Étude de l'effet de la différenciation endothéliale sur les propriétés immunomodulatrices des cellules souches mésenchymateuses issues de la gelée de Wharton du cordon ombilical humain

Reine El Omar

▶ **To cite this version:**

Reine El Omar. Étude de l'effet de la différenciation endothéliale sur les propriétés immunomodulatrices des cellules souches mésenchymateuses issues de la gelée de Wharton du cordon ombilical humain. Biologie cellulaire. Université de Lorraine, 2014. Français. NNT : 2014LORR0126 . tel-01750945v2

HAL Id: tel-01750945
https://theses.hal.science/tel-01750945v2

Submitted on 3 Jan 2018

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

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

AVERTISSEMENT

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

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

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

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

LIENS

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 122. 4
Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 335.2- L 335.10
http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg_droi.php
http://www.culture.gouv.fr/culture/infos-pratiques/droits/protection.htm

UNIVERSITÉ DE LORRAINE

Ecole doctorale BioSE (Biologie-Santé-Environnement)

Thèse

Présentée et soutenue publiquement pour l'obtention du grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DE LORRAINE

Mention "Sciences de la vie et de la santé"

Par **Reine El OMAR**

Étude de l'effet de la différenciation endothéliale sur les propriétés immunomodulatrices des cellules souches mésenchymateuses issues de la gelée de Wharton du cordon ombilical humain

Soutenue le 02 octobre 2014

Rapporteurs :	
M. Frédéric MALLEIN-GERIN	Directeur de Recherche, UMR5305, CNRS, Université de Lyon
M. Philippe NGUYEN	Professeur des Universités, praticien hospitalier, CHU de Reims
Directeur de thèse :	
M. Jean-François STOLTZ	Professeur des Universités, CNRS, UMR 7365, Université de Lorraine, Nancy
Président du jury:	
M. Stéphane BREZILLON	Directeur de Recherche, CNRS, URCA 3481, Reims
Examinateur:	
Mme Véronique DECOT	Maître de Conférences, praticien hospitalier, CNRS, UMR 7365, Université de Lorraine, Nancy et CHU de Nancy

UMR 7365 CNRS-Université de Lorraine. Laboratoire d'Ingénierie moléculaire et Physiopathologie articulaire (IMoPa)

Dédicaces

Papa, Maman,

Vous étiez toujours ma source de motivation, d'inspiration et de force.

C'est grâce à votre amour, bénédiction et vos prières que j'y suis arrivée,

je ne pourrai jamais vous exprimer l'ampleur de ma reconnaissance.

A vous je dédie cette thèse,

j'espère qu'elle serait à la hauteur de ce que vous attendiez de moi,

et que je pourrai vous rendre fiers,

Je vous aime.

Mes petits amours Sally et Rami,

Mon confort, mon support et mes rires,

sachez bien que votre grande sœur vous adore et sera toujours fière de vous, cette thèse vous est dédiée aussi.

Remerciements

Après avoir enfin achevé ce manuscrit, il est temps de synthétiser les remerciements que je voudrais adresser aux différentes personnes que j'ai rencontrées et appréciées durant ma vie de thésarde ainsi qu'aux personnes qui m'entourent depuis longtemps. Toutes mes excuses aux personnes que je pourrais oublier, mes pensées vont vers vous également.

Je tiens à remercier mon directeur de thèse M. **Jean-François Stoltz** pour avoir accepté d'encadrer ce projet.

Je voudrais remercier tout particulièrement ma co-directrice Mme **Véronique Decot** qui m'a dirigée tout au long de ces trois années. Elle a toujours été disponible même pour les moindres détails concernant cette thèse. Elle a tout fait pour la mise en valeur de mon travail et a été toujours à l'écoute pour répondre à mes questions et pour discuter. Je la remercie pour sa confiance en moi et pour ses mots d'encouragements et de motivation aux moments difficiles. Ses nombreuses relectures et corrections du manuscrit et des articles ont été très appréciables. Cette thèse lui doit beaucoup. Pour cela, et pour beaucoup d'autres que je n'ai pas mentionnés, je vous serai toujours reconnaissante.

Je tiens à remercier M. **Patrick Menu**, le chef de notre équipe, pour sa gentillesse et pour son soutien. Je remercie également M. **Jean-Yves Jouzeau**, le directeur de l'UMR 7365, pour m'avoir accueillie dans l'unité de recherche.

J'exprime mon profond respect à Mme **Ketsia Hess** et à M. **Stéphane Brézillon**, les deux membres de mon comité de thèse, qui ont suivi ce projet dès le début. Je les remercie pour le temps et les efforts qu'ils ont consacrés pour évaluer ma thèse, pour leurs conseils et leurs suggestions pour compléter au mieux quelques étapes du projet et je m'excuse si je n'ai pas pu tout faire, j'étais vraiment limitée par le temps. Je remercie M. Brézillon également pour avoir accepté de participer à mon jury de thèse.

J'exprime ma gratitude à M. **Frédéric Mallein-Gérin**, ainsi qu'à M. **Philippe Nguyen** pour avoir accepté de juger mon travail et d'être rapporteurs de ma thèse.

Je tiens à remercier particulièrement Mme **Emilie Velot** qui a aussi contribué à la réalisation de cette thèse. Je la remercie pour son efficacité et pour ces solutions dans les moments « d'urgence ». J'ai bénéficié d'une bonne formation en biologie moléculaire grâce à elle. Je la remercie aussi pour sa lecture exhaustive de mon manuscrit et de mon dernier article et pour ses corrections pertinentes.

J'exprime ma profonde reconnaissance à Mesdames : **Monique Gentils** pour le cœur d'ange qu'elle a, pour sa gentillesse, pour être toujours à l'écoute, pour ses mots apaisants et rassurants qui me soulageaient dans les moments les plus durs. Je la remercie également pour tous les films multicouches et produits qu'elle m'a préparés durant ces trois années ; **Brigitte Guerber** pour sa gentillesse et ses soins méticuleux, je n'oublierai jamais les gâteaux et les gâteries que je trouvais sur mon bureau quand je n'avais pas le temps de manger. Merci pour tout ma Brig ; **Ghislaine Cauchois** pour sa gentillesse, pour être à l'écoute et pour son efficacité à gérer les tâches qui lui ont été confiée.

J'adresse mes remerciements à M. **Arnaud Bianchi** qui n'a jamais hésité à répondre à mes multiples questions et à discuter, je le remercie aussi pour sa bonne humeur qu'il répand dans son entourage, il me faisait toujours sourire ; je remercie également M. **David Moulin** pour sa disponibilité quand j'en avais besoin et pour sa gentillesse. Je n'oublie pas de remercier Mme **Natalia De Isla,** Mme **Marthe Rousseau,** Mme **Marie-Hélène Piet et** Mme **Vanessa Moby** et Mme **Danièle Bensoussan** pour leur sympathie.

Merci au personnel administratif du biopôle que j'aime bien et qui a été toujours là pour résoudre mes problèmes administratifs et autres : Mme **Ghislaine Charpentier**, Mme **Valérie Gobert**, Mme **Nadia Bezai** et Mme **Karine Lorcin.**

La réalisation de ce travail s'appuie également sur un environnement et une bonne ambiance qui sont essentiels pour se détendre et pouvoir supporter les difficultés de la thèse et de la vie quotidienne à l'étranger. Je remercie profondèment les membres d'une grande famille que je me suis faite en France et dont je garderai le souvenir jusqu'aux derniers jours de ma vie :

Chaza, nous avons partagé ensemble les moments les plus difficiles et les plus heureux, tu as pu me supporter quand j'étais insupportable et me rassurer toujours. Notre amitié est une amitié exceptionnelle que rien ne pourrait rompre ; **Hassan**, grâce à cette thèse j'ai eu un frère à vie sur

lequel je peux compter dans les moments les plus délicats ; **Gaby**, je t'ai connu depuis ton stage de M1, je t'ai vu réussir ton M2 et te voilà en thèse, la personne agréable que t'es a fait de toi quelqu'un de spécial et akid inoubliable, je te remercie pour tout mais vraiment tout! Et comme promis je ferai de mon mieux pour assister à ta réussite en thèse ; **Mathieu**, je suis convaincue que t'as quelque chose de libanais dans tes gènes, enta ktiiiiir bijannen (dans le bon sens akid), enta sarsour ktir tayyoub, walla ta présence rendait les moments durs hayyen et moins hazin, n'oublie jamais qu'on est « srasir's team » forever akid akid akid!!! **Leyla**, ma source d'ondes postives, avec toi les discussions sont sans fin ; **Pan**, ta bonne humeur, ta gentillesse et tes blagues étaient essentiels pour que l'ambiance au bureau soit plus agréable ; **Jacky**, t'es adorable! Ensemble on a réalisé un succès important dont on sera toujours fières, **Léonore**, t'es quelqu'un de très gentille et sympa qui a essayé de me soulager quand j'en avais besoin, je n'oublierai pas le super gâteau que tu m'as préparé ; **Mélissa**, t'es simplement un ange ; **Ying Ying**, t'es d'une extrême gentillesse, **Pauline**, sans toi je n'aurais pas pu finir cette thèse, merci pour ton aide appréciable dans les manipulations et ta gentillesse. Anne Sophie, Gauthier, Alice, Lina, Mineem, Caroline, Meryem, Mathilde, Nasser, Samia, Victor, Yung Ying, Tunay,… je ne pourrai pas citer tout le monde, mais je remercie tous les membres du biopôle avec qui j'ai passé des moments agréables.

Un grand merci aux personnes qui ont été d'une générosité débordante et ont fait un don de leur sang précieux pour la réalisation de mes expériences : Gaby, Pan, Anne Sophie et Camille.

Merci au club libanais : Bader, Moustafa, Rose, Rasha, Hassan Melhem, Hadiya, Ali, Patricia, Stéphanie, Dima et Talar.

Une pensée spéciale à Rirou, ma source de support éternelle; et à Mme Naamat et M. Nicolas Malek, mes deux anges gardien qui ont marqué ma vie.

Je remercie de tout mon cœur la famille Vaudin pour toute l'affection et l'attention qu'elle m'a fournie, c'était une véritable chance de vous rencontrer et je tiens beaucoup à vous. Mme Marie Christine, M. Philippe, Diane et Laure je vous aime beaucoup et je ne vous oublierai jamais.

Liste des publications

Reine El Omar, Chaza Harmouch, Pierre Labrude, Véronique Decot, Patrick Menu, and Halima Kerdjoudj. "Influence of Serum Percentage on the Behavior of Wharton's Jelly Mesenchymal Stem Cells in Culture." *Bio-Medical Materials and Engineering* 23, no. 4 (2013): 273–80. doi:10.3233/BME-130751.

Reine El Omar, Jacqueline Beroud, Jean François Stoltz, Patrick Menu, Emilie Velot, and Véronique Decot. "Umbilical Cord Mesenchymal Stem Cells: The New Gold Standard for Mesenchymal Stem Cell Based Therapies?" *Tissue Engineering. Part B, Reviews*, February 19, 2014. doi:10.1089/ten.TEB.2013.0664.

Reine El Omar, Yu Xiong, Huguette Louis, Monique Gentils, Gabriel Dostert, Patrick Menu, Jean François Stoltz, Emilie Velot and Véronique Decot. "Immunomodulatory properties of Wharton's jelly mesenchymal stromal cells are slightly modified after differentiation towards an endothelial phenotype: impact on T and NK cells" (Journal of Immunology, Article en révision).

Liste des présentations orales

R. EL OMAR, Y. XIONG, H. LOUIS, M. GENTILS, G. DOSTERT, P. MENU, J-F. STOLTZ, E. VELOT, V. DECOT. Etude de l'effet de la différenciation endothéliale sur les propriétés immunomodulatrices des cellules souches mésenchymateuses du cordon ombilical. Journée de la Fédération de la Recherche 3209, 11 septembre, **Nancy**

R. El OMAR, E. VELOT, P. MENU, J.-F. STOLTZ and V. DECOT. Does endothelial differentiation of Wharton's jelly mesenchymal stem cells affect their immunosuppressive effects? The 2014 tissue engineering congress: Stem cells and bioprocessing, 2-4 juin, **Londres**.

R. EL OMAR, E. VELOT, N. Li, P. Dan, P. MENU, J.-F. STOLTZ and V. DECOT. Immunomodulatory properties of Wharton's jelly mesenchymal stem cells before and after endothelial differentiation. 5ème symposium de Kunming sur les cellules souches, 12-15 Décembre, **Kunming- Chine**.

R. EL OMAR. E. VELOT, P. MENU, J.-F. STOLTZ and V. DECOT. Effet de la différenciation endothéliale sur les propriétés immunomodulatrices des cellules souches mésenchyateuses de la gelée de Wharton. 3ème colloque GRIMIT, 26-27 Septembre 2013, **Paris.**

R. EL OMAR, E. VELOT, N. Li, P. Dan, P. MENU, J.-F. STOLTZ and V. DECOT. Effect of the endothelial differentiation on the immune functions of Wharton's jelly mesenchymal stem cells. Satellite meeting of the 8th Scientific Meeting of the Lorraine Pole for Cartilage Engineering, 24-25 Septembre, **Nancy**.

R. EL OMAR, E. VELOT, P. MENU, J.-F. STOLTZ and V. DECOT. Study of the WJ-MSCS immune functions before and after endothelial differentiation. DocScilor 2013, Abbaye des Prémontrés- **Pont-à-Mousson**.

Liste des présentations affichées

R. El OMAR, E. VELOT, P. MENU, J.-F. STOLTZ and V. DECOT. Does endothelial differentiation of Wharton's jelly mesenchymal stem cells affect their immunosuppressive effects? The 2014 tissue engineering congress: Stem cells and bioprocessing, 2-4 juin, Londres

R. EL OMAR, E. VELOT, P. MENU, J.-F. STOLTZ and V. DECOT. Effects of the endothelial differentiation on the immunomodulatory properties of Wharton's jelly mesenchymal stem cells. 9ème Journée de Recherche Biomédicale, Nancy (CHU de Nancy), 21 mars 2014 (1er prix poster).

R. EL OMAR, E. VELOT, N. Li, P. Dan, P. MENU, J.-F. STOLTZ and V. DECOT. Immunomodulatory properties of Wharton's jelly mesenchymal stem cells before and after endothelial differentiation. 8ème journées scientifiques du Pôle Lorraine d'ingénierie du cartilage, Nancy, 26-27 Septembre 2013.

R. EL OMAR, E. VELOT, P. MENU, J.-F. STOLTZ and V. DECOT. Immunomodulatory properties of Wharton's jelly mesenchymal stem cells before and after endothelial differentiation. 8ème Journée de Recherche Biomédicale, Nancy (CHU de Nancy), 24 Mai 2013.

R. EL OMAR, C. HARMOUCH, P. LABRUDE, N. MAKDISSY, D. MAQUIN, V. DECOT, E. VELOT and H. KERDJOUDJ. Wharton's jelly mesenchymal stem cells shape shifting: Correlation with serum percentage. 7e journées scientifiques du Pôle Lorraine d'ingénierie du cartilage, Nancy, 18-19 Octobre 2012.

SOMMAIRE

Liste des présentations orales vi

Liste des présentations affichées vii

LISTE DES FIGURES xii

LISTE DES TABLEAUX xiii

LISTE DES ABREVIATIONS xiv

Chapitre 1 : Ingénierie Tissulaire 5

I. Introduction 5

II. Principaux outils de l'ingénierie tissulaire 9

A. BIOMATERIAUX 9

B. CELLULES 12

C. SIGNAUX REGULATEURS 14

III. Application de l'ingénierie tissulaire à la médecine vasculaire 16

A. STRUCTURE, FONCTIONS ET PATHOLOGIES VASCULAIRES 18

a) Structure et fonctions de la paroi vasculaire 18

b) Pathologies vasculaires : exemple de l'athérosclérose 20

B. L'INGENIERIE VASCULAIRE 22

a) Biomatériaux en ingénierie vasculaire 26

(i) Les films multicouches de polyélectrolytes 27

Films multicouches PAH/PSS 29

Chapitre 2 : Les cellules utilisées en ingénierie tissulaire 33

I. Caractéristiques des cellules endothéliales adultes 33

II. Les sources de cellules souches utilisables en ingénierie tissulaire, plus particulièrement vasculaire 36

A. CELLULES SOUCHES PLURIPOTENTES 39

a) Cellules souches embryonnaires 39

b) Cellules souches pluripotentes induites (iPS) 40
c) Utilisation des CSE et iPS en tant que sources de CE 41
B. CELLULES SOUCHES MULTIPOTENTES 43
a) Cellules souches néonatales 43
(1) Les cellules fœtales 44
(i) Cellules souches mésenchymateuses (CSM) des tissus fœtaux 44
(ii) Cellules souches hématopoïétiques (CSH) des tissus fœtaux 45
(2) Cellules souches des tissus extra-embryonnaires 45
(i) Cordon ombilical 45
(ii) Liquide amniotique 46
(iii) Placenta 47
(iv) Cellules souches fœtales en médecine régénératrice 47
(3) Utilisation des cellules souches néonatales en ingénierie vasculaire 47
b) Cellules adultes 48
(1) Cellules de la moelle osseuse 51
(i) Cellules mononucléées de la moelle osseuse (CMN-MO) 51
(ii) Cellules souches mésenchymateuses dérivées de la moelle osseuse 53
(2) Cellules souches du tissu adipeux (CS-TA) 54
C. CELLULES PROGENITRICES ENDOTHELIALES 55
Chapitre 3: CSM du cordon ombilical : les nouveaux « Gold Standard » pour les thérapies à base de CSM ? 57
I. INTRODUCTION 57
II. REVUE 58
Chapitre 4: Grands Principes de l'Immunobiologie et Principaux Mécanismes Régulateurs des CSM 81
I. L'IMMUNITE 81

A. Rappel sur le Complexe Majeur d'Histocompatibilité (CMH) 82
a) Le locus génétique 82
b) Fonctions des molécules HLA 83
B. L'immunité innée 84
a) Cellules NK 85
b) Récepteurs inhibiteurs et activateurs des cellules NK 85
c) Médiateurs sécrétés par les cellules NK 86
d) Mécanismes de cytotoxicité 88
C. Immunité adaptative 89
a) Types de lymphocytes T 91
b) Activation des lymphocytes 92
(1) Lymphocytes LT CD4 : différenciation et rôles 94
(2) Lymphocytes T cytotoxiques CD8 : activation et mécanisme d'action 96
II. PRINCIPAUX MECANISMES IMMUNOREGULATEURS DES CSM 99
A. Principaux facteurs solubles impliqués dans l'immunomodulation par les CSM 100
a) Indoleamine-2,3-dioxygénase 100
b) Interleukine-6 102
c) Prostaglandine E2 103
d) TGF-β / HGF 105
e) MMP-2 et MMP-9 105
B. Principales molécules de contact impliquées dans l'immunomodulation 106
a) Programmed death ligand 1 106
b) Fas ligand 107
Chapitre 5 : Influence du pourcentage de sérum sur le comportement des CSM-GW 108
I. Introduction 108

II. Texte de l'article 108

III. Résultats et discussion de l'article 117

Chapitre 6 : Les propriétés immunomodulatrices des CSM-GW sont légèrement modifiées après différenciation vers un phénotype endothélial : impact sur les cellules T et NK. 120

I. Introduction 120

II. Article 121

Chapitre 7 : Discussion, conclusions et perspectives 174

Bibliographie 186

LISTE DES FIGURES

Figure 1. Expérience de Cao et al. 6
Figure 2. La triade de l'ingénierie tissulaire.. 7
Figure 3. Un exemple de concept d'ingénierie tissulaire. 9
Figure 4. Classification de la médecine régénératrice basée sur la nécessité d'utilisation de scaffolds. 10
Figure 5. Rôle du scaffold en ingénierie tissulaire. 11
Figure 6. Paramètres de l'ingénierie tissulaire 16
Figure 7. Les principales tuniques d'un vaisseau sanguin 19
Figure 8. Stries lipidiques apparaissant sous l'endothélium artériel 21
Figure 9. Athérome ou plaque simple 21
Figure 10. Plaque d'athérome mature 22
Figure 11. Schéma représentant les trois différentes approches d'ingénierie tissulaire pour la fabrication de substituts vasculaires. 25
Figure 12. Schéma représentant la technique « layer-by-layer » pour la construction de FMP de type PAH/PSS 31
Figure 13. Types et origines des cellules souches.. 38
Figure 14. Dérivation des lignées de CSE humaines et leur pluripotence. 40
Figure 15. Diagramme schématique représentant les voies de différenciation des cellules souches pluripotentes humaines en cellules endothéliales vasculaires. 43
Figure 16. Maintien de l'homéostasie à travers des divisions symétriques et asymétriques. 48
Figure 17. Aperçu sur les cellules souches adultes. 50
Figure 18. Utilisations potentielles des cellules souches adultes en médecine régénératrice 51
Figure 19. Deux méthodologies sont employées pour construire des substituts vasculaire à partir des CMN-MO.. 53
Figure 20. Récepteurs inhibiteurs et activateurs des cellules NK et leurs ligands. 86
Figure 21. Production de cytokines et lyse induites par les cellules NK. 87
Figure 22. Régulation de la lyse de cellules cibles par les cellules NK. 89
Figure 23. Immunités humorale et cellulaire.. 91
Figure 24. Activation des LT CD4.. 93
Figure 25. Signaux de co-stimulation nécessaires pour une activation totale des LT CD4. 94

Figure 26. Différenciation des LT CD4+ naïfs.. 96
Figure 27. Voies de cytotoxicité des CTL.. 98
Figure 28. Contrôle métabolique des réponses des cellules T et T reg via IDO..... 101
Figure 29. Transduction du signal de l'IL-6 par la voie JAK/STAT..... 103

LISTE DES TABLEAUX

Tableau I. Applications cliniques utilisant des conduits vasculaires crées par différentes approches d'ingénierie vasculaire. 244
Tableau II. Résumé de l'ensemble des biomatériaux utilisés en ingénierie vasculaire 288
Tableau III. Quelques marqueurs endothéliaux, leurs sites d'expression et fonctions. 344
TableauIV. Résumé des facteurs critiques pour l'immunosuppression médiée par les CSM. 99

LISTE DES ABREVIATIONS

Ac-LDL : acetylated low density lipoprotein

ADCC : antibody-dependant cellular cytotoxicity

AGM : aorte gonade mésonéphros

AVC : accidents vasculaires cérébraux

bFGF : basic fibroblasr growth factor

BMP : bone morphogenetic protein

B7-H1 : B7 homolog 1

CD : cluster de différenciation

CE : cellule endothéliale

CEL : cellule endothéliale-like

CMH : complexe majeur d'histocompatibilité

CML : cellule musculaire lisse

CMN : cellules mononucléées

CO : cordon ombilical

COX : cyclooxygénase

CPA : cellules présentatrices d'antigènes

CSM : cellules souches mésenchymateuses

CSEh : cellules souches embryonnaires humaines

CSF : cellules souches fœtales

CSH : cellules souches hématopoïétiques

CS-TA : cellules souches du tissue adipeux

CTL : cytotoxic T lymphocyte

EGF : endothelial growth factor

EGM-2 : endothelial growth medium-2

EOMES : eomesodermin

EPC : endothelial progenitor cells

ePTFE : polytétrafluoroéthylène expansé

FAS : apoptosis stimulating factor

FMP : films multicouches de polyélectrolytes

Foxp3 : forkhead box P3

FSV : fraction stromale vasculaire

GCN2 : general control nondepressible 2

GrB : granzyme B

GvHD : graft versus host disease

GW : gelée de Wharton

HGF : hepatocyte growth factor

HLA : human leukocyte antigen

Hmox-1 : hème oxygénase

HSP : heat shock protein

hTERT : human telomerase reverse transcriptase

HUVEC : human umbilical vein endothelial cells

ICAM : intercellular adhesion molecule

ICOS : inducible costimulator

ICOSL : inducible costimulator ligand

IDO : indoléamine 2,3-dioxygénase

IL : interleukine

INF-γ : interferon-γ

iPS : induced pluripotent stem cells

ISCT : International society of cellular therapy

ITAM : immunoreceptor tyrosine-based activation motifs

JAK : Janus kinase

KIR : killer immunoglobulin-like receptors

KYN : kynurénine

LbL : layer-by-layer

LIF : leukemia inhibitory factor

LPS : lipopolysaccharides

LT : Lymphocyte T

MAPK : mitogen-activated protein kinase

MCI : masse cellulaire interne

M-CSF : macrophage colony-stimulating factor

MCV : maladies cardiovasculaires

MEC : matrice extracellulaire

MIXL1 : mix paired-like homeobox

MMP : métalloproteinase matricielle

MO : moelle osseuse

mTOR : mammalian target of rapamycin

NCR : natural cytotoxicity receptors

NK : natural killer cells

NKG2D : natural killer group 2 membrane D

NO : nitric oxide

PAH : hydrochlorure de polyallylamine

PD-1 : programmed cell-death 1

PDL-1/2 : programmed cell-death ligand ½

PECAM : platelet endothelial cell adhesion molecule

PGA : acide poly-glycolique

PGE2 : prostaglandine E2

PHA : phytohémagglutinine

PLLA : acide poly-lactique

PSS : polystyrene sulfonate

ROR : RAR-related orphan receptor

SNC : système nerveux central

STAT : signaling transducer and activator of transcription

SVF : sérum de vœu fœtal

Tbet : T-box transcription factor

TCR : T cell receptor

TGF-β : transfroming growth factor-β

Th : T helper

TNF-α : tumor necrosis factor

TRAIL : TNF-related apoptosis-inducing ligand

Treg : lymphocytes T régulateurs

TRP : tryptophane

TSG-6 : TNF-stimulated gene 6

VCAM : vascular cell adhesion molecule

VE-Cad : vascular endothelial cadherin

VEGF : vascular endothelial growth factor

VEGFR2 : vascular endothelial growth factor

vWF : von Willebrand

3D : tridimensionnel

Introduction générale

L'ingénierie tissulaire est un concept qui repose sur 3 éléments : des cellules, généralement des cellules souches utilisées seules ou en association avec un biomatériau, différenciées ensuite vers la lignée cellulaire d'intérêt, à l'aide de facteurs de croissance et différenciation. Ces cellules peuvent être de deux origines : soit autologues soit allogéniques. Les cellules souches autologues présentent l'avantage de pouvoir être administrées à un patient sans risque de rejet mais l'inconvénient de devoir être prélevées chez le patient, amplifiées, différenciées, puis intégrées dans un substitut tissulaire en 3 dimensions. Ces différentes étapes nécessitant un délai certain qui est rarement compatible avec une application clinique. Les cellules souches allogéniques peuvent être prélevées chez des donneurs sains, et utilisées après amplification et différenciation pour la création d'un nouveau tissu. Ces tissus peuvent ensuite éventuellement être stockés au sein d'une banque, puis utilisés à la demande. L'avantage de cette source cellulaire est de pouvoir permettre la genèse de greffons compatibles avec une utilisation clinique. Cependant, le risque majeur lié à l'utilisation de cellules allogéniques est le risque qu'elles soient rejetées par le système immunitaire du patient, ce qui risquerait d'entraîner la perte du greffon. C'est pourquoi le choix du type de cellules souches utilisées doit être particulièrement pertinent afin d'éviter la survenue de ce phénomène.

Les cellules souches mésenchymateuses (CSM) sont définies comme des progéniteurs multipotents non hématopoïétiques caractérisés par leur adhérence au plastique, leur profil phénotypique caractéristique et leurs capacités d'auto-renouvellement et de différenciation en plusieurs types cellulaires selon les conditions de culture appropriées. Elles se caractérisent par leurs effets immunomodulateurs qui sont dus à deux propriétés essentielles : (1) l'**immunosuppression**, via des interactions spécifiques avec les cellules immunitaires participant aux réponses immunitaires innée et adaptative, et (2) le **privilège immunitaire**, c'est-à-dire leur capacité à échapper aux mécanismes de défense du système immunitaire. Ces 2 propriétés sont associées à une absence ou une faible expression des molécules de complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) de classe I et II et des molécules de co-stimulation des lymphocytes (CD80 et CD86).

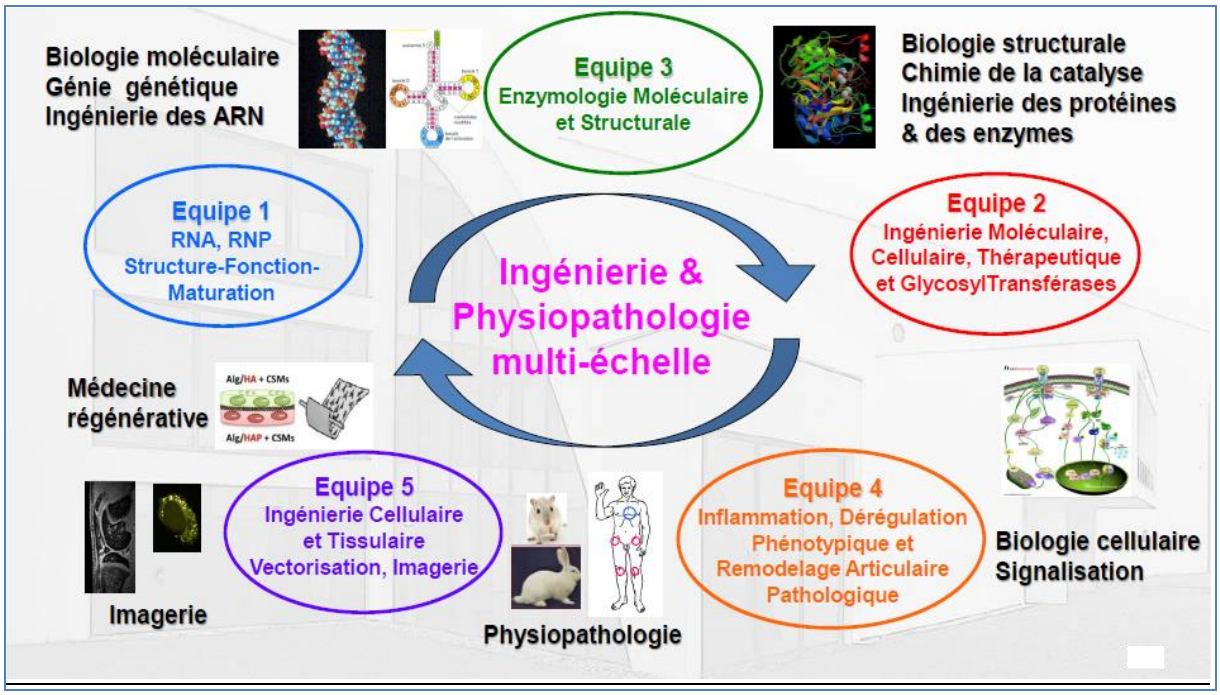
Les sources disponibles de CSM sont nombreuses et peuvent être adultes ou fœtales. Récemment, les CSM dérivées de la gelée de Wharton (GW), tissu conjonctif du cordon ombilical, figurent parmi les cellules les plus étudiées en tant qu'alternative aux CSM de la moelle osseuse (MO). L'utilisation de ces cellules permet de s'affranchir de quelques inconvénients liés aux CSM-MO tels que la nécessité d'avoir recours à une anesthésie générale pour le prélèvement, leur faible représentation dans la moelle et la diminution de leurs capacités d'auto-renouvellement et de différenciation avec l'âge du donneur. De plus, les CSM-GW sont plus primitives que les cellules adultes ce qui explique leur plus importante multipotentialité d'où l'intérêt porté à ces cellules en médecine régénératrice.

Toutefois, l'utilisation des CSM-GW dans un contexte allogénique pour des applications cliniques pose la question de l'immunogénicité de ces cellules, risquant d'aboutir à leur rejet après transplantation. Weiss et al ont été parmi les premiers à étudier l'immunogénicité des CSM-GW, et ont montré qu'elles sont capables d'inhiber la prolifération des splénocytes stimulés et des lymphocytes T dans une réaction mixte lymphocytaire. D'autres études plus récentes (1,2) se sont intéressées à comparer l'immunogénicité des CSM issues du cordon ombilical avec celle des CSM adultes. Les CSM du cordon présentaient une expression significativement plus faible de CMH-I par rapport aux CSM-MO, une production significativement plus élevée de TGF-β et d'IL-10, une activité proliférative significativement plus importante, et un rejet retardé *in vivo*. Il semblerait donc que les CSM-GW sont moins immunogènes que les CSM adultes et possèdent une capacité immunosuppressive plus importante et pourraient être plus adaptées pour des applications en ingénierie tissulaire.

En ingénierie tissulaire, les CSM sont généralement utilisées en tant qu'outil cellulaire et sont différenciées ensuite en la lignée cellulaire d'intérêt. Les caractéristiques immunologiques des CSM natives changent-elles après différenciation ?

Si quelques études se sont consacrées à étudier l'impact de la différenciation en chondrocytes en ostéocytes, en adipocytes ou en cellules nerveuses (3–7) sur les propriétés immunologiques des CSM, relativement peu d'études se sont consacrées à étudier ces cellules après différenciation endothéliale, d'où le projet de ma thèse qui s'est intéressé à étudier l'impact de ce dernier type de différenciation.

Le travail de thèse s'est déroulé au sein de l'Unité Mixte de Recherche (UMR) 7365 « Ingénierie Moléculaire et Physiopathologie Articulaire » (IMoPA), créée en janvier 2013 et dirigée par le Professeur Jean-Yves Jouzeau et le Dr Bruno Charpentier. Cette UMR fait elle-même partie de la Fédération de Recherche 3209 « Bio-ingénierie Moléculaire, Cellulaire et Thérapeutique » (BMCT). Le laboratoire se situe au niveau du campus de la Faculté de Médecine de Nancy, dans la structure appelée *Biopôle*. L'UMR IMoPA est constituée de 5 équipes complémentaires :



Mon projet s'inscrit dans le cadre des activités de l'équipe 5 travaillant dans le domaine de l'Ingénierie Cellulaire et Tissulaire et dont les responsables sont les Professeurs Pierre Gillet et Patrick Menu. Cette équipe travaille sur différentes thématiques liées à l'ingénierie ostéo-articulaire et vasculaire telles que le développement de matrices de support, la mécanotransduction, les matrices extracellulaire structurantes et bio-activatrices et la caractérisation des CSM. Plus particulièrement, le travail s'est intégré dans le contexte de l'ingéniérie vasculaire, au sein de l'équipe dirigée par le Pr Menu. En effet, notre groupe travaille depuis de nombreuses années sur un concept d'ingénierie vasculaire. Devant la pénurie de greffon vasculaire de petit diamètre, notre objectif est de créer un substitut vasculaire complet à partir de CSM-GW différenciées en cellules endothéliales et musculaires de manière à recréer

respectivement l'intima et la media d'un vaisseau. Depuis une dizaine d'années, les travaux de l'équipe se focalisent sur l'évaluation de l'effet des multicouches de polyélectrolytes formés de l'hydorchlorure de polyallylamine (PAH) et de polystyrène sulfonate (PSS), sur la différenciation des progéntieurs circulants et des CSM-MO en cellules vasculaires. Les résultats antérieurs ont mis en évidence une meilleure adhésion et prolifération cellulaire ainsi qu'une accélération notable de la différenciation au contact du film en comparaison de celle observée sur une surface contrôle de fibronectine ou de collagène de type I (8,9).

Afin d'évaluer la pertinence de l'utilisation de ces cellules dans le contexte de l'ingénierie vasculaire, mon projet vient compléter ces travaux en vérifiant si les cellules différenciés conservent les propriétés immunomodulatrices des CSM-GW pour évaluer si elles seront bien tolérées par le système immunitaire du receveur.

Les objectifs de notre travail sont donc :

(1) De différencier les cellules souches mésenchymateuses de la gelée de Wharton en cellules endothéliales.

(2) De vérifier si les CSM-GW conservent leur immunoprivilège et leurs propriétés immunosuppressives après différenciation.

Chapitre 1 : Ingénierie Tissulaire

I. Introduction

Paralysie par lésion de la moelle épinière, insuffisance hépatique, diabètes, rhumatismes inflammatoires, lésion étendue du muscle cardiaque, brûlures étendues, ablation chirurgicale du sein pour cancer, etc…Il arrive qu'une des parties de notre corps soit défectueuse, irréparable ou manquante comme dans les exemples précédents. Pour pallier ces problèmes, les méthodes courantes de traitement comprennent les lambeaux et les greffes de tissus autologues, les greffes de tissus de donneurs et l'utilisation de biomatériaux. Le tissu autologue représente un matériau biologique « idéal », malheureusement il n'est pas disponible qu'en quantité limitée et le site de prélèvement chez le donneur peut être fragilisé. Les tissus de donneurs vivants humains ou animaux posent des problèmes de compatibilité du système HLA (human leukocyte antigen) et des risques infectieux pour les tissus prélevés sur des cadavres. De plus, les hétérogreffes et les xénogreffes ne permettent pas d'apporter la composante cellulaire et les facteurs de croissance nécessaires à la régénération tissulaire. Bien qu'ils réduisent la qualité de vie du sujet atteint, ces traitements traditionnels sont à l'origine d'environ la moitié des dépenses dans le domaine de santé dans les pays développés. Ceci à entraîner le developpement d'une nouvelle forme de thérapie, « **l'ingénierie tissulaire** », dont l'objectif *in fine* est de remplacer les organes à plus long terme (10).

L'idéal, en cas de dommages irréparables, serait le remplacement de l'organe en cause, afin de rétablir la fonction perdue. Cette éventualité devient de plus en plus concrète grâce au développement de la médecine réparatrice et régénératrice (11). L'ingénierie tissulaire, à la frontière de la recherche clinique, est centrée sur la production en laboratoire de tissu néoformé et même d'organes complexes susceptibles d'être implantés en vue de remplacement de tissus ou organes défectueux.

Cette discipline a été initiée il y a environ 20 ans lorsque Langer et Vacanti ont publié un article fondateur décrivant le processus d'ingénierie tissulaire : il s'agit d'appliquer les principes des sciences de la vie et de l'ingénierie pour développer des substituts tissulaires afin de remplacer, de maintenir ou d'améliorer le fonctionnement d'un tissu ou d'un organe entier (12). A l'époque,

la notion de création de tissu en laboratoire n'était que pure imagination. Cependant, les études se sont poursuivies pour montrer que c'était possible, comme par exemple la formation d'une oreille humaine associée à un modèle murin. En effet, les chercheurs ont réalisé un moule d'aspect identique à une oreille humaine, avec des fibres de polyester biodégradables. Ils ont ensuite transféré des cellules osseuses et musculaires sur le moule puis ont transplanté l'ensemble sur le dos d'une souris (13) (figure 1). Ces études ont ouvert de nouvelles perspectives vers la régénération de tous les types de tissus (14). Ensuite, la production de nouveaux matériaux s'est enchaînée et les processus de fabrication se sont développés afin de supporter la genèse de tissus.

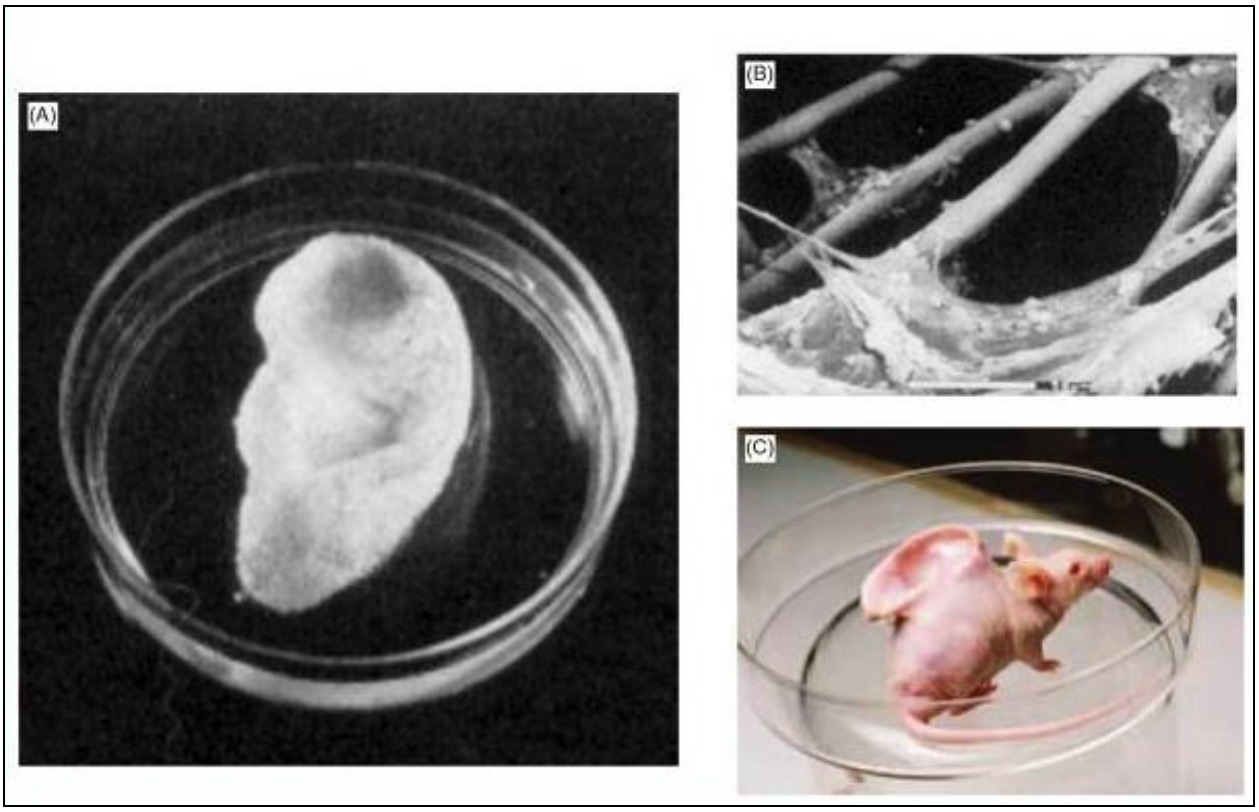


Figure 1. *Formation d'une oreille humaine par ingénierie tissulaire avec l'expérience de Cao et al.* (A) Structure du « scaffold » avant ensemencement ; (B) Micrographie montrant les cellules et la matrice extracellulaire formée dans le « scaffold » par microscopie électronique à balayage (MEB) ; (C) « Scaffold » implanté sur le dos d'une souris immunodéficiente **(13)**.

L'ingénierie tissulaire est un domaine interdisciplinaire en plein essor, s'inscrivant dans le cadre de la médecine régénératrice (15). Elle se situe au croisement des sciences du vivant et

des sciences de l'ingénieur. Elle implique plusieurs disciplines (science des matériaux, biologie moléculaire et cellulaire, ingénierie chimique et mécanique, biochimie, robotique, bioinformatique, médecine, chirurgie) et utilise le biomimétisme, c'est-à-dire la reproduction, dans le tissu artificiel, du microenvironnement spécifique à chaque tissu. Le principe général est d'associer une **matrice tridimensionnelle** avec des **cellules** et des **signaux régulateurs** pour reconstruire un nouveau tissu hybride (16,17), d'où la notion de **« triade de l'ingénierie tissulaire »** présentée dans la figure 2 (18).

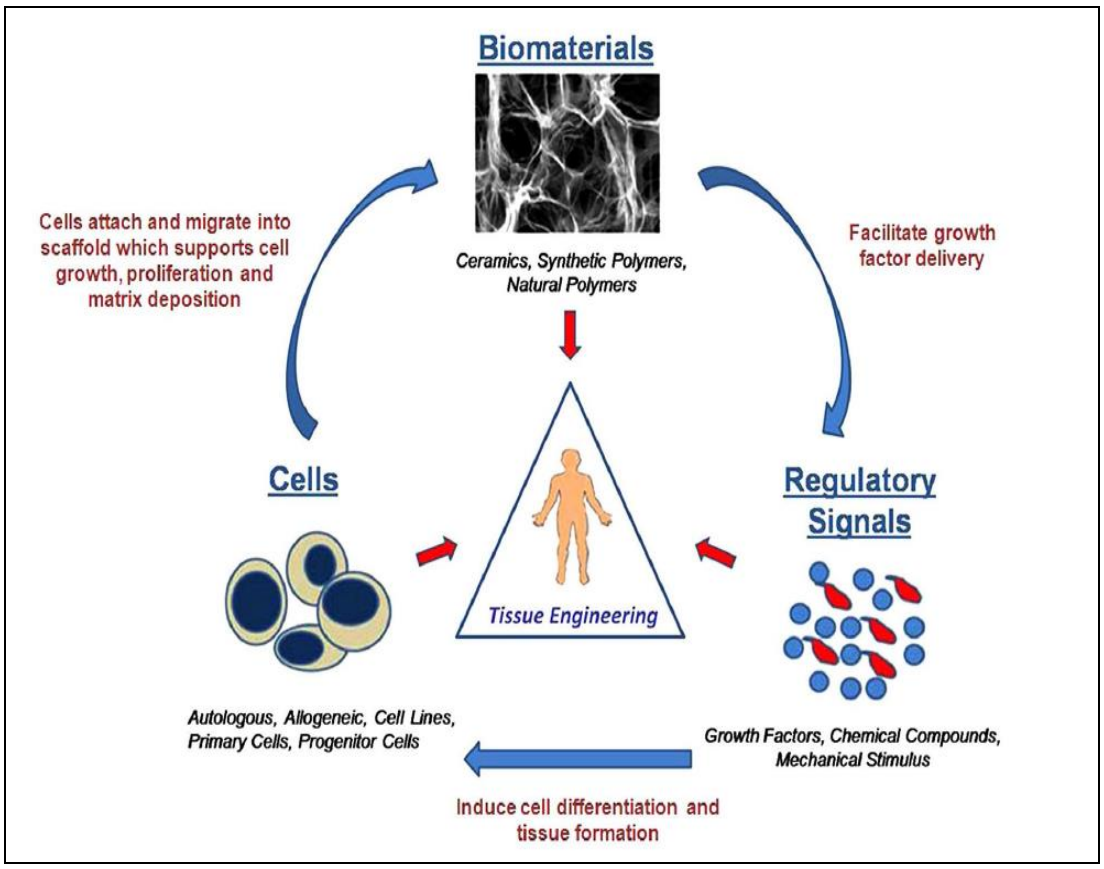


Figure 2. La triade de l'ingénierie tissulaire**.** Trois composantes principaux définissent l'ingénierie tissulaire : *(i)* un biomatériau fournissant la structure et le substrat pour la croissance et le développement du tissu d'intérêt, *(ii)* une source de cellules nécessaires pour la formation de ce tissu, et *(iii)* des facteurs de croissance ou des stimuli biophysiques dirigeant la croissance et la différenciation des cellules au sein du biomatériau **(18)**.

