5 and 7).

Particularly, the analysis of the percentage of NK cells derived from $CD45RA^+CD7^-$ and $CD45RA^+CD7^+$ HPCs in limiting dilution analysis enabled the appreciation of the intrinsic NK-cell differentiation potential of these cells and showed that $CD45RA^+CD7^+$ cells exhibited a more important NK-cell differentiation potential than $CD45RA^+CD7^-$ cells. This analysis of the percentage of NK cells obtained from $CD45RA^+CD7^-$ and $CD45RA^+CD7^+$ HPCs gives a qualitative approach of the NK-cell differentiation that enables a

better appreciation of the NK polarization of $CD45RA^+CD7^+$ HPCs in comparison to $CD45RA^+CD7^-$ cells [7]. Furthermore, the analysis of the clonogenic potential enables a quantitative approach of the NK-cell differentiation, which does not necessary lead to an appreciation of the intrinsic lymphoid potential but gives an idea of the proliferative potential of the cells and to what extent one population could be more immature than another (Fig. 4C). The absence of $TCR\gamma\delta^+$ in our T-cell culture (not shown) could be compatible with an instructive role for the TCR in $\alpha\beta$ versus $\gamma\delta$ lineage commitment [47].

Likewise, we showed that $CD45RA^+CD7^+$ HPCs were preferentially recruited into fetal thymic lobes (Fig. 6A). In our hands, ESC-derived MELPs could not generate mature IgM^+ B cells (Supplementary Fig. S2), which is in agreement with the work that Carpenter et al. [48] conducted with induced pluripotent stem cells. Moreover, $CD45RA^+CD7^-$ and $CD45RA^+CD7^+$ MELPs were devoid of erythro-megakaryocytic potential but could differentiate along the myeloid pathway, giving rise to granulo-macrophagic cells and DCs (Figs. 3 and 5) and suggesting, in the model of human ESCs, the close association of myeloid and lymphoid potentials in human MELPs as already described for adult multi-lymphoid progenitors [7,8,10–12]. Interestingly, these two subsets of HPCs could generate LCs without exogenous addition of TGF-β (Fig. 5), strengthening the lymphoid "nature" of $CD45RA^+CD7^-$ and $CD45RA^+CD7^+$ MELPs derived from ESCs [37,49]. Finally, limiting dilution analysis suggested that $CD45RA^+CD7^-$ HPCs are enriched in more immature and proliferative precursors than $CD45RA^+CD7^+$ (Fig. 4). This is also attested by *PU.1* expression (Fig. 3B) and by the fact that $CD45RA^+CD7^+$ HPCs could be derived from $CD45RA^+CD7^-$ cells (Supplementary Fig. S3). Furthermore, it is now clear that human multi-lymphoid progenitors are not lymphoid restricted, and possess myeloid, but not erythro-megakaryocytic potential [7,10,12]. Thus, since no erythro-megakaryocytic gene expressions is detectable in the $CD45RA^-$ cell populations, and because these cells express lower levels of lymphoid-associated genes in comparison to $CD45RA^+$ cell populations (Fig. 3B), we cannot exclude the fact that $CD45RA^-$ cells generated ex vivo from EB cells after a co-culture with MS5 cells could correspond to multipotent progenitors which are specified toward lympho-myeloid lineage and that could be located upstream of $CD45RA^+CD7^-$ and $CD45RA^+CD7^+$ cells.

The potential of human ESCs to differentiate into hematopoietic lineage has been classically demonstrated during EB differentiation or on co-culture with OP9 or S17 BM stromal cell lines. In these conditions, rare data are available regarding the early stages of hemato-lymphopoiesis. Vodyanik et al. performed a detailed analysis of precursors generated from ESCs in OP9 co-culture and described a $CD34^+CD43^+$ population committed toward the lympho-myeloid lineage [21,25]. Although T precursor activity was not addressed, these data suggested that the $CD34^+CD43^+$ population could contain multipotent lympho-hematopoietic progenitors. However, a report by Martin et al. indicated that such HPCs from ESCs did not derive T cells when co-cultured with OP9 cells expressing DL-1 or in fetal thymus organ culture [50]. Later, Timmermans et al. showed that $CD34^{hi}CD43^{lo}$ cells, present in so-called "hematopoietic zones" generated from ESCs when co-cultured on OP9 stromal cells, could differentiate into T-lineage cells when transferred on OP9/DL-1 monolayers [28]. In the EB system, the work by Galic et al. demonstrated that $CD34^+CD45^+$ hematopoietic precursors could efficiently generate thymocytes in the SCID-hu mice model [31]. Furthermore, Kennedy et al. recently identified $CD34^+CD43^{lo/-}$ progenitor populations from EB cells, with characteristics of hemogenic endothelium that along with myeloid and erythroid cells, display the capacity to generate T cells [23]. Nevertheless, the multi-lymphoid potential analysis of these HPCs described by Timmermans et al., Galic et al., and Kennedy et al. along with the characterization of human ESC-$CD34^+CD45RA^+$ HPCs have not been performed [23,28,31]. With regard to B lymphopoiesis, a study by Dravid et al. reported that B-lymphoid potential is defective in $CD34^+$ cells derived directly from day 8 EB cells [51], which underlines that the culture conditions (EB vs. co-culture) and the time of analysis are major criteria to be taken into account to enable ESCs to disclose their lympho-hematopoietic differentiation potential.

Acknowledgments

The authors would like to thank X. Baudin and A. Jobart-Malfait (technological platform ImagoSeine of Institute Jacques Monod, University Paris Diderot, CNRS) for their expert assistance in photonic imaging, F. Pflumio (Inserm U967, Fontenay aux Roses) for the kind gift of MS5/DL-1 stromal cells, M. Point (SFR Andre Lwoff, Villejuif) for technical assistance, E. Oberlin (Inserm U935, Villejuif) for providing RNA from fetal thymocytes, Ph. Duquesnoy (Inserm U933, Hospital Armand Trousseau, Paris) for the primers design and for providing RNA from BM cells, and L. Renou (Inserm U967, Fontenay aux Roses) for informatic assistance. This work was supported by Inserm, Université Paris Sud, Medicen-Paris Region Ile de France (IngeCELL), PRES UniverSud, and the Association NRB (nouvelle recherche biomédicale) Vaincre le cancer.

Author Disclosure Statement

The authors have no conflicting financial interests.

References

1. Katsura Y. (2002). Redefinition of lymphoid progenitors. Nat Rev Immunol 2:127–132.
2. Laiosa CV, M Stadtfeld and T Graf. (2006). Determinants of lymphoid-myeloid lineage diversification. Annu Rev Immunol 24:705–738.
3. Blom B and H Spits. (2006). Development of human lymphoid cells. Annu Rev Immunol 24:287–320.
4. Ezine S, L Gautreau, A Parcelier and B Canque. (2009). Developmental biology of mammalian T-cell progenitors: from early lymphoid progenitors to thymus-colonizing cells. In: *Hematopoietic Stem Cell Biology*. Kondo M, ed. Springer Science & Business Media, New York. pp. 83–116.
5. Galy A, M Travis, D Cen and B Chen. (1995). Human T, B, natural killer, and dendritic cells arise from a common bone marrow progenitor cell subset. Immunity 3:459–473.

6. Hao QL, EM Smogorzewska, LW Barsky and GM Crooks. (1998). In vitro identification of single CD34+CD38− cells with both lymphoid and myeloid potential. Blood 91:4145–4151.
7. Haddad R, P Guardiola, B Izac, C Thibault, J Radich, AL Delezoide, C Baillou, FM Lemoine, JC Gluckman, F Pflumio and B Canque. (2004). Molecular characterization of early human T/NK and B-lymphoid progenitor cells in umbilical cord blood. Blood 104:3918–3926.
8. Haddad R, F Guimiot, E Six, F Jourquin, N Setterblad, E Kahn, M Yagello, C Schiffer, I Andre-Schmutz, et al. (2006). Dynamics of thymus-colonizing cells during human development. Immunity 24:217–230.
9. Six EM, D Bonhomme, M Monteiro, K Beldjord, M Jurkowska, C Cordier-Garcia, A Garrigue, L Dal Cortivo, B Rocha, et al. (2007). A human postnatal lymphoid progenitor capable of circulating and seeding the thymus. J Exp Med 204:3085–3093.
10. Doulatov S, F Notta, K Eppert, LT Nguyen, PS Ohashi and JE Dick. (2010). Revised map of the human progenitor hierarchy shows the origin of macrophages and dendritic cells in early lymphoid development. Nat Immunol 11:585–593.
11. Doulatov S, F Notta, E Laurenti and JE Dick. (2012). Hematopoiesis: a human perspective. Cell Stem Cell 10: 120–136.
12. Kohn LA, QL Hao, R Sasidharan, C Parekh, S Ge, Y Zhu, HK Mikkola and GM Crooks. (2012). Lymphoid priming in human bone marrow begins before expression of CD10 with upregulation of L-selectin. Nat Immunol 13:963–971.
13. Thomson JA, J Itskovitz-Eldor, SS Shapiro, MA Waknitz, JJ Swiergiel, VS Marshall and JM Jones. (1998). Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. Science 282:1145–1147.
14. Kaufman DS. (2009). Toward clinical therapies using hematopoietic cells derived from human pluripotent stem cells. Blood 114:3513–3523.
15. Kaufman DS, ET Hanson, RL Lewis, R Auerbach and JA Thomson. (2001). Hematopoietic colony-forming cells derived from human embryonic stem cells. Proc Natl Acad Sci U S A 98:10716–10721.
16. Chadwick K, L Wang, L Li, P Menendez, B Murdoch, A Rouleau and M Bhatia. (2003). Cytokines and BMP-4 promote hematopoietic differentiation of human embryonic stem cells. Blood 102:906–915.
17. Wang L, L Li, F Shojaei, K Levac, C Cerdan, P Menendez, T Martin, A Rouleau and M Bhatia. (2004). Endothelial and hematopoietic cell fate of human embryonic stem cells originates from primitive endothelium with hemangioblastic properties. Immunity 21:31–41.
18. Wang L, P Menendez, C Cerdan and M Bhatia. (2005). Hematopoietic development from human embryonic stem cell lines. Exp Hematol 33:987–996.
19. Keller G. (2005). Embryonic stem cell differentiation: emergence of a new era in biology and medicine. Genes Dev 19:1129–1155.
20. Zambidis ET, B Peault, TS Park, F Bunz and CI Civin. (2005). Hematopoietic differentiation of human embryonic stem cells progresses through sequential hematoendothelial, primitive, and definitive stages resembling human yolk sac development. Blood 106:860–870.
21. Vodyanik MA, JA Thomson and II Slukvin. (2006). Leukosialin (CD43) defines hematopoietic progenitors in human embryonic stem cell differentiation cultures. Blood 108:2095–2105.
22. Kennedy M, SL D'Souza, M Lynch-Kattman, S Schwantz and G Keller. (2007). Development of the hemangioblast defines the onset of hematopoiesis in human ES cell differentiation cultures. Blood 109:2679–2687.
23. Kennedy M, G Awong, CM Sturgeon, A Ditadi, R Lamotte-Mohs, JC Zuniga-Pflucker and G Keller. (2012). T lymphocyte potential marks the emergence of definitive hematopoietic progenitors in human pluripotent stem cell differentiation cultures. Cell Rep 2:1722–1735.
24. Tavian M and B Peault. (2005). Embryonic development of the human hematopoietic system. Int J Dev Biol 49:243–250.
25. Vodyanik MA, JA Bork, JA Thomson and II Slukvin. (2005). Human embryonic stem cell-derived CD34+ cells: efficient production in the coculture with OP9 stromal cells and analysis of lymphohematopoietic potential. Blood 105:617–626.
26. Woll PS, CH Martin, JS Miller and DS Kaufman. (2005). Human embryonic stem cell-derived NK cells acquire functional receptors and cytolytic activity. J Immunol 175:5095–5103.
27. Galic Z, SG Kitchen, A Kacena, A Subramanian, B Burke, R Cortado and JA Zack. (2006). T lineage differentiation from human embryonic stem cells. Proc Natl Acad Sci U S A 103:11742–11747.
28. Timmermans F, I Velghe, L Vanwalleghem, M De Smedt, S Van Coppernolle, T Taghon, HD Moore, G Leclercq, AW Langerak, et al. (2009). Generation of T cells from human embryonic stem cell-derived hematopoietic zones. J Immunol 182:6879–6888.
29. Tseng SY, KP Nishimoto, KM Silk, AS Majumdar, GN Dawes, H Waldmann, PJ Fairchild, JS Lebkowski and A Reddy. (2009). Generation of immunogenic dendritic cells from human embryonic stem cells without serum and feeder cells. Regen Med 4:513–526.
30. Woll PS, B Grzywacz, X Tian, RK Marcus, DA Knorr, MR Verneris and DS Kaufman. (2009). Human embryonic stem cells differentiate into a homogeneous population of natural killer cells with potent in vivo anti-tumor activity. Blood 113:6094–6101.
31. Galic Z, SG Kitchen, A Subramanian, G Bristol, MD Marsden, A Balamurugan, A Kacena, O Yang and JA Zack. (2009). Generation of T lineage cells from human embryonic stem cells in a feeder free system. Stem Cells 27:100–107.
32. Larbi A, JM Gombert, C Auvray, B L'Homme, A Magniez, O Feraud, L Coulombel, A Chapel, MT Mitjavila-Garcia, et al. (2012). The HOXB4 homeoprotein promotes the ex vivo enrichment of functional human embryonic stem cell-derived NK cells. PLoS One 7:e39514.
33. Itoh K, H Tezuka, H Sakoda, M Konno, K Nagata, T Uchiyama, H Uchino and KJ Mori. (1989). Reproducible establishment of hemopoietic supportive stromal cell lines from murine bone marrow. Exp Hematol 17:145–153.
34. Issaad C, L Croisille, A Katz, W Vainchenker and L Coulombel. (1993). A murine stromal cell line allows the proliferation of very primitive human CD34++/CD38− progenitor cells in long-term cultures and semisolid assays. Blood 81:2916–2924.
35. Vandesompele J, K De Preter, F Pattyn, B Poppe, N Van Roy, A De Paepe and F Speleman. (2002). Accurate

normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. Genome Biol 3:RESEARCH0034.
36. Souaze F, A Ntodou-Thome, CY Tran, W Rostene and P Forgez. (1996). Quantitative RT-PCR: limits and accuracy. Biotechniques 21:280–285.
37. Canque B, S Camus, A Dalloul, E Kahn, M Yagello, C Dezutter-Dambuyant, D Schmitt, C Schmitt and JC Gluckman. (2000). Characterization of dendritic cell differentiation pathways from cord blood CD34(+)CD7(+) CD45RA(+) hematopoietic progenitor cells. Blood 96:3748–3756.
38. Armstrong F, P Brunet de la Grange, B Gerby, MC Rouyez, J Calvo, M Fontenay, N Boissel, H Dombret, A Baruchel, et al. (2009). NOTCH is a key regulator of human T-cell acute leukemia initiating cell activity. Blood 113:1730–1740.
39. Gerby B, E Clappier, F Armstrong, C Deswarte, J Calvo, S Poglio, J Soulier, N Boissel, T Leblanc, et al. (2011). Expression of CD34 and CD7 on human T-cell acute lymphoblastic leukemia discriminates functionally heterogeneous cell populations. Leukemia 25:1249–1258.
40. Calvo J, A BenYoucef, J Baijer, MC Rouyez and F Pflumio. (2012). Assessment of human multi-potent hematopoietic stem/progenitor cell potential using a single in vitro screening system. PLoS One 7:e50495.
41. Berardi AC, E Meffre, F Pflumio, A Katz, W Vainchenker, C Schiff and L Coulombel. (1997). Individual CD34+ CD38lowCD19−CD10− progenitor cells from human cord blood generate B lymphocytes and granulocytes. Blood 89:3554–3564.
42. Robin C, F Pflumio, W Vainchenker and L Coulombel. (1999). Identification of lymphomyeloid primitive progenitor cells in fresh human cord blood and in the marrow of nonobese diabetic-severe combined immunodeficient (NOD-SCID) mice transplanted with human CD34(+) cord blood cells. J Exp Med 189:1601–1610.
43. Ravet E, A Dubart-Kupperschmitt, C Robin, M Titeux, L Coulombel and F Pflumio. (2002). Successful transduction of human multipotent, lymphoid (T, B, NK) and myeloid, and transplantable CD34+CD38low cord blood cells using a murine oncoretroviral vector. J Hematother Stem Cell Res 11:327–336.
44. Klimchenko O, M Mori, A Distefano, T Langlois, F Larbret, Y Lecluse, O Feraud, W Vainchenker, F Norol and N Debili. (2009). A common bipotent progenitor generates the erythroid and megakaryocyte lineages in embryonic stem cell-derived primitive hematopoiesis. Blood 114: 1506–1517.
45. McDavid A, G Finak, PK Chattopadyay, M Dominguez, L Lamoreaux, SS Ma, M Roederer and R Gottardo. (2013). Data exploration, quality control and testing in single-cell qPCR-based gene expression experiments. Bioinformatics 29:461–467.
46. Guo G, S Luc, E Marco, TW Lin, C Peng, MA Kerenyi, S Beyaz, W Kim, J Xu, et al. (2013). Mapping cellular hierarchy by single-cell analysis of the cell surface repertoire. Cell Stem Cell 13:492–505.
47. Joachims ML, JL Chain, SW Hooker, CJ Knott-Craig and LF Thompson. (2006). Human alpha beta and gamma delta thymocyte development: TCR gene rearrangements, intracellular TCR beta expression, and gamma delta developmental potential—differences between men and mice. J Immunol 176:1543–1552.
48. Carpenter L, R Malladi, CT Yang, A French, KJ Pilkington, RW Forsey, J Sloane-Stanley, KM Silk, TJ Davies, et al. Human induced pluripotent stem cells are capable of B-cell lymphopoiesis. Blood 117:4008–4011.
49. Dalloul AH, C Patry, J Salamero, B Canque, F Grassi and C Schmitt. (1999). Functional and phenotypic analysis of thymic CD34+CD1a− progenitor-derived dendritic cells: predominance of CD1a+ differentiation pathway. J Immunol 162:5821–5828.
50. Martin CH, PS Woll, Z Ni, JC Zuniga-Pflucker and DS Kaufman. (2008). Differences in lymphocyte developmental potential between human embryonic stem cell and umbilical cord blood-derived hematopoietic progenitor cells. Blood 112:2730–2737.
51. Dravid G, Y Zhu, J Scholes, D Evseenko and GM Crooks. (2011). Dysregulated gene expression during hematopoietic differentiation from human embryonic stem cells. Mol Ther 19:768–781.

Address correspondence to:
Dr. Rima Haddad
Inserm UMR 935
"ESTeam Paris Sud"
Stem Cell Core Facility SFR André Lwoff
Paul Brousse Hospital
University Paris Sud
Bâtiment A/Campus CNRS
7 rue Guy Moquet
94801 Villejuif
France

E-mail: rima.haddad@u-psud.fr

Received for publication April 3, 2014
Accepted after revision June 21, 2014
Prepublished on Liebert Instant Online June 23, 2014

Hindawi Publishing Corporation
Stem Cells International
Volume 2014, Article ID 939275, 13 pages
http://dx.doi.org/10.1155/2014/939275

Research Article

Long-Term Quantitative Biodistribution and Side Effects of Human Mesenchymal Stem Cells (hMSCs) Engraftment in NOD/SCID Mice following Irradiation

Sabine François,[1,2] Benoit Usunier,[1] Luc Douay,[2] Marc Benderitter,[1] and Alain Chapel[1]

[1] *PRP-HOM, SRBE, Laboratory of Radiopathology and Experimental Therapy, Radiological Protection and Human Health Division, Institute of Radiological Protection and Nuclear Safety, 92260 Fontenay-aux-Roses, France*
[2] *UMRS 938 Department of Hematology, Saint Antoine Hospital APHP and UPMC University, 75012 Paris, France*

Correspondence should be addressed to Sabine François; sabine.francois@irba.fr and Alain Chapel; alain.chapel@irsn.fr

Received 2 May 2013; Revised 21 November 2013; Accepted 22 November 2013; Published 11 February 2014

Academic Editor: Mauro Krampera

Copyright © 2014 Sabine François et al. This is an open access article distributed under the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

There is little information on the fate of infused mesenchymal stem cells (MSCs) and long-term side effects after irradiation exposure. We addressed these questions using human MSCs (hMSCs) intravenously infused to nonobese diabetic/severe combined immunodeficient (NOD/SCID) mice submitted to total body irradiation (TBI) or local irradiation (abdominal or leg irradiation). The animals were sacrificed 3 to 120 days after irradiation and the quantitative and spatial distribution of hMSCs were studied by polymerase chain reaction (PCR). Following their infusion into nonirradiated animals, hMSCs homed to various tissues. Engraftment depended on the dose of irradiation and the area exposed. Total body irradiation induced an increased hMSC engraftment level compared to nonirradiated mice, while local irradiations increased hMSC engraftment locally in the area of irradiation. Long-term engraftment of systemically administered hMSCs in NOD/SCID mice increased significantly in response to tissue injuries produced by local or total body irradiation until 2 weeks then slowly decreased depending on organs and the configuration of irradiation. In all cases, no tissue abnormality or abnormal hMSCs proliferation was observed at 120 days after irradiation. This work supports the safe and efficient use of MSCs by injection as an alternative approach in the short- and long-term treatment of severe complications after radiotherapy for patients refractory to conventional treatments.