La stratégie la mieux appropriée et la plus généralement utilisée implique les étapes principales suivantes (figure 3):

a) la sélection d'une source de cellules (progéniteurs ou cellules souches dérivant de plusieurs sources) et leur prélèvement chez le patient

b) leur amplification en induisant leur différenciation vers le phénotype spécifique désiré ;

c) la conception de « scaffolds » biomimétiques convenables dont les propriétés seront choisies en fonction du tissu à reconstruire (choix du matériau, la porosité, interconnectivité, caractéristiques de la surface, etc…)

d) les cellules sont alors ensemencées directement sur le biomatériau et cultivées ensuite dans des conditions constantes ou dynamiques (bioréacteurs) pour favoriser la pénétration des nutriments et les échanges gazeux au sein du biomatériau (19). Afin de promouvoir la croissance cellulaire, des facteurs de croissance et de différenciation peuvent être utilisés ;

e) enfin le choix d'un modèle animal adéquat pour tester l'efficacité des différentes démarches d'ingénierie tissulaire utilisées ainsi que le potentiel des différentes combinaisons employées (cellules/ « scaffolds » / conditions de culture) (17). Si le modèle est validé, la « structure » d'ingénierie tissulaire est alors implantée chez le patient.

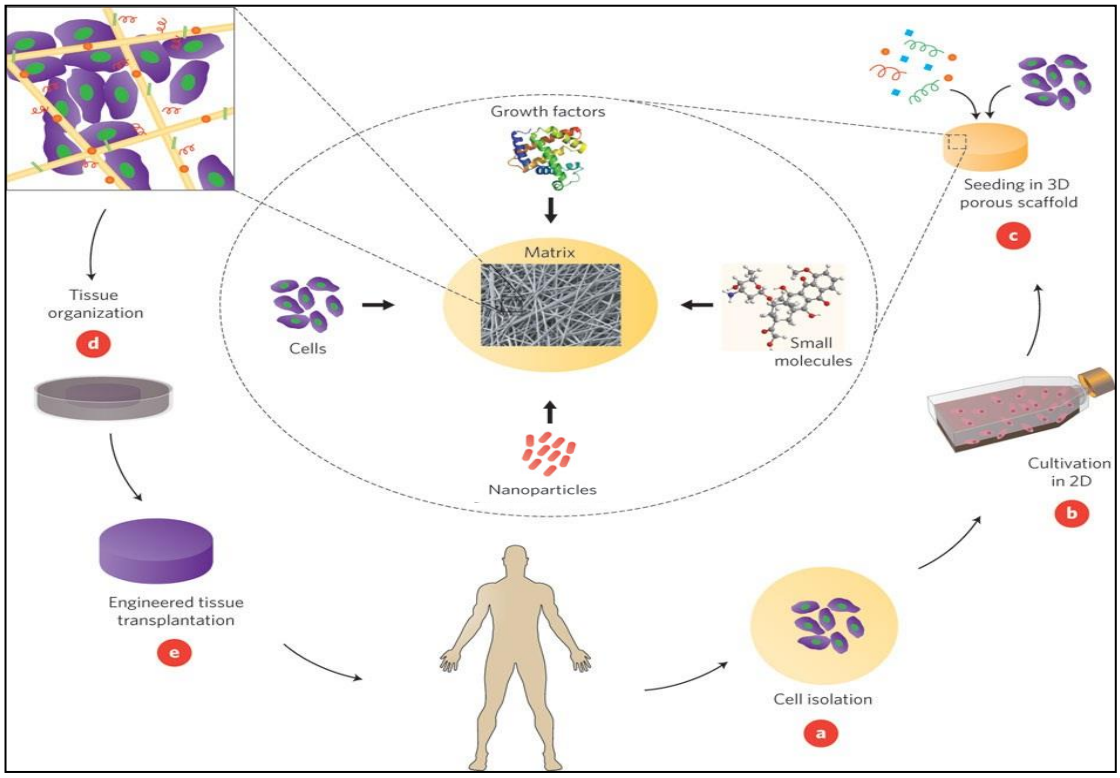


Figure 3. Un exemple de concept d'ingénierie tissulaire. Les cellules peuvent être prélevées chez le patient (a), multipliées et/ou différenciées *in vitro* sur des surfaces bidimensionnelles (b). Les cellules sont ensuite ensemencées dans le « scaffold » et sont associées à des facteurs de croissance et de petites molécules et/ ou des nanoparticules (c). L'ensemble est ensuite mis en culture sous contraintes dynamiques et/ou biochimiques pour permettre la synthèse de matrice extracellulaire par les cellules (d). Dès qu'un tissu fonctionnel est formé, la « structure » d'ingénierie tissulaire est implantée pour rétablir la fonction perdue (e) **(20)**.

II. Principaux outils de l'ingénierie tissulaire

A. BIOMATERIAUX

Les tissus sont des ensembles coopératifs de cellules qui forment une triple association : territoriale, fonctionnelle et biologique. Ils sont exclusivement constitués de cellules et de matrice extracellulaire (MEC) (structure complexe remplissant les espaces entre les cellules et assurant de nombreuses fonctions de consolidation, de cohésion, d'interactions et d'adaptation aux besoins). Lorsqu'un tissu est partiellement ou totalement endommagé, non seulement un grand nombre de cellules fonctionnelles est perdu, mais aussi la MEC. Un tissu biologique représente un réseau hautement organisé de cellules et de matrices. La fabrication d'un tissu de remplacement pourrait donc être facilitée en imitant l'organisation spatiale au sein du tissu natif. Dans ce but, un « scaffold » **bioactif** doit être utilisé comme archétype pour favoriser les

interactions cellulaires et la formation d'une MEC qui fournit un support structural au tissu néoformé. Des cellules isolées, placées en suspension sur un tissu, possèdent une capacité limitée de formation d'une structure tissulaire et cela à cause de la nécessité d'un modèle guidant l'organisation cellulaire. En ingénierie tissulaire, le terme « scaffold », « modèle » ou « matrice artificielle » désigne un substitut de MEC native. Un « scaffold » fournit un analogue tridimensionnel de la MEC qui permet l'infiltration et la prolifération des cellules dans le tissu ou organe cible. Quand aucun « scaffold » n'est nécessaire pour guider les cellules, il s'agit de **« thérapie cellulaire ».** La thérapie cellulaire ne fait intervenir aucune opération chirurgicale. Elle consiste en l'administration de cellules (cellules souches ou non, transformées ou non par thérapie génique), sous forme encapsulée ou non dans un organe lésé afin de restaurer ses fonctions. Il serait alors impératif de définir deux sous-groupes dans la médecine régénératrice en fonction de la nécessité de « scaffolds » (21).

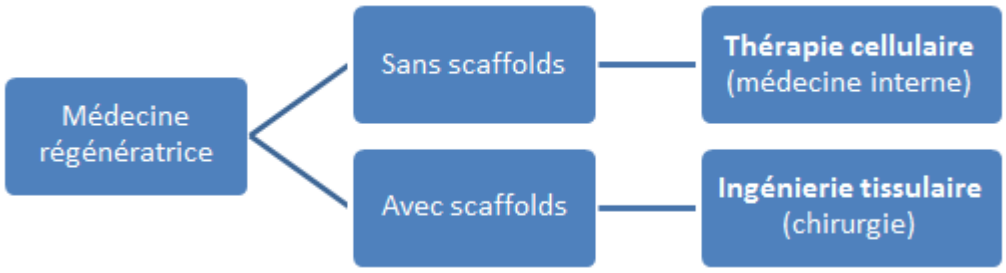


Figure 4. Classification de la médecine régénératrice basée sur la nécessité d'utilisation de « scaffolds ».

L'adhésion cellulaire est cruciale dans l'initiation de la croissance cellulaire et le développement d'un tissu. En premier lieu, le « scaffold » doit assurer l'adhésion et la prolifération des cellules sur un substrat solide en reproduisant la forme spécifique de l'organe et en la maintenant au cours du temps (Fig. 5). Le matériel utilisé et la structure tridimensionnelle (3D) du « scaffold » jouent un rôle significatif dans l'activité cellulaire, c'est pourquoi ses propriétés doivent être bien adaptées à la nature du tissu cible et à sa fonction ; les biomatériaux (synthétiques ou naturels) utilisés dans la fabrication des « scaffolds » doivent être

essentiellement sélectionnés en fonction de leur biocompatibilité, leur bioabsorbabilité et leurs propriétés mécaniques.

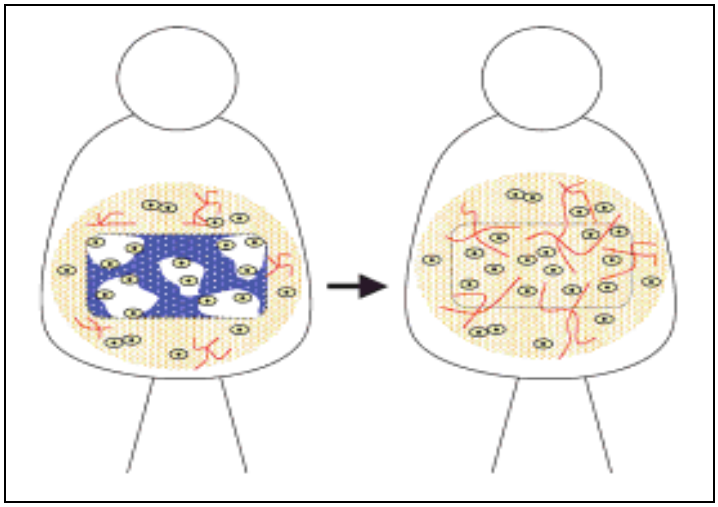


Figure 5. Rôle du « scaffold » en ingénierie tissulaire. Le « scaffold » est remplacé par des cellules de l'hôte et une nouvelle matrice extracellulaire (MEC) fournissant des propriétés fonctionnelles et mécaniques semblables au tissu natif.

En résumé, un scaffold biologiquement actif doit avoir les caractéristiques suivantes :

a) une structure poreuse en 3D bien définie permettant l'ensemencement d'un nombre important de cellules ainsi que la mise en place, si nécessaire, d'une vascularisation (22).

b) une structure physico-chimique permettant l'adhésion, la prolifération et la différenciation cellulaire et la formation d'une MEC afin d'organiser les cellules en une architecture 3D.

c) un réseau perméable de pores interconnectés pour favoriser la pénétration des nutriments et les échanges gazeux.

d) un substrat non toxique et absorbable avec un taux d'absorption contrôlable de façon à ce que la résorption du «scaffold » se fasse en parallèle avec la reconstruction tissulaire.

e) une propriété biologique facilitant la mise en place d'un système de vascularisation dans le scaffold.

f) des propriétés mécaniques correspondant à celles du tissu cible.

g) un vecteur de facteurs de migration, prolifération et différenciation pour les cellules environnantes (23,24).

h) une architecture fournissant temporairement les caractéristiques structurales et biomécaniques du tissu de remplacement jusqu'à ce que les cellules synthétisent leur propre MEC.

i) la reproduction de la forme spécifique de l'organe avec une architecture reproductible.

j) être stérile et stable au cours de la production, de la conservation et du transport.

B. CELLULES

La formation d'un tissu in vitro requiert l'utilisation de cellules pour les ensemencer sur les « scaffolds » et produire une matrice ressemblant à celle du tissu natif. Les cellules jouent un rôle crucial dans la régénération et la réparation tissulaires en raison de leurs caractéristiques de prolifération, de différenciation, d'interactions cellulaires, de production de biomolécules, de formation de MEC…

Les cellules utilisées en ingénierie tissulaire peuvent être de source autologue, allogénique ou xénogénique. Les cellules autologues sont isolées directement chez le patient, tandis que les cellules allogéniques proviennent d'un individu donneur (même espèce). Les cellules xénogéniques dérivent d'une espèce différente et sont moins utilisées en ingénierie tissulaire que dans le domaine de la transplantation d'un organe entier (18).

L'idéal serait une source de cellules :

- facilement accessibles
- facilement mises en culture pour proliférer sans induire des altérations de phénotype ou de fonctions

- ne transmettant pas de pathogènes spécifiques au donneur
- multipotentes, ayant la capacité de se différencier ou se transdifférencier en des cellules spécifiques du tissu ou organe cible
- la moins immunogène possible (25)

Certaines cellules, telles que les kératinocytes, les fibroblastes, les chondrocytes, les cellules endothéliales, les cellules musculaires lisses ou les cellules musculaires satellites prolifèrent rapidement et peuvent être considérées comme candidates convenables pour l'ingénierie du tissu qui leur est spécifique (25). D'autres cellules, comme les hépatocytes ou les cardiomyocytes adultes, prolifèrent peu voire pas du tout. Cependant, l'isolement de cellules matures requiert des techniques invasives, et leur capacité proliférative dépend de l'âge et de l'état du patient (26). Par conséquent, l'attention s'est focalisée sur l'utilisation de cellules souches, y compris les cellules souches embryonnaires (CSE), les cellules souches fœtales, les cellules souches adultes, les cellules souches pluripotentes induites (iPS) (cf chapitre 2).

Il existe trois principales stratégies thérapeutiques pour le traitement des tissus défectueux ou lésés chez les patients:

(a) *L'implantation de cellules isolées* : des populations cellulaires entières peuvent être implantées directement après isolement, ou elles peuvent être cultivées *ex vivo* afin de les faire proliférer avant implantation (18).

(b) *implantation d'un matériel formé à partir de cellules et de biomatériaux* : dans le contexte d'ingénierie tissulaire et de médecine régénératrice, l'utilisation de cellules isolées n'est pas limitée au remplacement direct des cellules endommagées. Une autre méthode serait d'implanter une combinaison de cellules, avec ou sans phase de culture, ensemencées sur un substrat (27,28).

(c) *régénération tissulaire in situ par les cellules natives* : L'isolement et l'expansion de cellules souches autologues ont été autrefois considérés comme l'avenir de l'ingénierie tissulaire et la médecine régénératrice. Cependant, les défis associés aux coûts, à la durée de culture ainsi qu'aux rapports limités d'efficacité ont conduit à se recentrer sur les processus de recrutement des cellules natives vers les sites de lésions tissulaires. Pour moduler la migration et la

différenciation requise des progéniteurs endogènes, des facteurs susceptibles d'affecter des signaux de régulation ou des protéines impliquées dans la cascade de signalisation peuvent être administrés. En tant que tel, le domaine de livraison contrôlée et ciblée de principes actifs via les biomatériaux produit actuellement de nombreuses innovations dans la conception de ces derniers (29–31). L'application des technologies de thérapie génique est une autre méthode pour la modulation du recrutement des progéniteurs et leur différenciation. La thérapie génique est un outil puissant pour la manipulation des progéniteurs existants ainsi que pour l'apport de signaux paracrines (32). Par exemple, les cellules peuvent être modifiées pour qu'elles produisent du VEGF (« vascular endothelial growth factor ») afin de stimuler l'angiogenèse. La thérapie génique utilisant des vecteurs viraux et non viraux peut permettre une livraison transitoire ou durable d'une série de facteurs thérapeutiques, mais souvent a un coût élevé et présente des risques de transformation maligne (27). Récemment, il y a eu un intérêt particulier pour la combinaison de la thérapie génique avec des modèles de biomatériaux pour produire des « gene-activated matrices », augmentant ainsi la capacité de réparation. Le biomatériau agit alors comme un support pour le gène tout en fournissant simultanément un soutien structural et une matrice pour le tissu néoformé (33–35).

C. SIGNAUX REGULATEURS

Le comportement cellulaire est fortement influencé par des signaux biologiques, biochimiques et biophysiques émis par la MEC. Par conséquent, l'utilisation de signaux de régulation est la troisième composante de la triade de l'ingénierie tissulaire. Ces signaux incluent notamment des stimuli biochimiques et/ou biophysiques pour induire et régler la formation des tissus à la fois *in vitro* et *in vivo* (18).

Les signaux biochimiques modulent les processus de signalisations cellulaires responsables de la migration cellulaire, l'adhésion, la prolifération, la différenciation et la survie. Les facteurs de croissance et cytokines peuvent fonctionner localement ou systématiquement afin de changer le mode d'expression des gènes dans les cellules cibles. Ils peuvent également être impliqués dans l'activation ou l'inhibition de la synthèse d'autres facteurs de croissance et récepteurs. Ces protéines se lient à des récepteurs transmembranaires qui transduisent les signaux extracellulaires entraînant des changements au niveau de l'expression génique (36,37). Les

facteurs de croissance et principes actifs modulant la signalisation cellulaire sont largement utilisés en ingénierie tissulaire, même si leur utilisation peut augmenter considérablement le coût d'un implant.

En plus des signaux biochimiques, les stimuli biomécaniques influencent également le comportement cellulaire par un processus connu sous le nom de « mécano-transduction ». Plusieurs systèmes ont été développés pour induire différents types de stimulation physique à des cellules en culture, y compris les bioréacteurs en flacon de type « spinner », les bioréacteurs à perfusion, les bioréacteurs de compression dynamique, et les bioréacteurs de pression hydrostatique (38). Une stimulation biomécanique appropriée, *ex vivo*, peut positivement influencer la différenciation cellulaire, la production de la MEC et, le résultat obtenu après l'implantation (39). La distribution hétérogène des cellules peut être un obstacle majeur pour le développement, *ex vivo,* d'un tissu ou d'un organe en 3D, pour cela des méthodes de biomécanique optimisées ont été mises au point pour améliorer la distribution cellulaire spatiale (40).

Une meilleure compréhension du rôle de la MEC dans la régulation des signaux moléculaires / biochimiques ainsi que physiques a permis le développement d'une nouvelle génération de biomatériaux. Par exemple, il a été montré que le destin des cellules souches est influencé par la rigidité du substrat sur lequel elles sont ensemencées (41). En conséquence, les biomatériaux, eux-mêmes, peuvent être considérés comme des signaux de régulation dans la conception de l'implant dans l'ingénierie tissulaire, de façon à ce que la structure chimique et physique du biomatériau soit bien adaptée à un comportement cellulaire optimal (18).

En résumé, les paramètres caractérisant chaque élément de la triade de l'ingénierie tissulaire sont montrés dans la figure 6 ci-dessous.

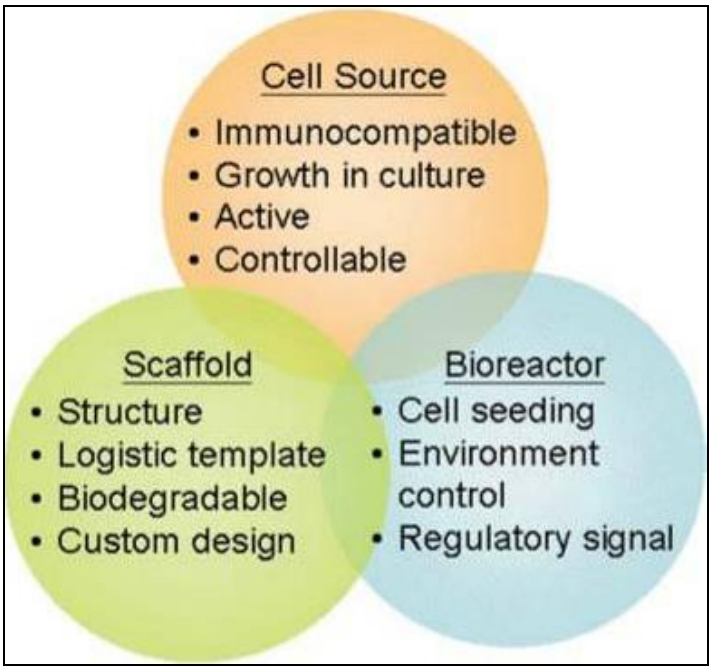


Figure 6. Paramètres définissant le concept de l'ingénierie tissulaire **(42)**.

III. Application de l'ingénierie tissulaire à la médecine vasculaire

Les maladies cardiovasculaires (MCV) sont la principale cause de mortalité dans les pays occidentaux, et parmi les dix premières causes de mortalité et de morbidité dans le monde. Chaque année, les infarctus de myocarde, les accidents vasculaires cérébraux (AVC), les insuffisances cardiaques congestives, les maladies des valves cardiaques et les maladies vasculaires telles que l'athérosclérose entraînent des milliers de morts. La prise en charge de ces maladies constitue donc un enjeu considérable en termes de santé publique. Selon Zaragoza et al, les complications cardiaques et vasculaires sont associées à des facteurs génétiques et environnementaux, ce qui rend ces pathologies multifactorielles très difficiles à éviter (43). Bien que beaucoup d'études précédentes aient rapporté que les nouveaux médicaments et les dispositifs innovants aient amélioré la qualité de vie des patients souffrant de MCV, mais elles n'ont pas mentionné que ces traitements ont réduit le taux de mortalité et de morbidité (44). Ensuite, la transplantation d'organes s'est avérée comme une nouvelle voie thérapeutique proposant un remède immédiat en remplaçant des tissus ou organes par des substituts fonctionnels. Comme il s'agit du traitement de choix dans le cas d'une défaillance d'un organe, il y a alors un besoin croissant d'organes humains compatibles transplantables (autologues ou allogéniques) (45). Cependant, deux obstacles majeurs compliquent l'application de ce

traitement : le manque de donneurs, et le risque élevé de rejet de greffe (46). En fait, le succès du traitement des MCV a été limité par l'absence de tissus autologues capables de réparer les muscles cardiaques atteints et de conduits vasculaires remplaçant les vaisseaux occlus. De plus, les immunosuppresseurs administrés lors d'une transplantation augmentent le risque d'infections et de cancers affectant aussi le taux de mortalité dû aux MCV (44).

Plus particulièrement, pour faire face aux atteintes du système vasculaire, plusieurs méthodes sont utilisées :

- des médicaments permettant de réduire le risque de survenue ou de récidive des maladies vasculaires ;
- des prothèses synthétiques (en Dacron® ou en polytétrafluoroéthylène expansé (ePTFE)) ;
- une endoprothèse (« stents »): qui consiste à placer un ballonnet gonflable à l'endroit où le vaisseau est rétréci pour le dilater, et y placer un dispositif à ressort pour maintenir le diamètre nécessaire pour une bonne circulation sanguine ;
- un pontage : c'est-à-dire une portion de vaisseau prélevé chez le patient est ajustée de part et d'autre de la zone obstruée.

Néanmoins, les médicaments ne fournissent pas un traitement curatif, les prothèses synthétiques ne sont applicables que pour les vaisseaux ayant un diamètre inférieur à 6mm, les endoprothèses peuvent induire une occlusion aigüe ou une resténose et le capital vasculaire d'un patient pourrait ne pas permettre un pontage (47,48). C'est pourquoi pour s'affranchir des limites des traitements traditionnels il est nécessaire de développer des substituts vasculaires issus de l'ingénierie et rassemblant les caractéristiques d'un vaisseau natif.

A. STRUCTURE, FONCTIONS ET PATHOLOGIES VASCULAIRES

a) Structure et fonctions de la paroi vasculaire

Les vaisseaux sanguins parcourent le corps et jouent un rôle dans les échanges gazeux, le transport des nutriments et des déchets, et la défense immunitaire. Les artères répondent toutes à un modèle commun d'organisation. Elles sont constituées de trois couches (figure 7) où chaque type cellulaire exerce différentes fonctions relatives à la physiologie cardiovasculaire:

(a) Une monocouche de cellules endothéliales (CE), reposant sur une zone sous-endothéliale de structure lâche, en contact direct avec le sang et formant la tunique interne ou **intima**. Les CE ont des fonctions diverses telles que le transport d'un nombre de constituants sanguins parmi lesquels les lipoprotéines. Elles peuvent produire des substances exerçant un effet sur les éléments figurés du sang et sur la paroi vasculaire comme : la prostacycline qui est vasodilatatrice et inhibe les fonctions plaquettaires ; d'autres substances vasodilatatrices agissant sur la media (décrite ci-dessous) ; des substances vasoconstrictrices (endothéline). Cette couche est sensible à des stimuli *via* des récepteurs membranaires, des messagers physiques, des médiateurs locaux et des conditions métaboliques.

(b) une couche de cellules musculaires lisses (CML), de péricytes et d'un réseau de collagène, élastine et de mucopolysaccharides recouvrant les CE et formant la tunique moyenne ou **media**. C'est la tunique la plus épaisse, limitée de part et d'autre par les membranes limitantes élastiques interne et externe. Les CML possèdent une fonction contractile assurant le tonus artériel et la vasomotricité et elles exercent aussi des fonctions métaboliques en particulier la sécrétion de la MEC et le catabolisme des lipoprotéines. Les péricytes ont un rôle dans l'inhibition de l'inflammation, la réduction de la formation de cicatrices et favorisent l'angiogenèse.

(c) Des fibroblastes et de la MEC forment la couche externe ou **adventice**. Cette couche joue un rôle dans le transport cellulaire, le remodelage vasculaire, l'ancrage et la médiation d'une réponse immunitaire.

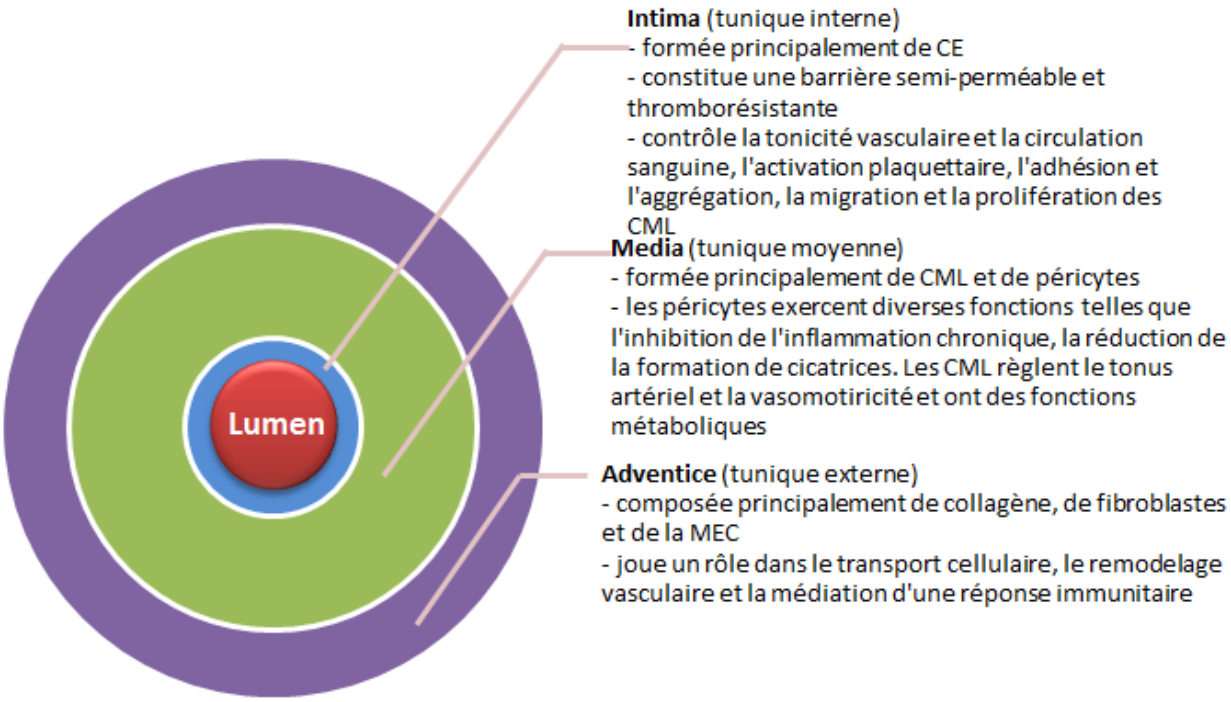


Figure 7. Les principales tuniques d'un vaisseau sanguin artériel : la composition cellulaire et les fonctions de l'intima, de la média et de l'adventice

Chaque type cellulaire formant le vaisseau exerce différentes fonctions relatives à la physiologie cardiovasculaire (49). Ensemble, ces trois couches de cellules jouent un rôle dans la réparation, le remodelage, et le maintien du vaisseau sanguin après une lésion.

Il a été démontré que tous les types cellulaires formant ces couches interviennent, non seulement dans le cas d'une pathologie cardiovasculaire, mais aussi dans la thérapie cellulaire. Dans une revue récente, Chen et al. ont indiqué que les cellules dérivant des vaisseaux sanguins sont utilisées en tant que sources cellulaires pour la réparation et la régénération tissulaire dans plusieurs maladies cardiaques et musculaires. Les cellules endothéliales myogéniques contribuent à la régénération musculaire et la réparation cardiaque surtout en cas d'infarctus aigu du myocarde. D'autre part, les péricytes participent à la régénération des muscles cardiaques dystrophiques, alors que les cellules de l'adventice permettent le remodelage vasculaire et la régénération des tissus voisins (50–52).

b) Pathologies vasculaires : exemple de l'athérosclérose

Les pathologies vasculaires telles que l'athérosclérose, l'artérite, l'insuffisance veineuse chronique et la thrombose sont parmi les principaux problèmes vasculaires dans le monde.

L'athérosclérose, cause commune des maladies cardiovasculaires, est en nette progression dans les pays développés. C'est une maladie artérielle décrite comme étant une pathologie inflammatoire chronique et évolutive caractérisée par des dépôts de lipides et d'éléments fibreux dans la paroi des artères. Le processus inflammatoire est associé à l'interaction entre les éléments cellulaires de la paroi artérielle, les cellules immunitaires (macrophages et lymphocytes T) et les lipoprotéines modifiées. Cette inflammation chronique aboutit à un processus cicatriciel réactionnel de la paroi artérielle impliquant les CML et la production de MEC et aboutissant à la formation des lésions complexes. La cicatrisation de la lésion permet sa stabilisation dans le temps même si ce phénomène pourrait aboutir parfois à la réduction du diamètre artériel. Certaines de ces lésions inflammatoires, trop importantes ou trop brutales, vont conduire à des lésions qui vont se compliquer par une rupture ou une érosion de plaque et une thrombose artérielle aboutissant à la complication ultime de cette pathologie, l'obstruction brutale du vaisseau et la survenue d'événements cliniques majeurs, infarctus du myocarde ou accidents vasculaires cérébraux (53,54).

D'après les descriptions anatomopathologiques, l'évolution de la formation des plaques d'athérosclérose se fait en 8 stades :

- stade I : un épaississement fibromusculaire de l'intima formé de cellules spumeuses isolées, c'est-à-dire des macrophages chargés d'une quantité abondante de lipides dans leur cytoplasme ;
- stade II : l'épaississement devient des stries lipidiques constituées par un plus grand nombre de cellules spumeuses, ainsi que de CML chargées de lipides. Les deux premiers stades sont asymptomatiques et peuvent se développer avant l'âge de dix ans (figure 8)

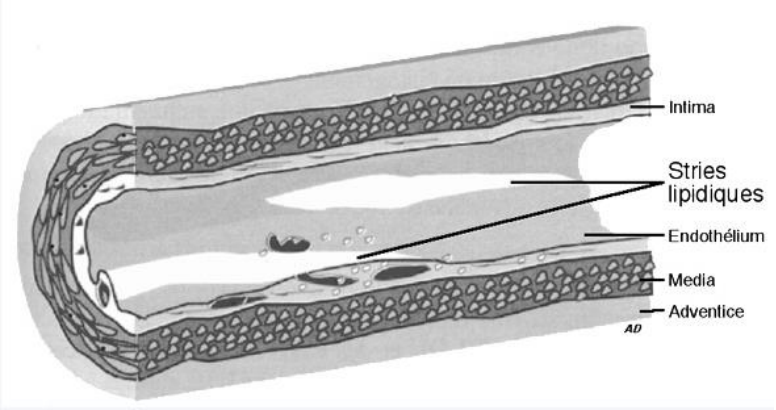


Figure 8. Stries lipidiques apparaissant sous l'endothélium artériel (55).

- stade III ou pré-athérome : correspond à l'évolution des stries lipidiques et à une accumulation de lipides extracellulaires chez le jeune adulte.
- stade IV : les lipides intra et extracellulaires forment un amas appelé cœur lipidique qui est l'athérome (plaque simple) (figure 9).

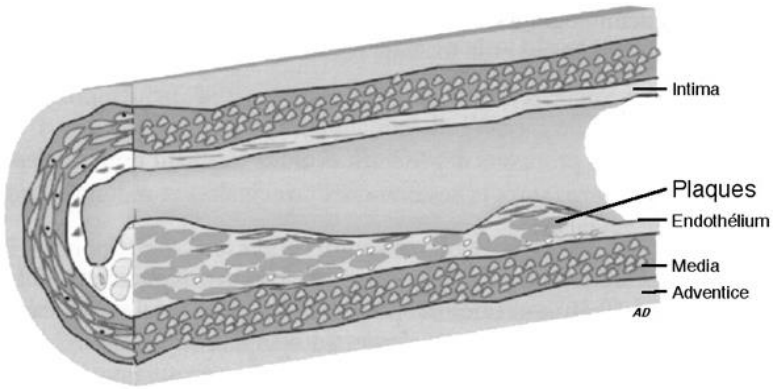


Figure 9. Athérome ou plaque simple **(55)**.

- Stade V : correspond à l'évolution de la plaque simple en plaque d'athérosclérose mature. La fibrose, tissu fibreux formé par les CML, entoure le cœur lipidique en l'isolant de la lumière artérielle (figure 10).

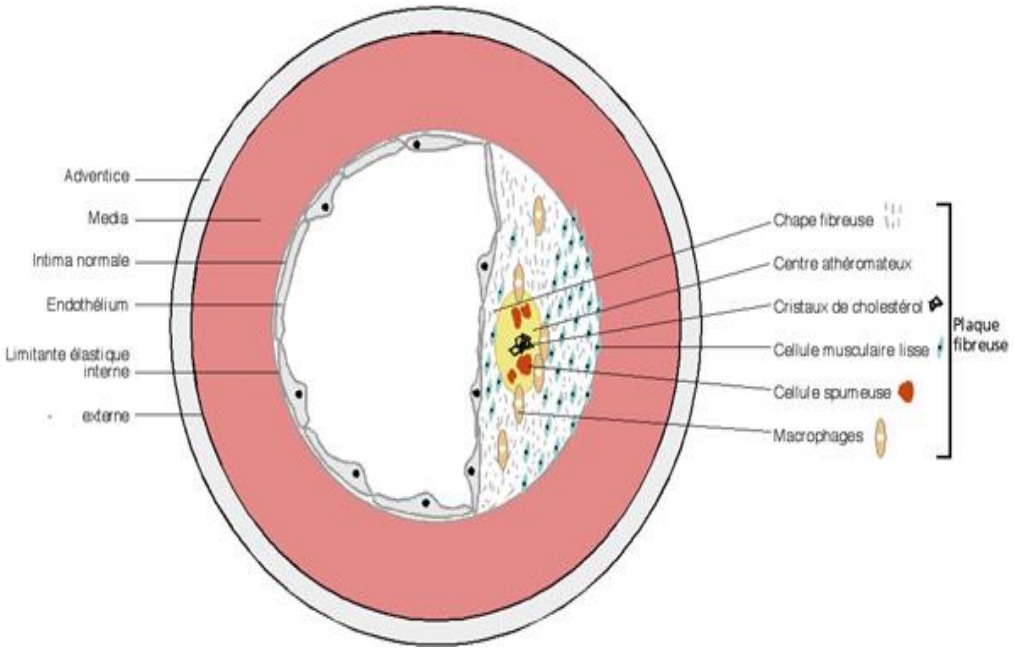


Figure 10. Plaque d'athérome mature **(56).**

- stade VI : la plaque d'athérosclérose mature devient une plaque compliquée, des accidents de rupture avec thrombose et infiltration hémorragique peuvent survenir
- stade VII : aux âges avancés apparaissent des plaques lourdement calcifiées ou presque exclusivement scléreuses au stade VIII.

L'initiation des plaques d'athérosclérose est imposée par deux phénomènes principaux : la présence de lipoprotéines circulantes ayant subi une oxydation et la dysfonction endothéliale (54).

B. L'INGENIERIE VASCULAIRE

La morbidité croissante liée aux maladies cardiovasculaires a rendu crucial le développement de substituts vasculaires pour remplacer plus particulièrement les vaisseaux de petit diamètre (moins de 6 mm). Bien que l'utilisation de prélèvements autologues reste la meilleure stratégie pour le remplacement d'un vaisseau défectueux, ils ne sont pas toujours disponibles en raison de prélèvements antécédents ou de leur qualité incorrecte notamment chez les patients âgés. Malgré un besoin clinique clair pour une greffe artérielle fonctionnelle, le succès des prothèses synthétiques s'est limité au remplacement des vaisseaux de gros calibre.

Cependant, les besoins de substituts vasculaires de petit diamètre sont importants notamment quand il s'agit de fistules artério-veineuses chez les hémodialysés ou de pontages artériels distaux. Les limites d'utilisation des substituts autologues dans certaines situations a fait de l'ingénierie tissulaire une approche prometteuse pour les pallier (49). Le concept de cette approche est basé sur l'association de cellules et d'une matrice (synthétique ou naturelle) qui seront soumis à des signaux locaux, physiques et chimiques afin de conditionner la perméabilité et les propriétés mécaniques des vaisseaux néoformés.

L'ingénierie tissulaire vasculaire nécessite une approche multidisciplinaire, intégrant les connaissances de la biologie vasculaire avec l'ingénierie des biomatériaux et la microfluidique afin d'essayer de reproduire le microenvironnement approprié dans lequel les cellules peuvent former des vaisseaux sanguins matures capables de maintenir la viabilité des tissus au cours du temps. La conception d'un système microvasculaire exige tout d'abord le choix de types cellulaires appropriés qui sont des cellules endothéliales et des cellules périvasculaires. Ces cellules peuvent être isolées directement en tant que cellules primaires, dérivées de progéniteurs circulants dans le sang ou différenciées à partir des cellules souches. Après avoir sélectionné le type cellulaire à employer, il est nécessaire de choisir un matériau permettant de soutenir les cellules dans un environnement en 3D (57).

Bell et al. ont été les premiers à appliquer les approches de l'ingénierie tissulaire vasculaire en construisant, pour la première fois, une artère *in vitro*. Dans cette étude pionnière, des CML bovines ont été cultivées dans des gels de collagène pour produire la media d'une artère dans laquelle des fibroblastes de l'adventice ont été ensemencés pour former l'adventice. Quant aux CE, elles ont été ensuite ensemencées dans la lumière du construit. Bien que ce greffon ressemble à une artère native d'un point de vue structural, il ne l'était pas au niveau fonctionnel. Néanmoins, à partir de cette étude, de nombreuses approches ont été développées pour concevoir un greffon vasculaire qui imite le vaisseau natif vis-à-vis de ses propriétés mécaniques et la composition de sa matrice extracellulaire (principalement de collagène et d'élastine). Dans l'ensemble, ces différentes méthodes peuvent être classées selon l'emploi ou non de « scaffolds », et les substituts vasculaires peuvent être générés soit dans un bioréacteur soit dans l'organisme de l'hôte (58). Trois technologies d'ingénierie vasculaire ont notamment conduit à des produits qui ont été employés dans des essais cliniques aux États-Unis et ailleurs

(tableau I), ce qui démontre le potentiel des stratégies d'ingénierie tissulaire à produire des vaisseaux sanguins implantables pour les applications cliniques.

Tableau I. Applications cliniques utilisant des conduits vasculaires crées par différentes approches d'ingénierie vasculaire.

Groupes	Approches	Méthodes	Applications cliniques
Nikalson/Humacyte	Matrices biodégradables	CMLs humaines cultivées dans une matrice d'APG sous un étirement pulsatile.	Shunts artério-veineux pour dialyse
L'Heureux/Cytograft	Auto-assemblages de feuillets cellulaires	Feuillets de CMLs contenant de fibroblastes humains enroulés autour d'une structure tubulaire et mis en culture pour permettre la fusion entre les feuillets.	Shunts artério-veineux pour dialyse
Shinoka et Breuer	Bioréacteur *in vivo*	Des CMN-MO cultivées brièvement sur un copolymère d'acide polycaprolactone-polyactique avec de l'APG permettant de recruter des cellules *in vivo* pour le remodelage.	Conduits cavopulmonaires extracardiaques

CMLs : cellules musculaires lisses ; APG : acide polyglycolique ; CMN-MO : cellules mononucléées de moelle osseuse

Les trois approches peuvent être résumées comme suit (figure 11) :

(a) Un assemblage des vaisseaux *in vitro* à partir de cellules et de scaffolds dégradables synthétiques ou naturels ;

(b) Un auto-assemblage in vitro à partir de feuillets cellulaires, méthode n'exigeant pas l'utilisation de scaffolds ;

(c) La formation de vaisseaux *in vivo* à partir de greffes acellulaires dérivant de vaisseaux sanguins décellularisés, de sous-muqueuses intestinales ou de CML allogéniques cultivées (59).

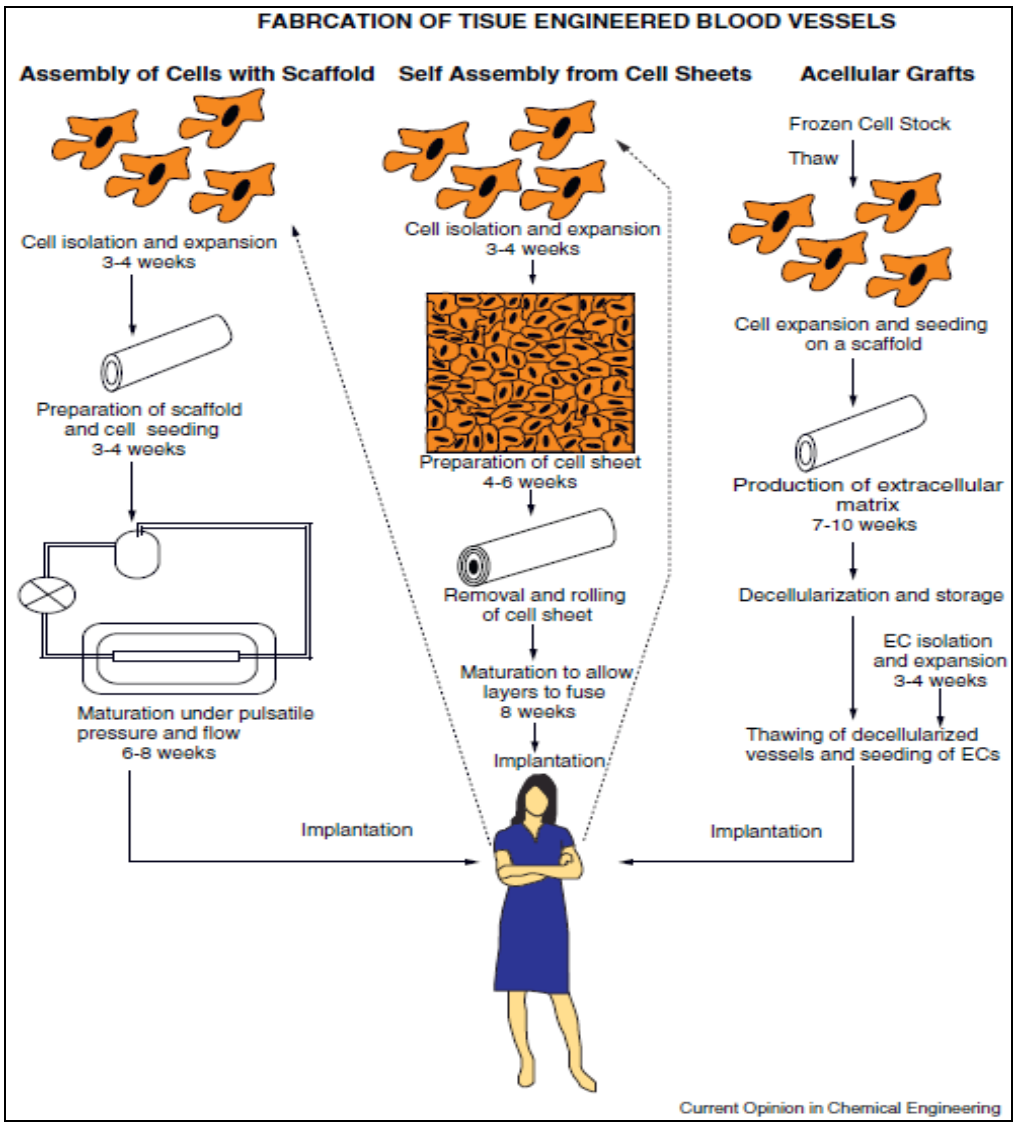


Figure 11. Schéma représentant les trois différentes approches d'ingénierie tissulaire pour la fabrication de substituts vasculaires (59).

a) Biomatériaux en ingénierie vasculaire

Les biomatériaux peuvent être d'origine naturelle ou synthétique. Le gel de fibrine compte parmi les matrices naturelles. L'ensemencement de ce gel par des fibroblastes dermiques humains et leur culture pendant 7 à 8 semaines a donné des résultats encourageants: en effet, le conduit obtenu a montré des propriétés mécaniques satisfaisantes, mais il reste à valider ce modèle *in vivo* (60). En pratique, ce sont les polymères synthétiques qui sont les plus couramment utilisés et non pas ceux d'origine naturelle comme on pourrait intuitivement penser. Parmi les polymères synthétiques, l'acide poly-glycolique (PGA) et l'acide poly-L-lactique (PLLA) dont l'utilisation a dominé pendant longtemps sont les plus connus, mais de nombreux autres matériaux sont aujourd'hui en cours de développement et testés.

Les matériaux, n'importe leur nature, doivent principalement répondre aux critères suivants pour envisager la possibilité de leur utilisation en clinique :

- Une résistance à la fatigue garantissant la stabilité du diamètre dans le temps
- Une résistance à la rupture similaire à celle des veines saphènes (>1700 mmHg)
- Une absence de thrombogénicité
- Des conditions de construction relativement simples
- Etre réglementairement acceptables et économiquement viable pour un industriel

Ce cahier des charges impose donc que les recherches actuelles optimisent principalement la biocompatibilité, la cinétique de dégradation afin qu'elle se produise au fur et à mesure de la formation de la MEC et la colonisation par les cellules de l'hôte, et les propriétés mécaniques pour avoir une compliance proche de celle des vaisseaux natifs (61). Pour cela il faut tenir compte de plusieurs variables pour répondre à toutes ces contraintes, notamment le poids moléculaire du polymère, sa porosité et son module d'élasticité compte tenu de la sensibilité de l'adhésion et de la différenciation cellulaires à la nature physique du substrat (62). Les nanotechnologies pourraient intervenir pour créer à l'échelle nanométrique une architecture mimant au mieux celle de la MEC native et optimisant alors les interactions avec les cellules circulantes (63).