1. Introduction

Multipotent stromal cells, also named mesenchymal stromal cells or mesenchymal stem cells (MSCs), have been identified in the bone marrow as multipotent progenitor cells that differentiate into osteocytes, chondrocytes, adipocytes, and stromal cells [1, 2]. In human, the use of MSCs is being tested for tissue remodelling including cardiovascular repair, treatment of lung fibrosis, spinal cord injury, and bone and cartilage repair; for review see [3, 4]. Regarding radio-induced lesion studies showed engraftment of MSCs at the site of injury [5–7] and repair to damaged tissues [8–11] but no one evaluated the long-term MSC engraftment. MSCs biodistribution has been studied in animal [12]; however, only one report described human MSC (hMSC) engraftment in human. The amount of MSCs detected in most tissues is exceedingly low and transitory. A low level of MSCs donor DNA was identified in bone marrow in some patients [13, 14]. Von Bahr et al. examined autopsies and tissue samples of patients treated with MSC infusions to assess MSC engraftment and examine the risk of tumour and/or ectopic tissue formation. Among the fifteen patients available for PCR analysis, long-term engraftment of MSCs appeared to be low due to rejection by the recipient immune system or an inability of MSCs to survive and engraft after intravenous infusion. MSC injections did not induce side effects [15]. Finally, in spite of successful clinical trials using MSCs, there is few data concerning the long-term engraftment and side effects after MSC systemic injections; transplanted stem cells must not form teratomas or undergo transformation and they must not promote tumour recurrence.

Clinical trials using MSCs in accidental irradiation [16], late severe damage of irradiation [17, 18], or radiotherapy

[19, 20] of breast cancer allowed for tissue regeneration when other therapies failed [21]. There is more to consider than radiation induced DNA damage and long-term inhibition of growth of exposed cells mediated by P53 and other pathways. P53 activation stops cell growth long enough to repair the DNA damage. MSC therapy allows cells to continue to repair the tissue over the short term [22]. The long-term consequences of this "repair" are not known. Allowing the cells to progress through cell cycle with a damaged DNA template will result in severe long-term consequences including cancer induction. In this report we have investigated the long-term effect of hMSCs injected just after irradiation. We describe a xenogeneic experimental transplant model that we built to evaluate the full long-term potential of hMSC engraftment after intravenous injection and to examine the risk of tumour in irradiated tissues and ectopic tissue formation. We have tested at long-term period after irradiation (120 days) whether MSCs engraftment depends of the configuration irradiation and could induce any abnormalities, neoplastic tissue, or uncontrolled cell proliferation.

We used NOD/SCID mice to evaluate the engraftment of hMSCs in irradiated tissues. Our results showed that local irradiation increased engraftment with a direct correlation with the dose of irradiation and modified the biodistribution of hMSCs in tissues. We observed a long-term engraftment in some organs and no side effects of hMSCs over a long-time period in irradiated tissues. We believe that these observations are relevant to several clinical situations such as total body irradiation given as a pretransplant conditioning regimen, radiotherapy for the treatment of cancer, and accidental irradiation, in promoting the use of MSC infusion as part of the therapeutic scheme for the treatment of radiation side effects after radiotherapy in the short and long term.

2. Materials and Methods

Isolation, Purification, and Expansion of hMSCs. Bone marrow cells were obtained from iliac crest aspirates from healthy volunteers after informed consent and were used in accordance with the procedures approved by the Human Experimentation and Ethic Committees of Hospital St Antoine as previously described [6, 7].

hMSC Infusion into NOD/SCID Mouse Model. All experiments and procedures were carried out in accordance with the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals as published by the US National Institutes of Health (NIH Publications Numbers 85-23, revised 1996), with European Directives (86/609/CEE), in compliance with the French Ministry of Agriculture Regulations for Animal Experimentation (Act reference 87-847, October 19, 1987, modified May 2001), and approved by the Local Ethical Committee (P04-07). NOD-LtSz-scid/scid (NOD/SCID) mice from breeding pairs originally purchased from Jackson Laboratory (Bar Harbor, ME, USA) were bred in our pathogen-free unit and maintained in sterile microisolator cages. A total of 134 eight-week-old male mice, divided in 4 groups, were used for this study. Group 1 was not irradiated before receiving 2.5 millions of hMSC intravenously (10 mice). Group 2 received local irradiation to the right posterior leg from 15 to 25 Gray (28 mice). Group 3 received local irradiation to the abdomen at a dose of 8.5 Gray (36 mice). Group 4 received TBI at a sublethal dose of 3.5 Gray (50 mice). Irradiations were performed as previously described [6]. Groups 2, 3, and 4 received intravenous hMSC infusion, 24 hours after irradiation. Animals were sacrificed from 3 to 120 days after irradiation and the quantitative and spatial distribution of the hMSC was studied through PCR and immunohistological analyses. Peripheral blood, bone marrow (femur), heart, lungs, liver, kidneys, spleen, stomach, gut, brain, right leg, quadriceps muscles, tibias, and skin were collected. Second-passage hMSCs were collected for infusion; the rates of viability to blue trypan were of 98%.

Detection and Quantitative Analysis of Engrafted hMSCs, DNA Extraction, and PCR Analysis. Human cells (hMSCs) in mouse tissues were detected as previously described by François et al. The biological samples were submitted to DNA extraction and PCR analysis to detect the presence of human cells in mouse recipients. Genomic DNA for PCR analysis was prepared from tissues using the QIAamp DNA Mini Kit, Qiagen. Amplification of human beta-globin gene was used to quantify the amount of human DNA in each sample of mouse tissue after DNA extraction. Endogenous mouse RAPSYN gene (Receptor-Associated Protein at the Synapse) was also amplified, as an internal control. Absolute standard curves were generated for the human beta-globin and mouse RAPSYN genes. Evaluation of human specificity of human beta-globin amplification was demonstrated using tenfold dilution between 100 ng and 0.05 ng of hMSC DNA with mouse DNA, without cross-reactivity, to quantify human cells in mouse tissue. One hundred nanograms of purified DNA from various tissues was amplified using TaqMan universal PCR master mix (Applied Biosytems). The primers and probe for human beta-globin were forward primer 5′GTGCACCTGACTCCTGAGGAGA3′ and reverse primer 5′CCTTGATACCAACCTGCCCAGG3′; the probe labelled with fluorescent reporter and quencher was 5′FAM-AAGGTGAACGTGGATGAAGTTGGTGG-TAMRA-3′. The primers and probe for mouse RAPSYN gene were forward primer 5′ACCCACCCATCCTGCAAAT3′ and reverse primer 5′ACCTGTCCGTGCTGCAGAA3′; the probe labelled with fluorescent reporter and quencher was 5′FAM-CGGTGCCAGTGATGAGGTTGGTC-TAMRA-3′.

2.1. Immunohistochemistry. To assess the tissue architectural changes induced by exposure to ionizing radiation, we performed a histological study of all organs collected and analyzed by PCR.

Before each sampling, the NOD/SCID mice were anesthetized by an intraperitoneal injection of 350 of Imlagen/Rompun solution (350 μL). Blood is collected directly by intracardiac punction and the animals were perfused with saline solution to remove blood from the organs. Each organ is divided into two parts: one that will be incubated 12 hours in a solution of 4% paraformaldehyde (for histological study)

and the other part will be stored in 1 mL of RNAlater buffer at −20°C (for PCR analysis).

One half of each tissue was used for PCR and immunohistology. For histological study, samples were fixed for 12 hours in 4% paraformaldehyde.

Following paraformaldehyde fixation, the organs were rinsed with distilled water and dehydrated. Tissues were sectioned at 5 μm on a rotary microtome (LEICA). For immunohistochemical staining of the paraffin embedded samples, microtomed sections were deparaffinized in xylene and rehydrated though ethanol baths and PBS 1x. The sections were dip into PBS-triton (0.1x) in order to increase tissue permeability. After being rinsed with distilled water, the sections were digested with 2% trypsin for 30 minutes resulting in the endogenous biotin being blocked. The polyclonal anti-beta-2-microglobulin antibody (product NCL-B2Mp, Novocastra) was added at a dilution of 1 : 50. Negative controls were incubated with rabbit IgG diluted to 1 : 100. Detection of bound primary antibody was carried out with biotinylated secondary antibody. The biotinylated anti-rabbit IgG secondary antibody was diluted to 1 : 200 in PBS 1x and incubated for 8 minutes. The immunoreactivity was performed using alkaline phosphatase reaction with a FARED substrate detection kit for 30 minutes. For antibody detection we used the Ventana kit, followed by counterstaining with hemalun for 4 minutes. This procedure was performed using NexES special staining automation system to ensure reproducibility. On successive sections we carried out a hematoxylin-eosin-saffron (HES) staining of paraffined slides that was performed on all tissues collected at 3 and 15 days after TBI. For a global vision of morphology and tissue damage, the observation of HES-stained section (5 μm) of splenic biopsies has been realized by using normal brightfield microscopy. Every 25 μm, one section is colored by HES staining. In general, 5 or 7 sections of tissue were analyzed for each animal. Each section was observed by microscopy in its entirety with objective ×20. The cell depletion is determined by the decrease of blue purple chromatin intensity. Color intensity could be quantified by Histolab software. All spleens (10 per group) were collected and analyzed by microscopy. All HES-stained sections have been performed at the same time to avoid seeing the differences in color intensity. The chromatin intensity is measured with 5 random areas per tissue section.

3. Results

hMSCs implanted in mouse tissues were detected by PCR of the for human β-gene globin. Human DNA accounted for engraftment. Results are expressed as the number of mice (or percentage) with an hMSC implantation in an organ (PCR positive for the gene for human β-globin) in comparison to the total number of mice injected with hMSCs. Day 0 the hMSC biodistribution kinetics corresponds to the day of irradiation. hMSCs were intravenously injected 24 hours after irradiation. The control (named sham) consists in nonirradiated mice injected with $5 \cdot 10^6$ hMSCs.

Table 1: hMSC engraftment in nonirradiated mice 3 days after injection.

Organs	Number of positive mice for 10 mice
Brain	10/10 (100%)
Heart	5/10 (50%)
Lung	10/10 (100%)
Liver	10/10 (100%)
Spleen	10/10 (100%)
Abdominal area	
Kidney	10/10 (100%)
Muscle	0/10 (0%)
Stomach	9/10 (90%)
Duodenum	2/10 (20%)
Jejunum	10/10 (100%)
Ileum	1/10 (10%)
Cecum	1/10 (10%)
Proximal colon	1/10 (10%)
Distal colon	1/10 (10%)
Posterior leg	
Skin	1/10 (10%)
Muscle	4/10 (40%)
Bone	3/10 (30%)
Bone marrow	10/10 (100%)
Blood	3/10 (30%)
Number of positive organs	102/190
Frequency	54%

Human DNA accounted for engraftment. hMSCs implanted in mouse tissues were detected by PCR of the gene for human β-globin. The rate of implantation of human cells was determined on a series of non-irradiated mice grafted with hMSC injection at $5{\cdot}10^6$ cells per mouse. The percentages represent the ratio of positive mice for the presence of human β-globin on the total number of mice analyzed.

Infused hMSCs Are Present for a Short-Time Period in Nonirradiated NOD/SCID Mice Tissues (Table 1). A preliminary experiment was conducted to determine in which organs hMSCs home in nonirradiated animals. The rate of implantation of human cells was determined on a series of nonirradiated mice injected with $5 \cdot 10^6$ hMSCs (sham animals). The percentages represent the ratio of positive mice for one organ for the presence of human β-globin over the total number of mice analyzed. Human DNA (PCR analysis) accounted for engraftment of hMSCs following their infusion into nonirradiated animals in various tissues. The qualitative study of MSC engraftment in sham mice is shown in Table 1. Three days after injection, without irradiation, hMSCs isolated from human bone marrow migrated to murine bone marrow (10 mice PCR positive for the gene for human β-globin on 10 mice, 100%). Without irradiation, lung, brain, liver, and spleen appeared to be a preferential site of migration for the injected human cells. Human cells were detected only in 20% of animals whose peripheral blood was analyzed.

Table 2: hMSC biodistribution in function of the irradiation dose 6 weeks after local irradiation of the right posterior leg at 15 to 25 Gy.

Organs (positive per mice)	Dose of irradiation		
	15 Gy	20 Gy	25 Gy
Brain	0/8 (0%)	4/10 (40%)	8/8 (100%)
Heart	6/8 (75%)	0/6 (0%)	8/8 (100%)
Lung	2/6 (33%)	4/10 (40%)	8/8 (100%)
Liver	0/8 (0%)	6/8 (75%)	8/8 (100%)
Spleen	0/8 (0%)	5/10 (50%)	8/8 (100%)
Abdominal area			
Kidney	2/6 (33%)	6/10 (60%)	8/8 (100%)
Muscle	2/8 (25%)	0/6 (0%)	6/8 (75%)
Stomach	0/8 (0%)	6/10 (60%)	8/8 (100%)
Duodenum	0/8 (0%)	10/10 (100%)	8/8 (100%)
Jejunum	0/6 (0%)	0/10 (0%)	6/8 (75%)
Ileum	0/8 (0%)	4/10 (40%)	6/8 (75%)
Cecum	0/8 (0%)	4/10 (40%)	6/8 (75%)
Proximal colon	0/8 (0%)	4/10 (40%)	6/8 (75%)
Colon distal	0/8 (0%)	4/10 (40%)	6/8 (75%)
Posterior leg			
Skin	0/8 (0%)	4/10 (40%	6/8 (75%)
Muscle	0/8 (0%)	1/8 (12.5%)	8/8 (100%)
Bone	1/8 (12.5%)	3/8 (38%)	8/8 (100%)
Bone marrow	2/6 (33%)	5/10 (50%)	6/8 (75%)
Number of positive organs	15/136	70/166	128/144
Frequency	11%	42%	89%

Results are expressed as the number of mice (or percentage) with hMSC implantation in an organ (PCR positive for the gene for human β-globin) in comparison to the total number of mice injected with hMSCs. Day 0 of the kinetics of hMSC biodistribution corresponds to the day of irradiation. hMSCs were intravenously injected 24 hours after irradiation. hMSCs appear to migrate preferentially in the organs of the irradiated area; their implantation rate seems to be dose-dependent in these organs. hMSCs were not found in blood; $n = 10$ (data are not shown).

hMSC Engraftment Is Related to the Irradiation Dose (Table 2). The biodistribution was investigated in function of the dose of irradiation 6 weeks after a local irradiation of the right posterior leg at 15 to 25 Gy.

hMSCs appeared to migrate preferentially in the organs of the irradiated area; their implantation rate seemed to be dose-dependent in these organs. For example, in bone, the percentage of hMSC engraftment varied from 12.5% at 15 Gy to 38% at 20 Gy and finally 100% of injected mice at 25 Gy.

These human cells also migrated in organs outside of the irradiated area such as kidneys. The site and frequency of implantation seem to be dose-dependent.

Configurations of Irradiation Modify Long-Term Biodistribution of hMSCs in Organs (Table 3, Figure 1). Table 3 summarizes the levels of hMSC engraftment after abdominal irradiation. Mice received localized irradiation to the abdomen. Sixty days after abdominal irradiation, very few mice were positive for human DNA. Biodistribution of human cells is maximum at 15 days. hMSC engraftment was detectable from 3 days after irradiation to at least 60 days. hMSC engraftment varies from 12% of organs at day 3 (D3), 54% on D15, 51% on D30, to 17% at day 60. The homing of human cells appeared to increase up to day 15 or day 30 depending on organs and then decreased with time. After abdominal irradiation, hMSCs appeared to preferentially migrate into the lungs, liver, kidneys, and spleen. For these organs, more than 50% of the animals were positive for the presence of the human gene at 2 and 4 weeks after irradiation. Injected human cells also colonized the abdominal muscles, the heart, liver, stomach, jejunum, quadriceps, bone (femur), and bone marrow but more moderately. For these organs, 35 to 50% of animals were positive for the presence of hMSCs. However very few hMSCs were engrafted in other parts of the intestine and the skin; for these organs less than 20% of the animals were positive for the presence of hMSCs.

Abdominal irradiation as compared to total body irradiation (TBI) modifies hMSC engraftment in the exposed area, that is, biodistribution. Abdominal irradiation increases hMSC engraftments from 3 to 60 days in stomach, duodenum, jejunum, and ileum and decreases engraftment in cecum and colon. Conversely, neither localized irradiation nor TBI modified hMSC engraftment in lung.

hMSC Implantation Increases during the First Two Weeks after Total Body Irradiation (TBI) and Persists for a Long-Time Period in Lung and Liver (Table 4, Figure 1). hMSC implantation (human DNA) was detectable in lung 24 hours after intravenous injection of human cells in lung.

Day 3 after-TBI, hMSCs were localized in heart, lung, liver, muscle (abdominal), stomach, and intestine (duodenum and jejunum, distal colon). They were not detectable

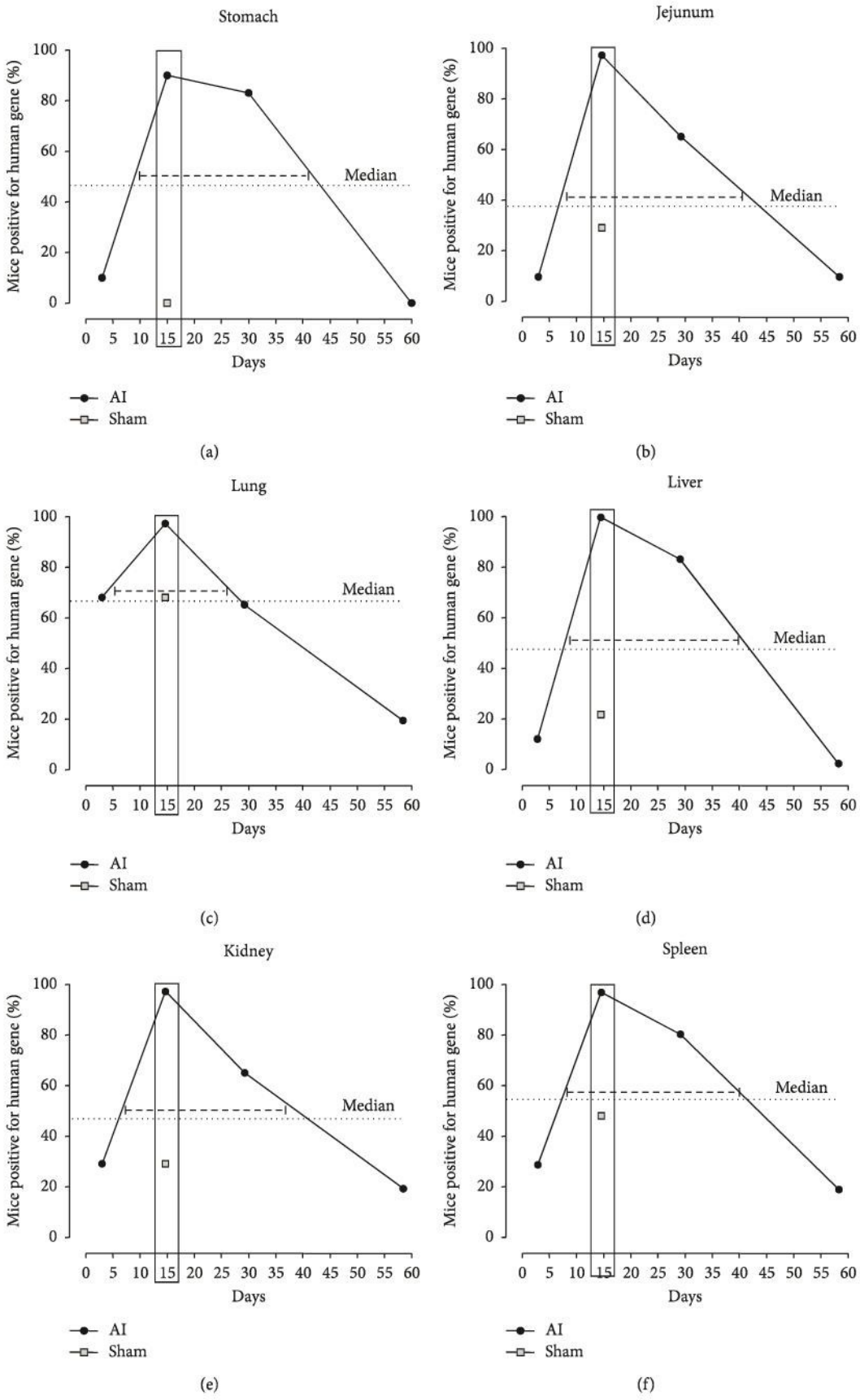


Figure 1: Continued.

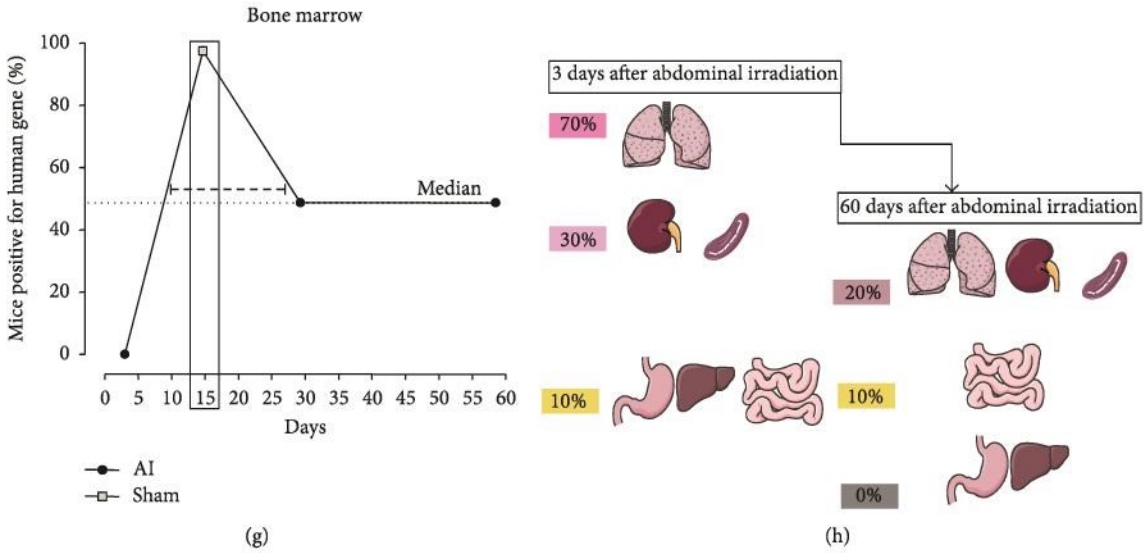


FIGURE 1: Kinetics of implantation of hMSCs during 60 days after abdominal irradiation. The percentage of positive mice for the human β-globin gene detected by PCR (AI) has been calculated after abdominal irradiation (AI). The human gene has been detected in (a) stomach, (b) jejunum, (c) lungs, (d) liver, (e) kidney, (f) spleen, and (g) bone marrow. The tissues were collected at 3, 15, 30, and 60 days after acute AI. The percentages represent the ratio (number of positive mice for the human beta-globin presence divided by total number of animals tested). At each analysis time, each group consisted of 10 animals. The control (named sham) consists in nonirradiated mice injected with $5 \cdot 10^6$ hMSCs. The dotted line represents the median of the positive animal percentage during the 60 days after radiation exposure. (h) Illustration of anatomical variations in the presence of MSC after acute abdominal radiation.

in the bone marrow until day 7. hMSCs isolated from bone marrow did not seem to preferentially colonize their tissue of origin in xenogeneic mouse model.