Ci-dessous le tableau II permet de résumer les types des biomatériaux utilisés en ingénierie vasculaires et d'énumérer leurs principales caractéristiques [pour plus de détails, se référer à la référence (64)].

Pour être efficace, un biomatériau doit être **bioactif**, c'est-à-dire capable de créer des liens « chimiques » étroits au niveau de l'interface tissu hôte/greffon. La bioactivité d'un matériau est donc fortement liée à ces propriétés physico-chimiques. Durant les trois dernières décennies, les recherches se sont intéressées à trouver les meilleures approches afin de rendre un matériau bioactif en ayant recours à la modification de sa surface soit par :

- la modulation des propriétés physiques telles que la rugosité, la charge de surface, la topographie… ;
- le dépôt de films auto-assemblés de polyélectrolytes appelés films multicouches de polyélectrolytes (FMP) ;
- le greffage de molécules à la surface du biomatériau ou le dépôt par adsorption de molécules afin de rendre le biomatériau biomimétique.

Dans ce qui nous suit, nous traiterons seulement la modification de la surface d'un biomatériau issu d'un dépôt de FMP puisque c'est cette approche qui a été employée dans ce projet de thèse de doctorat.

(i) Les films multicouches de polyélectrolytes

Les efforts de la recherche se portent actuellement à la réalisation de surfaces bioactives assurant l'adhésion et le développement cellulaires. L'utilisation de quelques méthodes telles que l'adsorption de protéines et le greffage chimique de polymères est limitée du fait que ces techniques sont difficiles à mettre en œuvre et ne s'adaptent pas à toutes les surfaces. Le dépôt de FMP est un moyen simple, original et efficace capable de fonctionnaliser les surfaces des biomatériaux afin de les cellulariser. Il est basé sur le dépôt couche par couche ou « layer-by-layer » (LbL) de polyélectrolytes (alternativement un polyanion et un polycation) (Fig. 12). La facilité de la mise au point de ce système ainsi que la diversité des polyélectrolytes a autorisé l'élaboration de FMP dont les propriétés physicochimiques et les possibilités modulables de fonctionnalisation permettent d'avoir des biomatériaux bien adaptés à l'application désirée.

Tableau II. Résumé de l'ensemble des biomatériaux utilisés en ingénierie vasculaire(64)

Executive summary

Synthetic polymers

- Nondegradable materials
  - Expanded polytetrafluoroethylene, Dacron® and polyurethane are currently used as synthetic vascular grafts.
  - Polyurethane is better able to match the compliance of native vasculature, but the patency rates of grafts composed of synthetic, nondegradable materials is relatively poor.
  - Functionalization of the polymer surfaces via chemical modification and coatings enables improved endothelialization and thromboresistance of the materials.
- Degradable scaffolds
  - Biodegradable polymers act as scaffolds upon which cells and the surrounding environment can modulate vascular remodeling.
  - Degradable polymers, including polyglycolic acid, polyhydroxyalkanoates, polycaprolactone and polyethylene glycol, have been utilized in generating cell-seeded scaffolds for vascular substitutes.
  - Degradable scaffolds have been further functionalized with proteolytic sites for the controlled release of bioactive molecules from the polymer matrix and optimized presentation of these factors to the surrounding environment via cell-mediated degradation.
  - While degradable polymers have enabled improved extracellular matrix (ECM) production and vascular cell infiltration into the graft site, compliance mismatch, prolonged cell culture periods and the challenges of cell sourcing remain significant obstacles in utilizing biodegradable materials in the clinical setting.

Biopolymers

- The generation of protein polymers that mimic native structural proteins and adopt the characteristics of the arterial wall offers a unique approach to develop a vascular graft.
- Collagen and fibrin gels and fibers are able to bind to critical proteins that direct cell fate, and are therefore ideal in the formation of artificial blood vessels. While aligned, crosslinked collagen fibers contribute to the mechanical integrity of the graft, the more elastic fibrin mimics the role of elastin in native vasculature.
- ECM production and mechanical integrity can be further modulated by smooth muscle cell seeding, culture techniques and preconditioning treatments.
- The biosynthetic machinery of microorganisms can be exploited to produce significant quantities of recombinant protein polymers that have been designed from primary amino acid sequences and self-assemble into a distinct 3D folded structure. The generation of elastin-mimetic protein polymers is one such example of a vascular tissue-engineering application.
- Decellularized allogeneic or xenogenic tubular tissues that contain an intact and structurally organized ECM have been investigated as vascular conduits, which include human umbilical vein and bovine and porcine carotid arteries. These grafts have met with some success, but drawbacks include the inability to tailor matrix content and architecture, progressive biodegradation and the risk of viral transmission from animal tissue.

Les polyélectrolytes sont des macromolécules portant un grand nombre de charges positives ou négatives ou des groupements (caroboxyliques, acides ou amines) qui peuvent être ionisés une fois dissous dans de l'eau en faisant varier le pH. Plusieurs polyélectrolytes ont été exploités dans les domaines d'ingénierie tissulaire dont les polyélectrolytes synthétiques typiques tels que le poly (styrène-4-sulfonate) (PSS), l'hydrochlorue de poly(allylammine) (PAH), l'acide poly(acrylique) (PAA), mais aussi des polysaccharides tels que l'acide hyaluronique (HA) et le chitosane (CHI). Ces polyélectrolytes sont commercialisés, et la construction ainsi que la caractérisation de plusieurs couples de polyélectrolytes ont été bien étudiées. En outre, des protéines (facteurs de croissance), enzymes, peptides… peuvent être intégrés ou adsorbés dans les structures de FMP. Les polyélectrolytes se comportent en tant que polyacides ou polybases forts ou faibles selon la nature du groupement fonctionnel naissant par les chaînes polyioniques. Deux polyélectrolytes de charges opposées interagissent par l'intermédiaire d'interactions électrostatiques menant à la formation des FMP. Sur la base de ces interactions électrostatiques, les FMP peuvent être construits par la technique « LbL » et leur stabilité résulte des interactions des charges intrinsèques fixes des polyélectrolytes mais aussi de la compensation des charges extrinsèques (présence de sels ioniques en solution). La technique LbL ou l'auto-assemblage est très simple : elle consiste en l'exposition d'une surface chargée (n'importe quel type de surface dont les substituts vasculaires, les surfaces artérielles natives…) à une solution de polyélectrolytes de charge opposée. Les interactions électrostatiques vont permettre l'adsorption du polyélectrolyte sur le substrat pour former une très fine couche ayant la charge opposée de la surface de départ. L'excès de charge est éliminé par simple rinçage. Lorsque cette couche est de nouveau exposée à une seconde solution contenant des polyélectrolytes de charge opposée, ceux-ci peuvent interagir électrostatiquement avec la première couche menant à la formation de la première bicouche. Cette procédure est répétée plusieurs fois jusqu'à l'obtention du nombre désirée de bicouches et peut être facilement adaptée pour recouvrir l'intérieur de tubes ou même des vaisseaux sanguins (65).

Films multicouches PAH/PSS

Nous nous intéresserons plus particulièrement aux FMP de type PAH/PSS qui ont été développés depuis une dizaine d'années au sein de l'équipe vasculaire de l'UMR-CNRS 7365 et

ont montré des propriétés très intéressantes mises à profit pour la réalisation d'un substitut vasculaire de petit calibre (8,9,66).

Parmi plusieurs associations de polyélectrolytes, il a été montré par Boura *et al.* que le film $(PAH\text{-}PSS)_3\text{-}PAH$ a permis une meilleure prolifération des CE et semble améliorer l'adhésion et le développement de ces cellules en condition statique ou sous flux laminaire (67,68). En effet, la fonctionnalisation par ce type de film favorise l'adhésion de CE sur la surface luminale d'un substitut synthétique en PTFEe. L'expression du facteur intracytoplasmique von Willebrand Factor (vWF) par la monocouche endothéliale a été confirmée par l'observation en microscopie confocale de la surface luminale (9). Ces résultats ont conduit à essayer de fonctionnaliser la surface luminale d'artères ombilicales cryoconservées dans le but de les implanter plus tard dans un modèle animal. Par microscopie confocale, un dépôt homogène du film sur toute la surface de l'artère a été observé ainsi qu'un recouvrement des fibres de collagène constituant la MEC. La poursuite des travaux sur les propriétés des FMP de type PAH/PSS a permis de démontrer que ces films permettent de modifier la face interne des artères, induisant une bonne perméabilité *in vivo* après trois mois d'implantation chez le lapin lorsque la charge de la dernière couche est négative (66) et favorisant l'adhérence et la rétention des CE lorsque sa charge est positive (69). Ces multicouches permettent non seulement l'adhésion des CE mais aussi d'autres types cellulaires, notamment les cellules progénitrices endothéliales (EPC : endothelial progenitor cells) (8), les CSM-MO (70) et les CSM-GW *(Rammal et al, 2014 ; données non publiées)*. Berthélémy *et al.* ont montré que ce type de film a réduit le temps de différenciation des EPC en CE par rapport à un support classique de fibronectine (8) et qu'il a favorisé leur différenciation en CML en hypoxie (71).

La fonctionnalisation de surface par dépôt de FMP est devenue l'axe principal de notre thématique, non seulement pour favoriser l'adhésion et la prolifération des CE, mais surtout pour la différenciation des cellules souches qui sont de plus en plus utilisées en tant qu'alternatives aux autres types cellulaires. Les FMP de type PAH/PSS sont les films de choix dans cette étude pour la différenciation des CSM-GW en CE.

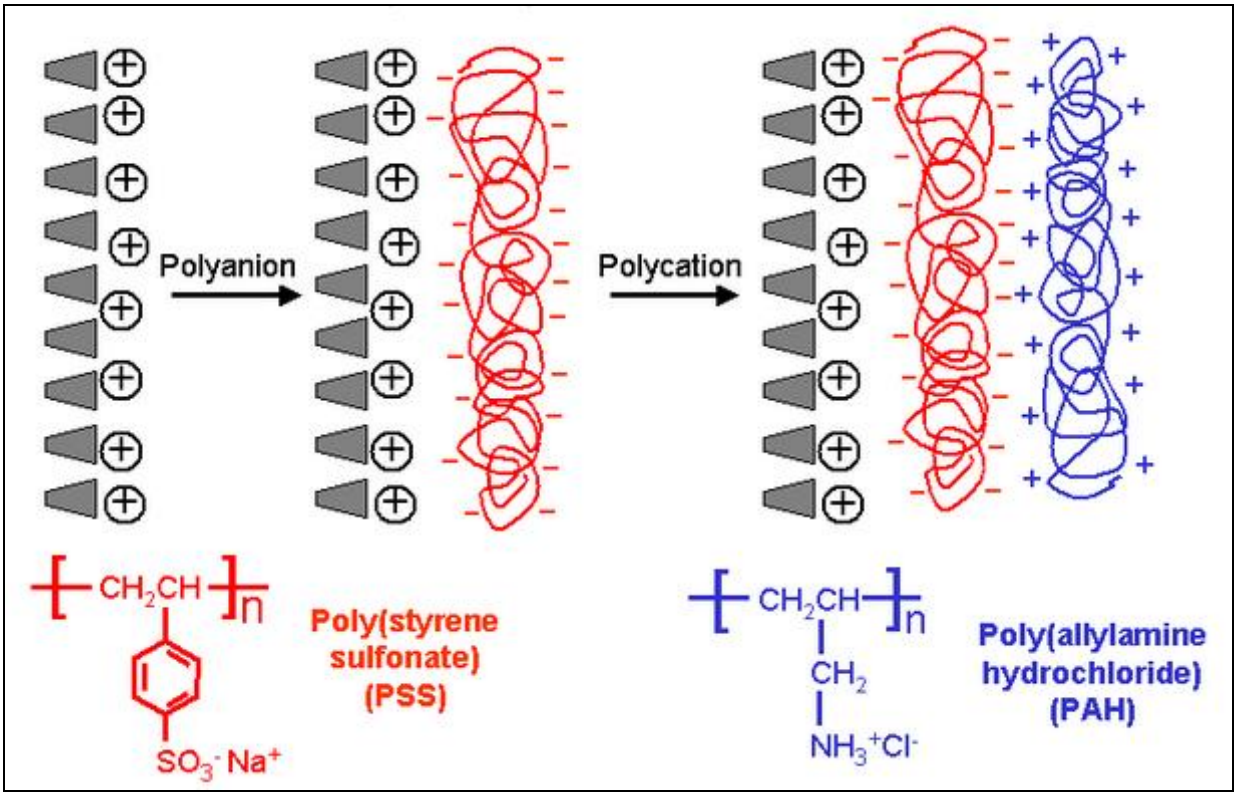


Figure 12. Schéma représentant la technique « layer-by-layer » pour la construction de FMP de type PAH/PSS (72).

Chapitre 2 : Les cellules utilisées en ingénierie tissulaire

Malgré les progrès considérables réalisés dans le développement de biomatériaux et du microenvironnement idéal permettant la formation d'un tissu *in vitro* et plus particulièrement dans le cadre de notre sujet d'étude, d'une structure vasculaire en 3D, le choix de la source cellulaire à utiliser reste un souci majeur. La génération rapide d'une couche endothéliale est particulièrement importante pour la formation d'un substitut vasculaire fonctionnel de diamètre inférieur à 6 mm. Les cellules endothéliales peuvent être obtenues soit de manière directes à partir de cellules matures soit différenciées à partir de cellules souches. Dans cette partie, nous détaillerons les propriétés des cellules endothéliales natives et décrirons les principales sources de cellules souches utilisables en ingénierie tissulaire et plus particulièrement en ingénierie vasculaire.

I. Caractéristiques des cellules endothéliales adultes

La source des cellules endothéliales adultes est le plus souvent veineuse et plus rarement artérielle. Les cellules autologues sont isolées à partir d'une veine prélevée chez le patient et peuvent être aussi isolées à partir de graisse lipoaspirée (59). Ensuite les CE sont cultivées *in vitro* pour permettre leur amplification avant de les ensemencer dans le « scaffold » ou la matrice vasculaire. Les CE sont caractérisées à l'aide d'un grand nombre de marqueurs dont certains d'entre eux sont ubiquitaires et exprimés aussi par d'autres types cellulaires, certains sont spécifiques à un type de vaisseaux ou tissus et certains ne sont exprimés qu'après activation par des signaux tels que les cytokines inflammatoires et les facteurs de croissance.

Dans le cœur, les artères, les capillaires et les veines et dans des conditions normales, le sang est en contact direct avec des CE saines et reste fluide. La surface luminale des CE quiescentes est anticoagulante et non thrombogénique, les plaquettes et les leucocytes n'y adhèrent pas et le système de coagulation reste inactif. En revanche, les macromolécules de la couche basale, sécrétées par les CE sont fortement thrombogéniques, ainsi que les CE activées favorisent la formation d'un thrombus. Les CE régulent donc l'équilibre entre la thrombose,

l'hémostase et la thromborésistance (73). Elles peuvent aussi participer aux réactions inflammatoires en coordonnant le recrutement des cellules inflammatoires sur les sites de lésion ou d'infection et en produisant des cytokines et des facteurs de croissance. En outre, les CE répondent à des stimuli inflammatoires comme les lipopolysaccharides (LPS) ou des cytokines. De nombreuses molécules d'adhésion sont exprimées à la surface des leucocytes et des CE et médient par la suite la fixation des leucocytes et leur migration à travers l'endothélium (74). Quelques-uns des marqueurs caractérisant et participant aux diverses fonctions des CE sont présentés dans le tableau suivant (tableau III).

Tableau III. Quelques marqueurs endothéliaux, leurs sites d'expression et fonctions.

Marqueurs	Expression et fonction
CD31/PECAM-1	Molécule d'adhésion, exprimée en abondance sur les CE au niveau des jonctions intercellulaires, sur les cellules T et, moins abondamment sur les plaquettes et la plupart des leucocytes. CD31 est nécessaire pour la migration trans-endothéliale des leucocytes à travers les espaces intercellulaires entre les CE.
Vascular endothelial Cadherin (VE-Cadhérine)	Membre de la famille des cadhérines, exprimé dans les CE, permet l'adhésion des cellules et est nécessaire leur survie.
E-sélectine [endothelial leukocyte adhesion molecule-1 (ELAM-1), CD62E]	Molécule d'adhésion moléculaire, exprimée de façon transitoire par les CE vasculaires en réponse à l'IL-1β et au TNF-α, jouant un rôle important dans le recrutement des leucocytes au site de l'inflammation.
P-sélectine (CD62P)	Molécule d'adhésion moléculaire, exprimée par les CE activées. Dans les CE inactivées, la P-sélectine est stockée dans des granules appelées les corps de Weibel-Palade. Une fois les CE sont activées, la P-sélectine se déplace de l'intérieur des cellules vers la surface cellulaire et joue un rôle dans le recrutement des leucocytes dans le cas d'une inflammation

Tie-2	Récepteur tyrosine kinase des angiopoïétines; joue un rôle dans l'homéostasie vasculaire.
Vascular cell adhesion molecule 1 (VCAM-1/ CD106)	Membre de la famille des immunoglobulines, exprimé à la surface des CE activées et de certains leucocytes. Son expression est induite par l'IL-1β, IL-4, TNF-α et IFN-γ. Il joue un rôle dans l'adhésion des lymphocytes, monocytes, éosinophiles et basophiles à l'endothélium vasculaire.
Intercellular adhesion molecule 1 (ICAM-1/ CD54)	Exprimé faiblement sur les CE et les leucocytes mais son expression peut augmenter après une stimulation par l'IFN-γ, le TNF-α, l'IL-1β et le LPS. Joue un rôle dans la migration des leucocytes à travers l'endothélium.
Facteur de Von Willebrand (vWF)	Glycoprotéine sérique médiant l'adhésion des plaquettes à l'endothélium vasculaire lésé.
Vascular endothelial growth factor receptors: - **VEGF-R1/ Flt-1** - **VEGF-R2/ Flk-1/KDR** - **VEGF-R3/ Flt-4**	Régulation de la vasculogenèse, l'angiogenèse et la lymphangiogenèse médiées par la famille des VEGF. VEGF-R2 est considéré comme l'inducteur primaire de la croissance des vaisseaux sanguins induite par le VEGF, alors que le VEGF-R3 joue un rôle important dans la lymphangiogenèse médiée par VEGF-C et VEGF-D.

L'utilisation de CE adultes en ingénierie vasculaire présente plusieurs limites telles que :

- L'invasivité des procédures nécessaires pour leur récupération;
- Leur nombre et leur durée de vie limités ;
- La fraction de CE dérivant de graisse lipoaspirée est souvent contaminée par d'autres types cellulaires (tels que les macrophages et les fibroblastes). Ceci a conduit à une augmentation de l'hyperplasie chez le chien (75) et à une diminution de la

perméabilité des vaisseaux dont le lumen a été ensemencé par ces cellules chez le lapin (76) ;

- Leur capacité prolifération qui diminue avec l'âge du donneur, sachant que la plupart des patients ayant besoin d'un implant vasculaire sont des personnes âgées. Pour surmonter ce problème, le gène hTERT (human telomerase reverse transcriptase) a été exprimé dans des CE isolées chez des personnes âgées pour augmenter le potentiel prolifératif de ces cellules en culture, mais ceci n'a pas réussi à inverser les effets de l'âge sur la sénescence cellulaire ni sur la durée de vie (26) ;
- Leur immunogénicité qui limite leur utilisation dans un contexte allogénique ;

En tenant compte des limitations mentionnées ci-dessus, il est nécessaire de trouver d'autres sources de CE ou d'autres types cellulaires produisant de CE qui pourraient être des meilleures candidates en ingénierie vasculaire. Les approches prometteuses permettant de générer des CE incluent (a) la différenciation de cellules souches embryonnaires (CSE) directement en CE, (b) la différenciation de CSM en CE, (c) la différenciation des EPC du sang en CE, (d) dédifférenciation des cellules stromales de l'hôte en cellules pluripotentes induites (iPS) puis les différencier en CE ou (e) la transdifférenciation des cellules stromales de l'hôte directement en CE sans induire un état de pluripotence (59)

II. Les sources de cellules souches utilisables en ingénierie tissulaire, plus particulièrement vasculaire

La découverte des cellules souches marque l'entrée de la médecine moderne dans une nouvelle ère. La caractérisation fine de leurs propriétés a logiquement suggéré leur possible utilisation en tant qu'agents thérapeutiques en médecine régénératrice.

Les cellules souches sont classifiées, selon la source et la capacité de différenciation, en (figure 13) :

(a) les cellules souches embryonnaires humaines (CSEh) : dites cellules pluripotentes car elles sont capables de générer la plupart, voire la totalité des tissus adultes, mais ne peuvent pas former les tissus extra-embryonnaires.

(b) les cellules souches pluripotentes induites (iPS : induced pluripotent stem cells) dérivant de cellules adultes somatiques, telles que les fibroblastes, et modifiées génétiquement par l'ajout de 4 gènes relatifs à l'embryogenèse.

(c) les cellules souches fœtales et (d) les cellules souches somatiques (adultes) : dites cellules multipotentes, capables de former plusieurs types de cellules différenciées issues d'un même tissu (77).

Les cellules souches se caractérisent par leurs capacités d'auto-renouvellement par division cellulaire mitotique et de différenciation en une large gamme de types de cellules spécialisées. Elles sont à l'origine de la formation des tissus dans le corps, et peuvent être cultivées *in vitro* dans le but de leur étude ou de leur utilisation en médecine (78). Indépendamment du type de cellules souches, l'intérêt essentiel se porte sur l'expansion de ces cellules, le maintien de leur état « souche », leur différenciation et en fin de compte leur utilisation en applications cliniques. Une meilleure compréhension de ces cellules et de leur manipulation afin de produire les types cellulaires d'intérêt ou des tissus transplantables est l'objectif essentiel de la médecine régénératrice.

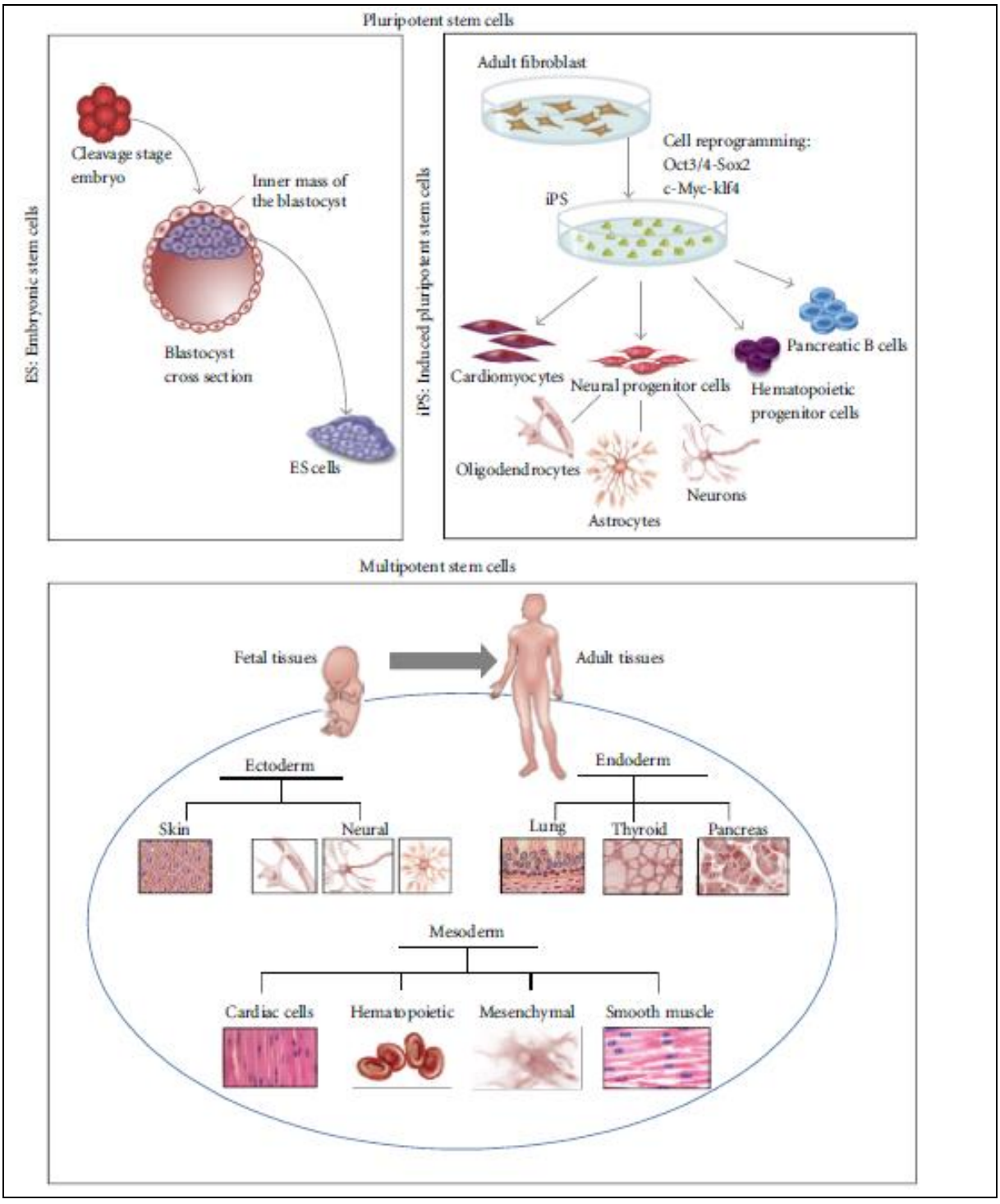


Figure 13. Types et origines des cellules souches. Deux groupes de cellules souches peuvent être définis selon leur capacité de différenciation : les cellules souches pluripotentes dont les cellules souches embryonnaires et les cellules pluripotentes induites (iPS) obtenues par reprogrammation, et les cellules souches multipotentes fœtales ou adultes (77).

A. CELLULES SOUCHES PLURIPOTENTES

a) Cellules souches embryonnaires

Les cellules souches embryonnaires (CSE) sont isolées de la masse cellulaire interne (MCI) du blastocyste (embryon au 5ème ou 6ème jour chez l'Homme) (figure 8). *In vivo*, la MCI a la propriété de donner naissance aux trois feuillets embryonnaires (endoderme, mésoderme et ectoderme) à l'origine de tous les tissus d'un être humain adulte, c'est la « pluripotence ». La pluripotence, *in vivo*, est très rapidement perdue au cours du développement embryonnaire. Les CSE présentent la propriété unique de pluripotence en ayant la capacité de former tous les types de cellules spécialisées et différenciées de l'organisme dont ils sont issus (Figure 14). Afin de maintenir leur pluripotence, ces cellules doivent proliférer tout en supprimant le processus de différenciation, un phénomène connu sous le nom d'auto-renouvellement (79).

En 1981, les premières CSE, provenant de souris, ont été isolées et mises en culture (80). Près de deux décennies plus tard, l'isolement des CSEh a été rapporté par Thomson *et al* (81). La pluripotence des CSE humaines et murines est démontrée par la formation de tératomes, contenant des cellules exprimant des marqueurs de chacun des feuillets embryonnaires, une fois injectées à des souris immuno-déficientes (81,82). Cependant, les conditions requises, *in vitro*, pour le maintien de la pluripotence et de l'auto-renouvellement de ces CSE *in vitro* sont très différentes, et donc les études sur une lignée de CSE d'un animal ne sont pas toujours transférables à un autre.

Les premières études expérimentales utilisant les CSE visaient à traiter des maladies dégénératives ou des traumatismes du système nerveux central (SNC). La transplantation de CSEh peut favoriser l'amélioration fonctionnelle, comportementale et morphologique dans des modèles animaux mais certaines études rapportent une hyperprolifération de ces cellules et la formation de tératomes après la greffe. Pour le traitement des troubles du SNC, un remplacement neuronal réussi nécessiterait l'établissement d'une croissance axonale et la formation des synapses au niveau des jonctions neuromusculaires par les cellules greffées. Jusqu'à présent, seules quelques études ont démontré la mise en place de liens fonctionnels entre les CSE greffées et les muscles de l'hôte après transplantation dans des modèles animaux souffrant d'une lésion aiguë des nerfs périphériques (83). L'ingénierie tissulaire à base de CSE n'est pas seulement

limitée à des troubles du CNS, un certain nombre d'études ont rapporté une réussite de leur utilisation dans la réparation du cartilage, dans la médecine régénératrice cardiaque, dans la réparation du nerf périphérique, etc (84–87).

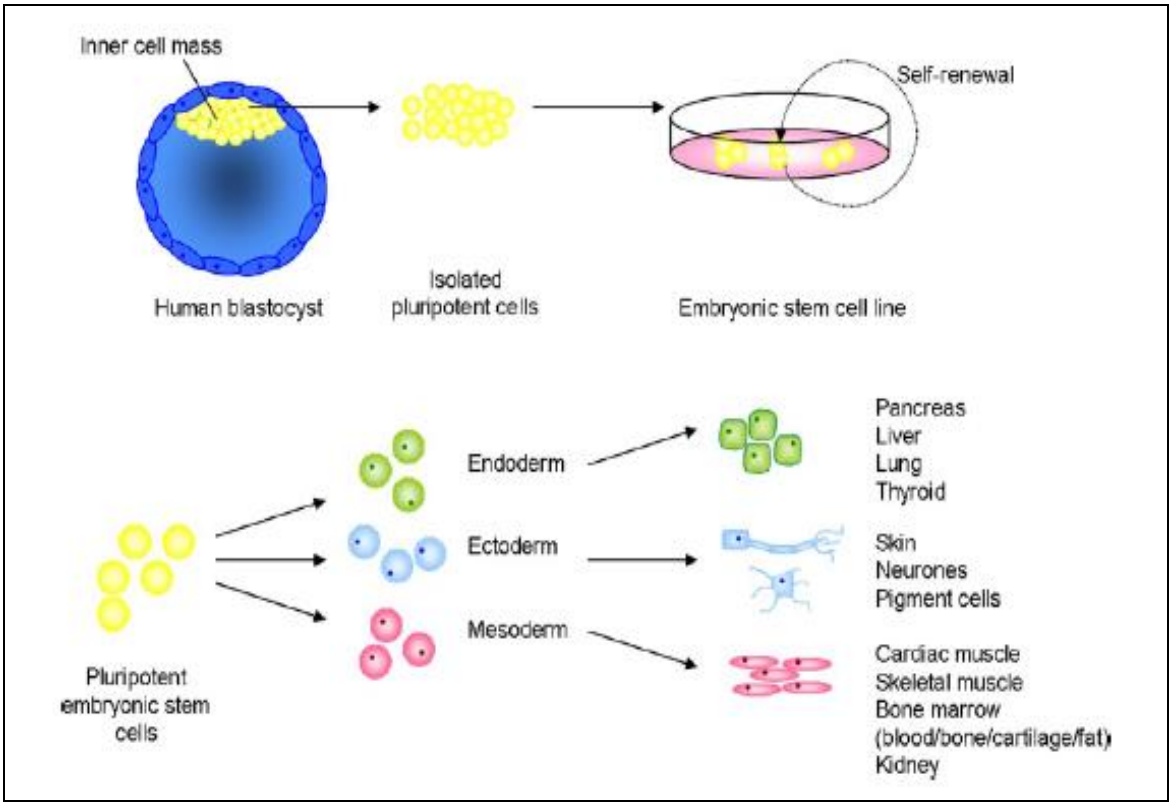


Figure 14. Dérivation des lignées de CSE humaines et leur pluripotence. Les CSE sont dérivées de la masse cellulaire interne d'embryons au stade de blastocyste. Quand elles sont maintenues en culture, elles subissent un auto-renouvellement : prolifération avec maintien de l'état de souche. *In vitro*, ces cellules sont pluripotentes du fait de leur capacité à se différencier en n'importe quel type cellulaire issu des trois feuillets embryonnaires (endoderme, mésoderme, et ectoderme). En théorie, les CSE peuvent être manipulées pour former n'importe quel type de cellule du corps humain (79).

b) Cellules souches pluripotentes induites (iPS)

Les cellules souches pluripotentes induites sont issues de la reprogrammation de cellules somatiques adultes par la surexpression de certains facteurs de transcription. Comme pour les CSE, les iPS sont capables de se différencier en cellules dérivées des trois feuillets embryonnaires primaires - l'ectoderme, le mésoderme et l'endoderme. Les iPS ont été différenciées avec succès vers un phénotype neuronal (motoneurones, neurones dopaminergiques et cholinergiques), en cardiomyocytes, etc… conduisant à une amélioration fonctionnelle après

leur application dans des modèles animaux de maladie de Parkinson, infarctus du myocarde, AVC, diabète de type I et d'autres pathologies. Cependant, il ne faut pas sous-estimer le risque de survenue de modifications génétiques dans les cellules du donneur et de l'hôte suite à la transplantation d'iPS, générées par la transfection d'un vecteur viral. Néanmoins, les iPS sont un outil extrêmement utile pour la recherche fondamentale dans l'étude des différentes pathologies, ainsi que dans le développement et la mise au point de nouveaux médicaments.

c) Utilisation des CSE et iPS en tant que sources de CE

Les cellules souches offrent l'avantage théorique d'avoir un potentiel de prolifération élevé et d'être relativement accessibles pour l'ingénierie vasculaire. Plusieurs études portant sur des modèles vertébrés, principalement des souris et des poissons zèbres, ont permis d'identifier les principales voies de signalisation impliquées dans le développement vasculaire. D'autres études se sont intéressées à étudier la différenciation des CSE en cellules vasculaires *in vitro* et à déterminer les facteurs de croissance et la durée de culture nécessaires pour cette différenciation. Ces dernières ont démontré que les cellules souches pluripotentes se sont engagées dans la voie du mésendoderme et mésoderme en 2-4 jours par l'intermédiaire des interactions coopératives des voies de signalisation Wnt canonique, Activine/Nodal et BMP4 (bone morphogenetic protein). L'activine et la BMP4 maintiennent la signalisation de la β-caténine pendant 3 jours transformant environ 80% des CSE en cellules mésodermique FLK+/CXCR4+, alors que l'inhibition de la signalisation de BMP4 a complètement aboli l'induction du mésoderme (88). Dans une étude plus récente, Singh *et al.* ont montré que les voies Activine/Smad2,3 et Wnt canonique augmentent l'expression des gènes mésodermiques tels que EOMES (Eomesodermin) et MIXL1 (« Mix paired-like homeobox ») après 2 jours de différenciation (89). Une différenciation plus poussée du mésendoderme en mésoderme requiert la BMP4 et le maintien de la voie Wnt. Une autre étude a rapporté que Wnt et Activine/Nodal sont nécessaires pour l'induction primaire de la différenciation mésodermique, alors que BMP4 a permis le développement du mésoderme. Des hémangioblastes FLK+/CD117+/CD34+/CD31+ avec un potentiel érythroïde ont été générés dans les 5-8 jours après la formation du corps embryoïde, et ce processus a été renforcé par plusieurs facteurs de croissance dont BMP4, bFGF (basic fibroblast growth factor), Activine, Wnt canonique et VEGF. L'expansion et la différenciation des hémangioblastes en cellules hématoendothéliales dépendait de la voie VEGF (90). Ces

hémangioblastes génèrent un endothélium fonctionnel après un traitement supplémentaire pour 3 jours par un milieu de différenciation endothéliale (EGM2, onza) (91).

Les CSE humaines ont été différenciées avec succès *in vitro* en CE. Il a été montré que le traitement séquentiel des corps embryoïdes avec BMP4, Activine A, VEGFA et SB431542 (un inhibiteur de TGFβIIR) a conduit à un fort potentiel de différenciation en CE (92). La co-culture des CSE sur un tapis des cellules OP9 (cellules stromales issues de cellules de la MO murine, connues pour aider à la différenciation des CSE en différents lignages telles que les voies mésodermique, hématopoïétique, endothéliale et cardiomyocytaire) pendant 8 jours a abouti à des progéniteurs vasculaires qui après sélection et culture sur du collagène IV en présence de VEGF pourraient se différencier en CE (93). Dans une autre approche, une simple culture en monocouches des CSE avec du sérum permet de les différencier en cellules CD34+ qui après traitement avec du VEFG-A et FGF2 se différencient en CE fonctionnelles (94).

Il est intéressant de noter que les CE dérivées d'iPS humaines ont montré un potentiel de prolifération limité par rapport à celles dérivées de CSE, ce qui laisse suggérer que la reprogrammation en iPS pourrait affecter le potentiel de régénération des cellules vasculaires différenciées (95).

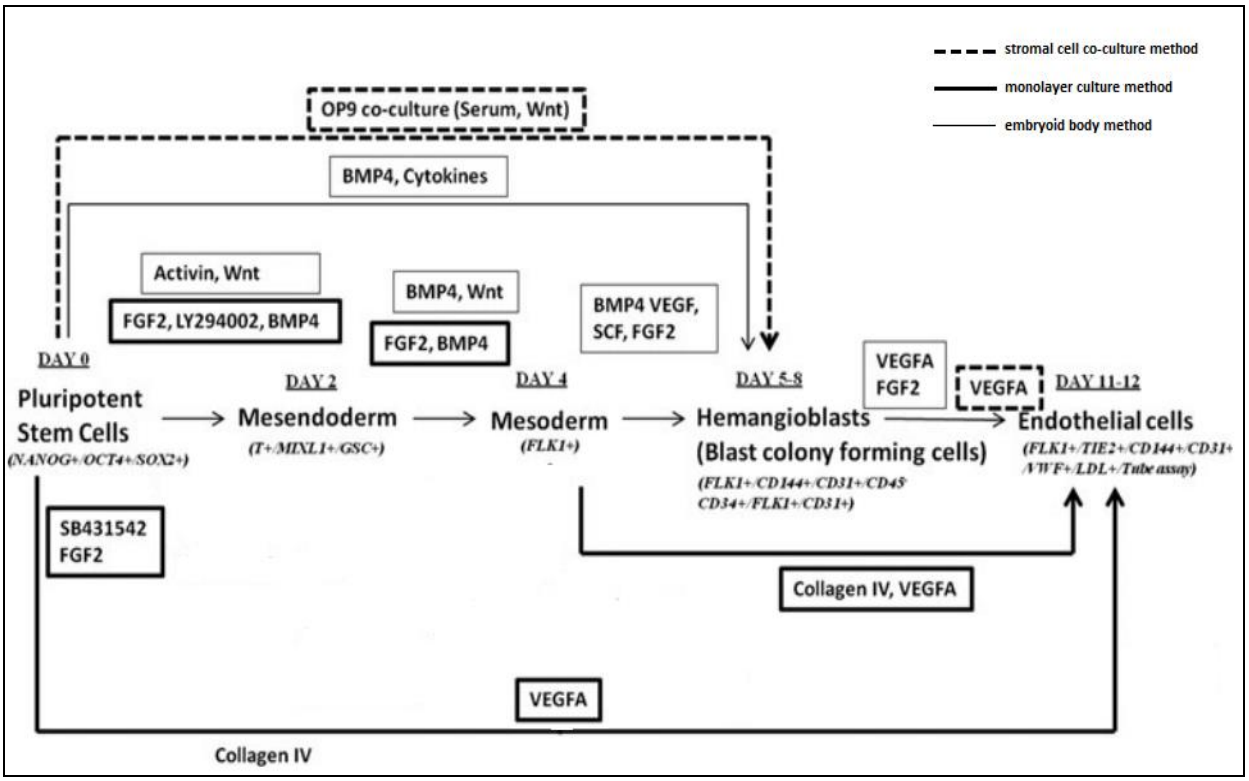


Figure 15. Diagramme schématique représentant les voies de différenciation des cellules souches pluripotentes humaines en cellules endothéliales vasculaires. Les marqueurs positifs et négatifs ainsi que les critères fonctionnels spécifiques à chaque lignée sont représentés en italique. La durée de chaque étape de différenciation est indiquée en lettres majuscules. Les études utilisant les méthodes de traitement des corps embryoides, de co-culture stromale ou la culture en monocouche sont présentées respectivement par des lignes fines, en pointillé et épaisses. FGF: « fibroblast growth factor », VEGF: « vascular endothelial growth factor », BMP4: « bone morphogenetic protein 4 », SCF: « stem cell factor ».

B. CELLULES SOUCHES MULTIPOTENTES

a) Cellules souches néonatales

Au cours des dernières années, les cellules souches fœtales (CSF) et les cellules souches isolées du sang de cordon ou de tissus extra-embryonnaires ont émergé comme étant des cellules intermédiaires entre les CSE et les cellules souches adultes. Les CSF se trouvent dans les tissus fœtaux tels que le sang, le foie, la moelle osseuse, le pancréas, la rate et les reins, et elles existent également dans le sang du cordon ombilical, et les tissus extra-embryonnaires tels que la gelée de Wharton, le liquide amniotique, le placenta, le chorion, et l'amnios (96). Leurs propriétés de primitivité, leur potentiel d'expansion et l'absence de tumorogénicité font de ces cellules une option prometteuse pour une utilisation en thérapie cellulaire et en ingénierie tissulaire. Alors

que l'utilisation de cellules souches isolées à partir de tissus extra-embryonnaires ne pose pas de problèmes éthiques, l'utilisation de celles extraites à partir de tissus de fœtus avortés est soumise à un débat éthique important (97). Jusqu'à récemment, ces cellules étaient considérées comme multipotentes, mais des études récentes prouvent l'existence de sous-populations pluripotentes au sein de certains tissus fœtaux et extra-embryonnaires (98).

(1) Les cellules fœtales

(i) Cellules souches mésenchymateuses (CSM) des tissus fœtaux

Les CSM sont des cellules multipotentes pouvant se différencier en des cellules des lignées mésodermiques (par exemple : ostéogenique, adipogénique, chondrogénique, myogénqiue…). Elles ont été tout d'abord décrites au sein de la moelle osseuse où elles représentent entre 0,001 et 0,01% de la population des cellules mononucléées (99). Des cellules stromales adhérentes avec des caractéristiques similaires ont été aussi isolées à partir d'autres tissues comme le tissu adipeux, la pulpe dentaire, le muscle, le cerveau, tissus fœtaux et extra-embryonnaires. C'est dans ces deux derniers types de tissus qu'il a été démontré que les CSM possèdent des potentiels de prolifération et de différenciation plus importants que les CSM adultes (97).

Les CSM isolées des tissus fœtaux (sang, moelle osseuse, poumons, foie et pancréas) partagent des caractéristiques communes :

- morphologie allongée fibroblastique,
- capacité de différenciation standard en ostéoblastes, chondrocytes et adipocytes,
- absence d'expression des marqueurs hématopoïétiques, endothéliaux et les molécules du complexe majeur d'histocompatibilité humain (HLA) de classe I,
- faible expression des molécules de HLA-II,
- expression de marqueurs tels que CD29 (β1-intégrine), CD73 (SH3 et SH4), CD105 (SH2), CD44 (HCAM1), le marqueur précoce des cellules progénitrices de la moelle osseuse CD90 (thy-1), et les protéines de la MEC (vimentine, laminine et fibronectine).

Contrairement aux CSM adultes de la moelle osseuse, les CSM fœtales issues du sang fœtal du premier trimestre, du foie et de la moelle osseuse (a) expriment les marqueurs de pluripotence Oct-4, Nanog, Rex-1, SSEA-3, SSEA-4, Tra-1-60 et Tra-1-81, (b) ont une capacité de prolifération plus importante (30-35h contre 80-100h), et (c) vieillissent plus tard tout en maintenant un phénotype stable. Ayant une multipotentialité ainsi qu'une capacité de différenciation plus importantes que les CSM adultes, les CSM fœtales peuvent se différencier plus efficacement en cellules appartenant aux autres lignées cellulaires (97). Ces cellules montrent aussi une meilleure migration après transplantation, ainsi qu'une meilleure capacité de régénération que les cellules adultes (83).

(ii) Cellules souches hématopoïétiques (CSH) des tissus fœtaux

Les CSH sont des cellules souches multipotentes qui maintiennent une hématopoïèse fonctionnelle, fœtale et adulte, en produisant toutes les lignées hématopoïétiques (100). Elles sont caractérisées par l'expression des antigènes CD34 et CD45, et l'absence d'expression de CD38 et de HLA/DR. Durant l'ontogénèse, l'hématopoïèse a lieu dans différents sites. Les CSH migrent de l'aorte-gonade-mésonéphros (AGM)- zone riche en CSH située le long de l'aorte embryonnaire dorsal- vers le foie embryonnaire et puis vers d'autres tissus hématopoïétiques telle que la moelle osseuse.

Le sang fœtal du premier trimestre contient plus de cellules $CD34^+$ que le sang de fin de gestation. Le nombre de CSH circulantes augmente du premier trimestre jusqu'à atteindre un pic au second trimestre, et cela est dû probablement à leur migration du foie fœtal vers la moelle osseuse fœtale où elles déclencheront l'hématopoïèse. Certaines CSH subsistent dans le sang du cordon ombilical et peuvent être collectées après l'accouchement pour une transplantation allogénique ou autologue. Les CSH du sang fœtal prolifèrent plus rapidement que les CSH du sang du cordon ombilical et celles issues de la moelle osseuse adulte, et peuvent générer toutes les lignées hématopoïétiques (97).

(2) Cellules souches des tissus extra-embryonnaires

(i) Cordon ombilical

Le sang et le tissu du cordon ombilical sont des réservoirs de cellules souches multipotentes. Après l'accouchement, environ 75 ml de sang ombilical peuvent être récupérés de

chaque cordon et contiennent une population hétérogène de cellules, y compris des CSH, des CSM-CO (cellules souches mésenchymateuses du cordon ombilical), des cellules souches somatiques, des progéniteurs de plusieurs lignées cellulaires, des progéniteurs endothéliaux et des très petites cellules souches embryonnaires-« like ». Les progéniteurs endothéliaux ont été isolés du sang de cordon en se basant sur les marqueurs de surface CD34+, CD133+, CD34+/CD133+ et AC133-/CD14+, et leur potentiel angiogénique a été démontré *in vivo.* Il a été montré par Pesce *et al.* que la proportion de cellules CD34+ représente 83% de l'ensemble des cellules souches mononuclées du sang de cordon, ce qui laisse suggérer que ce dernier est une source riche de progéniteurs endothéliaux.

Environ $1.75x10^5$ de CSM peuvent être extraites à partir d'un gramme de tissu de cordon et peuvent proliférer sur environ 55 passages. Après amplification de $2\text{-}5x10^6$ CSM, jusqu'à 10^{10} cellules peuvent être obtenues après 30 jours de culture ce qui veut dire que les CSM dérivant de cette sources ont une capacité prolifération très importante (101). Outre leur potentiel de différenciation classique en des cellules de la lignée mésenchymateuse, il a été démontré que les CSM du cordon ombilical (CSM-CO) peuvent se différencier en cardiomyocytes (102), hépatocytes (103), neurones (104), mais aussi en CE et cellules myogéniques *in vitro*. Les propriétés de ces CSM seront décrites plus particulièrement dans le chapitre suivant.

(ii) Liquide amniotique

Le liquide amniotique est un liquide biologique contenu dans le sac amniotique et dans lequel baigne l'embryon. Une variété de cellules souches ont été isolées à partir de ce liquide :

- Les cellules $CD34^+$ (105)
- Les CSM proliférant plus rapidement que les CSM adultes et fœtales. Malgré leur potentiel important de prolifération, ces cellules présentent un caryotype normal quand elles sont cultivées *in vitro* et ne forment pas des tumeurs *in vivo* (106)
- Les cellules c-kit^+ représentant 1% de l'ensemble des cellules du liquide amniotique. Ces cellules expriment les marqueurs des CSE (Oct-4, Nanog et SSEA-4), des marqueurs des CSM (CD90, CD73 et CD105) et plusieurs molécules d'adhésion (CD29 et CD44) (107)

(iii) Placenta

Le placenta est un organe fœto-maternel impliqué dans le maintien de la tolérance fœtale et permet l'absorption des nutriments et l'échange de gaz entre la mère et le fœtus, et contient également un grand nombre de cellules souches ou de cellules progénitrices se situant dans le chorion, l'amnion (tissus fœtaux) et le décidua (tissu maternel) (108).

(iv) Cellules souches fœtales en médecine régénératrice

L'utilisation des cellules souches isolées de tissus fœtaux, extra-embryonnaires et du sang du cordon ombilical en médecine régénératrice a augmenté au cours de ces dernières années. Toutefois, ce qui est étonnant est que le remplacement des cellules n'est probablement pas le mécanisme principal par lequel la thérapie cellulaire confère un avantage fonctionnel. Au contraire, l'effet bénéfique des cellules transplantées est apporté par leurs effets trophiques exercés sur les tissus de l'hôte. En outre, leur meilleure capacité de prolifération, par rapport aux cellules adultes, en fait des candidates idéales pour l'ensemencement des « scaffolds » et de matrices pour des applications en ingénierie tissulaire.

Parmi les applications thérapeutiques des SCF établies en études pré-cliniques, il y a entre autre : la maladie de Parkinson, l'ischémie cérébrale, l'infarctus du myocarde, les lésions pulmonaires, l'ostéogenèse imparfaite, la dystrophie musculaire de Duchenne, la nécrose tubulaire aigue, la thérapie anti-cancéreuse… (97)

(3) Utilisation des cellules souches néonatales en ingénierie vasculaire

Il a été montré que le traitement des CSM-CO par du VEGF et/ou bFGF ou EGF (endothelial growth factor) permet la production de protéines normalement exprimées par les CE, telles que vWF, eNOS (oxyde nitrique synthase endothéliale), CD31, VE-cadhérine et VEGFR2. Ces facteurs de croissance ont permis aussi l'acquisition des caractéristiques des CE, comme la capacité à incorporer les Ac-LDL (« acetylated low density lipoprotein ») et à former des réseaux vasculaires une fois ensemencées sur du Matrigel^{TM}(109,110). Les CE différenciées à partir de CSM-CO ont été capables de fomer de néo-vaisseaux après implantation au niveau de membres ischémiques chez des souris « nude » (111). En outre, malgré les dommages cellulaires induits par une condition d'hypoxie aigue, Li et *al*. ont récemment démontré que les CSM-CO ont acquis les propriétés phénotypiques et fonctionnelles des CE (112). La transplantation de CE

dérivant de CSM-CO accélère la ré-endothélialisation et inhibe l'hyperplasie intimale après une lésion vasculaire proposant alors une stratégie thérapeutique efficace pour la prévention de la resténose après une revascularisation (113). Très récemment, Doan *et al.* ont réussi à différencier les CSM-CO en CE en les ensemençant sur des surfaces de culture traitées avec de la fibronectine en présence d'un milieu de différenciation endothélial EGM-2 (Endothelial growth medium 2). Les cellules sont bien différenciées au niveau phénotypique en exprimant les marqueurs endothéliaux CD31, vWF, VE-cadhérine, VEGFR1 et VEGFR2, ainsi qu'au niveau fonctionnel en ayant la capacité d'incorporer le LDL-Ac et de former des structures capillaires sur Matrigel™ (114).

b) Cellules adultes

En raison de l'absence de critères de reconnaissance spécifiques, la définition la plus appropriée d'une cellule souche serait relative à sa fonction. Une cellule souche adulte, dite somatique pour la distinguer des cellules souches germinales, assure l'homéostasie en garantissant un renouvellement constant des cellules et la réparation des tissus tout en maintenant un réservoir de cellules souches. En d'autres termes il s'agit de pérenniser, chez l'adulte, la diversité des compartiments fonctionnels d'un tissu en produisant un large spectre de cellules différenciées (115). L'auto-renouvellement des cellules souches se fait soit par division **symétrique** en donnant deux cellules filles identiques (souches ou différenciées), soit par division **asymétrique** en donnant une cellule fille souche et une autre différenciée (figure 16).

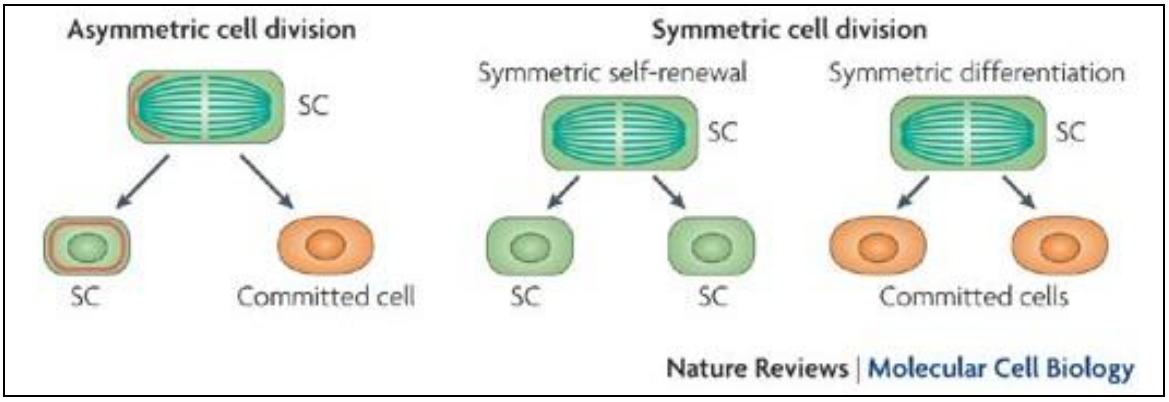


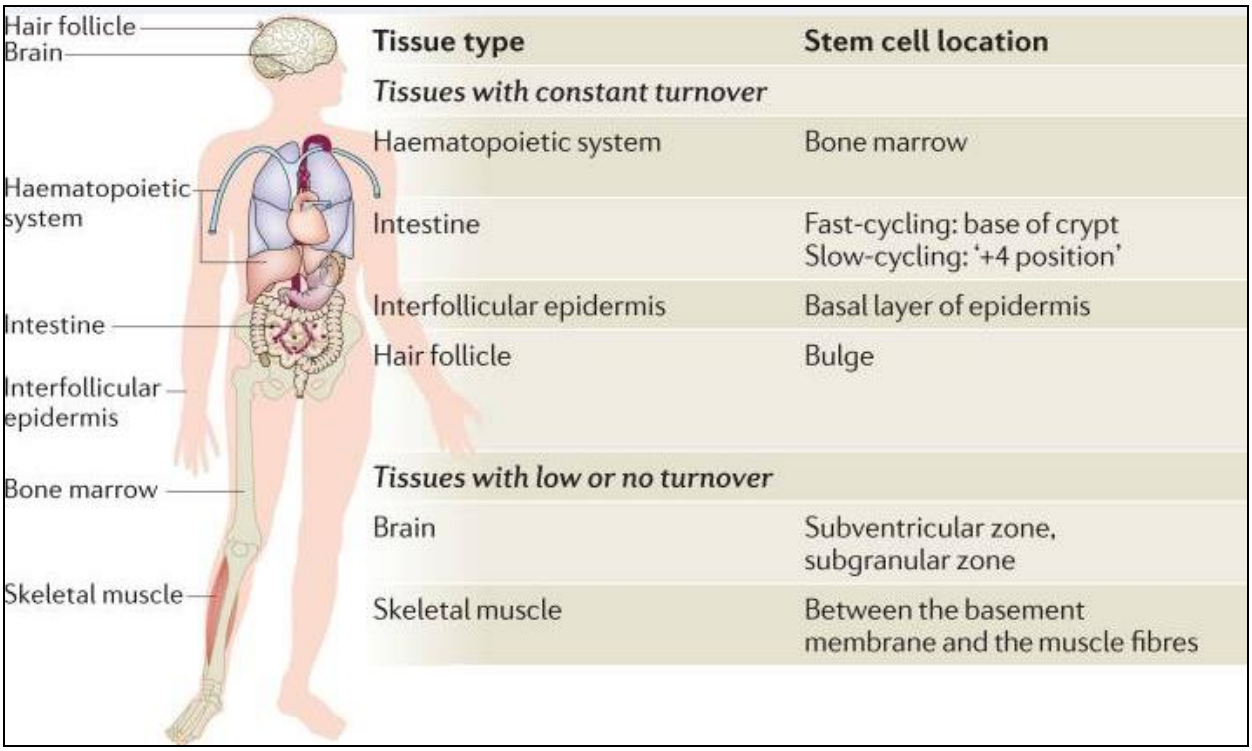
Figure 16. Maintien de l'homéostasie à travers des divisions symétriques et asymétriques. A priori, l'homéostasie est assurée par deux types distincts de divisons. Dans une division asymétrique, une cellule fille reste une CS en s'auto-renouvelant, alors que l'autre s'engage dans une voie de différenciation. Cette

division peut avoir lieu soit suite à une ségrégation inégale du matériel génétique, soit en plaçant une cellule fille à l'écart de la niche des CS. En outre, après une division symétrique, les deux cellules filles subissent le même destin et peuvent être 2 CS (auto-renouvellement symétrique) ou deux cellules différenciées (différenciation symétrique) **(116)**.

Les cellules souches adultes ou somatiques sont présentes chez l'Homme et l'adulte et ont été identifiées dans la plupart des tissus (figure 16). Deux types de tissus existent:

- Les tissus à renouvellement rapide : le système hématopoïétique, l'intestin et la peau. les cellules souches y fonctionnent ainsi en permanence pour renouveler les cellules de la peau (et du système pileux), des villosités intestinales et du système hématopoïétique.

- Les tissus se renouvelant peu ou pas : cependant, même dans les tissus quiescents, tels que le muscle adulte squelettique et le cerveau, les cellules souches y existent. De telles cellules subissent peu ou pas de divisions durant une hématopoïèse normale mais pourraient répondre efficacement à des stimuli comme l'apprentissage d'activités par le cerveau ou une lésion musculaire (117).



Tissue type	Stem cell location
Tissues with constant turnover	
Haematopoietic system	Bone marrow
Intestine	Fast-cycling: base of crypt Slow-cycling: '+4 position'
Interfollicular epidermis	Basal layer of epidermis
Hair follicle	Bulge
Tissues with low or no turnover	
Brain	Subventricular zone, subgranular zone
Skeletal muscle	Between the basement membrane and the muscle fibres

Figure 17. Aperçu sur les cellules souches adultes. Les cellules souches adultes sont trouvées dans la plupart des tissus du corps humain. Deux groupes se distinguent : celles à renouvellement rapide et celles à renouvellement lent. Dans les tissus à renouvellement rapide, tels que le système hématopoïétique, l'intestin, l'épiderme et le follicule pileux, les cellules souches sont responsables du maintien de l'homéostasie et de la réparation tissulaire suite à une lésion. Les cellules souches se trouvent aussi dans les tissus avec peu ou pas de renouvellement, tels que le cerveau et le muscle squelettique où leurs rôles seraient, par exemple, la génération de nouveaux neurones nécessaires pour l'apprentissage d'activités par le cerveau ou la réparation du muscle après une blessure **(117)**.

Les avantages d'utilisation des cellules souches adultes en médecine régénératrice sont nombreux dont l'absence de contraintes éthiques, l'absence de rejet par le système immunitaire si elles sont isolées chez le patient même et la capacité de générer à partir de ces cellules des iPS. Elles ont été testées dans un très grand nombre de maladies donnant des résultats encourageants (figure 18).

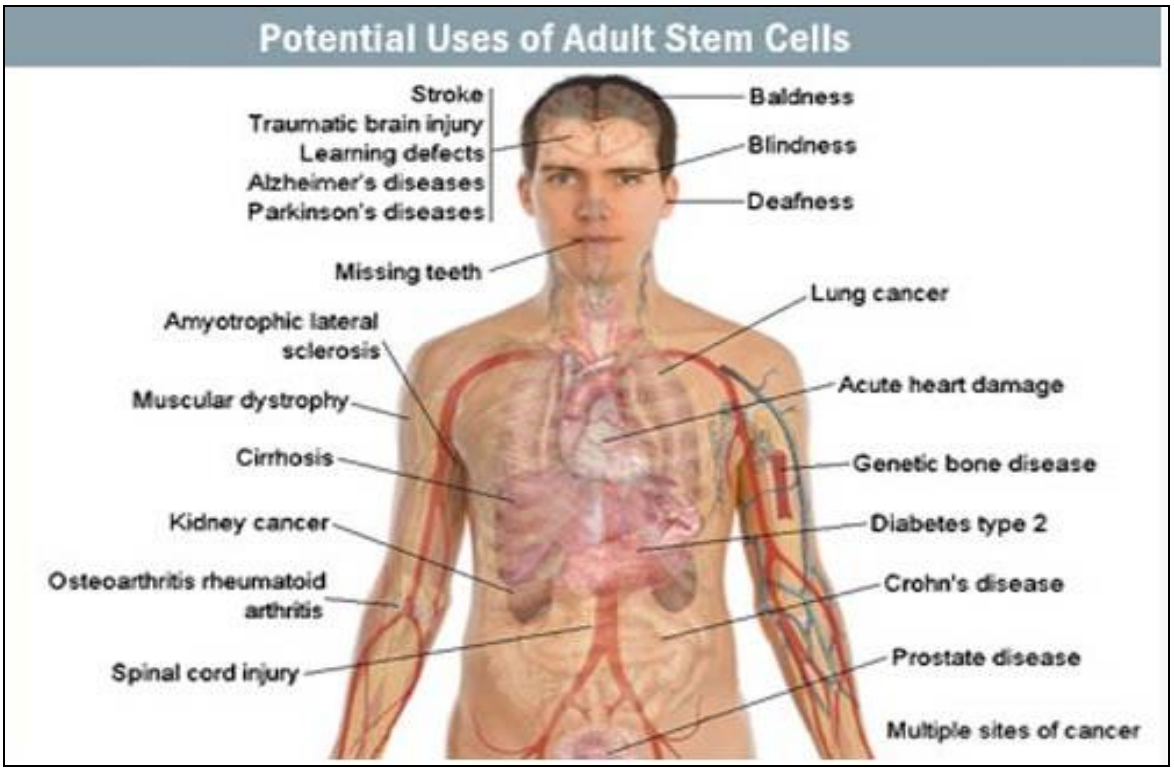


Figure 18. Utilisations potentielles des cellules souches adultes en médecine régénératrice **(118)**.

(1) Cellules de la moelle osseuse

(i) Cellules mononucléées de la moelle osseuse (CMN-MO)

La fraction de cellules mononucléées de la moelle osseuse peut être obtenue par un gradient de densité (Ficoll) et contient une population riche de cellules progénitrices. Ces CMN forment une population hétérogène constituée de EPC, CE matures, CSM, monocytes, cellules T CD4+, cellules T CD8+, cellules B, cellules NK et autres (119). Cette population a été intensivement exploitée pour le développement de substituts vasculaires en employant 2 méthodologies (figure 19). La première méthodologie consiste à cultiver les cellules dans des conditions spécifiques *in vitro*, avant ou après ensemencement, pour permettre aux progéniteurs de développer les phénotypes vasculaires avant l'implantation du greffon ; alors qu'il s'agit d'implanter les cellules sans les différencier dans la seconde méthodologie (120).

En soumettant les CMN-MO à une période de différenciation, il est possible de créer un substitut vasculaire constitué de CE et de CML imitant un vaisseau sanguin natif. Cho *et al*, ont été les premiers à mener cette technique en 2005 qui ont réussi à différencier les CMN-MO en

CE et en CML puis les ont ensemencées dans des artères canin décellularisées. Les greffons ont été cultivés pour une semaine supplémentaire avant d'être implantés dans l'artère carotide d'un modèle canin. Les greffons sont restés perméables après 8 semaines, alors que les contrôles non ensemencés se sont obstrués. Ces greffons ont montré aussi une régénération tissulaire proche d' une artère native et les cellules ensemencées marquées étaient toujours présentes (121). Les études utilisant cette méthodologie se sont ensuite succédées et ont rapporté des résultats encourageants (122–126).

La seconde méthodologie paraît être plus efficace vu qu'elle ne nécessite pas une étape de prédifférenciatinous avant l'implantation, ce qui diminue significativement la période nécessaire pour la préparation du substitut vasculaire. La première étude utilisant cette approche ainsi que la première à montrer que les CMN-MO contribuent à l'angiogénèse *in vivo* en se différenciant en cellules vasculaires (CE et CML) a été ménée par Matsumura *et al.* Après prélèvement des vaisseaux sanguins, les CMN-MO ont été marquées par une sonde fluorescente verte puis ont été ensemencées dans des « scaffolds » polymériques qui ont été implantés ensuite dans la veine cave inférieure de chiens. Une analyse immunohistochimique des structures vasculaires implantées a confirmé que les CMN-MO marquées se sont bien différenciées en CE et CML (127).

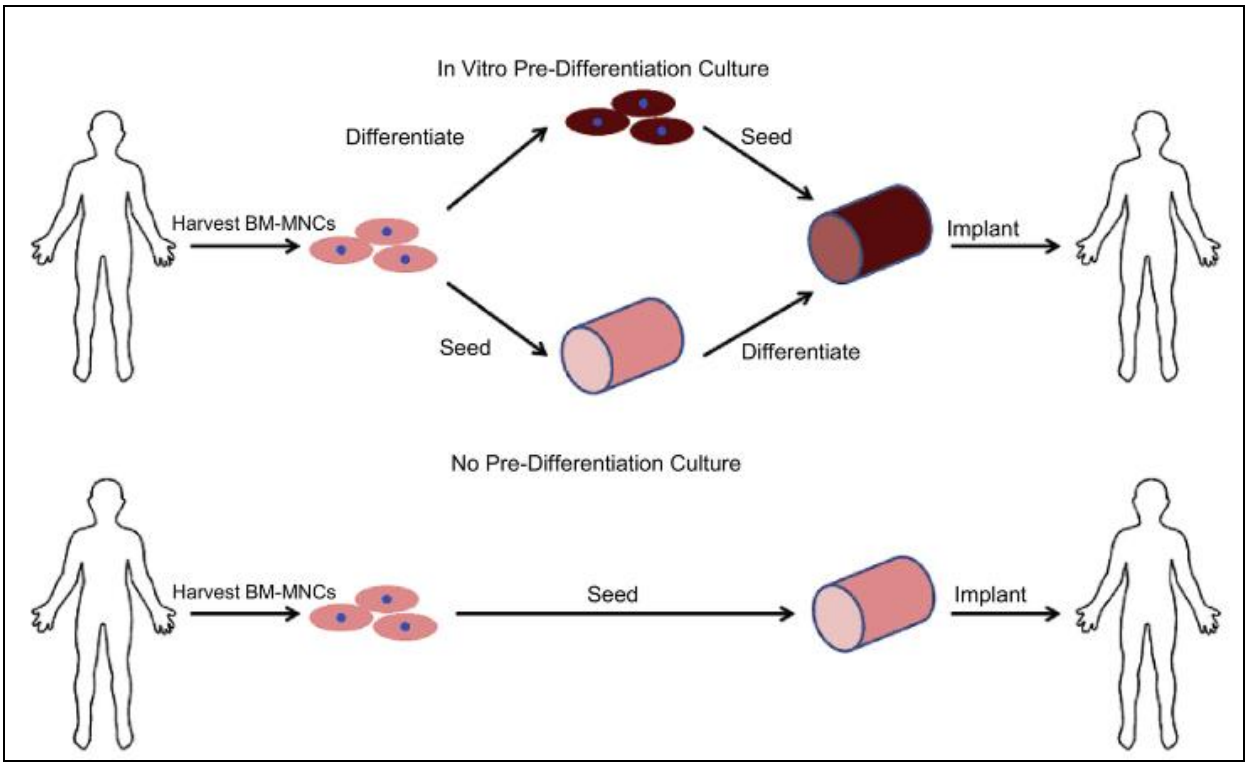


Figure 19. Deux méthodologies sont employées pour construire des substituts vasculaires à partir des CMN-MO. L'une est basée sur une période de prédifférenciation avant implantation, tandis que l'autre n'inclue pas cette étape **(120).**

(ii) Cellules souches mésenchymateuses dérivées de la moelle osseuse : CSM-MO

Une fois ensemencées dans des flacons de culture, la fraction de CSM des CMN va adhérer au plastique pour former des colonies fibroblastiques, alors que les progéniteurs hématopoiétiques n'y adhérent pas et seront éliminés au cours des changements de milieu. Les CSM-MO ont été utilisées avec un polymère de poly (acide L-lactique) (PALL) pour former des structures vasculaires qui ont été ensuite implantés en tant que greffes d'interposition dans les artères carotides chez le rat. Les greffes restent stables pendant 2 mois et montrent un remodelage important avec des cellules SMA+ dans la couche moyenne et des cellules CD31+ dans la lumière vasculaire suggérant que les CE de l'hôte auraient migrer vers les greffes (128). D'autres études ont eu des résultats semblables (129,130), ce qui laisse dire que contrairement au CMN-MO, pouvant contenir des progéniteurs endothéliaux, les CSM-MO ont un potentiel de différenciation endothélial limité, par contre elles semblent stabiliser les structures microvasculaires générées par les CE recrutées (26). Non seulement les conditions de culture jouent un rôle essentiel dans la différenciation vasculaire des CSM-MO, mais les propriétés des scaffolds utilisés ainsi que les forces mécaniques peuvent avoir aussi d'importants impacts.

Centolq et al ont créé un scaffold à base d'acide poly (L-lactiques)/poly(ε-caprolactone) capable de relarguer de l'héparine. En ensemençant les CSM-MO dans ces scaffolds, ils ont pu les différencier en CE (131). Moby et al ont montré que les FMP formés de trois bicouches et demi de PSS et PAH (en terminant par PAH) favorisent la différenciation des CSM-MO en CE (70). *In vitro*, la mise en culture de CSM-MO en présence de VEGF seul (132) ou combiné à une stimulation mécanique (133) a permis leur différenciation en CE fonctionnelles. Contrôlée par la voie de signalisation Rho/MRTF, une augmentation de l'expression de marqueurs endothéliaux spécifiques a été observée sur les CSM-MO après une stimulation par VEGF (134). Des études *in vivo* utilisant les CSM-MO pour créer des implants vasculaires ont montré des résultats prometteurs. Parmi ces études, Zhao *et al* ont différencié des CSM-MO ovins en CE et CML avant de les ensemencer dans des « scaffolds » décellularisés. Après implantation des greffons chez le mouton, ils sont restés perméables et anti-thrombotiques, formés d'éléments vasculaires et mécaniquement stables pour 5 mois (135).

(2) Cellules souches du tissu adipeux (CS-TA)

Plusieurs groupes ont indiqué que les CS-TA sont une riche source de CE. En plus de la population totale de CS-TA, la fraction cellulaire CD34+/CD31- du tissu adipeux viscéral, glutéal et de l'abdomen de donneurs humains expriment des marqueurs endothéliaux et favorisent la vascularisation après implantation au niveau de la patte postérieure (136). D'autre part, des cellules Flk1+/CD31-/CD34-/CD106- dérivées de la fraction stroma-vasculaire (FSV) peuvent également être différenciées en CE lorsqu'elles sont cultivées sur des surfaces couvertes par du Matrigel^{TM} en présence de VEGF et bFGF (137). Il est intéressant à noter que la capacité de différenciation des CS-TA en CE n'a été affectée ni par l'âge du donneur ni par la présence d'une pathologie vasculaire (138,139). Certaines études ont suggéré la présence d'un progéniteur commun parmi les CS-TA pouvant se différencier en cellules mésenchymateuses et endothéliales. Compte tenu de l'hétérogénéité de la FSV, il n'est toujours pas clair si les CE dérivées des CS-TA se sont différenciées directement ou si elles représentent une population de progéniteurs endothéliaux au sein de la FSV. Néanmoins, dans l'ensemble, ces études appuient le fait que le tissu adipeux constitue une source de cellules souches importantes pour la régénération vasculaire (26). Des applications cliniques des CS-TA sont rapportées dans des essais cliniques de phases I et II dans des infarctus du myocarde ou des pathologies vasculaires et montrent davantage alors un potentiel thérapeutique évident de ces cellules.

C. CELLULES PROGENITRICES ENDOTHELIALES

Les cellules progénitrices endothéliales (EPC : *endothelial progenitor cells)* sont des progéniteurs capables de se différencier en cellules endothéliales. La facilité d'isolement de ces cellules rend leur utilisation préférable à celle des CE. Les EPC peuvent être isolées à partir de la moelle osseuse, du sang périphérique, du sang du cordon ombilical, ou encore à partir de foie fœtal ou de tissu adipeux. L'identification phénotypique des EPC est compliquée en raison de l'absence d'un marqueur qui leur est spécifique et qui permet de les différencier des cellules endothéliales de la veine ombilicale humaine (HUVEC : human umbilical vein endothelial cells) ou des cellules endothéliales circulantes. Ces cellules ont été cependant caractérisées à la base des différentes méthodes employées pour leur obtention (140–145). La culture des cellules mononucléées pour des courtes périodes (4-7 jours) permet d'obtenir des EPC dites « précoces » ayant une morphologie fusiforme. Des EPC «tardives », ayant un phénotype endothélial, apparaissent après une culture plus prolongée (7-21 jours). Ce sont ces dernières qui sont attribuées à des EPC du fait des similitudes qu'elles ont avec les CE. Les EPC expriment très faiblement les molécules du complexe majeur d'histocompatibilité de classe I (CMH-I), et comme les CSM, n'expriment pas les molécules du CMH-II (146). Ces cellules sont aussi des cellules d'intérêt du fait que les EPC de patients souffrant de maladie coronarienne présentent un profil de marqueurs, une morphologie et des gènes antithrombotiques similaires aux EPC de sujets sains (147).

Le taux de prolifération et de différenciation des EPC peut être augmenté par :

- l'effet de plusieurs facteurs dont la thrombopoïétine (148) et le bFGF (149).
- le cisaillement (150,151)

Les EPC peuvent être isolées à partir de la moelle osseuse, du sang périphérique, du sang du cordon ombilical, ou encore à partir de foie fœtal ou de tissu adipeux mais ces populations ne sont pas tout à fait identiques. Les CE obtenues à partir des EPC de sang de cordon ont montré un meilleur potentiel de prolifération et d'adhésion que les CE générées d'EPC de sang périphérique (152). Durant la vasculogenèse, les EPC de sang de cordon ont été capables de former des structures vasculaires stables contrairement aux EPC de moelle (153), et elles sont sept fois plus nombreuses que les EPC du sang périphérique ; mais l'avantage de ces dernières

est qu'elles peuvent être mobilisées à partir de la moelle osseuse en utilisant plusieurs cytokines, hormones, facteurs de croissance et autres (154–157).

De nombreuses études ont montré qu'il est possible d'ensemencer les EPC sur divers matériaux en vue de créer des substituts vasculaires (120). En effet, l'ensemencement des EPC a permis de former une surface non thrombogénique augmentant la perméabilité du greffon une fois implanté *in vivo*. En associant les EPC aux CML, Neff et al ont montré une cellularité augmentée de la média, de plus importantes capacités contractiles et une expression plus élevée de l'α-actine et de la chaîne lourde de myosine par rapport aux substituts ensemencés seulement avec les EPC (158). Une autre stratégie consiste à employer des facteurs mobilisant les EPC pour l'endothélialisation des substituts vasculaires. Cette stratégie est utile car elle n'inclue pas les étapes de culture et d'ensemencement permettant une formation beaucoup plus rapide du greffon (159–161).

Chapitre 3: CSM du cordon ombilical : les nouveaux « Gold Standard » pour les thérapies à base de CSM ?

I. INTRODUCTION

La moelle osseuse contient un pool de cellules stromales multipotentes, qui ont été, en premier, décrites par Friedenstein *et al* (162). Ces cellules ont été ensuite isolées à partir d'un grand nombre de tissus adultes (tissus adipeux, ligament parodontal, peau, pulpe dentaire...), ainsi qu'extra-embryonnaires (gelée de Wharton du cordon ombilical, placenta, liquide amniotique…). Les CSM sont des cellules non-hématopoïétiques définies par leur capacité d'adhérence sur le plastique et par leur capacité de différenciation vers des cellules appartenant aux lignées mésenchymateuses. Friedenstein a proposé le concept de «cellules souches stromales», montrant le potentiel des CSM à donner naissance à l'os et l'environnement hématopoïétique. Plus tard, Caplan a proposé le terme de «cellules souches mésenchymateuses», mais le débat continue concernant la nature, l'identité, la fonction, les moyens d'isolement et également la nomenclature des CSM dans le domaine de la recherche. La Société Internationale de Thérapie Cellulaire (ISCT) essaie de clarifier au mieux cette controverse en introduisant la notion de «cellules stromales mésenchymateuses multipotentes». La plasticité et l'importante capacité de différenciation en une multitude de types cellulaires, *in vitro* et *in vivo*, des CSM ont suscité un intérêt énorme pour leur utilisation potentielle en médecine régénératrice.

D'autre part, les propriétés de régénération des CSM peuvent être en partie liées à leur capacité de sécrétion de facteurs trophiques ayant divers effets tels que la modulation des réactions inflammatoires, la migration vers les sites des lésions, la stimulation de l'angiogenèse... En fait, les CSM présentent des caractéristiques immunosuppressives très importantes liées à la production de facteurs solubles inductibles qui inhibent l'activation des principaux effecteurs de l'immunité. Les résultats impressionnants des études effectuées chez des patients et des modèles animaux atteints de la maladie du greffon contre l'hôte (GvHD) (163–168), complication fréquente et très sévère de l'allogreffe de CSH, ont confirmé l'intérêt de ces caractéristiques. Depuis, ce potentiel anti-inflammatoire et immunosuppresseur s'est étendu à des applications en

médecine régénératrice puisque les propriétés de réparation des CSM semblent dépendre étroitement de leurs propriétés immunologiques.

Parmi les diverses sources de CSM, c'est la gelée de Wharton du cordon ombilical qui a été sélectionné pour notre projet pour les avantages qu'elle présente par rapport à d'autres sources. Dans la revue publiée dans Tissue Engineering en 2014, les différentes propriétés de CSM-GW telles que leur potentiel de prolifération, leurs profils transcriptomique et protéique, leur potentiel régénératif via la capacité de différenciation et le sécrétome, leurs effets immunosuppresseurs, angiogéniques ainsi qu'anti-tumorigéniques ont été comparées avec celles provenant d'autres sources. La dernière partie de la revue exposera différentes applications thérapeutiques possibles des CSM dans certaines maladies auto-immunes et neurodégénératives.

II. REVUE

TISSUE ENGINEERING: Part B
Volume 00, Number 00, 2014
© Mary Ann Liebert, Inc.
DOI: 10.1089/ten.teb.2013.0664

Umbilical Cord Mesenchymal Stem Cells: The New Gold Standard for Mesenchymal Stem Cell-Based Therapies?

Reine El Omar,[1,*] Jacqueline Beroud,[1,*] Jean-Francois Stoltz, PhD,[1,2] Patrick Menu, PhD,[1] Emilie Velot, PhD,[1] and Veronique Decot, PharmD, PhD[1,2]

Due to their self-renewal capacity, multilineage differentiation potential, paracrine effects, and immunosuppressive properties, mesenchymal stromal cells (MSCs) are an attractive and promising tool for regenerative medicine. MSCs can be isolated from various tissues but despite their common immunophenotypic characteristics and functional properties, source-dependent differences in MSCs properties have recently emerged and lead to different clinical applications. Considered for a long time as a medical waste, umbilical cord appears these days as a promising source of MSCs. Several reports have shown that umbilical cord-derived MSCs are more primitive, proliferative, and immunosuppressive than their adult counterparts. In this review, we aim at synthesizing the differences between umbilical cord MSCs and MSCs from other sources (bone marrow, adipose tissue, periodontal ligament, dental pulp,…) with regard to their proliferation capacity, proteic and transcriptomic profiles, and their secretome involved in their regenerative, homing, and immunomodulatory capacities. Although umbilical cord MSCs are until now not particularly used as an MSC source in clinical practice, accumulating evidence shows that they may have a therapeutic advantage to treat several diseases, especially autoimmune and neurodegenerative diseases.

Introduction

Mesenchymal stromal cells (MSCs) are attractive cells due to their capacity of long-term *ex vivo* proliferation, multilineage differentiation potential, and immunomodulatory properties. These cells were first identified and isolated from the bone marrow (BM) and have emerged as powerful tools in tissue engineering and regeneration.[1] Although adult BM is the most common and best-characterized source of MSCs, Wharton's jelly (WJ) of the umbilical cord provides a novel source of MSCs with higher accessibility and fewer ethical constraints than BM holding great promise as an alternative. WJ in an extra-embryonic tissue that is easily obtained after birth, and it has initially been described by Thomas Wharton in 1656.[2] While the isolation of MSCs from BM requires an invasive procedure for the donor, MSCs can be noninvasively isolated from WJ.[3] These WJ-MSCs are believed to be more primitive than MSCs derived from more mature tissue sources and to have intermediate properties between embryonic and adult stem cells.[4] Moreover, WJ-MSCs are available in potentially large quantities, have a fast proliferation rate, a great expansion capability, do not induce teratomas, and harbor strong immunomodulatory capacities.[5,6]

In this review, we will focus on the similarities and differences between WJ-MSCs and MSCs from other sources with regard to their proliferation, their surface markers, and their transcriptome profiles. The controversy between their paracrine effects and trans-differentiation potential will be discussed. In addition, we will particularly highlight their roles as (a) immunomodulators and the mechanisms involved in their immunosuppressive properties, as (b) antitumor agents, (c) migratory curative cells with (d) a special emphasis on their clinical and therapeutic applications in autoimmune and neurodegenerative diseases.

Main Features of WJ-MSCs

Isolation methods

Isolation of MSCs from WJ requires complex processing. Many isolation and expansion protocols have been demonstrated for a fast and efficient *ex vivo* generation of large quantities of cells. Currently, ''enzymatic digestion'' and ''tissue explant'' are the two types of methods used for the isolation of WJ-MSCs.[7]

Those based on enzymatic digestion have mainly used collagenase alone or in combination with other enzymes

[1]CNRS UMR UL 7365, Bâtiment Biopôle, Faculté de médecine, Vandœuvre-lès-Nancy, France.
[2]CHU de Nancy, Unité de Thérapie Cellulaire et Tissus, Vandœuvre-lès-Nancy, France.
*Both authors contributed equally to this work.

(e.g., trypsine, hayluronidase) and were performed with or without the dissection of the umbilical cord into small pieces and with or without removing the blood vessels.[8] Recently, Han *et al.* have suggested that using 0.2% collagenase II at 37°C for a digestion of 16–20 h is an effective and simple enzyme digestion method.[7] Other groups have found that enzymatic digestion can alter cell population and function and, thus, have developed explant approaches without using any enzyme and taking advantage of the ability of MSCs to migrate from the tissue to adhere on the plastic.[8–10] Hua *et al.* have, very recently, compared three explant and three enzymatic methods with regard to time of primary culture, cell number, cell morphology, immune phenotype, and differentiation potential of WJ-MSCs. They have shown that the 10 mm-size tissue explant method was the optimal protocol for the isolation of MSCs.[11]

Morphology and proliferation capacity

WJ-MSCs cultured *in vitro* shared a similar fibro-blastoid shaped morphology to BM, amniotic fluid (AF), or teeth and periodontal ligament (PDL)-MSC.[12,13]

The proliferation capacity of cells is important regarding their application potential in cell therapy and tissue engineering. WJ-MSCs proliferation capacity seems to be different from other sources MSCs. Indeed, for instance, Yu *et al.* have shown that over a period of 7 days after seeding, WJ-MSCs grew much faster than PDL-MSC and had a cell doubling time of 22.23 h against 27.51 h for PDL-MSC.[14] Compared with BM-MSCs, WJ-MSCs grow much faster for the early passages and have a cell doubling time (24 h) almost twice shorter than BM-MSCs (40 h) over the 1st passage. These observations were confirmed by Abu Kasim *et al.* showing that WJ-MSCs and dental pulp-mesenchymal stem cells (DP-MSCs) were highly proliferative as compared with BM and adipose tissue (AT)-MSCs.[15] Furthermore, WJ-MSCs have a greater ability to form colony-forming unit-fibroblasts colonies *in vitro* than BM-MSCs, and their formation's frequency depends on seeding cell density.[4,16]

Other studies focusing on DP-MSCs showed that cells from both sources (WJ and teeth) initially grew slowly but their proliferation rates were increased after the first subculture.[17] However, WJ-MSCs growth is influenced by the number of culture passages *in vitro, as* amplifying these cells until passage 10 will result in a slower cell growth compared with the same cell culture at passage 5.[18]

A very recent study has evaluated the proliferation kinetics and phenotypic characteristics of MSCs derived from WJ and AT during prolonged *in vitro* expansion and found that WJ-MSCs were isolated with a high efficiency and bore a substantially increased proliferation capacity; whereas AT-MSCs exhibited a reduced proliferation potential showing typical signs of senescence at an early stage.[19]

Marker expression at protein level

A large number of studies have analyzed the surface markers of WJ-MSCs and compared their expression profiles with other sources of MSCs such as BM, teeth, or AF.

Table 1. Phenotypic Profile of WJ-MSCs Compared with MSCs from Other Sources

WJ-MSCs markers	*Compared with []*	*References*
Positive: CD29, CD105, HLA-ABC, Oct-4, Gata-4, Cx43, α-actin, cTnt Negative: CD34, HLA-DR	[AF-MSCs] Similar marker expression except Oct-4: ~25% for WJ-MSC vs. ~51% for AF MSC	18
Positive: CD44, CD13, CD56, CD61, CD73, CD105, CD90, CD166, CD29, HLA-ABC, CD59 Negative: HLA-DR	[dental pulp of milk and adult wisdom teeth-derived MSCs] Similar marker expression	17
Positive: CD73, CD105, CD90, Negative: CD34, HLA-DR, CD45, CD19, CD11b	[PDL-MSCs] Similar marker expression	14
Positive: CD68 Negative: CD34, CD45, CD163	[promyelocytic cell line (HL-60): known to express CD68] Similar level expression	20
Positive: CD13, CD29, CD44, CD105, CD106, CD73, CD166, HLA-ABC, CD90 Negative: CD14, CD34, CD38, CD45 CD31, HLA-DR	[Bone marrow MSCs] Similar marker expression except: • CD106: WJ < < < BM • HLA-ABC: WJ < < BM	13,16,21
Positive: CD105, CD146, CD73, CD90 Negative: CD14, CD34, CD31, CD45, CD3	[human MSCs from: tibial plateau (TP), trabecular bone, iliac crest (IC), BM, and WJ umbilical cord] Similar level expression for all markers except CD46 (twice more expressed for IC than for WJ and TP)	22
Positive: CD44, CD73, CD105, CD90, CD106, CD29, vimentin, laminin, Oct-4, Nanog, Negative: CD34, CD14, CD45, CD31, vWF	[Adult and fetal bone marrow (aBM-MSCs and fBM-MSCs) and adipose tissue-derived MSC (AT-MSCs)] Similar marker expression except Oct-4 and Nanog expressed only by BM-MSCs and WJ-MSCs	23

AF, amniotic fluid; AT, adipose tissue; BM, bone marrow; IC, iliac crest; MSCs, mesenchymal stromal cells; PDL, periodontal ligament; TP, tibial plateau; WJ, Wharton's jelly.

The following table summarizes the phenotypic profiles of these MSCs mentioned in the literature (Table 1).

WJ-MSCs, such as MSCs from other sources, positively express the classical mesenchymal surface markers. However, Table 1 highlights the differences in the expression levels of other markers:

- Unlike BM-MSCs, WJ-MSCs weakly expressed endoglin (SH2, CD105) and CD49e at passage 8.
- WJ-MSCs and AT-MSCs expressed CD106 at much lower levels than BM-MSCs.
- In comparison with BM-MSCs, HLA-ABC is very weakly expressed by WJ-MSCs, suggesting that these cells could be good candidates for allogeneic cell therapy.

Transcriptomic profile

Emerging data have compared the transcriptomic profile of WJ-MSCs with MSCs from other sources. The following table gives an overview of the main comparisons (Table 2).

Some studies showing a high expression of embryonic genes such as *LIFR, ESG1, SOX2, TERT, NANOG, POUF1, OCT4, LIN28, DNMT3B,* and GABRB3 by WJ-MSCs suggest that WJ could be a more primitive source of MSCs.[4,6,24–26] Furthermore, as shown in Table 2, WJ-MSCs express genes encoding for proteins that are associated with morphogenesis: *SHH*, *neuregulin-1* and 4, *SNA2*, and *WNT4*.[27]

WJ-MSCs, compared with MSCs from other tissues, differentially express genes involved in bone development. Transcription factors involved in osteoblast differentiation such as *RUNX2* were found to be expressed at comparative levels in BM-MSCs, skin-MSCs, AT-MSCs, and WJ-MSCs. However, Table 2 shows that skin-MSCs are characterized by a significantly increased expression of genes (*BMP4, BMP2*) that are associated with bone and cartilage development in comparison to the other MSCs.

WJ-MSCs reveal an important expression of genes involved in liver and cardiovascular development. The transcriptomic profile of WJ-MSCs and AF-MSCs reveals the basal expression of several mature myocardial genes: *GATA-4*, *c-TnT*, and *Cx43*, which could be associated to the potential of differentiation into myocardial cells. Interestingly, a high expression of genes encoding for GATA-binding protein 6 (*GATA6*), heart and neural crest derivatives expressed 1 (*HAND1*), inflammatory cytokine-induced intercellular adhesion molecule 1 (*ICAM1*), and vascular cell adhesion molecule 1 (*VCAM1*) was detected in WJ-MSCs (Table 2). WJ-MSCs were also shown to express genes involved in cardiovascular system development, including angiogenesis, cardiogenesis, endothelial cell (EC) development, and vasculogenesis (Table 2). In addition, other genes involved in cardiovascular development, including endoglin (*ENG*), *GJA1*, *VCAM1*, and *GATA6*, were significantly increased in BM-MSCs.[28]

The trancriptomic profile also reveals that WJ-MSCs have a significantly increased expression of genes (*AFP, DKK1, DPP4*, and *DSG2*) which are associated with liver development compared with BM-MSCs, AT-MSCs, and skin-MSCs.

WJ-MSCs express genes involved in neural development. WJ-MSCs and DP-MSCs revealed a high expression of the neuro-ectoderm lineage markers.[15] De Kock *et al.* have studied the whole gene expression profiles of four human mesoderm-derived stem cell populations: AT-MSCs, BM-MSCs, skin-MSCs, and WJ-MSCs. They have shown differences in gene expression between distinct stem cell types. Skin-MSCs predominantly expressed genes involved in neurogenesis (NES), skin, and bone (RUNX2, BMP4).[28]

Such a transcriptomic profile reveals a closer proximity between WJ-MSCs and BM-MSCs than between other combinations. Considering the genomic profile of WJ-MSCs, WJ may be considered a reliable source of MSCs useful not only in cardiovascular regenerative medicine[30,31] but also in neurodegenerative diseases. The latter will be discussed in the last part of the review.

Regenerative role of MSCs: differentiation potential versus secretome

A summary of the various comparisons between sources of MSCs that have been already described in the literature is shown in Figure 1.

WJ-MSCs differentiate into adipocytes slower than BM-MSCs.[4] Bai *et al.* have shown that AF-MSCs and WJ-MSCs could differentiate into myocardial-like cells with an important expression of myocardial genes such as GATA-4, c-TnT, α-actin, and Cx43 after myocardial induction.[18]

More recently, Chen *et al.* have worked on *in vitro* differentiation analysis of MSCs isolated from DP and WJ. They have shown that MSCs isolated from both sources exhibited the capacity to differentiate into osteoblasts, chondrocytes, and adipocytes. However, they have noted some differences in their differentiation potentials. DP-MSCs and WJ-MSCs had a similar potential for osteogenic differentiation, but the chondrogenic and adipogenic differentiation potentials of WJ-MSCs were more important than those of DP-MSCs.[17] Meanwhile, according to Zhang *et al.*, fetal human BM-MSCs have the highest potential of *in vitro* monolayer osteogenic differentiation, come after human WJ-MSCs, human adult BM-MSCs, and then AT-MSCs.[23] Baksh *et al.* have found similar results as the previous study when comparing the *in vitro* differentiation potentials of WJ-MSCs and BM-MSCs.[44]

Jo *et al.* have studied the *in vivo* osteogenic differentiation, in a rat model, of human MSCs isolated from different sources. No differences were detectable in osteogenesis between adult AT-MSCs, BM-MSCs, and WJ-MSCs.[45] Controversial results have been described by Zhang *et al.* In fact, after a subcutaneous implantation of MSCs scaffolds in mice, better results were obtained with scaffolds elaborated with human fetal and adult BM-MSCs than those constructed with WJ-MSCs and AT-MSCs.[23] Differences in the results between the mentioned studies are probably due to the different experimental conditions. This explains that MSCs of various tissue origins have specific characteristics of differentiation or require different conditions for osteoinduction.