Day 7 after-TBI, hMSCs appeared to preferentially colonize the lung (100%), spleen, stomach, and heart (75%). hMSCs were still present in muscle (50%) and distal colon (25%). HMSCs started to engraft in bone (25%) and bone marrow (12.5%).

Day 15 was the short-term point at which biodistribution of hMSCs was the largest (Figure 2). The number of tissues in which the gene for human β-globin is present increased during the first two weeks, from 14% on day 3, 28% on day 7, to 47% on day 15. 100% of livers, 75% brain, and 50% of kidneys (see localization in Figures 2(c), 2(d), 2(e), and 2(f)) were positive for human DNA by PCR. hMSCs were implanted in all organs with the exception of the distal colon and ileum. An hMSC circulation was observed in peripheral blood (as illustrated in Figures 2(c), 2(d), and 2(e)) which corresponded to the time when the engraftment was maximum in tissues. The presence of hMSCs in peripheral blood may be due to the dissemination of cells in a large variety of tissues. At 15 days, implantation of hMSCs into muscle was detected in 88% of quadriceps. In the intestine, engraftment was observed in duodenum (33%), jejunum (25%), and proximal colon (38%). The duodenum and proximal colon were the part of the intestine most colonized by hMSCs. Very few skins and bone (femurs) analyzed were positive by PCR, 38% and 12.5% at 15 days, respectively. To localize human cells in engrafted tissues, we performed immunologic experiment using a human beta-2-microglobulin specific antibody. 14 days after hMSC graft, we observed by microscopy that human cells were integrated into functional tissue structures such as vascular endothelial system (VES) of different organs (especially in liver (Figure 3(c)), brain (Figure 3(d)), and kidney (Figures 3(f) and 3(g))) and tissue functional units such as the glomerulus (Figure 3(e)).

Compared to nonirradiated mice, we observed that preferential colonization sites of hMSCs appeared to be modified by radiation exposure. Figure 4 indicates the quantitative engraftment 15 days after irradiation. TBI before hMSC infusion increased the levels of engraftment in brain, hearth, liver (Figure 4(a)) but not all in jejunum compared to nonirradiated mice (sham, Figure 4(b)). Irradiation at local site (abdomen) increased hMSCs implantation not only at the site of local irradiation (Figure 4(b)), but also in distant organs outside the local irradiation field (brain, heart, Figure 4(a)). This suggests mobilization induced by cytokines and potentially specific homing induced by chemokines, all released by inflammation.

At 30 days after-TBI, hMSCs were detected in all types of tissues except the duodenum, ileum, and the skin. Nevertheless, the hMSC biodistribution was more important at D15 (47%) than D30 (34%). After D30, the biodistribution of hMSCs injected was reduced. The number of positive blood analyzed by PCR increased at D30 (57%), suggesting a recirculation of human cells after implantation in the organs. In the intestine, hMSCs were present, in 25% of jejunum, 25% of ileum, 38% of cecum, 43% of proximal colons, and 20% of distal colons analyzed. hMSCs were not detected in the ileum and duodenums analyzed. Over a longer-time period, the duodenum was not the most colonized part of the intestine by MSCs. Although the intestine is a tissue with a rapid renewal,

Table 3: Levels of hMSC engraftment at 4 different time points after abdominal irradiation at 8.5 Gray.

Organs (positive per mice)	Days after irradiation			
	3 days	15 days	30 days	60 days
Brain	4/10 (40%)	10/10 (100%)	2/6 (33%)	1/10 (10%)
Heart	2/10 (20%)	5/10 (50%)	4/6 (67%)	4/10 (40%)
Lung	7/10 (70%)	10/10 (100%)	4/6 (67%)	2/10 (20%)
Liver	1/10 (10%)	10/10 (100%)	5/6 (83%)	0/10 (0%)
Spleen	3/10 (30%)	10/10 (100%)	5/6 (83%)	2/10 (20%)
Abdominal area				
Kidney	3/10 (30%)	10/10 (100%)	4/6 (67%)	2/10 (20%)
Muscle	1/10 (10%)	2/10 (20%)	6/6 (100%)	1/6 (17%)
Stomach	1/10 (10%)	9/10 (90%)	5/6 (83%)	0/8 (0%)
Duodenum	0/10 (0%)	2/10 (20%)	2/6 (33%)	1/10 (10%)
Jejunum	1/10 (10%)	10/10 (100%)	4/6 (67%)	1/10 (10%)
Ileum	1/10 (10%)	1/10 (10%)	2/6 (33%)	1/10 (10%)
Cecum	0/10 (0%)	1/10 (10%)	1/6 (17%)	1/10 (10%)
Proximal colon	0/10 (0%)	1/10 (10%)	2/6 (33%)	3/10 (30%)
Distal colon	0/10 (0%)	1/10 (10%)	2/6 (33%)	2/10 (20%)
Posterior leg (right)				
Skin	0/10 (0%)	1/10 (10%)	0/6 (0%)	0/10 (0%)
Muscle	1/10 (10%)	4/10 (40%)	2/6 (33%)	1/8 (12.5%)
Bone	1/10 (10%)	3/10 (30%)	5/6 (83%)	5/10 (50%)
Bone marrow	0/10 (0%)	10/10 (100%)	3/6 (50%)	4/8 (50%)
Blood	0/10 (0%)	3/10 (30%)	0/6 (0%)	0/10 (0%)
Number of positive organs	23/190	102/190	58/114	31/186
Frequency	12%	54%	51%	17%

The biodistribution of human cells is maximum at 15 days. hMSC engraftment is detectable from 3 days after irradiation to at least 60 days. hMSC engraftment varies from 12% of organs at day 3, 54% on D15, 51% on D30, to 17% at day 60. The homing of human cells appeared to increase up to day 15 and then decreased with time.

MSCs appeared to have incorporated all other sections of the intestine several months after-injection.

The time in which the implantation of hMSCs was optimum varied from one organ to another (Figure 1). The movement of hMSCs in the peripheral blood was maximum at day 30. For stomach, duodenum, and spleen, the highest hMSC implantation was observed at day 7. For bone marrow, muscle, brain, kidneys, liver, lungs, heart, jejunum, and cecum, after TBI, the maximum of hMSC engraftment in mice corresponds to day 15. For bone and skin, the maximum engraftment of hMSCs appeared later at days 60 and 90, respectively. The implantation of human cells appeared to decrease with time between D30 and D90.

hMSCs were detectable at least up to 120 days after injection of human cells in a number of organs. In the long term after TBI, hMSCs preferentially stayed in lung (100%), heart (67%), kidney (67%), muscle (33%), cecum and distal colon (33%), and stomach and bone marrow (17%).

hMSCs Do Not Induce Tissue Abnormality in Irradiated Tissues after Long-Term Injection (Table 5). The trichromatic staining HES was performed on tissue taken between day 3 and day 120 after-irradiation. Histological study on D15 has highlighted that irradiation induced cell depletion in spleen (Figures 1(a) and 1(b)). 120 days after total body irradiation, histological observation of all tissues was done. No abnormality was observed in mice injected with hMSCs. hMSCs did not seem to have anarchical proliferation or any other side effect on tissue structure after long-term engraftment in irradiated mice (see Table 5). After hMSC injections, transplanted stem cells not form teratomas or undergo transformation and did not promote tumour growth. Histological analysis of various radiation-induced tissue damage was performed on all organs collected (heart, lung, liver, kidney, spleen, stomach, whole intestine, muscle and skin of the posterior femur of right leg, and the brain). Long-term histological analysis performed on different parts of the intestine (duodenum, jejunum, ileum, cecum, proximal, and distal colon) from day 3 to day 120 after irradiation revealed that the gut tissue retained its integrity in the early time after total body irradiation. No tumours were found in tissues (defined by neoplastic tissue or uncontrolled cell proliferation). Tissue samples showed no disruption, as defined by tissue discontinuity (e.g., rupture in intestinal epithelial barrier). We did not observe any abnormalities (e.g., inflammatory foci or abnormal cell proliferation). In addition, the size of the intestinal villi had not changed. No tissue damage or structural changes were observed in other

Table 4: Kinetics of hMSC biodistribution after total body irradiation (TBI) at 3.5 Gray.

Organs (positive per mice)	Days after irradiation						
	3 days	7 days	15 days	30 days	60 days	90 days	120 days
Brain	0/10 (0%)	0/10 (0%)	6/8 (75%)	2/6 (33%)	4/8 (50%)	0/8 (0%)	0/6 (0%)
Heart	8/10 (80%)	6/8 (75%)	7/8 (88%)	6/8 (75%)	0/8 (0%)	4/8 (50%)	4/6 (67%)
Lung	4/10 (40%)	10/10 (100%)	8/8 (100%)	6/8 (75%)	0/8 (0%)	3/8 (38%)	6/6 (100%)
Liver	2/10 (20%)	0/10 (0%)	8/8 (100%)	4/7 (57%)	4/8 (50%)	0/8 (0%)	0/6 (0%)
Spleen	0/10 (0%)	6/8 (75%)	5/8 (63%)	4/7 (57%)	4/8 (50%)	2/6 (33%)	0/6 (0%)
Kidney	0/10 (0%)	0/10 (0%)	4/8 (50%)	3/7 (43%)	0/8 (0%)	0/8 (0%)	2/6 (33%)
Abdominal area							
Muscle	2/10 (20%)	5/10 (50%)	2/6 (33%)	0/8 (0%)	0/6 (0%)	4/8 (50%)	2/6 (33%)
Stomach	4/10 (40%)	6/8 (75%)	4/7 (57%)	4/6 (67%)	0/8 (0%)	3/8 (38%)	1/6 (17%)
Duodenum	2/10 (20%)	5/10 (50%)	2/6 (33%)	0/7 (0%)	0/8 (0%)	0/8 (0%)	0/6 (0%)
Jejunum	2/10 (20%)	0/10 (0%)	2/8 (25%)	2/8 (25%)	0/8 (0%)	2/8 (25%)	0/6 (0%)
Ileum	0/10 (0%)	0/10 (0%)	0/8 (0%)	0/8 (0%)	0/8 (0%)	0/8 (0%)	0/6 (0%)
Cecum	0/10 (0%)	0/10 (0%)	3/8 (38%)	3/8 (38%)	0/8 (0%)	2/8 (25%)	2/6 (33%)
Proximal colon	0/10 (0%)	0/10 (0%)	3/8 (38%)	3/7 (43%)	0/8 (0%)	2/8 (25%)	0/6 (0%)
Distal colon	2/10 (20%)	2/8 (25%)	0/8 (0%)	1/5 (20%)	0/8 (0%)	0/8 (0%)	2/6 (33%)
Posterior leg (right)							
Skin	0/10 (0%)	0/10 (0%)	3/8 (38%)	0/6 (0%)	0/8 (0%)	3/8 (38%)	0/6 (0%)
Muscle	0/10 (0%)	5/10 (50%)	7/8 (88%)	2/8 (25%)	4/8 (50%)	0/8 (0%)	0/6 (0%)
Bone	0/10 (0%)	2/8 (25%)	1/8 (12.5%)	0/8 (0%)	4/8 (50%)	2/8 (25%)	0/6 (0%)
Bone marrow	0/10 (0%)	1/8 (12.5%)	5/8 (63%)	3/8 (38%)	0/8 (0%)	0/8 (0%)	1/6 (17%)
Blood	0/10 (0%)	0/10 (0%)	1/8 (12.5%)	4/7 (57%)	0/8 (0%)	0/8 (0%)	0/6 (0%)
Number of positive organs	26/190	48/178	71/151	47/137	40/150	27/150	20/114
Frequency	14%	28%	47%	34%	27%	18%	18%

The time at which the implantation of hMSCs is optimum varies from one organ to another. hMSCs were detectable at least up to 120 days after injection of human cells in a number of organs. Abdominal irradiation as compared to TBI modifies hMSC engraftment in the exposed area. Abdominal irradiation increased hMSC engraftment from 3 to 60 days in the stomach, duodenum, jejunum, and ileum and decreased engraftment in cecum and colon.

organs, 120 days after TBI. Similar results were observed after local irradiation (data is not shown).

4. Discussion

We addressed the question of the potential therapeutic impact of MSC infusion and their potential side effects on tissues in the context of irradiation damage. We investigated the short- and long-term biodistribution of MSCs when infused intravenously (IV) to various tissues in relation to the dose after irradiation. To answer this question, we built a preclinical model in which hMSCs were infused to NOD/SCID mice, without previous irradiation, and following irradiation. Irradiation consisted of local irradiation exposure to the leg (15 to 25 Gray) or abdomen (8.5 Gray) or total body irradiation (3.5 Gray). These configurations induced damage to the exposed tissues as previously reported [6, 7]. Abdominal irradiation induced transient gut damage [9–11] and leg irradiation induced strong ulceration of the skin and muscles [8]. To assess the impact of localized irradiation which induced local damage, one group was subjected to irradiation of the right posterior leg and another group was subjected to irradiation of the abdomen.

In the described experiments following irradiation and hMSC infusion, most of the implanted human cells were found in weakly damaged areas and the frequency of engraftment of hMSCs was proportional to the dose of irradiation. This dose-dependent localization of hMSCs throughout the body after a localized irradiation suggested both unrestricted colonization of hMSCs and the existence of a global body's reaction following radiation exposure with an increased engraftment related to the dose of irradiation.

MSC migration reported here is in agreement with previous reports in radiation-induced multiorgan failure, ischemic brain injury, myocardial infarction, and acute renal failure [12]. In a different set of experiments that we conducted in a nonhuman primate model submitted to mixed gamma-neutron irradiation and infused with green fluorescent protein (GFP) labelled nonhuman primate MSCs, we observed that MSCs engrafted preferentially in regenerating tissues [5]. In NOD/SCID mice, as previously observed, two weeks after combined irradiation, hMSCs migrated to damage area [6, 7]. These results suggest that MSCs may participate in the preservation of the targeted tissues without side effects on irradiated tissues. We have previously published that MSC engraftment in irradiated tissues improves their functional recovery [7–11].

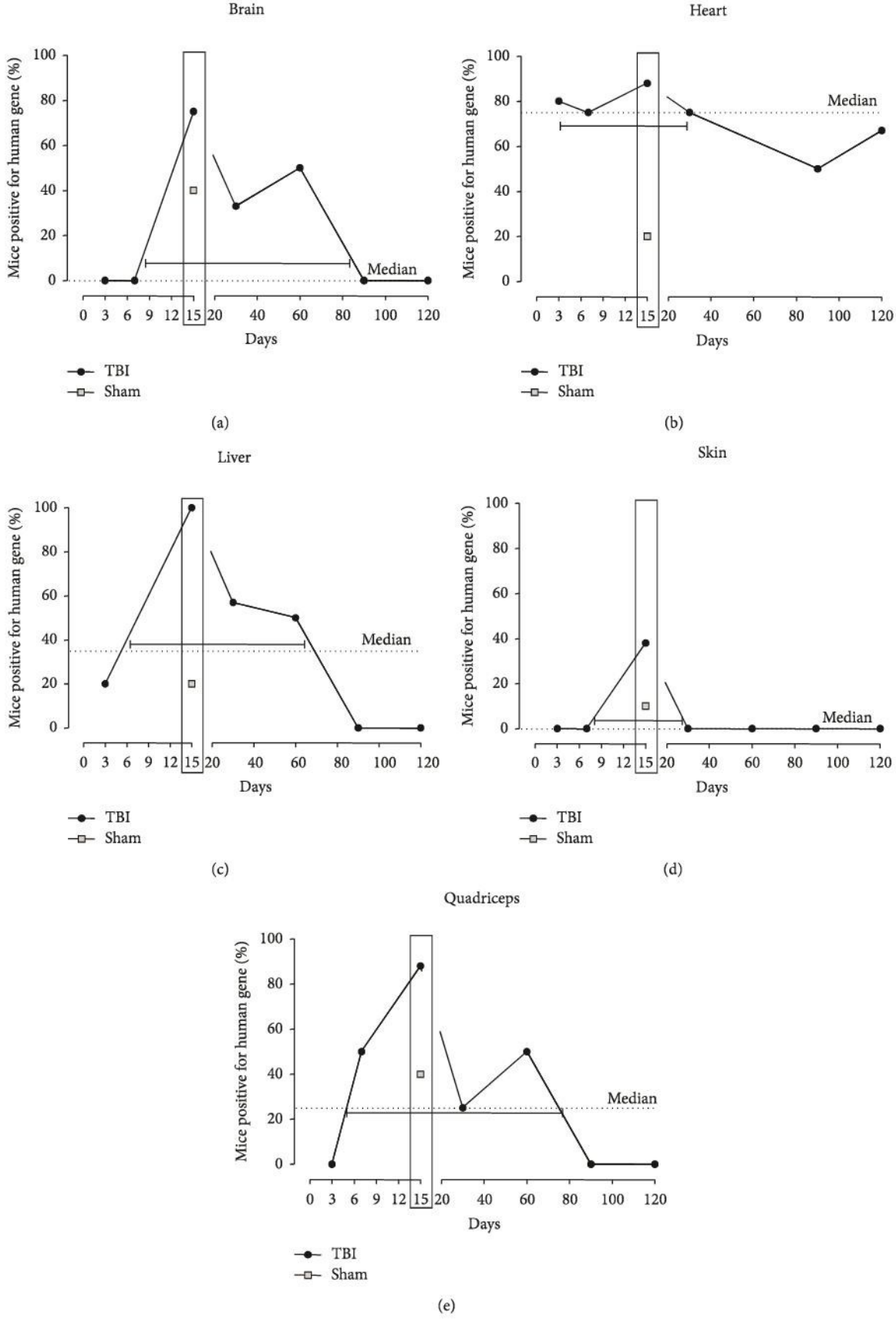


FIGURE 2: Continued.

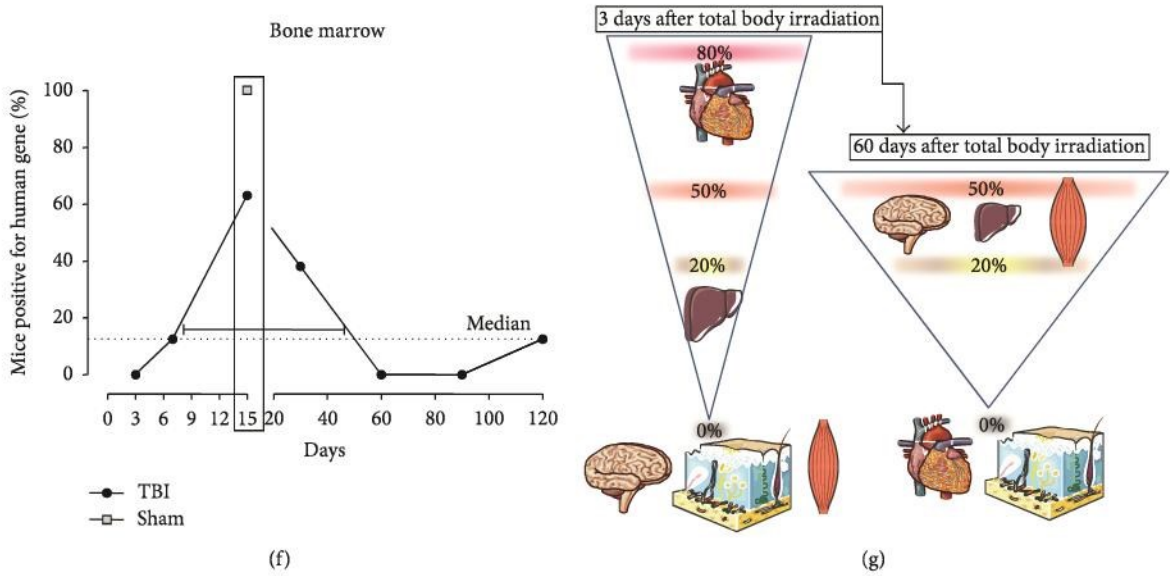


FIGURE 2: Kinetics of implantation of hMSCs during 120 days after total body irradiation. The percentage of positive mice for the human β-globin gene detected by PCR has been calculated after a sublethal total body irradiation (TBI). The human gene has been detected in (a) brain, (b) heart, (c) liver, (d) skin, (e) quadriceps, and (f) bone marrow. The tissues were collected at 3, 7, 15, 30, 60, and 120 days after TBI. The percentages represent the ratio (number of positive mice for the human beta-globin presence divided by total number of animals tested). At each analysis time, each group consisted of 10 animals. The control (named sham) consists in nonirradiated mice injected with hMSCs. The dotted line represents the median of the positive animal percentage during the 60 days after radiation exposure. (g) Illustration of anatomical variations in the presence of MSC after sublethal TBI.

TABLE 5: Histological analysis of tissue at 120 days after total body irradiation at 3.5 Gray in hMSC injected mice.