Table 2. Transcriptomic Profile of WJ-MSCs Compared with MSCs from Other Sources

Gene	*Gene identification/function*	*WJ-MSCs*	*BM-MSCs*	*PDL-MSCs*	*AF-MSCs*	*AT-MSCs*	*Skin-derived MSCs*	*References*
Genes related to bone development and neurogenesis								
BMP4	Induce endochondral osteogenesis	++	+	ND	ND	+	+++	28
TGFBR1	Bone development	++	+	ND	ND	ND	ND	27
OPN	Osteogenic marker	++	++	+++	ND	ND	ND	14,27
STAT1	Bone development	+	+	ND	ND	ND	ND	22
BSP	Osteogenic marker	−	ND	++	ND	ND	ND	14
OSX	Osteogenic marker	−	ND	−	ND	ND	ND	14
CXCR4	Mesoderm marker	+	+	ND	ND	ND	ND	27
BMP2	Bone development	+	++	ND	ND	+	+++	28
RUNX2	Osteogenic marker	++	+++	ND	ND	++	++	22
CDH2	Neural gene	++	+	ND	ND	+	−	27
NES	Neural development	++	++	ND	ND	−	+++	28
Gene related to liver and cardiovascular systems								
GATA-4	Mature myocardial gene	+	+	ND	+	+	++	18,28,29
c-TnT	Mature myocardial gene	+	ND	ND	+	ND	ND	18
VEGF	Cardiovascular development	+	+	ND	ND	ND	ND	27
Cx43	Mature myocardial genes	+	ND	ND	+	ND	ND	18,20
VCAM1	Cardiovascular development	++	+++	ND	ND	−	−	28
GJA1	Cardiovascular development	++	+	ND	ND	+	++	28
AFP	Liver development	+	−	ND	ND	++	+	28
DSG2	Liver development	++	−	ND	ND	+	−	28
ENG	Cardiovascular development	++	+++	ND	ND	−	−	28
HAND1	Cardiovascular development	++	+	ND	ND	+	++	28
GATA6	Cardiovascular development	++	−	ND	ND	+	−	28
DPP4	Liver development	+	−	ND	ND	++	−	28
DKK1	Liver development	+	−	ND	ND	++	−	28
Gene related to stemness								
ACTG2	Stemness-related genes	+	++	ND	ND	ND	ND	27
TERT	Stemness-related genes	++	+/−	ND	ND	ND	ND	4,27
ESG1	Stemness-related genes	++	++	ND	ND	ND	ND	27
Oct3/4	Stemness-related genes	+	++	ND	ND	ND	ND	27
ABCG2	Stemness-related genes	+++	++	ND	ND	ND	ND	27
LIFR	Stemness-related genes	+++	+++	ND	ND	ND	ND	27
SOX2	Stemness-related genes	+	ND	+	ND	ND	ND	14,27
Nanog	Stemness-related genes	+	ND	++	ND	ND	ND	14
Oct-4	Stemness-related genes	++	++++	++	ND	ND	ND	14
THY1	MSCs marker	++	+	ND	ND	+	−	28
Adipogenic and chondrogenic genes								
PPARγ	Adipogenic marker	+++	+++	+++	ND	ND	ND	13,14
FABP4	Adipogenic marker	+	++	ND	ND	ND	ND	13
LPL	Adipogenic marker	−	++	+	ND	ND	ND	13,14
LEPR	Adipogenic marker	−	+	ND	ND	ND	ND	13

(*continued*)

Table 2. Continued

Gene	*Gene identification/function*	*WJ-MSCs*	*BM-MSCs*	*PDL-MSCs*	*AF-MSCs*	*AT-MSCs*	*Skin-derived MSCs*	*References*
CD36	Adipogenic marker	−	ND	+	ND	ND	ND	14
CEBPA	Adipogenic differentiation	+	ND	++	ND	ND	ND	14
COL2	Chondrogenic marker	+	+	+	ND	+	+	14
SOX9	Chondrogenic marker	+		+	ND	ND	ND	14
Genes implicated in morphogenesis, adhesion, cell structure, and other mesodermal markers								
ACTA	Maintains the cytoskeleton	+	ND	ND	+	ND	ND	18
ACTB	Cell motility, structure, and integrity	+++	+	ND	ND	ND	ND	27
CDH5	Controls the cohesion and organization of the intercellular junctions in endothelial cells	++	+	ND	ND	+	+	28
ITGB1	Extracellular adhesion molecule	++	++	ND	ND	ND	ND	18
STAG1	Encodes for component cohesion	+	+	ND	ND	+++	++	28
WT1	Kidneys and gonads development	++	−/+	ND	ND	−/+	−/+	28
WNT4	Associated with morphogenesis	+	+	ND	ND	ND	ND	18
SNA2	Associated with morphogenesis	++	++	ND	ND	ND	ND	18
SHH	Associated with morphogenesis	−/+	+	ND	ND	ND	ND	18
Neuregulin 4	Associated with morphogenesis	++	++	ND	ND	ND	ND	18
COL1A1	Mesodermal marker	+++	+++	ND	ND	−	−	28
CXCR4	Mesoderm marker	+	+	ND	ND	ND	ND	18
ICAM1	Mesodermal lineage specification	+++	+	ND	ND	+	+	28
CD44	Mesoderm marker	++	++	ND	ND	ND	ND	18
PECAM1	Cell adhesion marker	++	+/−	ND	ND	+/−	+	28
CD9	Implication in differentiation, adhesion, and signal transduction	+	−	ND	ND	++	++	28
Collagen X	Mesoderm marker	−	+++	ND	ND	ND	ND	18
FlK-1	Mesoderm marker	++	−	ND	ND	ND	ND	18
CD68	Highly expressed by human monocytes and tissue macrophages	+++	ND	ND	ND	ND	ND	20

The table given next presents the difference of gene expression, for various markers, between the different MSCs sources. The difference of expression between the sources is presented by+++, ++, +, −, and ND corresponds to a nondetermined comparison.

PPIA, cyclophilin A, Homo sapiens peptidylprolylisomerase A; ITGB1, integrin, b1:fibronectin receptor, b polypeptide; WNT4, wingless-type MMTV integration site family, member 4; SHH, sonic hedgehog homolog (Drosophila); SNAI2, snail homolog 2 (Drosophila); SNAI2, snail homolog 2 (Drosophila); TGFBR1, transforming growth factor, β receptor I; TERT, telomerase reverse transcriptase; ESG1:ESTs, weakly similar to embryonal stem cell specific gene 1; Cx43, connexin-43; ACTA, alpha-actin; ACTB, beta actin; CDH2, cadherin 2; OPN, osteopontin; LIFR, leukemia inhibitory factor receptor: SOX2, sex-determining region Y (SRY)-box; ND, nondetermined.

Cell Types / MSCs Sources	Chondrocyte	Osteocyte	Adipocyte	Endothelial cell	Neuron	Myocardial cell	Pancreatic islet-like cell
Bone Marrow	++ (32, 33)	++ (23, 32)	++ (32, 34)	+++ (17)	++ (27)	++ (35)	++ (12)
Adipose tisssue	++ (32, 33)	++ (23, 36)	+++ (23, 34, 36)	ND	+++ (36)	++ (35)	++ (12)
Dental pulp	+ (17)	++ (12, 14, 17)	+ (17)	ND	++ (37, 38)	++ (35)	++ (39)
Umbilical cord	++ (14, 17)	++ (14, 17, 36)	+ (4, 14, 36)	+++ (17)	++ (27, 36)	++ (18)	++ (12)
Periodental ligament	+++ (12, 14)	+++ (14)	++ (12, 14)	++ (40)	++ (37, 38)	ND	ND
Amniotic fluid	++ (33)	++ (41)	+ (4)	++ (42)	++ (43)	++ (18)	++ (39)

FIG. 1. Differentiation potential of WJ-MSCs compared with MSCs from other sources. This figure shows differences in the differentiation potential of MSCs from many sources toward a specific cell type, which is indicated by + + +, + +, +, −, and ND corresponds to a nondetermined comparison. For example, PDL-MSCs have the greatest potential to differentiate into chondrocytes, while DP-MSCs have the lowest differentiation potential toward this type of cells. DP, dental pulp; WJ-MSC, Wharton's jelly-mesenchymal stromal cell. Color images available online at www.liebertpub.com/teb

Very recently, Yu *et al.* have shown that WJ-MSCs are not good alternatives for periodontal tissue generation compared with PDL-MSCs which have a much better osteo/dentinogenic differentiation potential.[12,14] Various studies have demonstrated the capacity of WJ-MSCs to differentiate into pancreatic islet-like cells.[46–48] Kim *et al.* have compared this potential with other sources of MSCs and did not show significant differences between BM-MSCs and AT-MSCs.[46]

Some authors have focused on the application of MSCs in vascular engineering and more particularly their capacity to differentiate into EC, or to acquire pericyte markers when co-culturing with EC. Chen *et al.* were pioneers in studying the endothelial differentiation potential of BM-MSCs and WJ-MSCs. Both sources of MSCs were able to differentiate into EC but WJ-MSCs appear to have a greater differentiation potential, as derived EC-like exhibited a higher expression of endothelial markers.[5]

For a long time, it has been considered that the regenerative potential of MSCs is due to their plasticity and differentiation capacity. However, the direct link between their differentiation potential and their beneficial effects has never been proved. Indeed, recent studies suggest that the benefits of MSCs transplantation may be associated to a paracrine modulatory effect rather than the replacement of affected cells, at the site of injury, by differentiated stem cells.[49,50] Emerging data suggest that stem cells could be then considered as a reservoir of trophic factors which are released when needed to modulate and repair surrounding damaged tissues, which leads to a paradigm shift in regenerative medicine. Understanding the cell secretome has attracted much attention, and it has been demonstrated that trophic factors could have many effects such as modulation of inflammatory reactions, immunomodulation, anti-apoptotic and pro-angiogenic capacities, and many others (reviewed in Doorn *et al.*[51]). Vallone *et al.* have highlighted in their review the exact mechanisms that would lead MSCs to damaged tissues after transplantation, where they will exert their remedial actions.[52] Katsuda *et al.* have also described a possible therapeutic mechanism of AT-MSCs, in Alzheimer disease, through a paracrine pathway. Vesicules secreted by these cells could carry soluble factors that may treat this pathology. Results of this study will be discussed

in the final part of this review. Therapeutic effects of BM-MSCs in regenerative medicine (heart disease for example) through paracrine/autocrine mechanisms have been reviewed by Pourrajab *et al.*[53]

The controversy between the implication of the differentiation potential and the paracrine mechanisms of MSCs in their beneficial therapeutic actions is shown in Figure 2.

During the next few sections of this review, we will highlight the effects of WJ-MSCs secretome involved in many processes such as immunomodulation, homing to damaged tissues and others.

WJ-MSCs as Immunoprivileged Cells

Immunological features of MSCs

In the last decade, MSCs have gained considerable attention as candidates for tissue engineering, as modulators of immune responses in graft-versus-host disease, and as autoimmune diseases,[54] as these cells, once administered therapeutically, may be able to evade the immune system of the host. They are currently being assessed as a novel anti-inflammatory therapeutic agent in numerous clinical trials.[55] Two outstanding features of MSCs are relevant to their immunomodulatory effects:

Immunosuppression. MSCs-mediated immunosuppression describes the fact that MSCs are able to suppress several functions (proliferation, production of soluble factors, and cellular cytotoxicity) exerted by diverse immune cells such as T-, B-, and natural killer (NK) cells. It has been shown that immunosuppression is mediated by both cell–cell contact and paracrine signals via soluble factors.

Immunoprivilege. MSCs themselves are somehow protected from immunological defense mechanisms.[56] Indeed, MSCs lack expression of major histocompatibility complex (MHC) class II, giving MSCs the potential to escape recognition by alloreactive $CD4^+$ T cells but express MHC Class I molecules. This expression enables them to escape from NK cell lysis, In addition, MSCs do not express co-stimulatory molecules required for effector T-cell induction.[57]

Even if BM-MSCs, considered the gold standard in MSC therapy, and UC-MSCs share many similarities, emerging data suggest that WJ-MSCs could be less immunogenic than BM-MSCs, making them a good candidate for allogeneic transplantation.

MSCs-mediated immunosuppression

MSCs show an absence or a low expression of MCH class II and co-stimulatory molecules, so they can be considered immunoprivileged cells, but they also interfere with different pathways of the immune response.[58] Their ability to modulate the immune system was first recognized after the fact that they could evade immunosurveillance after cell transplantation.[59] Especially, human MSC populations such as BM-, AT-, or UC-derived MSCs selectively alter immune cell function by suppressing T-cell proliferation, B-cell proliferation, and terminal differentiation,[60] inhibiting NK cell proliferation and cytotoxicity, steering monocytes and dendritic cells (DCs) to an immature DC state.[61]

MSCs and immune cell population. Adaptive immunity: *MSCs and T cells:* T cells recognize antigens and are critical for cell-mediated immune response. They mature within the thymus into one of different subtypes with diverse roles. These cells are involved in the maintenance of self-tolerance, activation of other lymphocytes, lysis of infected cells, and interaction with cells of the innate immune system.

Currently, interactions of MSCs with T cells have been extensively studied. Graft versus Host Disease models presented the first evidence that MSCs can regulate immunosuppression *in vivo*.[62] MSCs could reduce allograft rejection, which is partly mediated by T cells.[63,64] Shortly afterward, T-cell immunosuppression mediated by MSCs was demonstrated *in vitro*. MSCs probably inhibit, via their induced or constitutively expressed secreted factors, T-lymphocyte activation and proliferation induced by mitogens and alloantigens[65–68] as well as T-cell activation with CD3 beads.[66,69] MSCs have been shown to equally inhibit $CD4^+$, $CD8^+$, $CD2^+$, and $CD3^+$ subsets.[70] In addition, T-lymphocytes inhibited by BM-MSCs do not enter apoptosis, as they actively proliferate on re-stimulation with cellular and humoral activators.[65] Many other studies have shown the ability of BM-MSCs to induce the expansion of functional regulatory T cells (Tregs).[70,71] Recently, it has been shown that adhesion molecules ICAM1 and VCAM1,

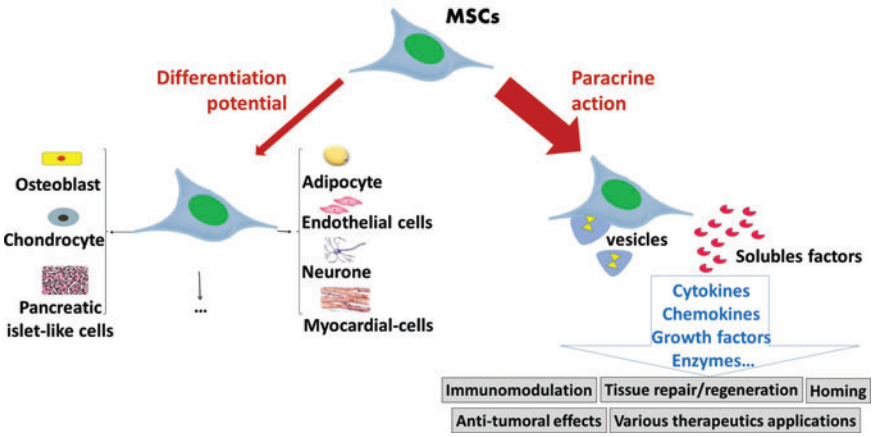


FIG. 2. Summary of the potential therapeutic roles of MSCs. Beneficial effects of MSCs have been attributed to their differentiation potentials. However, attention has been shifted to their paracrine effects (via vesicles and soluble factors) rather than their plasticity. The role that MSCs will play is determined by the microenvironment where they reside. MSCs, mesenchymal stromal cells. Color images available online at www.liebertpub.com/teb

which are required for a direct adhesion of MSCs to T cells, are critical for subsequent MSC-mediated immunosuppression, and are inducible by the parallel presence of interferon-gamma (IFN-γ) and inflammatory cytokines.[72] Another possible mechanism underlying the BM-MSC-mediated suppression of T cells is to prevent their entry into the S phase of the cell cycle by mediating irreversible G0/G1 phase arrest through the inhibition of cyclin D2 expression.[69,73] Similarly, it has been shown that the addition of DP-MSCs to phytohemagglutinin-stimulated T cells mediated an inhibition of their response.[74] Increased expression of immunodulatory soluble factors (hepatocyte growth factor [HGF]-β1, ICAM-1, IL-6, IL-10, transforming growth factor-β1 [TGF-β1], VCAM1, and vascular endothelial growth factor (VEGF)) secreted by human DP-MSCs was detected in a co-culture system with decreased expression levels of some pro-inflammatory cytokines and increased levels of some anti-inflammatory ones. Induction of Treg markers by human DP-MSCs was also demonstrated.[75] A very recent study has examined the *in vivo* and *in vitro* immunomodulatory effects of human supernumerary tooth-derived mesenchymal stem cells (SNT-MSCs). It has been shown that, in *in vitro* co-cultures, these cells suppressed the viability of T cells and also the differentiation of Th17 cells. *In vivo* transplantation of SNT-MSCs in systemic lupus erythematosus model MRL/Ipr mice suppressed increased levels of peripheral Th17 cells and IL-17 as well as *ex-vivo* differentiation of Th17 cells.[76]

Fetal MSCs have been reported to have similar inhibitory effects on T-lymphocytes. It has been shown that mitogen-induced T-cell proliferation in an allogeneic model transplant, as well as in a xenograft model, was effectively suppressed by WJ-MSCs with levels comparable to BM-MSCs immunosuppression.[77] In addition, IFN-γ and/or tumor necrosis factor-alpha (TNF-α) produced by activated T cells stimulate the production of indoleamine 2,3-dioxygenase (IDO) by MSCs, which, in turn, inhibited T-cell proliferation.[78] Tipnis *et al.* have reported that the expression of B7-H1, a negative regulator of T-cell activation constitutively expressed by WJ-MSCs, is increased after IFN-γ treatment. In addition, IFN-γ treatment induced IDO secretion by WJ-MSCs, which inhibited T-cell proliferation.[79] These results were confirmed very recently by Manochantr *et al.* showing that MSCs from amnion, placenta, and WJ can potentially substitute BM-MSCs in several therapeutic applications. Indeed, these cells inhibited alloreactive T-lymphocytes in the mixed lymphocyte reaction in a similar degree as BM-MSCs.[80]

MSCs and B cells: The reasearch on T-cell immunosuppression mediated by MSCs has attracted most of the attention in clinical applications and has been widely studied. However, B cells and humoral immune responses are more and more known as important mediators of chronic allograft rejection. Indeed, data about the influence of MSCs on B cells growth, differentiation, and production of immunoglobulins (Ig) are still scarce and controversial.[81]

B cells play an essential role in adaptive immunity. These cells develop in the BM strictly after a close interaction between B-cell progenitors and stromal cells that produce cytokines which are capable of supporting B-cell survival and proliferation.[82] They are directly responsible for the humoral immune response via the secretion of antibodies against pathogenic or foreign antigens. A subset of B lineage differentiates into memory B cells, which can mediate a rapid response on secondary exposure to that same antigen.

Corcione *et al.* demonstrated that BM-MSCs inhibited the proliferation of B cells and significantly decreased the production of IgM, IgG, and IgA[83]; the same effect has been reported by Che *et al.* showing that UC-MSCs significantly suppressed the proliferation, differentiation, and immunoglobulin secretion of B cells *in vitro.*[84] To understand the results of Che *et al.*, it is essential to know that ''B-lymphcote-induced matruration protein-1'' (Blimp-1), ''X-box binding protein-1'' (Xbp-1), ''B-cell lymphoma-6'' (Bcl-6) and ''paired box gene-5'' (PAX-5) are known as the main regulators of B-cell differentiation to immunoglobulin-secreting cells. PAX-5 and Bcl-6 are required to keep B-cell phenotypes. Blimp-1 inhibits the expression of both PAX-5 and Bcl-6 in order to let B cells differentiate. BCR signaling involves the MAPK signaling pathway and increases the transcriptional activity that is mediated by the transcription factor activator protein-1 (AP-1), which leads to Blimp-1 expression. Che *et al.* have shown a suppression of Blimp-1 expression and an induction of PAX-5 in the co-cultures of UC-MSCs and B-cells. Thay have also found that Akt and p38 MAPK were inhibited by WJ-MSCs.[84]

However, these results have been contradicted by other groups. Rasmusson *et al.* have shown an increase of B-cell immunoglobulin secretion when co-cultured with BM-MSCs; this effect varied depending on the type of stimulus used to trigger B cells.[85] Likewise, Traggiai *et al.* have reported that BM-MSCs could promote B-cell expansion and differentiation after treatment with an agonist of Toll-like receptor 9.[86] A recent study has demonstrated that UC-MSCs promoted proliferation and differentiation of B cells both *in vitro and in vivo* partially through prostaglandin E2 (PGE2) axis.[82]

Contradictions in the effects of MSCs on B cells could be associated to the differences in the B-cell source, the manner of their purification and stimulation, the culture conditions, and many other factors. However, the microenvironment plays a decisive role in determining the role that the MSCs will play.

Innate response:

MSCs and NK cells: NK cells are major effector cells of innate immunity, because they lack antigen-specific cell surface receptors.[87] They mediate antibody-dependent cellular cytotoxicity as well as ''spontaneous'' killing of infected or transformed cells through the release of perforin and granzyme from cytotoxic granules.[88]

MSCs and NK cells have been shown to interact *in vitro*. The outcome of this interaction may depend on the state of NK-cell activation and/or the cytokines present in the culture medium. IFN-γ-activated MSC-escaped NK cells mediated lysis through the induction of HLA-E and NK inhibitory ligands.[89,90] Previous studies have indicated that cytokine-induced proliferation of NK cells leads to the up-regulation of HLA class I on MSCs.[90] In response to this up-regulation, HLA class I molecules, including human leukocyte antigen-G5 (HLA-G5), expressed by MSCs, bind

to the inhibitory receptor ILT2 expressed on NK cells.[91] Furthermore, other studies have shown that the suppression of NK cell functions is mediated by a down-modulation of some activating NK cell receptors (NKp30, NKp44, and NKG2D) and by the inhibition of NK cell lytic granule formation.[92] There is growing evidence that IDO, PGE2, and TGF-β1 may control MSC-mediated inhibition of NK-cell function.[93]

Boissel *et al.* evidenced that NK cells had a higher expansion when cultured with allogeneic and autologous WJ-MSCs as feeders in the presence of NK growth factors. WJ-MSCs feeders were rejected during the first week of co-culture. Expanded NK cells maintained an elevated cytotoxic profile and may be genetically manipulated.[88] In a recent study, Zhao *et al.* have been interested in elucidating the effect of UC-MSCs on NK cell-mediated cytotoxicity against DCs and the mechanism involved. They found that UC-MSCs can enhance this effect possibly by inhibiting DCs maturation and up-regulating the ligands for killer activator receptor on the surface of the DCs.[94] When comparing the immunosuppressive activity of MSCs derived from UC, AT, and BM on lymphocytes, Ribeiro *et al.* have shown that all the three types of MSCs exhibited a strong inhibitory effect on $CD56^{dim}$NK cell subset activation (cytotoxic NK cells). UC-MSCs were the only cells that were unable to inhibit the activation of $CD56^{bright}$ NK cell subset (a subset that has the capacity to produce abundant cytokines after activation but has a low natural cytotoxicity). Among all these MSCs, AT-MSCs had a higher inhibitory capacity. A down-regulation of perforin and TNF-α ARNm by MSCs from the three sources was observed, while only AT- and BM-MSCs induced a minor reduction of granzyme B ARNm.[95]

MSCs and DCs: DCs play a key role in the initiation of primary immune responses and tolerance, depending on the activation and maturation stage of DCs. Locally produced inflammatory cytokines or microbial components promote the maturation of DCs from a processing to a presenting stage, characterized by the up-regulation of MHC-class II and co-stimulatory molecules (CD80 and CD86), production of IL-12, and migration to lymphoid tissue. DCs maturation is a prerequisite to induce immunogenic T-cell responses, whereas tolerance is observed when antigens are presented by immature or semi-mature DCs. Therefore, DC maturation plays a key role in initiating T-cell responses.

BM-MSCs were shown to block the generation of functional antigen-presenting cells, including myeloid DCs from both monocytes and $CD34^+$ cell precursors.[96–98] Most results supported the notion that DCs at early stages of differentiation are sensitive to their inhibitory effects, while at later stages, they are resistant. However, WJ-MSCs inhibited DC maturation and activation even when the contact happended during the mature or immature stage. Both cell contact via surface ligands (B7H1) and soluble factors (IDO) enhanced the efficiency of suppression.[79] Very recently, Saeidi *et al.* showed that UC-MSCs and BM-MSCs strongly inhibited the differentiation and maturation of DCs with a more inhibitory effect on CD1a, CD83, CD86 expression, and DC endocytic activity. These cells also severely up-regulate CD14 expression. Results have indicated that UC-MSCs and BM-MSCs exerted their inhibitory effect on differentiation, maturation, and function of DCs through the secreted factors and free of any cell-to-cell contacts.[99]

Immunomodulatory properties of WJ-MSCs in innate and adaptive responses are resumed in the figure given next (Fig. 3).

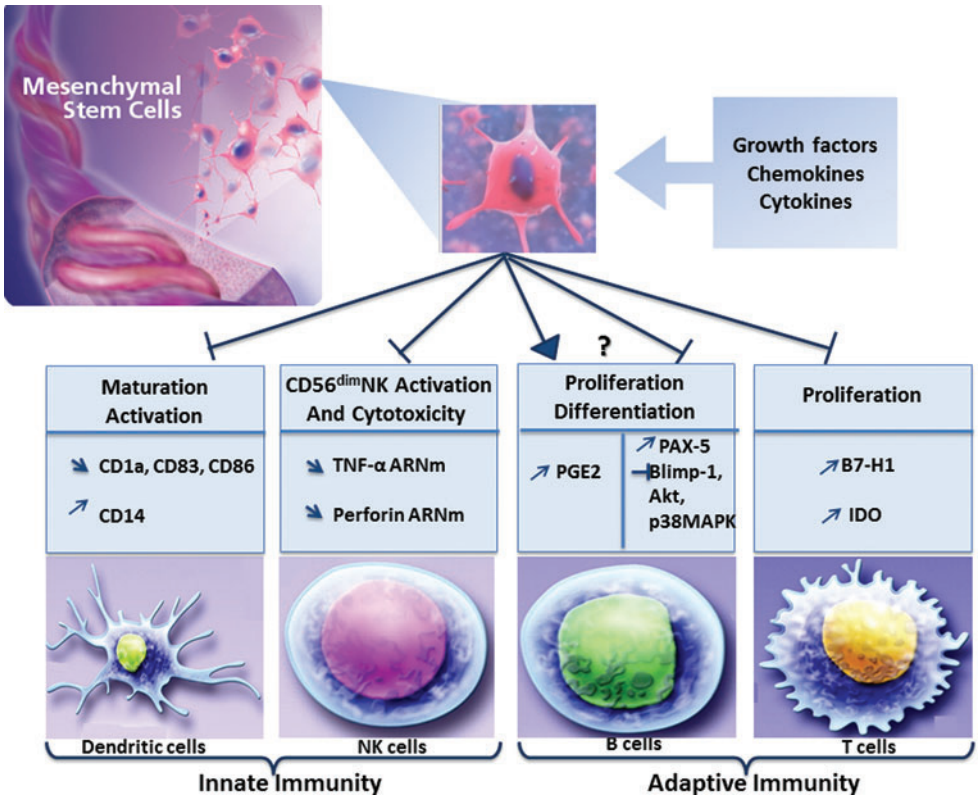


FIG. 3. Immunomodulatory effects of the WJ-MSCs on innate and adaptive immunity. The effects can be summarized as follows: inhibition of the maturation and activation of dendritic cells as well as the proliferation of T cells, activation of the expansion and cytotoxicity of NK cells. Effects of WJ-MSCs on B cells are still contradictory; they can stimulate or block the proliferation and differentiation of B cells and the secretion of immunoglobulin (Ig). NK, natural killer; WJ, Wharton's jelly. Color images available online at www.liebertpub.com/teb

MSCs and immumodulatory paracrine factors. Multiple reports have evidenced, first *in vitro* and then *in vivo*, the ability of MSCs to express molecules that interact with both innate and adaptive immunity, both through soluble factors[65,100] and in a cell contact-mediated fashion probably through the interaction of membrane receptors, adhesion molecules, or the cellular exchange of membrane vesicles.[101] It is still a matter of debate whether the regulatory effects are cell-to-cell contact -dependent, or whether soluble factors are sufficient.[102] The MSCs immune modulating effects will also depend on the ratio between MSCs and immune cells, and the state and stage of immune cell activation or maturation. Several factors that contribute to the MSCs-mediated effects have been identified, in particular growth factors, cytokines, chemokines, and hormones, all of which exert paracrine effects on immune cells and enable homing, migration, and their attachment to injured cells. Soluble factors implicated in MSCs-mediated immune modulation include nitric oxide (NO), indoleamine 2,3-dioxygenase (IDO), heme oxygenase (Hmox1), secretion of anti-inflammatory cytokines such as IL-10, TGF-β, HGF, IL-6, and PGE2.[68,70,103,104] A study comparing the immunomodulatory properties of MSCs derived from many sources showed that despite their similar cytokine profiles, WJ-MSCs only secrete IL-12, IL-15, and platelet-derived growth factor-AA (PDGF-AA). They did not secrete VEGF similar to other adult MSC sources.[78] The precise meaning of these differences, however, needs to be understood in WJ-MSCs/immune cell co-cultures.[105]

Specialized immune tolerance implicated at the maternal-fetal interfaces depends on the expression of many molecules, including galectin-1, B7 proteins, HLA-G,[106] and the expression of immune suppressive cytokines such as leukemia inhibitory factor (LIF).[107,108] Since WJ-MSCs are isolated from a peri-natal source, they could exhibit immune evasion mechanisms that are dominant at the fetal-maternal interface. In fact, Najar *et al.* showed that higher constitutive as well as IFN-γ inducible levels of LIF are expressed by WJ-MSCs than by BM-MSCs and the suppression of lymphoproliferation can be rescued by blocking LIF in co-cultures.[109] Furthermore, Prasanna *et al.* reported higher levels of both constitutive and IFN-γ inducible HGF in WJ-MSCs compared with BM-MSCs.[110]

Nonclassical type I HLA molecules are an interesting as yet only partly explored field in MSCs immune function. Several reports showed that BM-MSCs and WJ-MSCs express the HLA-G molecule, at both mRNA and protein level, and its soluble form HLA-G5.[29,77,111] Weiss *et al.* also showed that WJ-MSCs constitutively express high levels of the immune suppressive HLA-G6 isoform, while BM-MSCs express the HLA-G5 isoform constitutively and its expression is not induced by IFN-γ.[77] HLA-G5 secretion has been directly implicated in the induction of regulatory cells ($CD4^+CD25^+FoxP3^+$ Tregs) that are characterized as key suppressors of effector responses to alloantigens.[112] HLA-G5 secretion has also been linked with the suppression of NK cell production of IFN-γ in BM-MSCs co-cultures.[113] Since the inhibition of maternal alloreactivity is due to the expression of high levels of HLA-G by the fetus, the exact role of immune-suppressive HLA-G isoforms, such as HLA-G6 expressed by WJ-MSCs, needs to be evaluated in detail.[105] Recently, the expression of HLA-E and HLA-F in the WJ-MSCs has been reported; both are implicated in tolerogenic processes occurring at the fetal-maternal interface, along with HLA-G.[114]

Homing of MSCs

Mantaining the function and the integrity of the human body, which is often subjected to injuries, is essentially due to tissue repair. Shortly after an injury, different types of immune cells (neutrophils, monocytes, and lymphocytes) are conducted to the site of damage. These cells are responsible for the secretion of various growth factors and cytokines that will attract other residing or circulating cells such as MSCs. Endogenous MSCs present a pool of regenerative cells, participate in tissue repair, and communicate with other cells in response to signals of cellular damage.[115] Their ''homing'' can be defined as the arrest of MSCs within the vasculature of a tissue than crossing the endothelium.[116]. Thus, the homing of endogenous MSCs is being considered a therapeutic benefit, and studies are evaluating new methods for recruiting a sufficient number of MSCs to exert their regenerative capacity. In cases where the reservoir of MSCs is depleted because of several diseases or the age, exogenous MSCs could be administrated to compensate the lack of endogenous MSCs (reviewed in Marquez-Curtis and Janowska-Wieczorek[115] and Sohni and Verfaillie[117]). It has been reported that *in-vitro*-expanded MSCs preferentially home to sites of tissue damage, where they enhance wound healing, support tissue regeneration, and restore the BM microenvironment after damage by myeloablative chemotherapy or integrate into tumors.[118]

Since the precise molecular mechanisms by which MSCs migrate into sites of injury are not yet fully defined, the migration of leukocytes into sites of inflammation has been taken as a model.[119] Indeed, on delivery into the blood stream, the MSCs keep close contact with EC whose role is being extensively studied in MSCs migration. They engraft into the endothelium, and eventually pass and leave the endothelium.[120] The migration of MSCs is mediated by a wide variety of molecules that are expressed by MSCs, including growth factors, chemokines, and receptors, and by chemotactic factors produced by immune cells.[116] It has been demonstrated that human MSCs showed significant chemotaxis responses to several factors (including PDGF, VEGF, IGF-1, IL-8, bone morphogenetic protein BMP-4, and BMP-7)[121] and express a variety of chemokine receptors (such as CCR1, CCR4, CCR7, CXCR5, and CCR10) which might be involved in their migration into injured tissues along a chemokine gradient.[122]

In addition, specific proteolytic enzymes are required so the cells can traverse the protein fibers of the extracellular matrix (ECM) and reach the target sites.[118,123] In particular, the matrix metalloproteinases (MMPs), consisting of more than 24 zinc-dependent endopeptidases, are physiologically necessary for stem cell migration, degradation, and remodeling of ECM components, and are crucial for developmental events such as morphogenesis, cell proliferation, apoptosis, and differentiation.[124–127]

Ries *et al.* were the first to show that human BM-MSCs use constitutively expressed MMP-2 (gelatinase A), membrane-type matrix metalloproteinase-1 (MT1-MMP), and tissue inhibitor of metalloproteinase 2 (TIMP-2) to migrate

through human recombinant basement membranes. Inflammatory cytokines such as TGF-β1, IL-1β, and TNF-α are able to exert chemoattractive potential on hBM-MSCs and to up-regulate MMP-2, MT1-MMP, and/or MMP-9, enabling cellular trafficking of MSCs across human ECM barriers.[118] MMP-2 has been also detected in WJ-MSCs in association with MMP-9 (gelatinase B), MMP-8, and MMP-13 (respectively collagenase-1 and -2), as well as in different regions of full-term human umbilical cord and in cultured HUVEC. The wide expression of these enzymes in the umbilical cord has been attributed to their role in the degradation and remodeling of ECM and in other physiological processes.[128]

Recently, Balasubramanian *et al.* have compared chemokine and receptor gene expression between WJ- and BM-MSCs. Their results have shown that Chemokine (C-C motif) receptor 3 (CCR3) was more expressed in WJ-MSCs than in BM-MSCs; whereas the latter have presented a higher expression of CCR1, CCR7, CCRL2, Chemokine (C-X3-C motif) receptor 1 (CX3CR1), and CXCR5. MSCs from both sources had a similar expression of CCR5, CCR6, and CCRL1.

In addition, Chemokine (C-X-C motif) ligand 1 (CXCL1), CXCL2, CXCL5, CXCL6, and CXCL8 (members of the CXC chemokine family) were up-regulated in WJ-MSCs in comparison with BM-MSCs. These chemokines are known as potent promoters of angiogenesis and mediate their activity by binding CXCR2 receptor on the endothelium (Fig. 4). On the contrary, CXCL12 and CXCL13, also two members of the CXC chemokine family and known to contribute to immune and nonimmune cell homing, were up-regulated in BM-MSCs. WJ-MSCs have shown a higher expression of IL-1A (enhance the expression of CXCL8) and TNF-α (angiogenic factor) than BM-MSCs; while IL16 (has an immunomodulatory role in asthmatic inflammation) and CCRL12 (plays a role in the control of airway inflammatory response and in lung DC trafficking) were more expressed in BM-MSCs. Moreover, results have reported a stronger expression, in WJ-MSCs, of many growth factors linked with angiogenesis such as VEGF-D, PDGF-AA, TGF-β2, β-FGF, and HGF.[116] Their chemokine gene profile suggests that WJ-MSCs may be useful in the healing and treatment of ischemic lesions such as the ischemic myocardium, with cerebral ischemia for example. Moreover, they could be suggested as a treatment to reduce or prevent fibrosis and scarring in tissue lesions, as it has been shown that they secreted bFGF and HGF (known to have an anti-fibrotic effect).

Thus, *ex vivo*-expanded human MSCs with cytokines may be a useful method, in clinical applications, to increase their migration/homing potential after transplantation into patients, as well as the administration of cytokines to mobilize MSCs to sites of injury.

Anti-tumourigenic Effects of WJ-MSCs

MSCs have the capacity to migrate to tumor sites and modulate their microenvironment. Thus, they have an impact on tumour behavior.[129] A great deal of evidence suggests that solid tumors generate a microenvironment similar to that associated with wound healing, as they apply physical and chemical stress to neighboring tissues. Tumors can, therefore, be considered sites of tissue damage, which induces the migration of MSCs.[130]

Human MSCs have been intensively studied for their potential use in cancer treatment. Their use has been limited, however, by a general concern related to their biosafety.[131] Many studies have reported pro- or anti-tumorigenic effects of MSCs on the progression of primary and metastatic tumours. These contradictory results could be associated with differences in the MSC sources used, the type of tumour

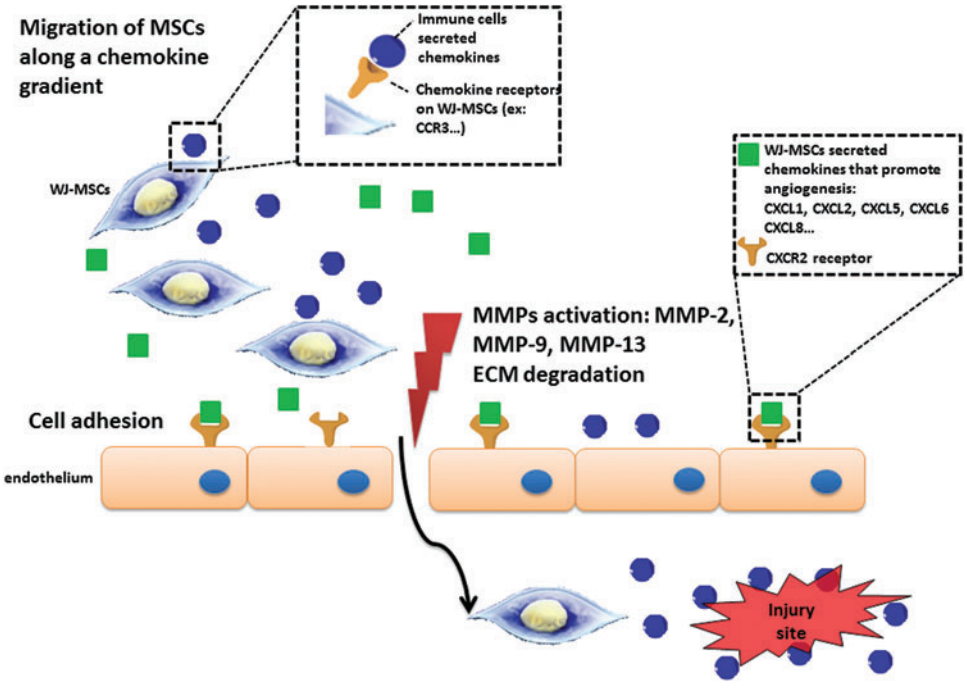


FIG. 4. Proposed mechanisms involved in the homing of WJ-MSCs to sites of tissue injury and their angiogenesis capacity. MSCs home to site of injury along gradients created by inflammatory chemokines and several factors. They express a variety of chemokine receptors that might be involved in their migration into injured sites. The expression of a set of MMPs by WJ-MSCs contributes to the extracellular matrix (ECM) degradation, which enables them to cross the ECM and reach the site of injury. They also express a variety of chemokines that are known as angiogenesis mediators and exert their function by binding to their receptor CXCR2 on the endothelium. MMPs, metalloproteinases. Color images available online at www.liebertpub.com/teb

model, the method of administration, or other unknown factors.[130,132]

The tumor stroma consists of a complex ECM in which inflammatory and immune cells, fat cells, fibroblasts, and blood vessels reside. It plays a crucial role in tumor progression, angiogenesis, and metastasis through its effects on tumor-host interactions. Tumor-associated fibroblasts (TAFs) are activated fibroblasts in the tumor stroma.[131] Several reports have hypothesized that BM-MSCs selectively proliferate to tumors and contribute to the formation of tumor-associated stroma by transforming into TAFs. They also promote tumor growth and metastasis by enhancing migration and angiogenesis and inhibiting apoptosis of tumor cells.[133–137]

On the other hand, the immunosuppressive effects of MSCs can impair the function of a variety of immune cells (directly or through paracrine signals). This may be an important mechanism enabling MSCs to promote tumor growth or to increase the incidence of tumor formation. For instance, by increasing Tregs and reducing the activity of NK cells and cytotoxic T lymphocytes (CTL) (known to kill tumour cells), BM-MSCs can protect breast cancer cells.[138] They also have been linked to osteocarcinomas,[139] prostate tumors,[140,141] breast tumors,[138,140,142] colon cancer,[137] and others. A recent study has also demonstrated a fusion between MSCs and gastrointestinal epithelial cells, suggesting the formation of a more cancer-prone cell type.[143]

Very recently, in order to examine the possible anticancer therapeutic applications of MSCs from different sources, Akimoto *et al.* have studied the inhibitory effects of MSCs from umbilical cord blood (UCB) and AT on ''glioblastoma multiforme (GBM)'' (the most aggressive type of primary brain tumor in humans). They found that, both *in vitro* and *in vivo*, GBM growth was inhibited by UCB-MSCs but promoted by AT-MSCs. UCB-MSCs induced apoptosis through the tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL), which is more strongly expressed by UBC-MSCs than by AT-MSCs.[144] Furthermore, it has been shown that naïve WJ-MSCs are able to produce factors suppressing cancer cell growth and inducing apoptosis, and so may be a novel tool for cancer therapy in contrast to MSCs from some other sources.[145] Other reports have likewise shown that WJ-MSCs can abrogate certain solid tumors.[146–149] These cells decreased the growth of human breast cancer *in vitro* and stopped its growth when intravenously injected in an SCID mouse model.[150] Later, Fan *et al.* showed that WJ-MSCs do not induce teratomas in immunodeficient SCID mice, nor do they induce tumors when transplanted into diseased animal models.[151] In a recent study, Subramanian *et al.* have examined whether WJ-MSCs, such as BM-MSCs, transform to the TAF phenotype in the presence of ovarian and breast cancer conditioned medium. Results have shown no expression of tumor-associated markers for hWJ-MSCs with a low expression of TAF-related genes, confirming that these cells are not associated with enhanced growth of solid tumors.[3] In order to determine whether WJ-MSC-mediated inhibition of cancer cell growth was not specific to breast cancer cells, the same group compared the effects of WJ-MSC extracts and cell lysate on three other types of solid tumors: breast adenocarcinoma, ovarian carcinoma, and osteocarcinoma. They observed the same effects, which were probably mediated via agents in WJ-MSC extracts.[152] In addition, Ma *et al.* have shown that WJ-MSCs significantly inhibited the growth of breast cancer stem cells *in vitro* and *in vivo*, probably by inducing a cell cycle arrest and tumor cell apoptosis and inhibiting the activities of phosphoinositide 3-kinase (PI3K) and AKT (also known as protein kinase B).[149] A more recent study has reported that WJ-MSC conditioned medium as well as its cell lysate inhibits mammary carcinoma and osteosarcoma cell growth via apoptosis and autophagy *in vitro* and in xenograft mice.[153] In another study evaluating the tumorigenesis potential of WJ-MSCs in comparison with ESCs, animals injected with ESCs developed teratomas with increased levels of pro-inflammatory cytokines; whereas those injected with WJ-MSCs developed no tumors or inflammatory reactions at the injection sites and exhibited increased production of anti-inflammatory cytokines.[154] A very recent study on the effects of WJ-MSCs on intrahepatic cholangiocarcinoma (ICC, a common form of primary liver cancer) has shown that these cells can inhibit the proliferation and induce the apoptosis of human ICC cells. Apoptosis of tumour cells is related to the inhibition of PI3K/Akt and the Wnt/β-catenin signaling pathways.[155] The effects of WJ-MSCs have also been studied in hematopoietic tumours. Results obtained by Tian *et al.* have provided a new insight on how these cells may modulate leukemic tumour growth *in vitro.* According to this study, p38 MAPK, a suppressor of tumor development, was required for leukemic tumor suppression by WJ-MSCs.[156]

These studies, taken together, indicate that WJ-MSCs are nontumorigenic, anti-tumorigenic, and hypoimmunogenic; do not transform to the TAF phenotype that is associated with enhanced growth of solid tumors; and suppress hematopoietic tumor development. WJ-MSCs appear to be a safe and promising tool for future cancer therapy and clinical applications, but more pieces of evidence are needed to further characterize their anti-tumorigenic mechanisms and to confirm this hypothesis.

Therapeutic Applications

Treatment of autoimmune diseases

The immune properties of WJ-MSCs suggest that they may be a therapeutic option to treat autoimmune diseases such as type 1 diabetes or Crohn's disease (CD).