Organs	Positive organs				Negative organs			
	Number of mice	Tumour	Tissue		Number of mice	Tumour	Tissue	
			Disruption	Abnormality			Disruption	Abnormality
Brain	1	Neg.	Neg.	Neg.	9	Neg.	Neg.	Neg.
Heart	4	Neg.	Neg.	Neg.	6	Neg.	Neg.	Neg.
Lung	2	Neg.	Neg.	Neg.	8	Neg.	Neg.	Neg.
Liver	0	ND	ND	ND	10	Neg.	Neg.	Neg.
Spleen	2	Neg.	Neg.	Neg.	8	Neg.	Neg.	Neg.
Kidney	2	Neg.	Neg.	Neg.	8	Neg.	Neg.	Neg.
Abdominal area								
Muscle	1	Neg.	Neg.	Neg.	5	Neg.	Neg.	Neg.
Stomach	0	ND	ND	ND	8	Neg.	Neg.	Neg.
Duodenum	1	Neg.	Neg.	Neg.	9	Neg.	Neg.	Neg.
Jejunum	1	Neg.	Neg.	Neg.	9	Neg.	Neg.	Neg.
Ileum	1	Neg.	Neg.	Neg.	9	Neg.	Neg.	Neg.
Cecum	1	Neg.	Neg.	Neg.	9	Neg.	Neg.	Neg.
Colon proximal	3	Neg.	Neg.	Neg.	7	Neg.	Neg.	Neg.
Colon distal	2	Neg.	Neg.	Neg.	8	Neg.	Neg.	Neg.
Posterior leg (right)								
Skin	0	ND	ND	ND	10	Neg.	Neg.	Neg.
Muscle	1	Neg.	Neg.	Neg.	7	Neg.	Neg.	Neg.
Bone	5	Neg.	Neg.	Neg.	5	Neg.	Neg.	Neg.
Bone marrow	4	Neg.	Neg.	Neg.	5	Neg.	Neg.	Neg.

Histological analysis of various radiation-induced tissue damage was performed on all organs collected (heart, lung, liver, kidney, spleen, stomach, intestine in its entirety, muscle and skin of the posterior femur of left leg, and the brain). No tissue damage or structural changes were observed in the studied organs.

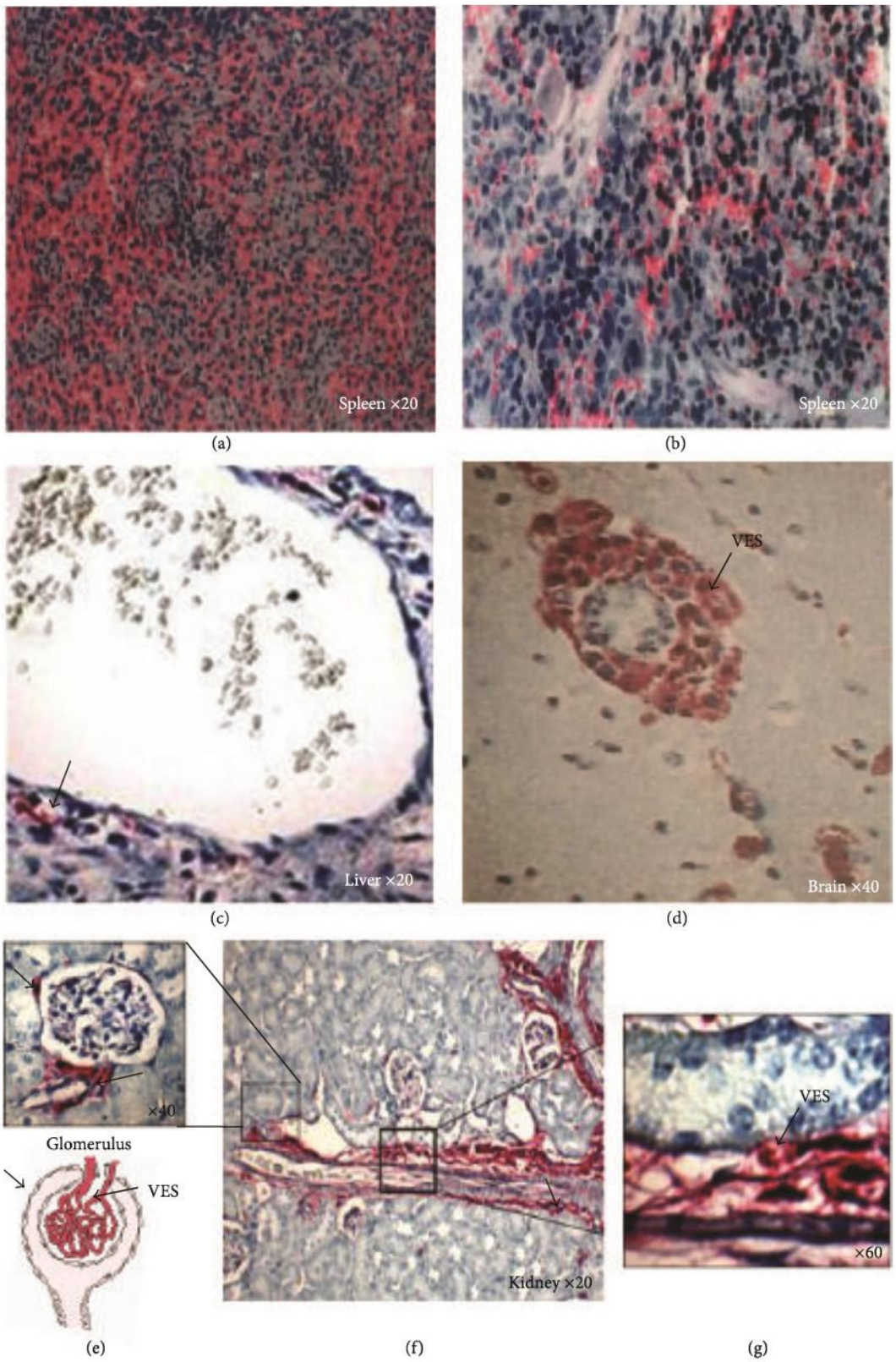


FIGURE 3: Histological examination of radiation exposed tissues by HES staining and human beta-2-microglobulin immunostaining in spleen and kidney. (a) illustrates a spleen of nonirradiated mice (control), (b) shows cell depletion 15 days after total body irradiation. The human cells expressing the human beta-2-microglobulin are stained in red. hMSCs migrated around the vascular axis (f), in functional structure such as glomerulus (e). Into glomerulus human cells have integrated both unitary structures: the glomerulus (e) and vascular endothelial system of this organ (g).

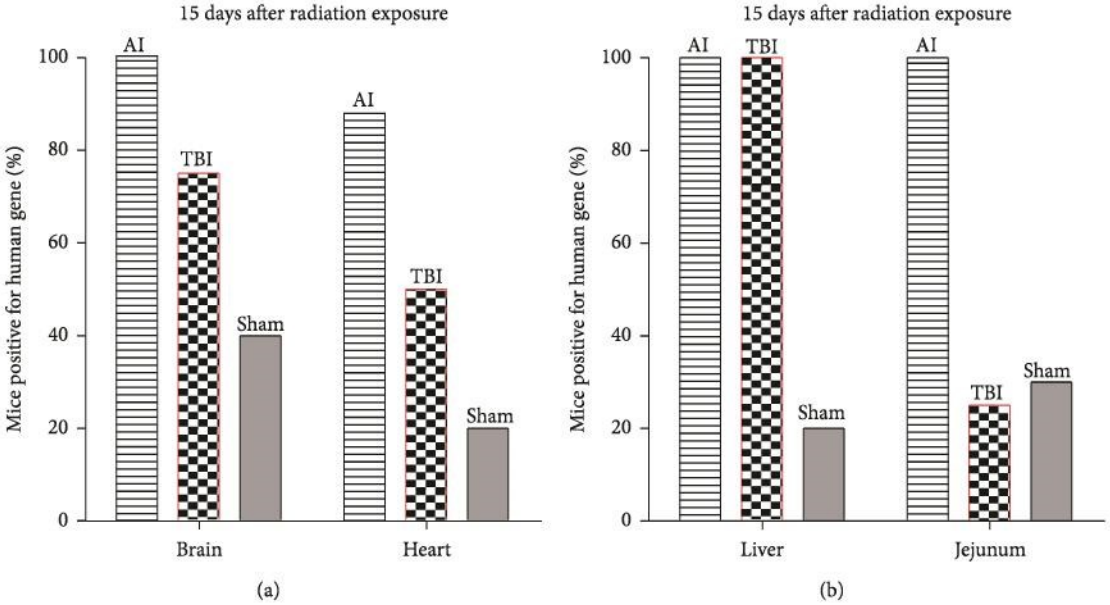


FIGURE 4: Radiation exposure promotes optimal chemotaxis of MSC. The percentage was calculated 15 days after radiation exposure and compared according to the irradiation configuration (abdominal irradiation (AI), represented in gray strips; total body irradiation (TBI) in red; and sham control group in gray). The histogram (a) represents the presence of the human beta-globin gene in organs outside the abdominal area such as the brain and heart. The histogram (b) represents the presence of the human gene in abdominal pelvic organs such as the liver and jejunum. Each group consisted in 10 animals. 15 days after AI, 100% of brain and 83% of hearts have human DNA. AI resulted in a mobilization of injected human stem cells on all the body via the vasculature system promoting communication into and between organs.

To our knowledge, no study reports the circulation of hMSCs in peripheral blood. We detected the circulation of hMSCs in peripheral blood and their passage through endothelial walls from days 15 to 30 after irradiation. The *in vivo* homing potential of hMSCs circulating in the bloodstream to the sites of injury/inflammation can be regulated by adhesion of hMSCs to the endothelium. Crossing of the endothelial barrier is another critical step in tissue migration of circulating cells [23].

Radiotherapy is used to treat 50% of cancer; 5% to 10% of patients develop late complications that alter quality of life [17]. Conventional therapies are palliative, poorly tolerated, costly, and lacking efficacy. The benefit of cell therapy by injection of mesenchymal stem cells for treatment of pelvic diseases has been documented [17]. A proof of concept was performed on 4 patients accidentally overirradiated after radiotherapy treatment for prostate cancer who suffered from chronic and fistulising colitis [18]. MSC injections might provide an efficient, safe, and well-tolerated alternative approach in the treatment of severe complications after pelvic radiotherapy for patients refractory to conventional therapy. Nevertheless understanding mechanisms in which adult somatic stem cells modulate tumour growth and long-term effect of MSCs after irradiation is essential to safely develop cell therapy as a therapeutic tool to treat radiation damage. We report no long-term side effects of hMSCs in irradiated tissues. Since the first reported trial in 1995, cultured MSCs have been used in 125 registered clinical trials (registered at http://www.clinicaltrial.gov/) without any reported side effect for cell therapy treatment. Clinical data support the long-term safety of MSCs. Furthermore the followup of patients after cell therapy treatment after-radiotherapy for breast [24], bladder, or prostate cancers [25] has never revealed side effects over a long-time period. A methodical review of clinical trials examined the safety of MSCs using MEDLINE, EMBASE, and the Cochrane Central Register of Controlled Trials (to June 2011). Systematic analysis examination for adverse events related to the use of MSCs did not identify any significant safety signals other than transient fever. This report further supports the safety of cell therapy to treat the consequence of radiation exposure in healthy tissues [26].

5. Conclusion

This work, along with our previously published studies on MSCs, supports the larger use of hMSC infusion to repair damaged tissues in patients following accidental irradiation and to treat side effects of radiotherapy in patient refractory to conventional treatments.

Conflict of Interests

The authors declare that there is no conflict of interests regarding the publication of this paper.

Authors' Contribution

Sabine Francois, Benoit Usunier, and Alain Chapel participated in research design, conducted experiments, performed

data analysis, and wrote the paper. Luc Douay and Marc Benderitter wrote the paper.

Acknowledgments

The authors thank Bruno L'homme and Magali Leroy for their helpful contributions.

References

[1] D. J. Prockop, "Marrow stromal cells as stem cells for nonhematopoietic tissues," *Science*, vol. 276, no. 5309, pp. 71–74, 1997.

[2] M. F. Pittenger, A. M. Mackay, S. C. Beck et al., "Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells," *Science*, vol. 284, no. 5411, pp. 143–147, 1999.

[3] J. Doorn, G. Moll, K. Le Blanc, C. van Blitterswijk, and J. de Boer, "Therapeutic applications of mesenchymal stromal cells: paracrine effects and potential improvements," *Tissue Engineering B*, vol. 18, no. 2, pp. 101–115, 2012.

[4] G. Ren, X. Chen, F. Dong et al., "Concise review: mesenchymal stem cells and translational medicine: emerging issues," *Stem Cells Translational Medicine*, vol. 1, no. 1, pp. 51–58, 2012.

[5] A. Chapel, J. M. Bertho, M. Bensidhoum et al., "Mesenchymal stem cells home to injured tissues when co-infused with hematopoietic cells to treat a radiation-induced multi-organ failure syndrome," *Journal of Gene Medicine*, vol. 5, no. 12, pp. 1028–1038, 2003.

[6] S. François, M. Bensidhoum, M. Mouiseddine et al., "Local irradiation not only induces homing of human mesenchymal stem cells at exposed sites but promotes their widespread engraftment to multiple organs: a study of their quantitative distribution after irradiation damage," *Stem Cells*, vol. 24, no. 4, pp. 1020–1029, 2006.

[7] M. Mouiseddine, S. François, A. Semont et al., "Human mesenchymal stem cells home specifically to radiation-injured tissues in a non-obese diabetes/severe combined immunodeficiency mouse model," *The British Journal of Radiology*, vol. 80, no. 1, pp. S49–S55, 2007.

[8] S. François, M. Mouiseddine, N. Mathieu et al., "Human mesenchymal stem cells favour healing of the cutaneous radiation syndrome in a xenogenic transplant model," *Annals of Hematology*, vol. 86, no. 1, pp. 1–8, 2007.

[9] A. Sémont, S. François, M. Mouiseddine et al., "Mesenchymal stem cells increase self-renewal of small intestinal epithelium and accelerate structural recovery after radiation injury," *Advances in Experimental Medicine and Biology*, vol. 585, pp. 19–30, 2006.

[10] A. Sémont, M. Mouiseddine, A. François et al., "Mesenchymal stem cells improve small intestinal integrity through regulation of endogenous epithelial cell homeostasis," *Cell Death and Differentiation*, vol. 17, no. 6, pp. 952–961, 2010.

[11] M. Mouiseddine, S. François, M. Souidi, and A. Chapel, "Intravenous human mesenchymal stem cells transplantation in NOD/SCID mice preserve liver integrity of irradiation damage," *Methods in Molecular Biology*, vol. 826, pp. 179–188, 2012.

[12] D. M. Patel, J. Shah, and A. S. Srivastava, "Therapeutic potential of mesenchymal stem cells in regenerative medicine," *Stem Cells International*, vol. 2013, Article ID 496218, 15 pages, 2013.

[13] O. N. Koç, J. Day, M. Nieder, S. L. Gerson, H. M. Lazarus, and W. Krivit, "Allogeneic mesenchymal stem cell infusion for treatment of metachromatic leukodystrophy (MLD) and Hurler syndrome (MPS-IH)," *Bone Marrow Transplantation*, vol. 30, no. 4, pp. 215–222, 2002.

[14] L. Fouillard, M. Bensidhoum, D. Bories et al., "Engraftment of allogeneic mesenchymal stem cells in the bone marrow of a patient with severe idiopathic aplastic anemia improves stroma," *Leukemia*, vol. 17, no. 2, pp. 474–476, 2003.

[15] L. von Bahr, I. Batsis, G. Moll et al., "Analysis of tissues following mesenchymal stromal cell therapy in humans indicates limited long-term engraftment and no ectopic tissue formation," *Stem Cells*, vol. 30, no. 7, pp. 1575–1578, 2012.

[16] J. J. Lataillade, C. Doucet, E. Bey et al., "New approach to radiation burn treatment by dosimetry-guided surgery combined with autologous mesenchymal stem cell therapy," *Regenerative Medicine*, vol. 2, no. 5, pp. 785–794, 2007.

[17] J. Voswinkel, S. Francois, J. M. Simon et al., "Use of mesenchymal stem cells (MSC) in chronic inflammatory fistulizing and fibrotic diseases: a comprehensive review," *Clinical Reviews in Allergy and Immunology*, vol. 45, no. 2, pp. 180–192, 2013.

[18] J. Voswinkel, S. Francois, N. C. Gorin, and A. Chapel, "Gastrointestinal autoimmunity: preclinical experiences and successful therapy of fistulizing bowel diseases and gut Graft versus host disease by mesenchymal stromal cells," *Immunologic Research*, vol. 56, no. 2-3, pp. 241–248, 2013.

[19] F. Caviggioli, L. Maione, D. Forcellini, F. Klinger, and M. Klinger, "Autologous fat graft in postmastectomy pain syndrome," *Plastic and Reconstructive Surgery*, vol. 128, no. 2, pp. 349–352, 2011.

[20] G. Rigotti, A. Marchi, M. Galiè et al., "Clinical treatment of radiotherapy tissue damage by lipoaspirate transplant: a healing process mediated by adipose-derived adult stem cells," *Plastic and Reconstructive Surgery*, vol. 119, no. 5, pp. 1409–1422, 2007.

[21] M. Benderitter, P. Gourmelon, E. Bey et al., "New emerging concepts in the medical management of local radiation injury," *Health Physics*, vol. 98, no. 6, pp. 851–857, 2010.

[22] A. Chapel, "Mesenchymal stromal cell therapy to repair radiation-induced intestinal damage: implications for treatment of abdominopelvic malignancy," *Cytotherapy*, vol. 14, no. 10, pp. 1157–1158, 2012.

[23] H. Motaln, C. Schichor, and T. T. Lah, "Human mesenchymal stem cells and their use in cell-based therapies," *Cancer*, vol. 116, no. 11, pp. 2519–2530, 2010.

[24] G. Rigotti, A. Marchi, P. R. Micciolo, and P. G. Baroni, "On the safety of autologous fat grafting for breast reconstruction," *Plastic and Reconstructive Surgery*, vol. 130, no. 1, pp. 206e–207e, 2012.

[25] A. Chapel, S. Francois, L. Douay, M. Benderitter, and J. Voswinkel, "New insights for pelvic radiation disease treatment: multipotent stromal cell is a promise mainstay treatment for the restoration of abdominopelvic severe chronic damages induced by radiotherapy," *World Journal of Stem Cells*, vol. 5, no. 4, pp. 106–111, 2013.

[26] M. M. Lalu, L. McIntyre, C. Pugliese et al., "Safety of cell therapy with mesenchymal stromal cells (SafeCell): a systematic review and meta-analysis of clinical trials," *PLoS ONE*, vol. 7, no. 10, Article ID e47559, 2012.

Résumé

Malgré l'augmentation des cas de cancers, l'amélioration des thérapies anti-cancéreuses a permis d'accroitre la survie des patients. Bien qu'efficace, la radiothérapie peut induire des complications sévères. La sphère abdomino-pelvienne concentre de nombreux cancers (prostate, vessie…), et des organes à risque lors de la radiothérapie. Le côlon-rectum développe des séquelles sévères chez 20% des patients 20 ans après traitement. La fibrose colorectale est la principale de ces complications. Les traitements actuels de ces lésions sont palliatifs. Les Cellules Souches Mésenchymateuses (CSM) favorisent la régénération tissulaire dans de nombreuses pathologies, y compris fibrosantes, et semblent donc adaptées au traitement des atteintes radio-induites. Néanmoins, les effets des CSM sur la tumeur et sur les complications des radiothérapies sont méconnus. Nos travaux évaluent la sureté et l'efficacité de la transplantation de CSM avant et après radiothérapie colorectale chez le rat. Sur un modèle de tumorigénèse colorectale suivie de radiothérapie, l'injection de CSM a inhibé la croissance tumorale en modifiant le profil des lymphocytes T et macrophages du microenvironnement tumoral. Dans un second modèle, les CSM ont induit une suppression durable de la fibrose colorectale radio-induite. Les protéines HGF et TSG-6 sécrétées par les CSM bloquent l'acquisition du phénotype pro-fibrosant par les cellules sécrétrices de matrice extracellulaire dans le côlon-rectum. Les CSM ont amélioré la survie des animaux dans ces deux modèles. Dans l'ensemble, nos résultats supportent l'utilisation des CSM dans le contexte des complications des radiothérapies abdomino-pelviennes.

Mots-clés : côlon-rectum ; tumorigenèse ; radiothérapie ; fibrose ; Cellules Souches Mésenchymateuses.

Abstract

Despite the growing number of cancer cases, current anti-cancer treatments greatly improve patients' survival. Although it is efficient, radiotherapy can induce severe complications. The abdomino-pelvic area regroups cancers with high prevalence (prostate, bladder…) and organs at risk during radiotherapy. Colon and rectum display severe side effects in 20% of patients 20 years after treatment. Colorectal fibrosis is the most frequent of these complications. Existing treatments are only palliative. Mesenchymal Stem Cells (MSCs) promote tissue regeneration in a wide variety of pathologies, fibrosis included, and thus seem fitted for the treatment of radiation-induced disorders. However, the effects of MSCs on tumor growth and radiotherapy induced damages are still unclear. Our work evaluates the safety and efficacy of MSC transplantation before and after colorectal radiotherapy in rats. In a model of chemically-induced colorectal carcinogenesis, followed by radiotherapy, MSC injection suppressed tumor growth by modifying the phenotype of T lymphocytes and macrophages of the tumor microenvironment. In a second model, transplanted MSCs suppressed radiation-induced fibrosis. Two proteins secreted by MSCs, HGF and TSG-6, are responsible for inhibiting extracellular matrix-producing cells, which are the major contributors to fibrosis. MSC injection was associated with increased survival in both studies. Overall, our results support the use of MSCs to treat the side effects of abdomino-pelvic radiotherapy.

Keywords: colorectal; tumorigenesis; radiotherapy; fibrosis; Mesenchymal Stem Cells.