Type 1 diabetes. Diabetes is a metabolic disease listed among the leading causes of death in some countries. It is characterized by absolute or relative insulin deficiency. Type 1 diabetes is characterized by an absolute insulin decrease due to T-cell-mediated destruction of insulin-producing pancreatic β cells.[157] This autoimmune destruction of pancreatic islet β-cells reduces the patient's ability to regulate blood glucose, leading to a high frequency of vascular complications that compromise the quality and expectancy of life.[158]

Transplantation of pancreatic islet cells (PICs) as a potential cure for type I diabetes has been hampered by immune rejection and recurrent attacks against islets by the underlying autoimmunity. Studies have shown the capacity of WJ-MSCs to differentiate into mature islet-like cell clusters. These islet-like cell clusters have been shown to contain human C-peptide and to release insulin *in vitro* and

in vivo in response to physiological glucose levels. Real-time PCR analysis has shown the enhancement of insulin and other pancreatic β-cell-related genes, such as pancreatic and duodenal homeobox 1 (pdx1), homeobox HB9 ou MNX1 (hlxb9), NK2 homeobox 2 (nkx2.2), NK6 homeobox 1 (nkx6.1), and glucose transporter 2 (glut-2) in these cells.[159] Various publications have confirmed the pancreatic islet-like cell differentiation potential of WJ-MSCs.[47,48,160] Kim *et al.*, comparing the capacities of MSCs from various sources (WJ, BM, AT, and periosteum) to differentiate into PICs, have confirmed that all cell lines were well differentiated with an increased insulin mRNA expression, but only PICs derived from periosteum progenitor cells showed insulin secretion to a high glucose concentration.[160]

More recently, Hu *et al.* have studied the therapeutic potential of WJ-MSCs in patients with type 1 diabetes, evaluating the effects of these cells over a longer treatment time. They followed two groups of patients, the first of which received a basic treatment combined with WJ-MSC implantation; while the second received a basic treatment combined with normal saline therapy. Patients were followed for two years after the operations. During the follow-up period, patients treated with WJ-MSCs showed better Hba1 and C-peptide expression levels than patients in the second group. Although the precise mechanisms involved are unknown, WJ-MSC therapy appears to have a promising effect on type 1 diabetes patients and to be a good strategy for treatment of this disease.[158]

Type 2 diabetes. Type 2 diabetes mellitus (T2DM) is the most common form of diabetes and is characterized by insulin resistance and pancreatic β-cell dysfunction. Hu *et al.* studied the effect of intravenous infusion of human WJ-MSCs as therapy, administering them alone and in combination with sitagliptin (a dipeptidyl-peptidase IV inhibitor known to increase insulin release and decrease glucagon levels by having an impact on α and β cells in the pancreatic islets) in a T2DM rat model. Compared with the control groups (a diabetic control group and a sitagliptin-only group), rats treated with WJ-MSCs only and those treated with a combination of WJ-MSCs and sitagliptin exhibited increased numbers of β cells. Glucagon level was decreased in the sitagliptin-only group and the WJ-MSCs + sitagliptin group compared with the WJ-MSCs-only group and the diabetic control group. These results suggest the therapeutic potential of WJ-MSCs in β-cell regeneration.[161]

Crohn's disease. CD is an inflammatory chronic disease caused by a dysregulation of immune tolerance and characterized by an idiopathic inflammation of the gastrointestinal tract. Frequent complications in CD are abscess and stricture formation, intestinal obstruction, and fistulas (abnormal connective passages from the epithelial lining of the intestines to another organ or to the skin caused by inflammation). Anti-TNF-α therapy is the first choice in the treatment of patients with perianal fistulas. Even with this treatment, however, perianal fistulas often lead to physical and emotional distress, and only 46% of cases heal completely.[162]

Therapeutic effects of AT-MSCs and BM-MSCs on CD have already been proved.[163,164] For instance, Garcia-Olma *et al.* performed a clinical study on patients suffering from Crohn's enterocutaneous fistulas in which they compared the therapeutic effects of autologous expanded AT-MSCs and unexpanded cells corresponding to the stromal vascular fraction (SVF) when cells of each type were implanted in the fistulas. Three out of four cases treated with expanded AT-MSCs were healed, compared with only one out of four cases treated with SVF. The authors have suggested that the use of expanded AT-MSCs would be more advantageous, and that the immunosuppressive properties of these cells were responsible for their healing effects in the treatment of CD. Other studies in progress will enable us to better understand the link between the expansion of AT-MSCs and their beneficial effects.[163] In another study, Ciccocioppo *et al.* examined the effect of *ex-vivo*-expanded BM-MSCs in CD. All 10 cases in which BM-MSCs were injected into the fistula exhibited signs of healing. In addition, a pro-apoptotic effect of BM-MSCs on mucosal T cells has been observed.[164]

Recently, studies have focused on two granulomatous disorders: intestinal tuberculosis (ITB) and CD. Both diseases present similar clinical signs and are difficult to distinguish. The current challenge is the early identification of the correct disease in order to treat it efficiently and quickly to avoid complications or death. Working from the fact that recruited MSCs within granulomas in ITB can evade the host immune response, Banerjee *et al.* have been pursuing the possibility of analyzing MSC markers in the two types of granulomas (i.e., those derived from patients with CD and those derived from patients with ITB). Their results have shown that the mesenchymal marker CD73 is expressed only in MSCs within tuberculous granulomas, identifying CD73 as a possible marker of ITB. This would explain the essential pathogenic mechanisms in ITB as being based on the recruitment of MSCs with high CD73 expression. These observations suggest that MSCs with increased CD73 expression could be a future candidate for therapeutic intervention in CD. Given their phenotypic profile, WJ-MSCs could have real potential for therapeutic applications in CD.[165]

Treatment of neurodegenerative diseases

Neurodegenerative diseases are chronic and progressive disorders of the central nervous system (CNS) which are characterized by a steady loss of neurons in the region of the brain and spinal cord that affects the mental and motor abilities of affected people. According to the World Health Organization, in 2040, the devastating diseases known as Alzheimer's and Parkinson's will represent the second leading cause of death worldwide. Multiple sclerosis (MS) is another neurodegenerative disease.

Parkinson's disease. Parkinson's disease (PD) is a neurodegenerative disorder that is more common in the elderly. Its symptoms (tremor, rigidity, bradykinesia, and postural instability) are caused primarily by the degeneration of dopamine (DA) neurons in the substantia nigra.[166] Current therapies mostly relieve symptoms but do not restore the function of the lesioned side of the brain or the efficacy lost due to disease progression. Embryonic stem cells have been investigated as a renewable source of DA-producing cells.

However, technical and ethical obstacles have limited the application of this therapy.[167]

Several groups have been interested in determining the effect of MSCs on the CNS. Ribeiro *et al.* have shown that AT-MSCs and WJ-MSCs are able to release trophic/neuroregulatory factors that could improve the metabolic viability of hippocampal neurons *in vitro*. These two types of MSCs do not have similar functionality, however, because their secretomes act differently on cell viability and on the densities of hippocampal neurons. Indeed, AT-MSCs require exogenous factors such as bFGF to be added in the primary cultures of hippocampal neurons in order to influence the metabolic viability and neuronal cell densities; whereas WJ-MSCs are able to promote neuronal survival without the addition of exogenous factors.[168]

Weiss *et al.* have characterized WJ-MSCs and compared them with MSCs derived from other sources. In their study, they tested the therapeutic effects of WJ-MSCs in parkinsonian rats. Their initial results demonstrated that WJ-MSCs express growth factors and angiogenic factors, suggesting that they may be useful for the treatment of neurodegenerative diseases. Indeed, the characterization of WJ-MSCs reveals that they produce glial cell line-derived neurotrophic factor located in the cytoplasm. WJ-MSCs also express nestin, a marker of primitive neural stem cells.[4] After neural induction of WJ-MSCs, the expression of nestin was lower in differentiated cells than in undifferentiated cells; whereas the expression of tyrosine hydroxylase (a mature neural marker of catecholaminergic neurons) was greater in differentiated cells. Moreover, it has been shown that WJ-MSCs express some genes encoding for proteins with a neurotrophic effect: CNTF (ciliary neurotrophic factor), VEGF, FGF20, and TRKC (neurotrophic tyrosine kinase). In addition, when they are transplanted into parkinsonian rats, WJ-MSCs can partially reverse the parkinsonian behavioral phenotype.[27] Yan *et al.* have managed to differentiate WJ-MSCs into neural-like cells *in vitro* and have subsequently tested the therapeutic potential of differentiated cells by implanting them into the striatum and substantia nigra of methyl-4-phenyl-1, 2, 3, 6-tetrahydropyridine (MPTP) lesioned hemi-parkinsonian rhesus monkeys. PD monkeys transplanted with the induced cells showed an improvement in behavioral measures. Furthermore, pathological and immunohistochemical data have indicated the presence of neuronal-like cells in the right brain hemisphere of PD monkeys, suggesting that they may be dopaminergic neurons.[167] Nearly identical results were obtained when WJ-MSCs were replaced by AT-MSCs.[169] The beneficial effect of BM-MSCs on a parkinsonian rat model was shown by Ye *et al.*[170]

Multiple Sclerosis. Multiple sclerosis (MS) is a progressive neurodegenerative disorder of the CNS that is characterized by chronic inflammation, demyelination, and neuronal damage. Currently, there is no medical cure for MS, mainly owing to an incomplete understanding of its pathophysiology.[171]

Recently, Payne *et al.* have assessed the therapeutic efficiency of BM-MSCs, AT-MSCs, and WJ-MSCs against MS, using recombinant myelin oligodendrocyte glycoprotein (rMOG)-induced experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE), a model of MS in which both T- and B-cells contribute to the disease pathogenesis. They have demonstrated that BM-MSCs exerted more potent immunomodulatory effects *in vitro* compared with AT-MSCs and WJ-MSCs. Unexpectedly, however, BM-MSCs did not impact the disease course, although the transplantation of AT-MSCs ameliorated clinical signs in two animal models of EAE. Furthermore, only AT-MSCs and WJ-MSCs expressed integrin-α4 (CD49d); BM-MSCs, which may not be able to adhere to VCAM1, a critical step in the extravasation of cells into the CNS during EAE, did not express integrin-α4.[172] In their recent work, Liu *et al.* showed that WJ-MSCs could potentially play a therapeutic role in MS and could be an alternative to BM-MSCs, which have been extensively studied with regard to the treatment of MS.[173–175] Thus, it is believed that these cells could restore behavioral functions and attenuate the histopathological deficits of EAE mice over the long term (50 days).[176] These results confirm those of Liang *et al.*, who transplanted WJ-MSCs to a patient with refractory progressive MS and subsequently observed stabilization of the disease.[177]

Alzheimer's disease. Alzheimer's disease (AD) is a progressive and fatal neurodegenerative disorder that is characterized by a loss of memory and a deterioration of cognitive ability. Cumulative evidence supports the hypothesis that the accumulation of amyloid-β peptide (Aβ) in the brain and oxidative stress play critical roles in AD pathogenesis.

Very recently, Liang *et al.* have attempted to differentiate WJ-MSCs into cholinergic-like neurons. Cholinergic neurons are neurons of the autonomic nervous system and are one of the causes of cognitive disorders such as AD. To induce differentiation, Liang *et al.* used a neural stem cell conditioned medium supplemented with bone morphogenetic protein 4 (BMP4) and fibroblast growth factors 8 (FGF8). First, they observed morphological changes of WJ-MSCs after culture in conditioned medium. These cells, which under normal conditions have a bipolar spindle-like morphology, changed into a bulbous shape with thin extensions touching each other to a certain extent after 16 days of differentiation. These observations already suggest a structural organization into axons. Moreover, they confirmed their hypothesis by showing an expression of cholinergic neuron markers, including choline acetyltransferase and NF by immunofluorescence and RT-PCR 20 days after the beginning of WJ-MSC induction. These *in-vitro* results demonstrate that WJ-MSCs can be induced into cholinergic-like neurons, which suggests that WJ-MSCs may be a very good candidate for the treatment of AD.[178] Patients suffering from AD show a decrease in the expression and activity levels of neprilysin (neural endopeptidase [NEP]), which is one of the several proteases involved in the proteolysis of Aβ. Thus, NEP has been intensively studied as a potential therapeutic target for AD. Since MSCs have the ability to synthesize vesicles (generated from the membrane), which also have a real therapeutic potential, Katsuda *et al.* have studied vesicles derived from AT-MSCs and identified their effects in co-cultures with cells over-producing Aβ. They observed a decrease in the amount of Aβ in the presence of AT-MSC vesicles. This phenomenon is explained by the initial expression on AT-MSC membranes of the NEP that is later present as an active form in the vesicles. Furthermore, they observed that AT-MSCs expressed NEP at a higher

level than BM-MSCs did, suggesting that AT-MSCs could be a better candidate than BM-MSCs for the treatment of AD.[179]

In another recent *in-vivo* study, Yang *et al.* sought to determine the therapeutic impact and mechanisms of action of neuron-like cells differentiated from WJ-MSCs in AD. They induced the differentiation of human WJ-MSCs into neuron-like cells using tricyclodecan-9-yl-xanthogenate (D609), then transplanted them into a transgenic AD mouse model. The resulting beneficial effects were linked to an ''alternatively activated'' microglia (M2-like microglia). Treated mice showed increased M2-like microglial activation, associated with an increase in the expressions of IL-4 (an anti-inflammatory cytokine) and NEP and a decrease in the expressions of IL-1β and TNF-α (pro-inflammatory cytokines). Hence, according to this study, transplantation of neuron-like cells differentiated from WJ-MSCs might be a promising cell therapy for AD.[180] Later, the same group studied the therapeutic impact of systemic administration of WJ-MSCs in a transgenic AD mouse model, and found that WJ-MSC infusion improved spatial learning and alleviated memory decline by reducing oxidative stress. All these results, taken together, suggest that WJ-MSCs in their differentiated (neuron-like cells) and undifferentiated forms may have beneficial effects in the prevention and treatment of AD.

Conclusion

The number of diseases that in their final stages require organ transplant or cellular therapy is increasing. Many of them are derived from or are accompanied by an unbalance in the organ inflammatory or immune state. In this regard, the use of a cellular therapy vehicle that can provide both organ recellularization and restoration of a physiological microenvironment without being rejected by the patient would benefit patients significantly.

To date, BM-MSCs have been considered the gold standard among therapeutic MSC-based therapies, yet BM-MSCs eventually degrade, exhibiting loss of proliferation and senescence. In the search for an alternative therapy lacking this flaw, different sources of MSCs have been explored. MSCs from AT, dental pulp, and AF have variable proliferation potentials and multilineage differentiation capacities, suggesting that the source of MSCs should be chosen carefully depending on the clinical applications targeted. Over the last few years, MSCs derived from WJ have gained much attention in regenerative medicine. The overview of the literature presented in this review has described their high differentiation potential as well as their important trophic, immunomodulatory, and anti-tumorigenic effects, which should be confirmed in different animal models. Taken together, all these works clearly show that the immunological features of various types of MSCs may affect their applications in regenerative medicine in ways which may be essential. Since these two properties rely, in turn, on paracrine effects, it is essential to further study the composition of MSCs secretome. This task will probably represent a major part of the relevant publications over the next 10 years.

The great question with regard to MSC therapy that still remains to be answered concerns its biosafety. Clinical trials are still needed to evaluate this particular aspect, especially in new sources of MSCs such as WJ-MSCs, even if they seem to be promising tools for the treatment of incurable degenerative diseases.

Disclosure Statements

No competing financial interests exist.

References

1. Catacchio, I., Berardi, S., Reale, A., De Luisi, A., Racanelli, V., Vacca, A., and Ria, R. Evidence for bone marrow adult stem cell plasticity: properties, molecular mechanisms, negative aspects, and clinical applications of hematopoietic and mesenchymal stem cells transdifferentiation. Stem Cells Int **2013,** 589139, 2013.
2. Friedman, R., Betancur, M., Boissel, L., Tuncer, H., Cetrulo, C., and Klingemann, H. Umbilical cord mesenchymal stem cells: adjuvants for human cell transplantation. Biol Blood Marrow Transplant **13,** 1477, 2007.
3. Subramanian, A., Shu-Uin, G., Kae-Siang, N., Gauthaman, K., Biswas, A., Choolani, M., Bongso, A., and Chui-Yee, F. Human umbilical cord Wharton's jelly mesenchymal stem cells do not transform to tumor-associated fibroblasts in the presence of breast and ovarian cancer cells unlike bone marrow mesenchymal stem cells. J Cell Biochem **113,** 1886, 2012.
4. Troyer, D.L., and Weiss, M.L. Wharton's jelly-derived cells are a primitive stromal cell population. Stem Cells **26,** 591, 2008.
5. Chen, M.Y., Lie, P.C., Li, Z.L., and Wei, X. Endothelial differentiation of Wharton's jelly-derived mesenchymal stem cells in comparison with bone marrow-derived mesenchymal stem cells. Exp Hematol **37,** 629, 2009.
6. Fong, C.Y., Chak, L.L., Biswas, A., Tan, J.H., Gauthaman, K., Chan, W.K., and Bongso, A. Human Wharton's jelly stem cells have unique transcriptome profiles compared to human embryonic stem cells and other mesenchymal stem cells. Stem Cell Rev **7,** 1, 2011.
7. Han, Y.F., Tao, R., Sun, T.J., Chai, J.K., Xu, G., and Liu, J. Optimization of human umbilical cord mesenchymal stem cell isolation and culture methods. Cytotechnology **65,** 819, 2013.
8. Dalous, J., Larghero, J., and Baud, O. Transplantation of umbilical cord-derived mesenchymal stem cells as a novel strategy to protect the central nervous system: technical aspects, preclinical studies, and clinical perspectives. Pediatr Res **71,** 482, 2012.
9. Xu, Y., Meng, H., Li, C., Hao, M., Wang, Y., Yu, Z., Li, Q., Han, J., Zhai, Q., and Qiu, L. Umbilical cord-derived mesenchymal stem cells isolated by a novel explantation technique can differentiate into functional endothelial cells and promote revascularization. Stem Cells Dev **19,** 1511, 2010.
10. Majore, I., Moretti, P., Stahl, F., Hass, R., and Kasper, C. Growth and differentiation properties of mesenchymal stromal cell populations derived from whole human umbilical cord. Stem Cell Rev **7,** 17, 2011.
11. Hua, J., Gong, J., Meng, H., Xu, B., Yao, L., Qian, M., He, Z., Zou, S., Zhou, B., and Song, Z. Comparison of different methods for the isolation of mesenchymal stem cells from umbilical cord matrix: proliferation and multilineage differentiation as compared to mesenchymal stem cells from umbilical cord blood and bone marrow.

Cell Biol Int 2013 [Epub ahead of print]; DOI: 10.1002/cbin.10188.
12. Kim, S.S., Kwon, D.W., Im, I., Kim, Y.D., Hwang, D.S., Holliday, L.S., Donatelli, R.E., Son, W.S., and Jun, E.S. Differentiation and characteristics of undifferentiated mesenchymal stem cells originating from adult premolar periodontal ligaments. Korean J Orthod **42,** 307, 2012.
13. Hsieh, J.Y., Fu, Y.S., Chang, S.J., Tsuang, Y.H., and Wang, H.W. Functional module analysis reveals differential osteogenic and stemness potentials in human mesenchymal stem cells from bone marrow and Wharton's jelly of umbilical cord. Stem Cells Dev **19,** 1895, 2010.
14. Yu, S., Long, J., Yu, J., Du, J., Ma, P., Ma, Y., Yang, D., and Fan, Z. Analysis of differentiation potentials and gene expression profiles of mesenchymal stem cells derived from periodontal ligament and Wharton's jelly of the umbilical cord. Cells Tissues Organs **197,** 209, 2013.
15. Abu Kasim, N.H., Govindasamy, V., Gnanasegaran, N., Musa, S., Pradeep, P.J., Srijaya, T.C., and Aziz, Z.A. Unique molecular signatures influencing the biological function and fate of post-natal stem cells isolated from different sources. J Tissue Eng Regen Med 2012 [Epub ahead of print]; DOI: 10.1002/term.
16. Lu, L.L., Liu, Y.J., Yang, S.G., Zhao, Q.J., Wang, X., Gong, W., Han, Z.B., Xu, Z.S., Lu, Y.X., Liu, D., Chen, Z.Z., and Han, Z.C. Isolation and characterization of human umbilical cord mesenchymal stem cells with hematopoiesis-supportive function and other potentials. Haematologica **91,** 1017, 2006.
17. Chen, H.C., Lee, Y.S., Sieber, M., Lu, H.T., Wei, P.C., Wang, C.N., Peng, H.H., Chao, A.S., Cheng, P.J., Chang, S.D., Chen, S.J., and Wang, T.H. MicroRNA and messenger RNA analyses of mesenchymal stem cells derived from teeth and the Wharton jelly of umbilical cord. Stem Cells Dev **21,** 911, 2012.
18. Bai, J., Hu, Y., Wang, Y.R., Liu, L.F., Chen, J., Su, S.P., and Wang, Y. Comparison of human amniotic fluid-derived and umbilical cord Wharton's Jelly-derived mesenchymal stromal cells: characterization and myocardial differentiation capacity. J Geriatr Cardiol **9,** 166, 2012.
19. Christodoulou, I., Kolisis, F.N., Papaevangeliou, D., and Zoumpourlis, V. Comparative evaluation of human mesenchymal stem cells of fetal (Wharton's jelly) and adult (adipose tissue) origin during prolonged in vitro expansion: considerations for cytotherapy. Stem Cells Int **2013,** 246134, 2013.
20. La Rocca, G., Anzalone, R., and Farina, F. The expression of CD68 in human umbilical cord mesenchymal stem cells: new evidences of presence in non-myeloid cell types. Scand J Immunol **70,** 161, 2009.
21. Malgieri, A., Kantzari, E., Patrizi, M.P., and Gambardella, S. Bone marrow and umbilical cord blood human mesenchymal stem cells: state of the art. Int J Clin Exp Med **3,** 248, 2010.
22. Torreggiani, E., Lisignoli, G., Manferdini, C., Lambertini, E., Penolazzi, L., Vecchiatini, R., Gabusi, E., Chieco, P., Facchini, A., Gambari, R., and Piva, R. Role of slug transcription factor in human mesenchymal stem cells. J Cell Mol Med **16,** 740, 2012.
23. Zhang, Z.Y., Teoh, S.H., Chong, M.S., Schantz, J.T., Fisk, N.M., Choolani, M.A., and Chan, J. Superior osteogenic capacity for bone tissue engineering of fetal compared with perinatal and adult mesenchymal stem cells. Stem Cells **27,** 126, 2009.
24. Salehinejad, P., Alitheen, N.B., Ali, A.M., Omar, A.R., Mohit, M., Janzamin, E., Samani, F.S., Torshizi, Z., and Nematollahi-Mahani, S.N. Comparison of different methods for the isolation of mesenchymal stem cells from human umbilical cord Wharton's jelly. In Vitro Cell Dev Biol Anim **48,** 75, 2012.
25. Nekanti, U., Rao, V.B., Bahirvani, A.G., Jan, M., Totey, S., and Ta, M. Long-term expansion and pluripotent marker array analysis of Wharton's jelly-derived mesenchymal stem cells. Stem Cells Dev **19,** 117, 2010.
26. Fong, C.Y., Subramanian, A., Gauthaman, K., Venugopal, J., Biswas, A., Ramakrishna, S., and Bongso, A. Human umbilical cord Wharton's jelly stem cells undergo enhanced chondrogenic differentiation when grown on nanofibrous scaffolds and in a sequential two-stage culture medium environment. Stem Cell Rev **8,** 195, 2012.
27. Weiss, M.L., Medicetty, S., Bledsoe, A.R., Rachakatla, R.S., Choi, M., Merchav, S., Luo, Y., Rao, M.S., Velagaleti, G., and Troyer, D. Human umbilical cord matrix stem cells: preliminary characterization and effect of transplantation in a rodent model of Parkinson's disease. Stem Cells **24,** 781, 2006.
28. De Kock, J., Najar, M., Bolleyn, J., Al Battah, F., Rodrigues, R.M., Buyl, K., Raicevic, G., Govaere, O., Branson, S., Meganathan, K., Gaspar, J.A., Roskams, T., Sachinidis, A., Lagneaux, L., Vanhaecke, T., and Rogiers, V. Mesoderm-derived stem cells: the link between the transcriptome and their differentiation potential. Stem Cells Dev **21,** 3309, 2012.
29. La Rocca, G., Anzalone, R., Corrao, S., Magno, F., Loria, T., Lo Iacono, M., Di Stefano, A., Giannuzzi, P., Marasa, L., Cappello, F., Zummo, G., and Farina, F. Isolation and characterization of Oct-4+/HLA-G+ mesenchymal stem cells from human umbilical cord matrix: differentiation potential and detection of new markers. Histochem Cell Biol **131,** 267, 2009.
30. Zhang, J., Chen, G.H., Wang, Y.W., Zhao, J., Duan, H.F., Liao, L.M., Zhang, X.Z., Chen, Y.D., and Chen, H. Hydrogen peroxide preconditioning enhances the therapeutic efficacy of Wharton's Jelly mesenchymal stem cells after myocardial infarction. Chin Med J (Engl) **125,** 3472, 2012.
31. Corrao, S., La Rocca, G., Lo Iacono, M., Zummo, G., Gerbino, A., Farina, F., and Anzalone, R. New frontiers in regenerative medicine in cardiology: the potential of Wharton's jelly mesenchymal stem cells. Curr Stem Cell Res Ther **8,** 39, 2013.
32. Hoganson, D.M., Meppelink, A.M., Hinkel, C.J., Goldman, S.M., Liu, X.H., Nunley, R.M., Gaut, J.P., and Vacanti, J.P. Differentiation of human bone marrow mesenchymal stem cells on decellularized extracellular matrix materials. J Biomed Mater Res A 2013 [Epub ahead of print]; DOI: 10.1002/jbm.a.34941.
33. Park, J.S., Shim, M.S., Shim, S.H., Yang, H.N., Jeon, S.Y., Woo, D.G., Lee, D.R., Yoon, T.K., and Park, K.H. Chondrogenic potential of stem cells derived from amniotic fluid, adipose tissue, or bone marrow encapsulated in fibrin gels containing TGF-beta3. Biomaterials **32,** 8139, 2011.
34. Vishnubalaji, R., Al-Nbaheen, M., Kadalmani, B., Aldahmash, A., and Ramesh, T. Comparative investigation of the differentiation capability of bone-marrow- and adipose-derived mesenchymal stem cells by qualitative and quantitative analysis. Cell Tissue Res **347,** 419, 2013.

35. Arminan, A., Gandia, C., Bartual, M., Garcia-Verdugo, J.M., Lledo, E., Mirabet, V., Llop, M., Barea, J., Montero, J.A., and Sepulveda, P. Cardiac differentiation is driven by NKX2.5 and GATA4 nuclear translocation in tissue-specific mesenchymal stem cells. Stem Cells Dev **18,** 907, 2009.
36. Hu, L., Hu, J., Zhao, J., Liu, J., Ouyang, W., Yang, C., Gong, N., Du, L., Khanal, A., and Chen, L. Side-by-side comparison of the biological characteristics of human umbilical cord and adipose tissue-derived mesenchymal stem cells. Biomed Res Int **2013,** 438243, 2013.
37. Osathanon, T., Sawangmake, C., Nowwarote, N., and Pavasant, P. Neurogenic differentiation of human dental pulp stem cells using different induction protocols. Oral Dis 2013 [Epub ahead of print]; DOI: 10.1111/odi.12119.
38. Kadar, K., Kiraly, M., Porcsalmy, B., Molnar, B., Racz, G.Z., Blazsek, J., Kallo, K., Szabo, E.L., Gera, I., Gerber, G., and Varga, G. Differentiation potential of stem cells from human dental origin—promise for tissue engineering. J Physiol Pharmacol **60 Suppl 7,** 167, 2009.
39. Carnevale, G., Riccio, M., Pisciotta, A., Beretti, F., Maraldi, T., Zavatti, M., Cavallini, G.M., La Sala, G.B., Ferrari, A., and De Pol, A. *In vitro* differentiation into insulin-producing beta-cells of stem cells isolated from human amniotic fluid and dental pulp. Dig Liver Dis **45,** 669, 2013.
40. Martinez, C., Rath, S., Van Gulden, S., Pelaez, D., Alfonso, A., Fernandez, N., Kos, L., Cheung, H., and Ramaswamy, S. Periodontal ligament cells cultured under steady-flow environments demonstrate potential for use in heart valve tissue engineering. Tissue Eng Part A **19,** 458, 2013.
41. de Lara Janz, F., Favero, G.M., Bohatch, M.S., Jr., Aguiar Debes, A., and Bydlowski, S.P. Simvastatin induces osteogenic differentiation in human amniotic fluid mesenchymal stem cells (AFMSC). Fundam Clin Pharmacol 2012 [Epub ahead of print]; DOI: 10.1111/fcp.12006.
42. Benavides, O.M., Petsche, J.J., Moise, K.J., Jr., Johnson, A., and Jacot, J.G. Evaluation of endothelial cells differentiated from amniotic fluid-derived stem cells. Tissue Eng Part A **18,** 1123, 2012.
43. Hartmann, K., Raabe, O., Wenisch, S., and Arnhold, S. Amniotic fluid derived stem cells give rise to neuron-like cells without a further differentiation potential into retina-like cells. Am J Stem Cells **2,** 108, 2013.
44. Baksh, D., Yao, R., and Tuan, R.S. Comparison of proliferative and multilineage differentiation potential of human mesenchymal stem cells derived from umbilical cord and bone marrow. Stem Cells **25,** 1384, 2007.
45. Jo, C.H., Yoon, P.W., Kim, H., Kang, K.S., and Yoon, K.S. Comparative evaluation of *in vivo* osteogenic differentiation of fetal and adult mesenchymal stem cell in rat critical-sized femoral defect model. Cell Tissue Res **353,** 41, 2013.
46. Kim, S.H., Abbasi, F., Lamendola, C., Reaven, G.M., and McLaughlin, T. Glucose-stimulated insulin secretion in gastric bypass patients with hypoglycemic syndrome: no evidence for inappropriate pancreatic beta-cell function. Obes Surg **20,** 1110, 2012.
47. Tsai, P.J., Wang, H.S., Shyr, Y.M., Weng, Z.C., Tai, L.C., Shyu, J.F., and Chen, T.H. Transplantation of insulin-producing cells from umbilical cord mesenchymal stem cells for the treatment of streptozotocin-induced diabetic rats. J Biomed Sci **19,** 47, 2012.
48. Wang, H.S., Shyu, J.F., Shen, W.S., Hsu, H.C., Chi, T.C., Chen, C.P., Huang, S.W., Shyr, Y.M., Tang, K.T., and Chen, T.H. Transplantation of insulin-producing cells derived from umbilical cord stromal mesenchymal stem cells to treat NOD mice. Cell Transplant **20,** 455, 2011.
49. Bianco, P., Cao, X., Frenette, P.S., Mao, J.J., Robey, P.G., Simmons, P.J., and Wang, C.Y. The meaning, the sense and the significance: translating the science of mesenchymal stem cells into medicine. Nat Med **19,** 35, 2013.
50. Bollini, S., Gentili, C., Tasso, R., Anderson, K.S., and Cancedda, R. The regenerative role of the fetal and adult stem cell secretome. J Clin Med **2,** 302, 2013.
51. Doorn, J., Moll, G., Le Blanc, K., van Blitterswijk, C., and de Boer, J. Therapeutic applications of mesenchymal stromal cells: paracrine effects and potential improvements. Tissue Eng Part B Rev **18,** 101, 2011.
52. Fernandez Vallone, V.B., Romaniuk, M.A., Choi, H., Labovsky, V., Otaegui, J., and Chasseing, N.A. Mesenchymal stem cells and their use in therapy: what has been achieved? Differentiation **85,** 1, 2013.
53. Pourrajab, F., Forouzannia, S.K., and Tabatabaee, S.A. Molecular characteristics of bone marrow mesenchymal stem cells, source of regenerative medicine. Int J Cardiol **163,** 125, 2013.
54. Stubbendorff, M., Deuse, T., Hua, X., Phan, T.T., Bieback, K., Atkinson, K., Eiermann, T.H., Velden, J., Schroeder, C., Reichenspurner, H., Robbins, R.C., Volk, H.D., and Schrepfer, S. Immunological properties of extraembryonic human mesenchymal stromal cells derived from gestational tissue. Stem Cells Dev **22,** 2619, 2013.
55. Patel, D.M., Shah, J., and Srivastava, A.S. Therapeutic potential of mesenchymal stem cells in regenerative medicine. Stem Cells Int **2013,** 496218, 2013.
56. Hass, R., Kasper, C., Bohm, S., and Jacobs, R. Different populations and sources of human mesenchymal stem cells (MSC): a comparison of adult and neonatal tissue-derived MSC. Cell Commun Signal **9,** 12, 2011.
57. Ryan, J.M., Barry, F.P., Murphy, J.M., and Mahon, B.P. Mesenchymal stem cells avoid allogeneic rejection. J Inflamm (Lond) **2,** 8, 2005.
58. De Miguel, M.P., Fuentes-Julian, S., Blazquez-Martinez, A., Pascual, C.Y., Aller, M.A., Arias, J., and Arnalich-Montiel, F. Immunosuppressive properties of mesenchymal stem cells: advances and applications. Curr Mol Med **12,** 574, 2012.
59. Yagi, H., Soto-Gutierrez, A., Parekkadan, B., Kitagawa, Y., Tompkins, R.G., Kobayashi, N., and Yarmush, M.L. Mesenchymal stem cells: Mechanisms of immunomodulation and homing. Cell Transplant **19,** 667, 2010.
60. English, K., French, A., and Wood, K.J. Mesenchymal stromal cells: facilitators of successful transplantation? Cell Stem Cell **7,** 431, 2010.
61. Uccelli, A., Moretta, L., and Pistoia, V. Mesenchymal stem cells in health and disease. Nat Rev Immunol **8,** 726, 2008.
62. Maitra, B., Szekely, E., Gjini, K., Laughlin, M.J., Dennis, J., Haynesworth, S.E., and Koc, O.N. Human mesenchymal stem cells support unrelated donor hematopoietic stem cells and suppress T-cell activation. Bone Marrow Transplant **33,** 597, 2004.
63. Le Blanc, K., Frassoni, F., Ball, L., Locatelli, F., Roelofs, H., Lewis, I., Lanino, E., Sundberg, B., Bernardo, M.E., Remberger, M., Dini, G., Egeler, R.M., Bacigalupo, A.,

Fibbe, W., and Ringden, O. Mesenchymal stem cells for treatment of steroid-resistant, severe, acute graft-versus-host disease: a phase II study. Lancet **371,** 1579, 2008.
64. Le Blanc, K., Rasmusson, I., Sundberg, B., Gotherstrom, C., Hassan, M., Uzunel, M., and Ringden, O. Treatment of severe acute graft-versus-host disease with third party haploidentical mesenchymal stem cells. Lancet **363,** 1439, 2004.
65. Di Nicola, M., Carlo-Stella, C., Magni, M., Milanesi, M., Longoni, P.D., Matteucci, P., Grisanti, S., and Gianni, A.M. Human bone marrow stromal cells suppress T-lymphocyte proliferation induced by cellular or nonspecific mitogenic stimuli. Blood **99,** 3838, 2002.
66. Tse, W.T., Pendleton, J.D., Beyer, W.M., Egalka, M.C., and Guinan, E.C. Suppression of allogeneic T-cell proliferation by human marrow stromal cells: implications in transplantation. Transplantation **75,** 389, 2003.
67. Le Blanc, K., Tammik, L., Sundberg, B., Haynesworth, S.E., and Ringden, O. Mesenchymal stem cells inhibit and stimulate mixed lymphocyte cultures and mitogenic responses independently of the major histocompatibility complex. Scand J Immunol **57,** 11, 2003.
68. Ren, G., Zhang, L., Zhao, X., Xu, G., Zhang, Y., Roberts, A.I., Zhao, R.C., and Shi, Y. Mesenchymal stem cell-mediated immunosuppression occurs via concerted action of chemokines and nitric oxide. Cell Stem Cell **2,** 141, 2008.
69. Krampera, M., Glennie, S., Dyson, J., Scott, D., Laylor, R., Simpson, E., and Dazzi, F. Bone marrow mesenchymal stem cells inhibit the response of naive and memory antigen-specific T cells to their cognate peptide. Blood **101,** 3722, 2003.
70. Aggarwal, S., and Pittenger, M.F. Human mesenchymal stem cells modulate allogeneic immune cell responses. Blood **105,** 1815, 2005.
71. Ghannam, S., Pene, J., Torcy-Moquet, G., Jorgensen, C., and Yssel, H. Mesenchymal stem cells inhibit human Th17 cell differentiation and function and induce a T regulatory cell phenotype. J Immunol **185,** 302, 2010.
72. Ren, G., Zhao, X., Zhang, L., Zhang, J., L'Huillier, A., Ling, W., Roberts, A.I., Le, A.D., Shi, S., Shao, C., and Shi, Y. Inflammatory cytokine-induced intercellular adhesion molecule-1 and vascular cell adhesion molecule-1 in mesenchymal stem cells are critical for immunosuppression. J Immunol **184,** 2321, 2010.
73. Glennie, S., Soeiro, I., Dyson, P.J., Lam, E.W., and Dazzi, F. Bone marrow mesenchymal stem cells induce division arrest anergy of activated T cells. Blood **105,** 2821, 2005.
74. Pierdomenico, L., Bonsi, L., Calvitti, M., Rondelli, D., Arpinati, M., Chirumbolo, G., Becchetti, E., Marchionni, C., Alviano, F., Fossati, V., Staffolani, N., Franchina, M., Grossi, A., and Bagnara, G.P. Multipotent mesenchymal stem cells with immunosuppressive activity can be easily isolated from dental pulp. Transplantation **80,** 836, 2005.
75. Demircan, P.C., Sariboyaci, A.E., Unal, Z.S., Gacar, G., Subasi, C., and Karaoz, E. Immunoregulatory effects of human dental pulp-derived stem cells on T cells: comparison of transwell co-culture and mixed lymphocyte reaction systems. Cytotherapy **13,** 1205, 2011.
76. Makino, Y., Yamaza, H., Akiyama, K., Ma, L., Hoshino, Y., Nonaka, K., Terada, Y., Kukita, T., Shi, S., and Yamaza, T. Immune therapeutic potential of stem cells from human supernumerary teeth. J Dent Res **92,** 609, 2013.
77. Weiss, M.L., Anderson, C., Medicetty, S., Seshareddy, K.B., Weiss, R.J., VanderWerff, I., Troyer, D., and McIntosh, K.R. Immune properties of human umbilical cord Wharton's jelly-derived cells. Stem Cells **26,** 2865, 2008.
78. Yoo, K.H., Jang, I.K., Lee, M.W., Kim, H.E., Yang, M.S., Eom, Y., Lee, J.E., Kim, Y.J., Yang, S.K., Jung, H.L., Sung, K.W., Kim, C.W., and Koo, H.H. Comparison of immunomodulatory properties of mesenchymal stem cells derived from adult human tissues. Cell Immunol **259,** 150, 2009.
79. Tipnis, S., Viswanathan, C., and Majumdar, A.S. Immunosuppressive properties of human umbilical cord-derived mesenchymal stem cells: role of B7-H1 and IDO. Immunol Cell Biol **88,** 795, 2010.
80. Manochantr, S., U-pratya, Y., Kheolamai, P., Rojphisan, S., Chayosumrit, M., Tantrawatpan, C., Supokawej, A., and Issaragrisil, S. Immunosuppressive properties of mesenchymal stromal cells derived from amnion, placenta, Wharton's jelly and umbilical cord. Intern Med J **43,** 430, 2013.
81. Franquesa, M., Hoogduijn, M.J., Bestard, O., and Grinyo, J.M. Immunomodulatory effect of mesenchymal stem cells on B cells. Front Immunol **3,** 212, 2012.
82. Ji, Y.R., Yang, Z.X., Han, Z.B., Meng, L., Liang, L., Feng, X.M., Yang, S.G., Chi, Y., Chen, D.D., Wang, Y.W., and Han, Z.C. Mesenchymal stem cells support proliferation and terminal differentiation of B cells. Cell Physiol Biochem **30,** 1526, 2012.
83. Corcione, A., Benvenuto, F., Ferretti, E., Giunti, D., Cappiello, V., Cazzanti, F., Risso, M., Gualandi, F., Mancardi, G.L., Pistoia, V., and Uccelli, A. Human mesenchymal stem cells modulate B-cell functions. Blood **107,** 367, 2006.
84. Che, N., Li, X., Zhou, S., Liu, R., Shi, D., Lu, L., and Sun, L. Umbilical cord mesenchymal stem cells suppress B-cell proliferation and differentiation. Cell Immunol **274,** 46, 2012.
85. Rasmusson, I., Le Blanc, K., Sundberg, B., and Ringden, O. Mesenchymal stem cells stimulate antibody secretion in human B cells. Scand J Immunol **65,** 336, 2007.
86. Traggiai, E., Volpi, S., Schena, F., Gattorno, M., Ferlito, F., Moretta, L., and Martini, A. Bone marrow-derived mesenchymal stem cells induce both polyclonal expansion and differentiation of B cells isolated from healthy donors and systemic lupus erythematosus patients. Stem Cells **26,** 562, 2008.
87. Vivier, E., Raulet, D.H., Moretta, A., Caligiuri, M.A., Zitvogel, L., Lanier, L.L., Yokoyama, W.M., and Ugolini, S. Innate or adaptive immunity? The example of natural killer cells. Science **331,** 44, 2011.
88. Boissel, L., Tuncer, H.H., Betancur, M., Wolfberg, A., and Klingemann, H. Umbilical cord mesenchymal stem cells increase expansion of cord blood natural killer cells. Biol Blood Marrow Transplant **14,** 1031, 2008.
89. Rasmusson, I., Ringden, O., Sundberg, B., and Le Blanc, K. Mesenchymal stem cells inhibit the formation of cytotoxic T lymphocytes, but not activated cytotoxic T lymphocytes or natural killer cells. Transplantation **76,** 1208, 2003.
90. Spaggiari, G.M., Capobianco, A., Becchetti, S., Mingari, M.C., and Moretta, L. 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,** 1484, 2006.

91. Shiroishi, M., Tsumoto, K., Amano, K., Shirakihara, Y., Colonna, M., Braud, V.M., Allan, D.S., Makadzange, A., Rowland-Jones, S., Willcox, B., Jones, E.Y., van der Merwe, P.A., Kumagai, I., and Maenaka, K. Human inhibitory receptors Ig-like transcript 2 (ILT2) and ILT4 compete with CD8 for MHC class I binding and bind preferentially to HLA-G. Proc Natl Acad Sci U S A **100,** 8856, 2003.
92. Favier, B., Lemaoult, J., Lesport, E., and Carosella, E.D. ILT2/HLA-G interaction impairs NK-cell functions through the inhibition of the late but not the early events of the NK-cell activating synapse. FASEB J **24,** 689, 2010.
93. Spaggiari, G.M., Capobianco, A., Abdelrazik, H., Becchetti, F., Mingari, M.C., and Moretta, L. Mesenchymal stem cells inhibit natural killer-cell proliferation, cytotoxicity, and cytokine production: role of indoleamine 2,3-dioxygenase and prostaglandin E2. Blood **111,** 1327, 2008.
94. Zhao, Y., Cao, D., and Chen, W. [Regulation of mesenchymal stem cells derived from umbilical cord on natural killer cells-mediated cytotoxicity against dendritic cells]. Nan Fang Yi Ke Da Xue Xue Bao **33,** 121, 2013.
95. Ribeiro, A., Laranjeira, P., Mendes, S., Velada, I., Leite, C., Andrade, P., Santos, F., Henriques, A., Graos, M., Cardoso, C.M., Martinho, A., Pais, M., da Silva, C., Cabral, J., Trindade, H., and Paiva, A. Mesenchymal stem cells from umbilical cord matrix, adipose tissue and bone marrow exhibit different capability to suppress peripheral blood B, natural killer and T cells. Stem Cell Res Ther **4,** 125, 2013.
96. Nauta, A.J., Kruisselbrink, A.B., Lurvink, E., Willemze, R., and Fibbe, W.E. Mesenchymal stem cells inhibit generation and function of both CD34+-derived and monocyte-derived dendritic cells. J Immunol **177,** 2080, 2006.
97. Spaggiari, G.M., Abdelrazik, H., Becchetti, F., and Moretta, L. 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,** 6576, 2009.
98. Beyth, S., Borovsky, Z., Mevorach, D., Liebergall, M., Gazit, Z., Aslan, H., Galun, E., and Rachmilewitz, J. Human mesenchymal stem cells alter antigen-presenting cell maturation and induce T-cell unresponsiveness. Blood **105,** 2214, 2005.
99. Saeidi, M., Masoud, A., Shakiba, Y., Hadjati, J., Mohyeddin Bonab, M., Nicknam, M.H., Latifpour, M., and Nikbin, B. Immunomodulatory effects of human umbilical cord Wharton's jelly-derived mesenchymal stem cells on differentiation, maturation and endocytosis of monocyte-derived dendritic cells. Iran J Allergy Asthma Immunol **12,** 37, 2013.
100. Vija, L., Farge, D., Gautier, J.F., Vexiau, P., Dumitrache, C., Bourgarit, A., Verrecchia, F., and Larghero, J. Mesenchymal stem cells: stem cell therapy perspectives for type 1 diabetes. Diabetes Metab **35,** 85, 2009.
101. Hass, R., and Otte, A. Mesenchymal stem cells as all-round supporters in a normal and neoplastic microenvironment. Cell Commun Signal **10,** 13, 2012.
102. Casiraghi, F., Noris, M., and Remuzzi, G. Immunomodulatory effects of mesenchymal stromal cells in solid organ transplantation. Curr Opin Organ Transplant **15**, 731, 2010.
103. Ghannam, S., Bouffi, C., Djouad, F., Jorgensen, C., and Noel, D. Immunosuppression by mesenchymal stem cells: mechanisms and clinical applications. Stem Cell Res Ther **1,** 2, 2010.
104. Meisel, R., Zibert, A., Laryea, M., Gobel, U., Daubener, W., and Dilloo, D. Human bone marrow stromal cells inhibit allogeneic T-cell responses by indoleamine 2,3-dioxygenase-mediated tryptophan degradation. Blood **103,** 4619, 2004.
105. Prasanna, S.J., and Jahnavi, V.S. Wharton's jelly mesenchymal stem cells as off-the-shelf cellular therapeutics: a closer look into their regenerative and immunomodulatory properties. Open Tissue Eng Regen Med J **4,** 28, 2011.
106. Than, N.G., Romero, R., Erez, O., Weckle, A., Tarca, A.L., Hotra, J., Abbas, A., Han, Y.M., Kim, S.S., Kusanovic, J.P., Gotsch, F., Hou, Z., Santolaya-Forgas, J., Benirschke, K., Papp, Z., Grossman, L.I., Goodman, M., and Wildman, D.E. Emergence of hormonal and redox regulation of galectin-1 in placental mammals: implication in maternal-fetal immune tolerance. Proc Natl Acad Sci U S A **105,** 15819, 2008.
107. Carosella, E.D., Moreau, P., Le Maoult, J., Le Discorde, M., Dausset, J., and Rouas-Freiss, N. HLA-G molecules: from maternal-fetal tolerance to tissue acceptance. Adv Immunol **81,** 199, 2003.
108. Vogiagis, D., and Salamonsen, L.A. Review: the role of leukaemia inhibitory factor in the establishment of pregnancy. J Endocrinol **160,** 181, 1999.
109. Najar, M., Raicevic, G., Boufker, H.I., Fayyad-Kazan, H., De Bruyn, C., Meuleman, N., Bron, D., Toungouz, M., and Lagneaux, L. Adipose-tissue-derived and Wharton's jelly-derived mesenchymal stromal cells suppress lymphocyte responses by secreting leukemia inhibitory factor. Tissue Eng Part A **16,** 3537, 2010.
110. Prasanna, S.J., Gopalakrishnan, D., Shankar, S.R., and Vasandan, A.B. Pro-inflammatory cytokines, IFNgamma and TNFalpha, influence immune properties of human bone marrow and Wharton jelly mesenchymal stem cells differentially. PLoS One **5,** e9016, 2010.
111. Selmani, Z., Naji, A., Gaiffe, E., Obert, L., Tiberghien, P., Rouas-Freiss, N., Carosella, E.D., and Deschaseaux, F. HLA-G is a crucial immunosuppressive molecule secreted by adult human mesenchymal stem cells. Transplantation **87,** S62, 2009.
112. Lee, J.M., Jung, J., Lee, H.J., Jeong, S.J., Cho, K.J., Hwang, S.G., and Kim, G.J. Comparison of immunomodulatory effects of placenta mesenchymal stem cells with bone marrow and adipose mesenchymal stem cells. Int Immunopharmacol **13,** 219, 2012.
113. Selmani, Z., Naji, A., Zidi, I., Favier, B., Gaiffe, E., Obert, L., Borg, C., Saas, P., Tiberghien, P., Rouas-Freiss, N., Carosella, E.D., and Deschaseaux, F. Human leukocyte antigen-G5 secretion by human mesenchymal stem cells is required to suppress T lymphocyte and natural killer function and to induce CD4+CD25highFOXP3+ regulatory T cells. Stem Cells **26,** 212, 2008.
114. La Rocca, G., Corrao, S., Lo Iacono, M., Corsello, T., Farina, F., and Anzalone, R. Novel immunomodulatory makers expressed by human WJ-MSC: and updated review in regenerative and reparative medicine. Open Tissue Eng Regen Med J **5,** 50, 2012.
115. Marquez-Curtis, L.A., and Janowska-Wieczorek, A. Enhancing the migration ability of mesenchymal stromal

cells by targeting the SDF-1/CXCR4 Axis. Biomed Res Int **2013,** 15, 2013.
116. Balasubramanian, S., Venugopal, P., Sundarraj, S., Zakaria, Z., Majumdar, A.S., and Ta, M. Comparison of chemokine and receptor gene expression between Wharton's jelly and bone marrow-derived mesenchymal stromal cells. Cytotherapy **14,** 26, 2012.
117. Sohni, A., and Verfaillie, C.M. Mesenchymal stem cells migration homing and tracking. Stem Cells Int **2013,** 130763, 2013.
118. Ries, C., Egea, V., Karow, M., Kolb, H., Jochum, M., and Neth, P. MMP-2, MT1-MMP, and TIMP-2 are essential for the invasive capacity of human mesenchymal stem cells: differential regulation by inflammatory cytokines. Blood **109,** 4055, 2007.
119. Chute, J.P. Stem cell homing. Curr Opin Hematol **13,** 399, 2006.
120. Nourshargh, S., and Marelli-Berg, F.M. Transmigration through venular walls: a key regulator of leukocyte phenotype and function. Trends Immunol **26,** 157, 2005.
121. Mishima, Y., and Lotz, M. Chemotaxis of human articular chondrocytes and mesenchymal stem cells. J Orthop Res **26,** 1407, 2008.
122. Chamberlain, G., Fox, J., Ashton, B., and Middleton, J. Concise review: mesenchymal stem cells: their phenotype, differentiation capacity, immunological features, and potential for homing. Stem Cells **25,** 2739, 2007.
123. Kalluri, R. Basement membranes: structure, assembly and role in tumour angiogenesis. Nat Rev Cancer **3,** 422, 2003.
124. Birkedal-Hansen, H., Moore, W.G., Bodden, M.K., Windsor, L.J., Birkedal-Hansen, B., DeCarlo, A., and Engler, J.A. Matrix metalloproteinases: a review. Crit Rev Oral Biol Med **4,** 197, 1993.
125. Mandal, M., Mandal, A., Das, S., Chakraborti, T., and Sajal, C. Clinical implications of matrix metalloproteinases. Mol Cell Biochem **252,** 305, 2003.
126. Lipari, L., Mauro, A., Tortorici, S., Burruano, F., Leone, A., Spatola, G.F., Gerbino, A., Buscemi, M., and Tete, S. Immunohistochemical and transcriptional expression of the matrix metalloproteinases MMP-2 and MMP-9 in normal and pathological human oral mucosa. J Biol Regul Homeost Agents **23,** 259, 2009.
127. Schneider, R.K., Puellen, A., Kramann, R., Raupach, K., Bornemann, J., Knuechel, R., Perez-Bouza, A., and Neuss, S. The osteogenic differentiation of adult bone marrow and perinatal umbilical mesenchymal stem cells and matrix remodelling in three-dimensional collagen scaffolds. Biomaterials **31,** 467, 2010.
128. Mauro, A., Buscemi, M., and Gerbino, A. Immunohistochemical and transcriptional expression of matrix metalloproteinases in full-term human umbilical cord and human umbilical vein endothelial cells. J Mol Histol **41,** 367, 2010.
129. Stagg, J. Mesenchymal stem cells in cancer. Stem Cell Rev **4,** 119, 2008.
130. Ljujic, B., Milovanovic, M., Volarevic, V., Murray, B., Bugarski, D., Przyborski, S., Arsenijevic, N., Lukic, M.L., and Stojkovic, M. Human mesenchymal stem cells creating an immunosuppressive environment and promote breast cancer in mice. Sci Rep **3,** 2298, 2013.
131. Torsvik, A., and Bjerkvig, R. Mesenchymal stem cell signaling in cancer progression. Cancer Treat Rev **39,** 180, 2013.
132. Mandel, K., Yang, Y., Schambach, A., Glage, S., Otte, A., and Hass, R. Mesenchymal stem cells (MSC) directly interact with breast cancer cells and promote tumor cell growth *in vitro* and *in vivo*. Stem Cells Dev **22,** 3114, 2013.
133. Studeny, M., Marini, F.C., Champlin, R.E., Zompetta, C., Fidler, I.J., and Andreeff, M. Bone marrow-derived mesenchymal stem cells as vehicles for interferon-beta delivery into tumors. Cancer Res **62,** 3603, 2002.
134. Studeny, M., Marini, F.C., Dembinski, J.L., Zompetta, C., Cabreira-Hansen, M., Bekele, B.N., Champlin, R.E., and Andreeff, M. Mesenchymal stem cells: potential precursors for tumor stroma and targeted-delivery vehicles for anticancer agents. J Natl Cancer Inst **96,** 1593, 2004.
135. Mishra, P.J., Humeniuk, R., Medina, D.J., Alexe, G., Mesirov, J.P., Ganesan, S., Glod, J.W., and Banerjee, D. Carcinoma-associated fibroblast-like differentiation of human mesenchymal stem cells. Cancer Res **68,** 4331, 2008.
136. Spaeth, E.L., Dembinski, J.L., Sasser, A.K., Watson, K., Klopp, A., Hall, B., Andreeff, M., and Marini, F. Mesenchymal stem cell transition to tumor-associated fibroblasts contributes to fibrovascular network expansion and tumor progression. PLoS One **4,** e4992, 2009.
137. Shinagawa, K., Kitadai, Y., Tanaka, M., Sumida, T., Kodama, M., Higashi, Y., Tanaka, S., Yasui, W., and Chayama, K. Mesenchymal stem cells enhance growth and metastasis of colon cancer. Int J Cancer **127,** 2323, 2010.
138. Patel, S.A., Meyer, J.R., Greco, S.J., Corcoran, K.E., Bryan, M., and Rameshwar, P. Mesenchymal stem cells protect breast cancer cells through regulatory T cells: role of mesenchymal stem cell-derived TGF-beta. J Immunol **184,** 5885, 2010.
139. Amariglio, N., Hirshberg, A., Scheithauer, B.W., Cohen, Y., Loewenthal, R., Trakhtenbrot, L., Paz, N., Koren-Michowitz, M., Waldman, D., Leider-Trejo, L., Toren, A., Constantini, S., and Rechavi, G. Donor-derived brain tumor following neural stem cell transplantation in an ataxia telangiectasia patient. PLoS Med **6,** e1000029, 2009.
140. Zhang, T., Lee, Y.W., Rui, Y.F., Cheng, T.Y., Jiang, X.H., and Li, G. Bone marrow-derived mesenchymal stem cells promote growth and angiogenesis of breast and prostate tumors. Stem Cell Res Ther **4,** 70, 2013.
141. Luo, J., Ok Lee, S., Liang, L., Huang, C.K., Li, L., Wen, S., and Chang, C. Infiltrating bone marrow mesenchymal stem cells increase prostate cancer stem cell population and metastatic ability via secreting cytokines to suppress androgen receptor signaling. Oncogene 2013 [Epub ahead of print]; DOI: 10.1038/onc.2013.233.
142. Karnoub, A.E., Dash, A.B., Vo, A.P., Sullivan, A., Brooks, M.W., Bell, G.W., Richardson, A.L., Polyak, K., Tubo, R., and Weinberg, R.A. Mesenchymal stem cells within tumour stroma promote breast cancer metastasis. Nature **449,** 557, 2007.
143. Ferrand, J., Noel, D., Lehours, P., Prochazkova-Carlotti, M., Chambonnier, L., Menard, A., Megraud, F., and Varon, C. Human bone marrow-derived stem cells acquire epithelial characteristics through fusion with gastrointestinal epithelial cells. PLoS One **6,** e19569, 2011.
144. Akimoto, K., Kimura, K., Nagano, M., Takano, S., To'a Salazar, G., Yamashita, T., and Ohneda, O. Umbilical cord blood-derived mesenchymal stem cells inhibit, but adipose tissue-derived mesenchymal stem cells promote,

glioblastoma multiforme proliferation. Stem Cells Dev **22,** 1370, 2013.
145. Kim, D.W., Staples, M., Shinozuka, K., Pantcheva, P., Kang, S.D., and Borlongan, C.V. Wharton's jelly-derived mesenchymal stem cells: phenotypic characterization and optimizing their therapeutic potential for clinical applications. Int J Mol Sci **14,** 11692, 2013.
146. Rachakatla, R.S., Marini, F., Weiss, M.L., Tamura, M., and Troyer, D. Development of human umbilical cord matrix stem cell-based gene therapy for experimental lung tumors. Cancer Gene Ther **14,** 828, 2007.
147. Sun, B., Yu, K.R., Bhandari, D.R., Jung, J.W., Kang, S.K., and Kang, K.S. Human umbilical cord blood mesenchymal stem cell-derived extracellular matrix prohibits metastatic cancer cell MDA-MB-231 proliferation. Cancer Lett **296,** 178, 2010.
148. Chao, K.C., Yang, H.T., and Chen, M.W. Human umbilical cord mesenchymal stem cells suppress breast cancer tumourigenesis through direct cell-cell contact and internalization. J Cell Mol Med **16,** 1803, 2011.
149. Ma, Y., Hao, X., Zhang, S., and Zhang, J. The *in vitro* and *in vivo* effects of human umbilical cord mesenchymal stem cells on the growth of breast cancer cells. Breast Cancer Res Treat **133,** 473, 2012.
150. Ayuzawa, R., Doi, C., Rachakatla, R.S., Pyle, M.M., Maurya, D.K., Troyer, D., and Tamura, M. Naive human umbilical cord matrix derived stem cells significantly attenuate growth of human breast cancer cells *in vitro* and *in vivo*. Cancer Lett **280,** 31, 2009.
151. Fan, C.G., Zhang, Q.J., and Zhou, J.R. Therapeutic potentials of mesenchymal stem cells derived from human umbilical cord. Stem Cell Rev **7,** 195, 2011.
152. Gauthaman, K., Yee, F.C., Cheyyatraivendran, S., Biswas, A., Choolani, M., and Bongso, A. Human umbilical cord Wharton's jelly stem cell (hWJSC) extracts inhibit cancer cell growth *in vitro*. J Cell Biochem **113,** 2027, 2012.
153. Gauthaman, K., Fong, C.Y., Arularasu, S., Subramanian, A., Biswas, A., Choolani, M., and Bongso, A. Human Wharton's Jelly stem cell conditioned medium and cell-free lysate inhibit human osteosarcoma and mammary carcinoma cell growth *in vitro* and in xenograft mice. J Cell Biochem **114,** 366, 2013.
154. Gauthaman, K., Fong, C.Y., Suganya, C.A., Subramanian, A., Biswas, A., Choolani, M., and Bongso, A. Extra-embryonic human Wharton's jelly stem cells do not induce tumorigenesis, unlike human embryonic stem cells. Reprod Biomed Online **24,** 235, 2012.
155. Liu, J., Han, G., Liu, H., and Qin, C. Correction: suppression of cholangiocarcinoma cell growth by human umbilical cord mesenchymal stem cells: a possible role of Wnt and Akt signaling. PLoS One 8: e6244, doi 10.1371/journal.pone.0062844.
156. Tian, K., Yang, S., Ren, Q., Han, Z., Lu, S., Ma, F., and Zhang, L. p38 MAPK contributes to the growth inhibition of leukemic tumor cells mediated by human umbilical cord mesenchymal stem cells. Cell Physiol Biochem **26,** 799, 2010.
157. Anzalone, R., Lo Iacono, M., Loria, T., Di Stefano, A., Giannuzzi, P., Farina, F., and La Rocca, G. Wharton's jelly mesenchymal stem cells as candidates for beta cells regeneration: extending the differentiative and immunomodulatory benefits of adult mesenchymal stem cells for the treatment of type 1 diabetes. Stem Cell Rev **7,** 342, 2011.
158. Hu, J., Yu, X., Wang, Z., Wang, F., Wang, L., Gao, H., Chen, Y., Zhao, W., Jia, Z., Yan, S., and Wang, Y. Long term effects of the implantation of Wharton's jelly-derived mesenchymal stem cells from the umbilical cord for newly-onset type 1 diabetes mellitus. Endocr J **60,** 347, 2013.
159. Chao, K.C., Chao, K.F., Fu, Y.S., and Liu, S.H. Islet-like clusters derived from mesenchymal stem cells in Wharton's Jelly of the human umbilical cord for transplantation to control type 1 diabetes. PLoS One **3,** e1451, 2008.
160. Kim, S.J., Choi, Y.S., Ko, E.S., Lim, S.M., Lee, C.W., and Kim, D.I. Glucose-stimulated insulin secretion of various mesenchymal stem cells after insulin-producing cell differentiation. J Biosci Bioeng **113,** 771, 2012.
161. Hu, J., Wang, F., Sun, R., Wang, Z., Yu, X., Wang, L., Gao, H., Zhao, W., Yan, S., and Wang, Y. Effect of combined therapy of human Wharton's jelly-derived mesenchymal stem cells from umbilical cord with sitagliptin in type 2 diabetic rats. Endocrine **45,** 279, 2014.
162. Molendijk, I., Duijvestein, M., van der Meulen-de Jong, A.E., van Deen, W.K., Swets, M., Hommes, D.W., and Verspaget, H.W. Immunomodulatory effects of mesenchymal stromal cells in Crohn's disease. J Allergy (Cairo) **2012,** 187408, 2012.
163. Garcia-Olmo, D., Herreros, D., Pascual, M., Pascual, I., De-La-Quintana, P., Trebol, J., and Garcia-Arranz, M. Treatment of enterocutaneous fistula in Crohn's disease with adipose-derived stem cells: a comparison of protocols with and without cell expansion. Int J Colorectal Dis **24,** 27, 2009.
164. Ciccocioppo, R., Bernardo, M.E., Sgarella, A., Maccario, R., Avanzini, M.A., Ubezio, C., Minelli, A., Alvisi, C., Vanoli, A., Calliada, F., Dionigi, P., Perotti, C., Locatelli, F., and Corazza, G.R. Autologous bone marrow-derived mesenchymal stromal cells in the treatment of fistulising Crohn's disease. Gut **60,** 788, 2011.
165. Banerjee, R., Balaji, M., Sasikala, M., Anuradha, S., Rao, G.V., and Reddy, D.N. Granulomas of intestinal tuberculosis and Crohn's disease can be differentiated by CD73 cell surface marker expression: a pilot study. Dig Dis Sci **58,** 2301, 2013.
166. Vernier, P., Moret, F., Callier, S., Snapyan, M., Wersinger, C., and Sidhu, A. The degeneration of dopamine neurons in Parkinson's disease: insights from embryology and evolution of the mesostriatocortical system. Ann N Y Acad Sci **1035,** 231, 2004.
167. Yan, M., Sun, M., Zhou, Y., Wang, W., He, Z., Tang, D., Lu, S., Wang, X., Li, S., and Li, H. Conversion of human umbilical cord mesenchymal stem cells in Wharton's jelly to dopamine neurons mediated by the Lmx1a and neurturin in vitro: potential therapeutic application for Parkinson's disease in a rhesus monkey model. PLoS One **8,** e64000, 2013.
168. Ribeiro, C.A., Fraga, J.S., Graos, M., Neves, N.M., Reis, R.L., Gimble, J.M., Sousa, N., and Salgado, A.J. The secretome of stem cells isolated from the adipose tissue and Wharton jelly acts differently on central nervous system derived cell populations. Stem Cell Res Ther **3,** 18, 2012.
169. Zhou, Y., Sun, M., Li, H., Yan, M., He, Z., Wang, W., and Lu, S. Recovery of behavioral symptoms in hemiparkinsonian rhesus monkeys through combined gene and stem cell therapy. Cytotherapy **15,** 467, 2013.
170. Ye, M., Wang, X.J., Zhang, Y.H., Lu, G.Q., Liang, L., Xu, J.Y., and Chen, S.D. Transplantation of bone marrow

stromal cells containing the neurturin gene in rat model of Parkinson's disease. Brain Res **1142,** 206, 2007.
171. Auletta, J.J., Bartholomew, A.M., Maziarz, R.T., Deans, R.J., Miller, R.H., Lazarus, H.M., and Cohen, J.A. The potential of mesenchymal stromal cells as a novel cellular therapy for multiple sclerosis. Immunotherapy **4,** 529, 2012.
172. Payne, N.L., Sun, G., McDonald, C., Layton, D., Moussa, L., Emerson-Webber, A., Veron, N., Siatskas, C., Herszfeld, D., Price, J., and Bernard, C.C. Distinct immunomodulatory and migratory mechanisms underpin the therapeutic potential of human mesenchymal stem cells in autoimmune demyelination. Cell Transplant **22,** 1409, 2013.
173. Zhang, J., Li, Y., Chen, J., Cui, Y., Lu, M., Elias, S.B., Mitchell, J.B., Hammill, L., Vanguri, P., and Chopp, M. Human bone marrow stromal cell treatment improves neurological functional recovery in EAE mice. Exp Neurol **195,** 16, 2005.
174. Zhang, J., Brodie, C., Li, Y., Zheng, X., Roberts, C., Lu, M., Gao, Q., Borneman, J., Savant-Bhonsale, S., Elias, S.B., and Chopp, M. Bone marrow stromal cell therapy reduces proNGF and p75 expression in mice with experimental autoimmune encephalomyelitis. J Neurol Sci **279,** 30, 2009.
175. Ryu, C.H., Park, K.Y., Hou, Y., Jeong, C.H., Kim, S.M., and Jeun, S.S. Gene therapy of multiple sclerosis using interferon beta -secreting human bone marrow mesenchymal stem cells. Biomed Res Int **2013,** 696738, 2013.
176. Liu, R., Zhang, Z., Lu, Z., Borlongan, C., Pan, J., Chen, J., Qian, L., Liu, Z., Zhu, L., Zhang, J., and Xu, Y. Human umbilical cord stem cells ameliorate experimental autoimmune encephalomyelitis by regulating immunoinflammation and remyelination. Stem Cells Dev **22,** 1053, 2013.
177. Liang, J., Zhang, H., Hua, B., Wang, H., Wang, J., Han, Z., and Sun, L. Allogeneic mesenchymal stem cells transplantation in treatment of multiple sclerosis. Mult Scler **15,** 644, 2009.
178. Liang, J., Wu, S., Zhao, H., Li, S.L., Liu, Z.X., Wu, J., and Zhou, L. Human umbilical cord mesenchymal stem cells derived from Wharton's jelly differentiate into cholinergic-like neurons *in vitro*. Neurosci Lett **532,** 59, 2013.
179. Katsuda, T., Tsuchiya, R., Kosaka, N., Yoshioka, Y., Takagaki, K., Oki, K., Takeshita, F., Sakai, Y., Kuroda, M., and Ochiya, T. Human adipose tissue-derived mesenchymal stem cells secrete functional neprilysin-bound exosomes. Sci Rep **3,** 1197, 2013.
180. Yang, H., Xie, Z., Wei, L., Yang, S., Zhu, Z., Wang, P., Zhao, C., and Bi, J. Human umbilical cord mesenchymal stem cell-derived neuron-like cells rescue memory deficits and reduce amyloid-beta deposition in an AbetaPP/PS1 transgenic mouse model. Stem Cell Res Ther **4,** 76, 2013.

Address correspondence to:
Veronique Decot, PharmD, PhD
CNRS UMR UL 7365
Bâtiment Biopôle
Faculté de médecine
9 Ave. de la Forêt de Haye
54500 Vandœuvre-lès-Nancy
France

E-mail: v.decot@chu-nancy.f

Received: October 24, 2013
Accepted: February 4, 2014
Online Publication Date: April 21, 2014

Chapitre 4: Grands Principes de l'Immunobiologie et Principaux Mécanismes Régulateurs des CSM

Outre les fonctions réparatrices des CSM, plusieurs études ont montré qu'elles possèdent des propriétés immunomodulatrices puissantes, à la fois de l'immunité innée et de l'immunité adaptative (169–173).

Pour faciliter la compréhension des effets immunomodulateurs des CSM, les grands principes de l'immunobiologie sont tout d'abord exposés dans la partie suivante.

I. L'IMMUNITE

L'immunité est définie comme étant la résistance aux maladies et, plus particulièrement aux maladies infectieuses. Le système immunitaire est un système de défense remarquablement adaptatif protégeant des pathogènes aussi variés que, les bactéries, les virus, les parasites et les champignons. Il est constitué d'une grande variété de cellules et de molécules composant un réseau dynamique capable de reconnaître spécifiquement et d'éliminer un grand nombre de micro-organismes étrangers ; la réaction coordonnée de ces cellules et molécules contre les germes pathogènes porte le nom de réponse immunitaire (174).

La reconnaissance immunitaire consiste à distinguer les composants étrangers de ceux du Soi. En effet, le système immunitaire se caractérise par sa capacité remarquable à :

- reconnaître des profils moléculaires qui caractérisent des groupes de pathogènes présentant des caractéristiques connues et fournir une réponse rapide dirigée contre ces pathogènes,
- détecter les fines différences chimiques distinguant un pathogène d'un autre,
- distinguer les molécules étrangères et les cellules ou les protéines de l'organisme (discrimination Soi/non Soi) (175).

Dans certains cas pathologiques, ce système peut devenir défaillant et devient alors délétère pour l'organisme en s'attaquant aux constituants du Soi induisant alors des maladies auto-immunes.

La réponse effectrice éliminant ou neutralisant l'organisme étranger survient après la phase de reconnaissance de ce pathogène et dans laquelle les divers constituants du système immunitaire interviennent pour induire différentes réponses, chacune étant conçue spécifiquement pour éliminer un type particulier de pathogène. Une exposition ultérieure au même organisme étranger peut induire une réponse mémoire, caractérisée par une réaction immunitaire plus précoce et plus intense prévenant ainsi les infections. A mentionner que le principe de cette réponse mémoire est à la base de la vaccination (174).

Il est important de distinguer l'immunité « innée » de l'immunité « adaptative », deux systèmes de l'immunité qui ne cessent de collaborer pour protéger l'organisme. Avant de détailler ces deux types d'immunité, commençons par définir le complexe majeur d'histocompatibilité et de montrer le rôle majeur qu'il joue dans l'immunité.

A. Rappel sur le Complexe Majeur d'Histocompatibilité (CMH)

a) Le locus génétique

Le Complexe majeur d'Histocompatibilité (CMH) joue un rôle primordial dans l'immunité. Il se compose de plusieurs systèmes dont le système « Human Leukocyte Antigen » (HLA) découvert en 1958 par Jean Dausset qui a démontré sa capacité à induire le rejet de greffe allogénique (176). La région génomique du système HLA se situe sur le bras court du chromosome 6 (bande 6p21.3) et est formée de 3600 kilobases. Elle porte plus de 200 gènes codant pour des produits très divers, ce qui rend cette région la plus riche en gènes exprimés.

Le CMH est constitué de trois régions. Les produits codés par les gènes de ces trois régions sont très différents au niveau de leur localisation, structure et fonction :

- La région la plus télomérique dite de **classe I** : est composée de gènes « classiques » qui sont les gènes HLA-A, B et C, et des gènes « non-classiques » représentés par HLA-E, F et G, MICA et MICB, ainsi que d'autres gènes dont la fonction est toujours inconnue.

- La région la plus centromérique ou région de **classe II** : contenant les gènes HLA-DR, DQ et DP, et d'autres gènes participant à la présentation des antigènes.
- La région intermédiaire nommée région de **classe III** : c'est une région particulière ne contenant pas de gènes qui codent pour les molécules du système HLA mais contient plutôt des gènes codant pour des produits intervenant dans la réponse immunitaire tels que des éléments du complément, des molécules d'inflammation (TNFα et β) et des protéines du choc thermique (HSP70) (177).

Les gènes HLA sont co-dominants et sont transmis généralement en bloc avec un taux de recombinaisons rare. Ainsi, chaque individu hérite un haplotype maternel et un autre paternel, et les molécules codées par chaque haplotype sont coexprimées à la surface cellulaire. Ces gènes sont aussi fortement polyalléliques, ce qui rend la région HLA la région la plus polymorphique du génome humain.

b) Fonctions des molécules HLA

La fonction principale des molécules HLA est de fixer des peptides antigéniques et de les présenter aux lymphocytes T. Selon la classe des molécules HLA, varie la nature des peptides présentés, leur trajet intracellulaire avant leur association à ces molécules, et le type de lymphocytes T auxquels ils seront présentés (177).

La quasi-totalité des cellules nucléées expriment les molécules HLA-I à leur surface, avec une expression plus importante par les lymphocytes T et B, les macrophages et les cellules dendritiques. Ces molécules ont comme fonction de présenter aux lymphocytes T CD8 des peptides dérivant de la dégradation de protéines endogènes synthétisées par la cellule.

L'expression des molécules HLA de classe II est plus restreinte limitée aux cellules présentatrices d'antigènes (CPA) (macrophages, monocytes, cellules dendritiques, lymphocytes B, +/- lymphocytes T activés). Ces molécules sont reconnues par les lymphocytes T CD4 et présentent des peptides antigéniques résultant de la dégradation de protéines exogènes ou de protéines sécrétées ou membranaires (177).

B. L'immunité innée

L'Immunité innée est une réponse immédiate qui survient chez tout individu en l'absence d'immunisation préalable ; elle constitue la première barrière de défense vis-à-vis de divers agents pathogènes et assure un rôle de sentinelle vis-à-vis de l'apparition des tumeurs.

En premier abord, le système immunitaire utilise ses barrières physiques :

- La peau et la surface des muqueuses constituant des barrières efficaces contre l'entrée de la plupart des microorganismes,
- l'acidité de l'estomac et de la transpiration empêchant le développement des organismes ne pouvant pas se développer dans des conditions acides,
- les enzymes (tel que le lysozyme) altérant la paroi cellulaire de certaines bactéries.

Au-delà de ces premières barrières, l'immunité innée est en grande partie assurée par les anticorps préformés, encore appelés naturels, par des cellules phagocytaires (monocytes, polynucléaires) et par les cellules Natural Killer (NK) qui ne possèdent pas de récepteurs spécifiques de l'antigène. Parmi ces différents acteurs de l'immunité innée, on traitera d'une manière plus détaillée les cellules NK et leurs mécanismes d'actions puisque l'effet des cellules différenciées sur cette population a été étudié dans notre étude.

a) Cellules NK

Les cellules NK sont les cellules effectrices les plus importantes de la réponse innée représentant 5-20% des cellules mononucléées (CMN) du sang périphérique mais cette proportion peut représenter jusqu'à 30-50% de l'ensemble des lymphocytes dans le foie (178). Ces cellules sont identifiées par leur absence d'expression du CD3, et par l'expression du CD56 (N-CAM) et CD16 (FcγRIIIa) mais peuvent être davantage classées en trois sous-populations : NK $CD16^{+}CD56^{dim}$ représentant 90% des cellules NK, NK $CD16^{-}CD56^{bright}$ 10% et NK $CD16^{+}56^{-}$ 1-3%. Les NK $CD16^{-}CD56^{bright}$ expriment CD117 (récepteur exprimé par les cellules progénitrices) contrairement à la population $CD16^{+}CD56^{dim}$ qui exprime le CD57 (exprimé par les cellules sénescentes) (179–181). Concernant la population minoritaire NK $CD16^{+}56^{-}$, sa fréquence augmente dans certains cas d'infections chroniques comme le VIH (182).

b) Récepteurs inhibiteurs et activateurs des cellules NK

Les fonctions des cellules NK sont médiées par un équilibre entre des signaux transmis par les récepteurs activateurs et inhibiteurs exprimés à la surface des cellules NK.

Parmi les récepteurs inhibiteurs, peuvent être cités certains « killer imunoglobulin-like receptors » (KIR), CD161 et CD94-NKG2A (NKG2D : *natural killer group 2 membrane D*). Les ligands des KIR sont des molécules classiques du CMH de classe I (HLA-A, B et C) exprimées par la grande majorité des cellules du corps. Plus d'une dizaine de KIR existent et chaque individu peut avoir entre 9 et 14 dans son génome (183,184). Le ligand du récepteur CD161 est le « lectin-like transcript I ». Le CD94-NKG2A, un autre important récepteur inhibiteur, est hétérodimérique reconnaissant les molécules non-classiques de classe I (HLA-E) (185,186).

Parmi les principaux récepteurs activateurs exprimés par les cellules NK, peuvent être cités NKG2D, le CD16, les KIR activateurs et les récepteurs de cytotoxicité naturelle (NCR, natural cytotoxicity receptors) composés de NKp30, NKp44 et NKp46. Les ligands de NKG2D, MICA/B (major histocompatibility complex class I chain-related gene A and gene B) et ULBP1-4 (UL16 binding protein), sont plutôt induits dans des conditions pathologiques telles qu'une infection virale ou une tumeur (187). Le CD16 a comme ligand la région Fc des immunoglobulines. La figure 20 montre les principaux récepteurs activateurs et inhibiteurs des cellules NK ainsi que leurs ligands.

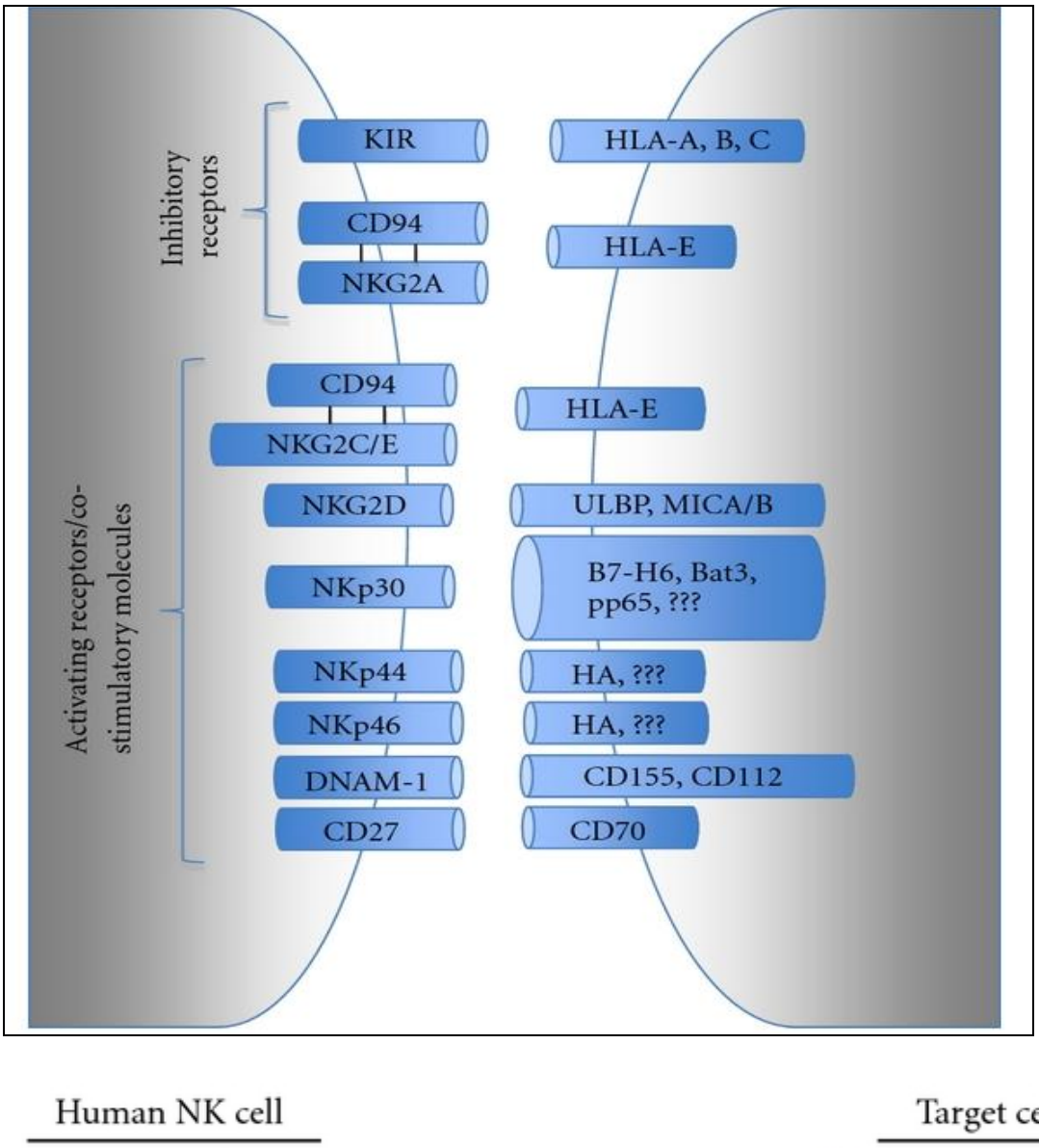


Figure 20. Récepteurs inhibiteurs et activateurs des cellules NK et leurs ligands. L'activation des cellules NK est médiée par une variété de récepteurs membranaires activateurs et inhibiteurs reconnaissant des ligands exprimés par les cellules cibles. Une infection virale, une transformation maligne ou un stress cellulaire induisent une diminution de l'expression des ligands des récepteurs inhibiteurs et augmentent l'expression de ceux des récepteurs activateurs. Malgré la présence de signaux activateurs et inhibiteurs sur les cellules cibles, c'est la prédominance de l'un ou l'autre des deux signaux qui permettra l'activation ou non des cellules NK **(188).**

c) Médiateurs sécrétés par les cellules NK

Plusieurs cytokines et chimiokines sont secrétées par les cellules NK, tels que l'INF-γ (interféron γ), TNF-α, GM-CSF (granulocyte-macrophage colony-stimulating factor)… Ces cytokines, et plus particulièrement l'INF-γ, possèdent des propriétés anti-tumorales et anti-

virales (189). L'INF-γ peut aussi réguler les réponses immunitaires innée et adaptative à travers les CD et les lymphocytes T. Les cellules NK $CD16^{-}CD56^{bright}$ sont connues pour leur capacité de sécréter de grandes quantités de cytokines (190), mais des études récentes ont démontré que la population NK $CD16^{+}CD56^{dim}$ peut produire aussi des cytokines après la liaison de ligands aux récepteurs activateurs à la surface de ces cellules (191,192). La production de cytokines par les cellules NK peut être déclenchée par plusieurs signaux tels que les interleukines-2 (pouvant être secrétée par les lymphocytes T et les CD), -12, -15 ou -18 (pouvant être secrétées par les macrophages, les monocytes et les CD), ou par la stimulation de récepteurs activateurs comme le CD16, le NKG2D et les NCR (193). Autre que la production de cytokines, les cellules NK sont caractérisées par leur capacité de lyser les cellules cibles grâce à la libération par dégranulation des perforines et des granzymes (194) qui vont perforer la cellule et déclencher l'apoptose ou *via* la liaison des récepteurs de mort cellulaire avec leurs ligands tels que le TRAIL (TNF-related apoptosis-inducing ligand) et le FAS-L (apoptosis stimulating factor) (figure 21).

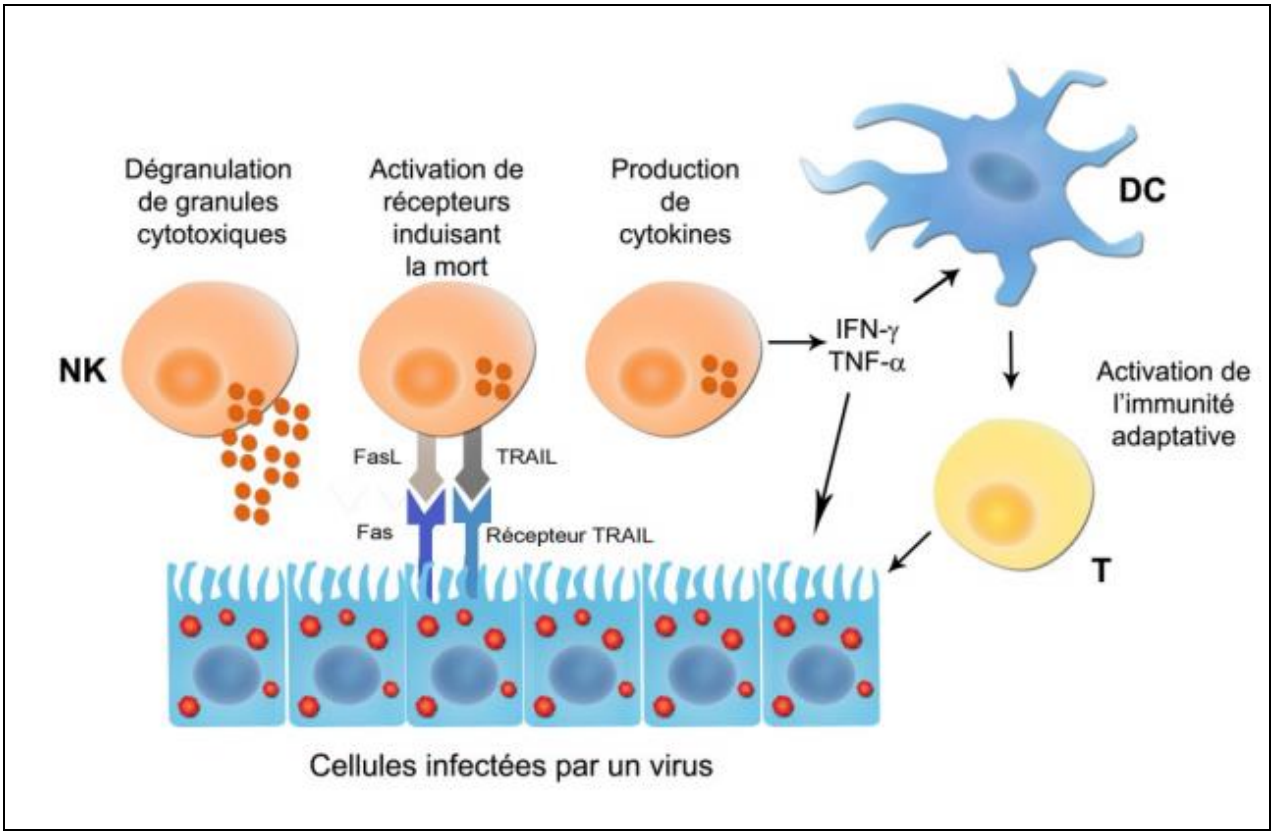


Figure 21. Production de cytokines et lyse induites par les cellules NK. Les cellules NK peuvent secréter des cytokines activant la maturation des CD et contribuant au développement de la réponse immunitaire adaptative. Ces cellules peuvent aussi lyser les cellules infectées ou tumorales *via* des récepteurs induisant la mort cellulaire ou par libération de granules cytotoxiques **(195)**.

d) Mécanismes de cytotoxicité

La lyse des cellules cibles par les cellules NK peut être :

- dépendante des anticorps ou ADCC (antibody-dependant cellular cytotoxicity) : elle est médiée par la population $CD16^{+}CD56^{dim}$ et implique le CD16. Ce récepteur a comme ligand la région constante Fc des immunoglobulines recouvrant la surface des cellules tumorales ou infectées. Lorsque le CD16 est engagé, les cellules NK sont alors activées et libèrent des perforines et granzymes lysant les cellules cibles ;
- indépendante des anticorps et ne nécessitant aucune stimulation préalable. C'est l'équilibre entre les signaux activateurs et inhibiteurs qui permettra aux cellules NK de lyser une cellule infectée ou non. Pour que la lyse soit induite, il doit y avoir une absence d'inhibition, une présence d'activation ou une éducation. Les cellules NK expriment au moins un récepteur inhibiteur reconnaissant le CMH-I qui est normalement exprimé par toutes les cellules normales du corps, ce qui permet alors de protéger ces dernières d'une lyse éventuelle par les cellules NK (196). Dans certains cas d'infections ou de transformations malignes, les cellules infectées diminuent leur expression de CMH-I et deviennent, par conséquent, sensibles à la lyse par les cellules NK ne recevant plus de signaux inhibiteurs. Dans ce cas il s'agit du mécanisme d' « absence du soi » (197). Le second mécanisme contribuant à la lyse est l'activation des cellules NK par les récepteurs activateurs cités précédemment. Le troisième facteur essentiel pour avoir une lyse par les cellules NK est l'éducation. En l'absence de l'éducation des cellules NK au cours de leur développement, elles seront anergiques. Le processus d'éducation consiste à une interaction entre un récepteur inhibiteur et son ligand le CMH-I. Un clone de cellules NK devient anergique quand elles expriment un récepteur inhibiteur spécifique pour un CMH-I qui est absent dans le génome.

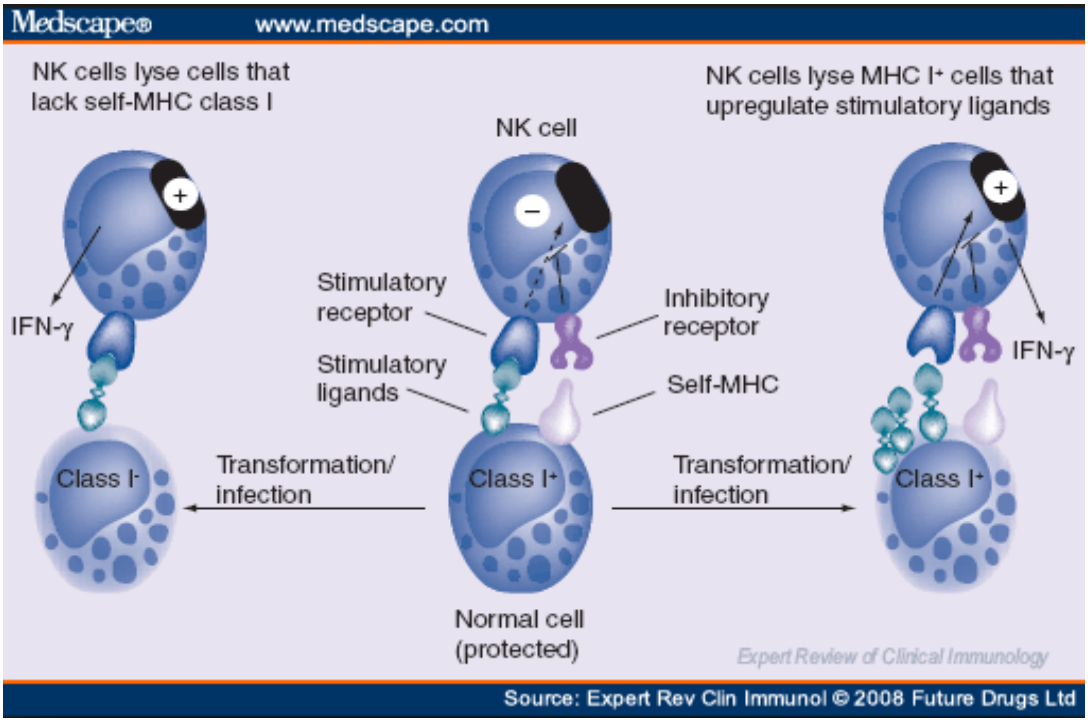


Figure 22. Régulation de la lyse de cellules cibles par les cellules NK. L'expression de CMH-I par les cellules normales du corps protègera ces cellules d'une lyse par les cellules NK. En absence d'expression de CMH-I par les cellules infectées ou transformées, les cellules NK ne reçoivent plus un signal inhibiteur et peuvent lyser les cellules. Dans un autres cas, les cellules infectées peuvent surexprimer des ligands activateurs induisant la lyse par les cellules NK **(198)**.

C. Immunité adaptative

Une seconde forme de réponse immunitaire existe, elle dépend de l'immunité innée et se met en place quelques jours après l'infection initiale. Il s'agit de l'immunité adaptative qui intervient pour éliminer sélectivement les pathogènes ayant échappé à la réponse innée ou qui persistent malgré cette réponse. Les principales caractéristiques de l'immunité adaptative sont la génération de cellules à durée de vie longue et spécifiques d'un antigène. En effet, après une première rencontre avec un antigène ou un pathogène, ces cellules sont susceptibles de répondre plus rapidement et plus fortement lorsqu'elles le rencontreront à nouveau. L'immunité adaptive est considérée comme étant le domaine exclusif des lymphocytes T et B tandis que les monocytes, granulocytes, cellules dendritiques font plutôt partie de l'immunité innée. Cependant la frontière immunité innée / adaptive est de plus en plus floue car des sous populations de cellules B et T sont capables de se comporter comme des cellules de l'immunité innée et inversement (199).

Deux types d'immunité adaptative existent : immunité humorale et immunité cellulaire. Les médiateurs de l'immunité humorale sont les anticorps produits par les lymphocytes B. Les anticorps arrêtent les microbes circulants afin de les empêcher d'accéder aux cellules et aux tissus conjonctifs prévenant alors les infections avant qu'elles ne se déclarent. Ils sont destinés à reconnaître spécifiquement les antigènes microbiens extracellulaires. Par contre, les anticorps ne peuvent pas atteindre les microbes intracellulaires, c'est dans ce cas que la réponse cellulaire intervient pour les éliminer par l'intermédiaire des lymphocytes T (figure 23). Ces derniers reconnaissent les antigènes produits par les microbes intracellulaires. En ce qui concerne les lymphocytes T, la partie suivante de ce chapitre leur est concerné.

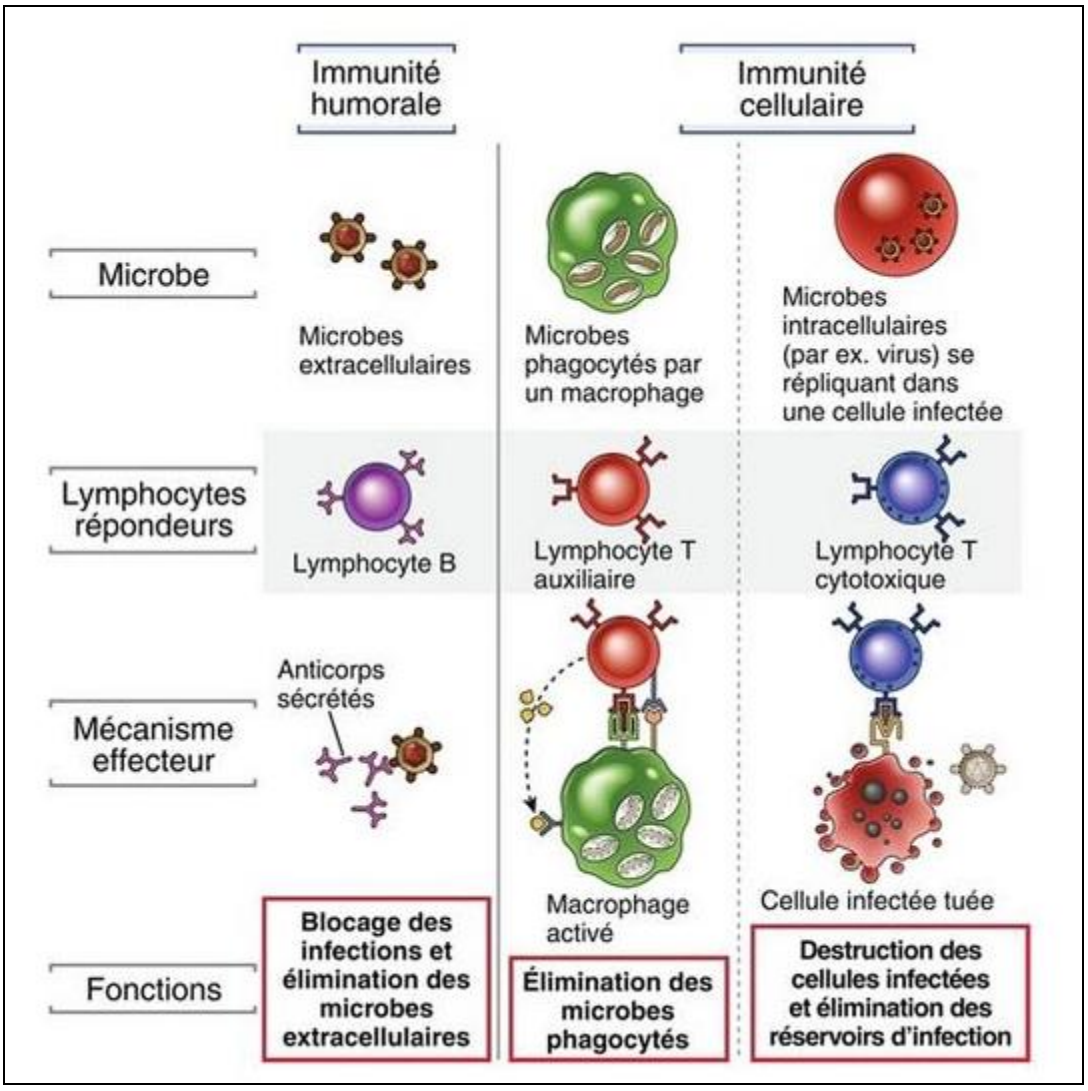


Figure 23. Les lymphocytes B sécrètent des anticorps éliminant les microbes extracellulaires, il s'agit de l'immunité humorale. Dans l'immunité cellulaire, plusieurs types de lymphocytes T recrutent et activent les phagocytes afin qu'ils tuent les microbes ingérés ou tuent directement les cellules infectées **(200)**.

a) Types de lymphocytes T

Les lymphocytes T (LT) sont les chefs d'orchestre de l'immunité adaptative, leur efficacité résulte de leur capacité à reconnaître de manière spécifique un pathogène donné et à déclencher une attaque adaptée. Ils proviennent d'un progéniteur hématopoïétique localisé dans la moelle osseuse. Ce progéniteur va ensuite migrer vers le thymus où il va se différencier et maturer. Au cours de la différenciation, il migre du cortex vers la medulla (201).

Les lymphocytes T expriment à leur surface un récepteur appelé TCR (pour T-cell receptor) capable de reconnaître des déterminants antigéniques spécifiques. Ces récepteurs sont différents à la surface de chaque lymphocyte ce qui permet à l'organisme de reconnaître une grande diversité de pathogènes. Après leur maturation dans le thymus, seuls les LT capables d'interagir avec des cellules présentant les antigènes, sans s'activer contre le soi, seront autorisés d'en sortir pour rejoindre, via la circulation sanguine, les ganglions lymphatiques. Dans le cas où un lymphocyte T reconnaît de manière spécifique un pathogène, il s'active et multiplie.

Il existe plusieurs sous-types de LT :

- les LT tueurs (cytotoxic LT ou CTL), capables de tuer les cellules infectées, sont caractérisés par l'expression du CD8.
- les LT auxiliaires (T « helper »), apportent un soutien aux autres cellules du système immunitaire. Ils participent à l'activation des lymphocytes B et des LT tueurs dans les ganglions, ainsi que dans les sites d'infection, sont caractérisés par l'expression du CD4. Parmi les LT CD4, il existe plusieurs sous-types dont les LT Th1, Th2, Th9, Th17, et T régulateurs, chacun caractérisé par un profil cytokinique particulier (202).

b) Activation des lymphocytes

Comme déjà mentionné, les LT sont activés par les antigènes associés aux molécules du CMH de classe II (exprimées par les CPA). Deux types de signaux sont nécessaires pour activer ces lymphocytes :

(1) **des signaux de stimulation** induits par la phosphorylation des « immunoreceptor tyrosine-based activation motifs » (ITAM) contenus dans le domaine cytoplasmique du TCR (203). Cette phosphorylation génère une cascade qui va mener à la translocation nucléaire des facteurs de transcription conduisant à la prolifération cellulaire et la production de médiateurs inflammatoires (204) (figure 24) ;

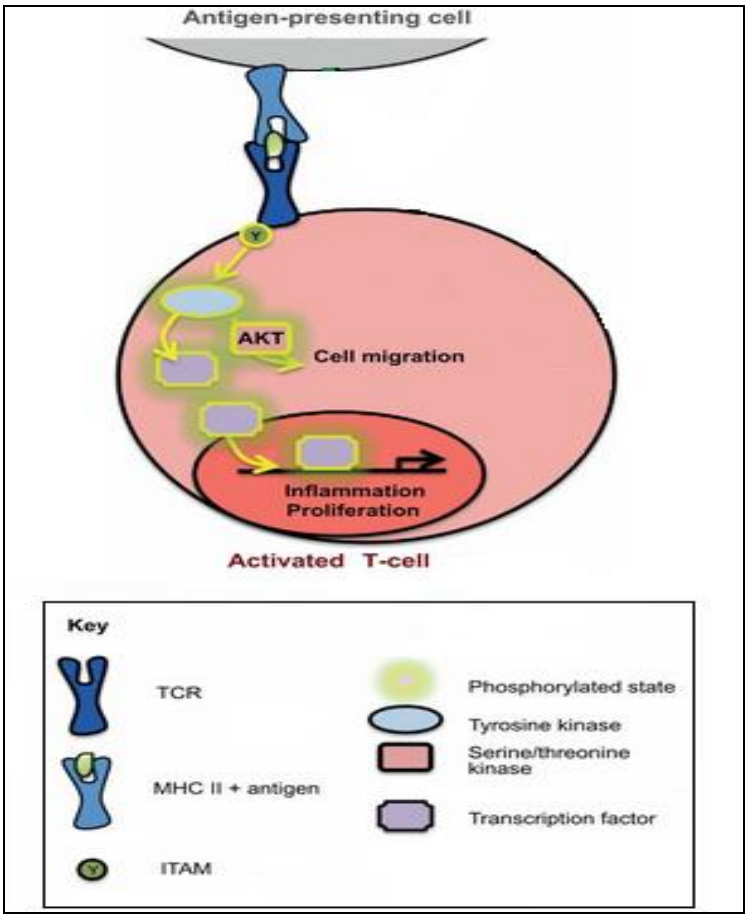


Figure 24. Activation des LT CD4. La stimulation du TCR par les complexes antigènes+MHC-II présents à la surface des CPA déclenche le recrutement des tyrosines kinases qui activeront une cascade de signalisation menant à l'activation des LT CD4. Cette voie de signalisation conduit aussi à la phosphorylation de la protéine AKt favorisant la migration cellulaire (204).

(2) des **signaux de co-stimulation** nécessaires pour une activation complète des LT CD4 et sont produits par une interaction directe entre le ligand CD28 exprimé à la surface des LT CD4 et ses récepteurs appartenant à la famille B7 (CD80, CD86) et CD40 exprimés par les CPA. Une signalisation impliquant le TCR et CD28 provoque l'expression du ligand de CD40 (CD40L) par les LT. La liaison CD40/CD40L induit une augmentation de l'expression de CD80/CD86 renforçant ainsi le signal déclenché par CD28. Une boucle positive d'activation est ainsi mise en place permettant une forte prolifération des LT (205) (figure 25). Le signal de costimulation est indispensable pour protéger les cellules T d'une anergie ou d'une apoptose précoce qui interviennent en son absence (205).

Après cette costimulation, plusieurs autres molécules interviennent et participent à la différenciation fonctionnelle des lymphocytes T. Parmi ces molécules, peuvent être citées :

- « Inducible costimulator » (ICOS) et OX40 qui sont exprimées par les LT avec leurs ligands respectifs ICOSL et OX40L exprimés par les CPA. Ces molécules sont essentielles pour la survie des LT CD4+ mémoire et pour activer les lymphocytes B qui expriment également les ligands (206–208).
- La molécule « programmed cell death-1 » (PD-1) qui est une molécule inhibitrice intervenant dans l'interaction lymphocyte T/CPA. Elle est reconnue par deux ligands PDL-1 (CD274, B7-H1) et PDL-2 (CD273, B7-DC) (209,210).

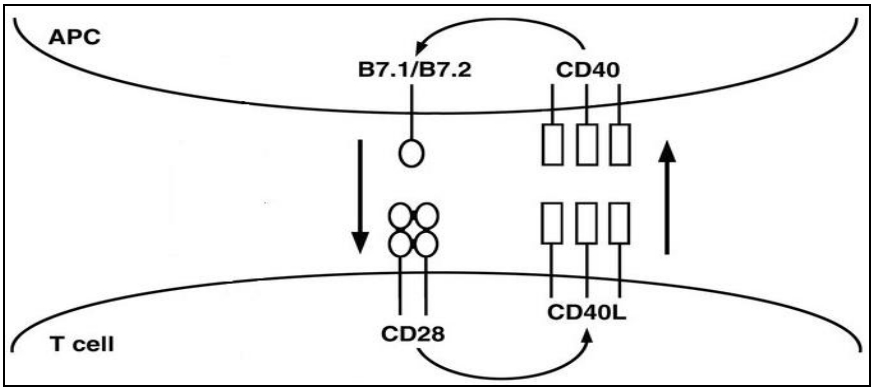


Figure 25. Signaux de co-stimulation nécessaires pour une activation totale des LT CD4. Suite à la stimulation initiale des LT par la reconnaissance du peptide antigénique associé au CMH-II, l'expression constitutive de B7.1 et/ou B7.2 à la surface de la CPA induit une activation du CD28 à la surface des LT. Ensuite, une augmentation de l'expression de CD40L est induite qui, à son tour, se lie au récepteur CD40 exprimé par la CPA augmentant davantage l'expression de B7.1/B7.2 et renforçant la boucle de rétroaction positive CD28/CD40 **(205)**.

(1) Lymphocytes LT CD4 : différenciation et rôles

Après la phase de reconnaissance de l'antigène et l'activation, les LT CD4+ subissent une étape de prolifération et de différenciation en cellules effectrices ou auxiliaires. Ces cellules jouent un rôle dans le recrutement des cellules de l'immunité innée et l'activation des LTCD8 cytotoxiques ainsi que les lymphocytes B. Le type de différenciation des LT CD4+ dépend des cytokines secrétées par la CPA, et chaque population de LT CD4+ est définie par un profil de cytokines particulier. On distingue :

- L'IL-12 et l'IFN-γ sont essentiels pour l'induction de lymphocytes «T helper 1» (Th1). L'IFN-γ est la « signature » des cellules Th1 puisque ce sont le seul sous-type à le produire. Elles produisent aussi de l'IL-2. Ces lymphocytes sont responsables de la réponse immunitaire cytotoxique.
- Les lymphocytes « T helper 2 » (Th2) sont essentiellement induits par l'IL-4, ils sont caractérisés par un autre profil cytokinique avec une sécrétion majoritaire de l'IL-4, l'IL-5 et l'IL-13. Elles peuvent aussi produire du TNF-α. Ils soutiennent la différenciation des lymphocytes B et sont impliqués dans les phénomènes allergiques.
- La population Th17, obtenue par l'action de l'IL-6 et du TGF-β, est caractérisée par la sécrétion de l'IL-17A, l'IL-17F et l'IL-22 (« signatures » des Th17), elles secrètent aussi de l'IL-21, l'IL-26 et du TNF-α. Les Th17 sont impliquées dans le recrutement et l'activation des cellules de l'immunité innée et dans plusieurs maladies inflammatoires et auto-immunes.
- Le TGF-β et l'IL-2 sont nécessaires pour la différenciation en LT régulateurs (Treg). Les Treg sécrètent deux cytokines anti-inflammatoires particulières l'IL-10 et le TGF-β et sont responsables de la tolérance vis-à-vis des molécules du soi et de l'environnement (211).

La différenciation des LT CD4+ est induite par la liaison des cytokines à leurs récepteurs provoquant ainsi l'activation des protéines de la famille « Signaling Transducer and Activator of Transcription » (STAT). Cette activation augmente à son tour l'expression des facteurs de transcription de plusieurs gènes dont ceux des cytokines spécifique à chaque sous-population créant ainsi les profils cytokiniques « signatures ». Chaque sous-population est caractérisée alors par un ou plusieurs facteurs de transcription majeurs qui vont permettre la polarisation de la cellule et l'inhibition du développement des autres profils (212) :

- Tbet (T-box transcription factor) et STAT4 pour les Th1
- GATA-3 et STAT6 pour les Th2
- RORγt (RAR-related orphan receptor gamma) et STAT 3 pour les Th17
- FoxP3 (forkhead box P3) pour les Treg

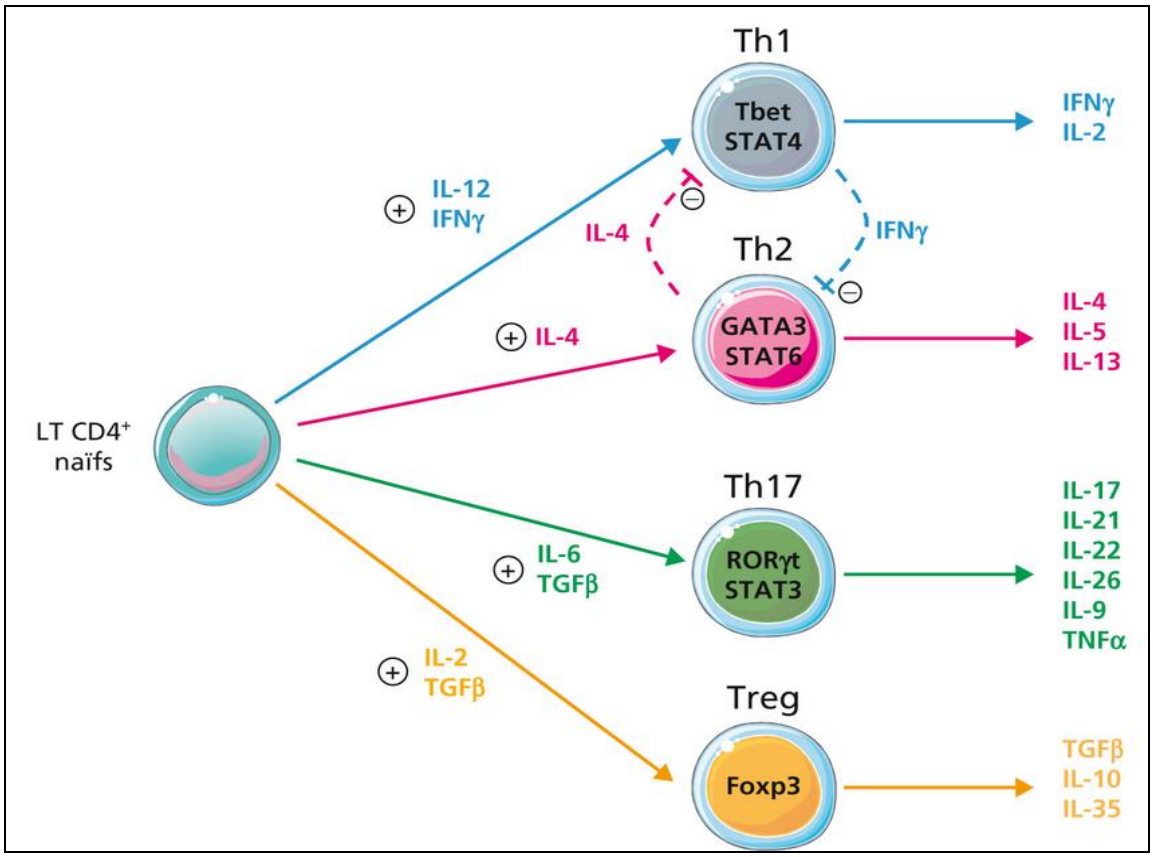


Figure 26. Différenciation des LT CD4+ naïfs. Chaque population de LT CD4 est caractérisée par un profil cytokinique et transcriptionnel qui lui est spécifique (212).

(2) Lymphocytes T cytotoxiques CD8 : activation et mécanisme d'action

Suite à un contact avec les CD matures au niveau des ganglions, les LT CD8+ naïfs sont activés. Le premier signal d'activation est la reconnaissance par le TCR de l'antigène du complexe CMH-I/peptide présenté à la surface des CD. D'autres co-signaux sont aussi nécessaires pour une activation optimale d'un LT CD8+ naïf, c'est à dire pour qu'il s'engage dans une expansion clonale caractérisée par une prolifération des LT CD8+ spécifiques de l'antigène reconnu, et par leur différenciation en LT CD8+ effecteurs capables de tuer les cellules infectées. Des récepteurs et des molécules de costimulation exprimés à la surface des CD comme CD80, CD86, CD40 et CD2 interagissent avec leurs ligands respectifs CD28, CD40L et CD58 exprimés à la surface des LT CD8+ (213). Des cytokines secrétées par les CD, comme l'IL-2, l'IL-12, l'IL-15 et l'IL-18, participent aussi à l'activation et la différenciation des LT

CD8+. Après la reconnaissance antigénique, les LT CD8+ naïfs se différencient en LT mémoires et LT effecteurs ou cytotoxiques (CTL). On peut distinguer ces trois populations grâce à des différences phénotypiques et fonctionnelles (214).

Les LT cytotoxiques utilisent principalement deux voies de lyse (figure 27):

- *Voie perforine/granzyme* : mécanisme le plus fréquemment utilisé, il est basé sur l'exocytose polarisée par le CTL du contenu de granules cytotoxiques. Ceci aboutit à la libération de protéines cytolytiques, dont les principales sont la perforine et les sérines protéases de la famille des granzymes, notamment le granzyme B (GrB). Le Gr B est ensuite internalisé dans la cellule cible par endocytose, puis est libéré dans le cytoplasme, à travers les pores membranaires formé par la perforine, où il active le programme apoptotique (215).
- *Voie des récepteurs à domaine de mort* : cette voie implique des ligands de la famille du TNF exprimés par les CTL activés (FasL, TNF, TRAIL), qui vont engager des récepteurs à domaine de mort appartenant à la famille des récepteurs de TNF (Fas, TNFRI, TRAIL-R1/DR4, TRAIL-R2/DR5). Une fois le récepteur de mort est engagé par son ligand, il recrute et active la caspase 8 dont l'activation va permettre de déclencher le programme de mort apoptotique de la cellule cible (215).

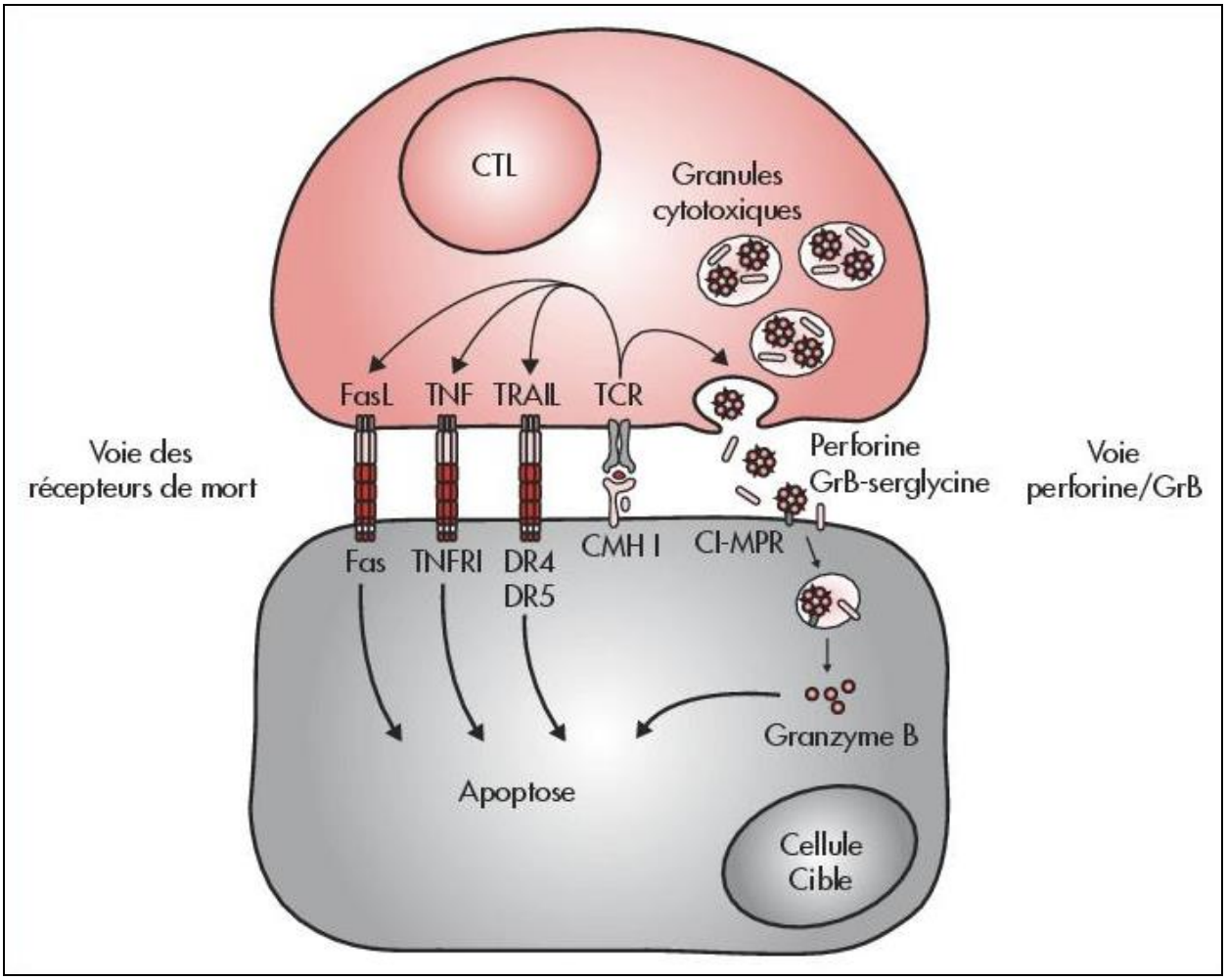


Figure 27. Voies de cytotoxicité des CTL. Les CTL utilisent deux types de mécanismes de cytotoxicité pour induire la mort des cellules cibles : la voie perforine/Granzyme B et l'engagement de récepteurs à domaine de mort exprimés à la surface de la cellule cible **(215)**.

II. PRINCIPAUX MECANISMES IMMUNOREGULATEURS DES CSM

Dans le chapitre 3, nous avons montré l'importance des propriétés immunologiques des CSM, principalement immunosuppressives, qui jouent un rôle central dans leur potentiel thérapeutique. Dans le tableau IV figurent les facteurs essentiels impliqués dans l'immunorégulation médiée par les CSM. Dans ce qui suit, les modes d'action de quelques-uns seront détaillés.

Tableau IV. Résumé des facteurs critiques pour l'immunosuppression médiée par les CSM **(216)**.

Molécules exprimées par les CSM	Description et effet sur les cellules de l'immunité
IDO (indoléamine 2,3-dioxygénase)	Molécules qui inhibent la prolifération, la cytotoxicité, l'activation Et la différenciation des cellules de l'immunité. Diminuent la sécrétion decytokines pro-inflammatoires. IDO entraîne l'apoptose des cellules T activées et PGE2 active les Treg (217,218).
PGE2 (prostaglandine E2)	
sHLA-G *(soluble human leukocyte antigen)*	
TGF-β	
Hmox1 (hème oxygénase)	
HGF *(hepatocyte growth factor)*	
NO *(nitric oxide)*	
MMP-2 et MMP-9 (métalloprotéinases matricielles)	Réduisent l'expression du marqueur de surface CD25 sur les LT et inhibent leur prolifération (219).
PDL-1 (aussi appelé B7-H1) et B7-H4	Protéines transmembranaires de co-stimulation jouant un rôle important dans la suppression du système immunitaire. Elles suppriment la prolifération et l'activation des LT. Elles diminuent leur sécrétion de cytokines pro-inflammatoires. FasL induit l'apoptose des LT activés (220).
FasL *(Fas ligand)*	
M-CSF *(macrophage colony-stimulating factor)*	Inhibe la différenciation des monocytes (217).
IL10 (interleukine 10) et LIF *(leukemia inhibitory factor)*	Active les cellules Trég (218).
IL6	Inhibe le burst oxydatif des polynucléaires neutrophiles et s'oppose à leur apoptose (100,221).

CCL1, CXCL1 (*chemokine ligand 1*, motifs C-C et CXC)	Glycoprotéines qui régulent la migration des cellules de l'immunité et activent les Treg (222).
TSG-6 *(TNF-stimulated gene 6 protein)*	Inhibe de la migration des polynucléaires neutrophiles (221).
Galectine-3	Module la prolifération, l'activation, l'adhésion et la migration des LT (223).

A. Principaux facteurs solubles impliqués dans l'immunomodulation par les CSM

a) Indoleamine-2,3-dioxygénase

L'indoleamine-2,3-dioxygénase (IDO) une enzyme intracellulaire et non sécrétée qui contribue à la régulation immunitaire métabolique en induisant le catabolisme oxidatif du tryptophane (TRP), un acide aminé essentiel, dans la voie de la kynurénine (KYN). IDO peut modifier les réponses immunitaires de deux façons : en produisant de la KYN, un ligand naturel pour le récepteur aryl hydrocarbone (AhR : *aryl hydrocarbon receptor*) et en appauvrissant le milieu en TRP. Le catabolisme du TRP induit par IDO génère des métabolites de la voie kynurénine qui sont biologiquement actifs en tant que ligands du récepteur AhR. Les effets des métabolites du TRP sur l'AhR apparaissent être immunosuppresseurs, favorisant la différenciation des LT en Treg FoxP3+ et la suppression des réponses immunitaires anti-tumorales. L'autre effet d'IDO est la rapide consommation de TRP du microenvironnement local. La déplétion en TRP agit comme un signal régulateur puissant via des acteurs moléculaires répondant à la diminution des acides aminés tels que la GCN2 (*general control nondepressible 2*) et mTOR (*mammalian target of rapamycin*) (figure 28) (224).

IDO a été découverte en 1967 (225) et synthétisée pour la première fois en 1978. La première étude décrivant le rôle d'IDO en tant qu'immunosuppresseur a été publiée par Munn *et al.* qui ont montré son rôle dans la prévention du rejet de fœtus allogénique (226) suggérant son implication dans la tolérance foeto-maternelle. Depuis, plusieurs études ont clarifié les effets immunosuppresseurs d'IDO, notamment via la déplétion locale du milieu en tryptophane ou l'accumulation de métabolites toxiques notamment responsables de l'arrêt de prolifération et de l'apoptose des lymphocytes T et des cellules NK, extrêmement sensibles à une privation en

tryptophane. De plus, la kynurénine agit également sur les cellules NK en inhibant l'expression de certains récepteurs tels que NKp46 et NKG2D ainsi que leur activation (227).

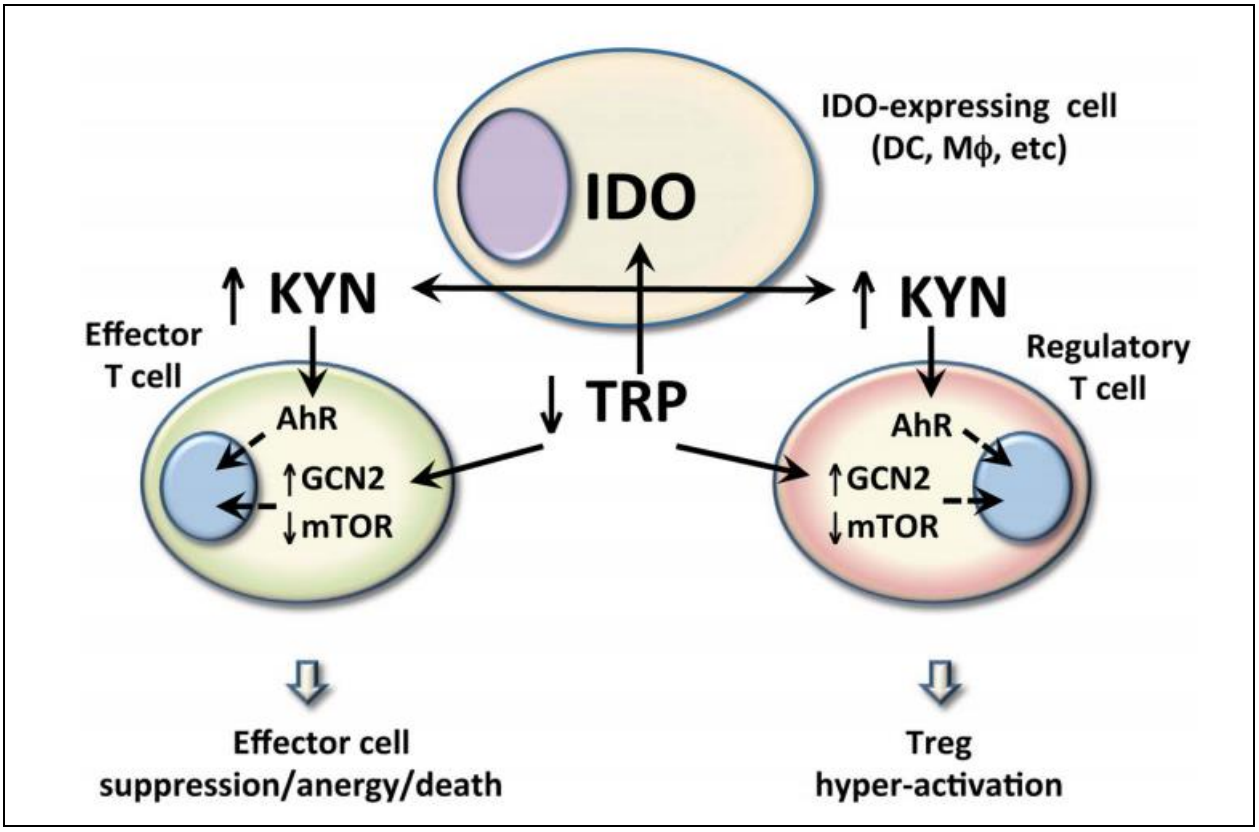


Figure 28. Contrôle métabolique des réponses des cellules T et Treg *via* IDO. La production de KYN et la consommation de TRP par les cellules exprimant IDO transmettent des signaux aux AhR et capteurs d'acides aminés (GCN2 et mTOR) qui ont des effets importants sur les réponses des cellules T et Treg aux signaux inflammatoires et antigéniques. L'activité d'IDO favorise aussi la différenciation des LT CD4+ naïves **(224)**.

IDO a été identifiée comme l'un des principaux facteurs immunosuppresseurs exprimés par les CSM humaines (228). Meisel *et al* ont été les premiers à démontrer le rôle d'IDO dans l'inhibition des réponses de cellules T allogéniques par les CSM-MO humaines. Ils ont montré que les CSM, inhibant la prolifération des cellules T, expriment IDO qui est fonctionnellement active après une stimulation par l'IFN-γ. L'activité d'IDO consistant en une déplétion de TRP et la production de KYN a été détectée dans les surnageants des co-cultures CSM/cellules T allogéniques (229). Les études se sont succédées et ont confirmé le rôle majeur joué par IDO dans l'immunosuppression médiée par les CSM humaines de moelle osseuse (230), du fluide

amniotique (231), du placenta (232), du tissu adipeux (233), du cordon ombilical (234,235) et des tissus dentaires (236,237).

b) Interleukine-6

L'interleukine-6 (IL-6) est une cytokine pléiotropique se caractérisant par un large spectre d'activités dans la régulation immunitaire, l'hématopoïèse, l'inflammation et l'oncogenèse. La pléiotropie et la redondance des fonctions de l'IL-6 ont été identifiées par la caractérisation d'un système unique de récepteurs comprenant deux protéines fonctionnelles : un récepteur spécifique de l'IL-6 (IL-6R) et gp130, un transducteur de signal des cytokines liées à l'IL-6. La transduction du signal via gp130 est médiée par deux voies de signalisation : les voies JAK-STAT (JAK : *Janus kinase* ; STAT : *signal transducer and activator of transcription*) et Ras-MAPK (*mitogen-activated protein kinase*) (figure 29).

L'IL-6 a été tout d'abord découverte dans les surnageants des cellules T stimulées par de la phytohémagglutinine (PHA) où elle a induit la différenciation finale des cellules B en cellules sécrétrices d'immunoglobulines. Les études qui ont émergé par la suite suggèrent que l'IL-6 est un signal clé permettant la transition de la réponse immunitaire innée initiale à une réponse adaptative (238). Des données récentes suggèrent également un rôle régulateur essentiel de l'IL-6 dans la différenciation des cellules T naïves en cellules Th17 (239) en présence de TGF-β (240). Le TGF-β seul induit la différenciation des LT CD4+ naïves en Treg, tandis que l'ajout de l'IL-6 détourne la différenciation vers la sous-population Th17 (239).

Il a été démontré que les CSM produisent de l'IL-6 avec un rôle probablement pro-inflammatoire (241,242). Cependant, il a été récemment démontré que l'IL-6 est impliquée dans la suppression de la prolifération des cellules T et de l'inflammation locale (243,244), et qu'elle contribue à l'activité immunorégulatrice des CSM (245,246). La modulation de la réponse immunitaire par l'IL-6 secrétée par les CSM passe par la voie de signalisation JAK-STAT3 (247).

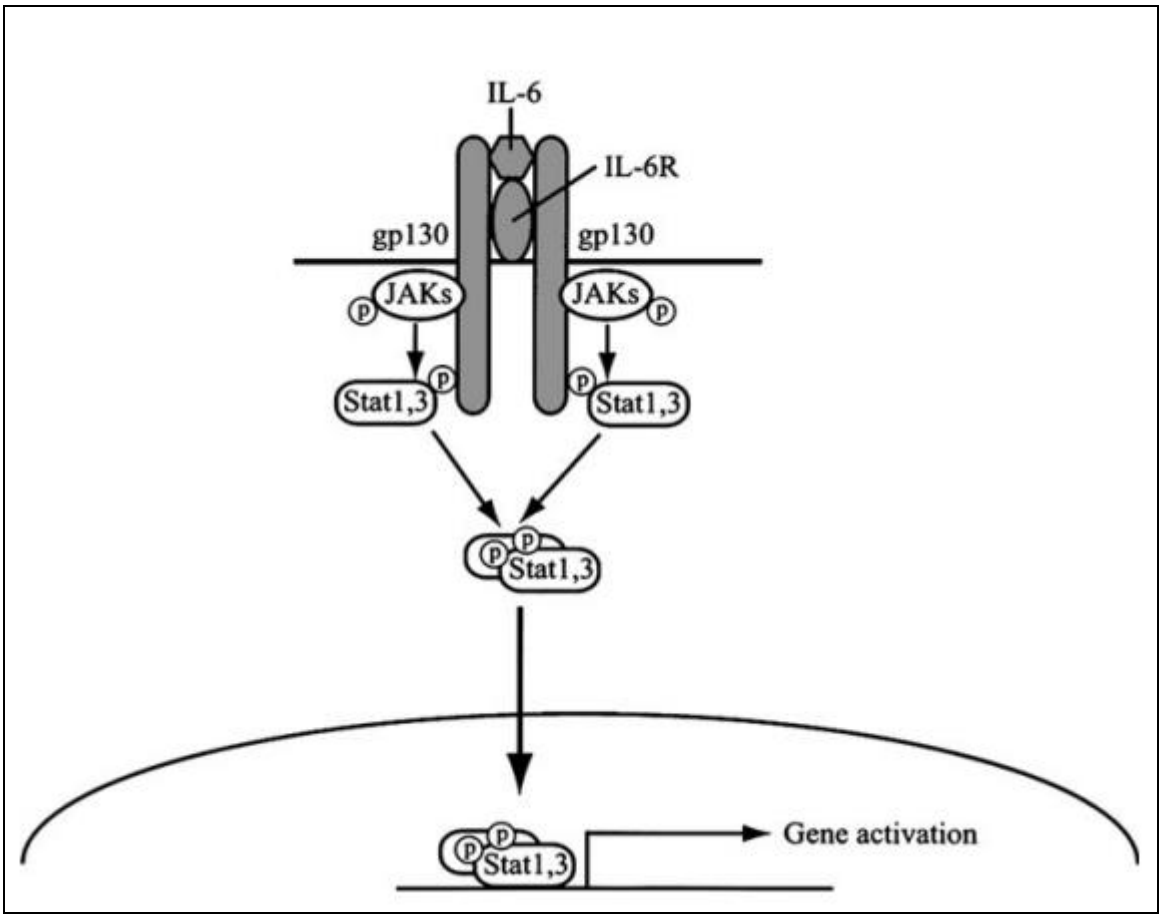


Figure 29. Transduction du signal de l'IL-6 par la voie JAK/STAT. La stimulation par l'IL-6 induit une homodimérisation du récepteur gp130 activant (par phosphorylation) les protéines JAKs et Stat 1 et 3. Les Stat 1 et 3 activées forment des homo- ou hétérodimères ce qui induit l'activation des gènes cibles **(248)**.

c) Prostaglandine E2

Les prostaglandines (PG) sont des petites molécules dérivées de l'acide arachidonique et produites par les cyclooxygénases (COX ; COX1 la cyclooxygénase constitutivement active et COX2 inductible) et les PG synthases avec une contribution relativement mineure de la voie isoprostane. Les taux locaux de PGE2, le produit principal des COX dans les cellules stromales et myéloïdes, sont régulés par un équilibre entre la synthèse induite par COX2 et la dégradation de la PGE2 médiée par la 15-hydroxyprostaglandine déhydrogénase (15-PGDH). L'expression des récepteurs de la PGE2 (EP1-EP4) sur plusieurs types cellulaires reflète les fonctions ubiquitaires de la PGE2 intervenant dans la nociception et d'autres aspects de la signalisation neurale, l'hématopoïèse, la régulation du débit sanguin, la filtration rénale et la pression

sanguine, la régulation de l'intégrité des muqueuses, la perméabilité vasculaire et la fonction du muscle lisse (249).

La PGE2 joue aussi un rôle clé dans la régulation de différents mécanismes effecteurs des réponses immunitaires. Bien que généralement reconnue en tant que médiateur de l'inflammation, favorisant la vasodilatation, l'attraction et l'activation précoce des neutrophiles et des macrophages, la PGE2 peut aussi induire la production de la cytokine suppressive IL-10 et supprimer directement la production de plusieurs cytokines pro-inflammatoires permettant de limiter l'inflammation non spécifique, favorisant l'immunosuppression associée à l'inflammation chronique et au cancer (250,251).

La PGE2 affecte différemment les fonctions de différentes cellules effectrices :

- Elle supprime les fonctions cytolytiques effectrices des cellules NK en inhibant leur réactivité vis-à-vis des interleukines IL-12, IL-15 (252,253) et IL-2, et inhibe aussi la production de l'IFN-γ par les cellules NK (254).
- La PGE2 inhibe les phases précoces de différenciation des CD (255), et récemment il a été montré que les CD résultantes sont capables de supprimer la réactivité des CTL (256).
- Elle a des effets suppressifs sur l'activation et l'expansion des cellules T naïves, dont l'inhibition de la production de l'IL-2 ainsi que l'inhibition de l'expression du récepteur de l'IL-2 et de la protéine JAK3 qui sont responsables de la réactivité des cellules T en réponse à l'IL-2 (257,258). A des faibles concentrations, la PGE2 montre des effets modulateurs importants en détournant la réponse immunitaire Th1 des LT CD4+ vers les réponses Th2 et Th17 qui médient des réponses immunitaires moins destructives (249).
- Il a été démontré que la PGE2 et la COX2 favorisent la différenciation des précurseurs naïfs en cellules Treg (259), la PGE2 induit l'interaction des CD avec les Treg ce qui laisse suggérer qu'elle pourrait aussi contribuer à l'expansion de Treg préexistants (260). En outre, la PGE2 est aussi impliquée dans l'activité suppressive des Treg (261).

La PGE2 est aussi impliquée dans l'activité immunosuppressive des CSM. Sa production par les CSM est augmentée par une stimulation par la TNF-α ou l'INF-γ, son inhibition par des inhibiteurs spécifiques restaure la prolifération des LT (241). Il a été montré que la PGE2 secrétée par les CSM agit sur les macrophages en stimulant la production de l'IL-10 et sur les

monocytes en bloquant leur différenciation en CD (171,262). Il est intéressant de noter aussi qu'en présence de la PGE2, les effets d'IDO dans l'immunorégulation des CSM sur la prolifération des cellules T et l'activation des cellules NK sont amplifiés (263,264).

d) TGF-β / HGF

De nombreuses études ont démontré que les CSM étaient capables d'inhiber la prolifération des LT induites par des alloantigènes, des mitogènes, ou des anticorps anti-CD3 ou CD28 (265,266). Parmi les médiateurs sécrétés par les CSM, Le TGF-β et l'HGF sont des facteurs solubles qui semblent avoir une forte activité immunomodulatrice sur la réponse T. En effet, il a été montré que des anticorps neutralisant l'action du TGF-β et de l'HGF étaient susceptibles de restaurer la prolifération T inhibée par les CSM. D'autres études ont également montré que le TGF sécrété par les CSM jouerait un rôle dans l'induction de Treg (267,268). D'autres études suggèrent aussi un impact du TGF-β sur le fonctionnement des cellules NK. Zhao *et al*. ont notamment observé qu'il était susceptible d'affecter leur fonctionnement en diminuant l'expression du récepteur activateur NKG2D (269).

e) MMP-2 et MMP-9

Les métalloprotéinases matricielles encore appelées matrixines, sont des endoprotéinases dépendantes du calcium et du zinc. Elles sont impliquées dans une grande variété de processus physiologiques ou pathologiques, tels que la migration, la réparation tissulaire ou l'inflammation. Leurs capacités à altérer le fonctionnement de nombreuses enzymes, protéines ou récepteurs suggèrent qu'elles peuvent être impliquées dans le fonctionnement de nombreuses cellules. Ainsi, en ce qui concerne les CSM, certaines molécules d'adhésion et certains composants de la matrice extracellulaire qu'elles synthétisent deviennent fonctionnels après protéolyse par les MMP (270).

Certaines études ont démontré que les MMP, notamment les MMP-2 et 9 jouent un rôle dans la différenciation notamment adipogénique des CSM (271). Il a également été observé que ces deux MMP auraient un rôle à jouer dans les propriétés immunosuppressives des CSM. En effet, Ding Y. *et al* ont observé que les CSM étaient capables de prévenir le rejet de greffe allogénique d'îlots de Langerhans réalisées dans un modèle murin (219). Ils ont pu déterminer que ce phénomène était dû à l'action immunosuppressive des MMP. Dans ce modèle, les MMP

étaient capables de cliver le CD25, marqueur d'activation et récepteur de l'IL-2 sur les lymphocytes T, induisant ainsi une absence de réponse à l'IL-2 et une inhibition de leur prolifération. L'ajout d'un inhibiteur de MMP dans des co-cultures CSM/ LT restaurait la prolifération de ces derniers en réponse à l'IL-2.

Des résultats similaires concernant les effets immunosuppresseurs des MMP ont été observés dans un autre modèle murin (272). Dans cette étude, les auteurs ont testé l'effet du milieu conditionné des CSM sur les LT. Parmi les effets observés, le milieu conditionné induisait l'apoptose des LT et une réduction de la production d'IL-2. L'implication des MMP dans les effets observés a été démontrée en utilisant un inhibiteur qui a permis de restaurer la production d'IL-2 tout en évitant le clivage du CD25. Cependant, l'ajout de l'inhibiteur de MMP n'a pas permis de restaurer complètement la prolifération T. Cela suggère que les MMP ne sont pas les seuls médiateurs impliqués dans l'inhibition de la prolifération médiée par le milieu conditionné des CSM.

B. Principales molécules de contact impliquées dans l'immunomodulation

Parmi les nombreuses molécules exprimées à la surface des CSM et pouvant jouer un rôle dans l'effet immunosuppresseur des CSM, nous nous focaliserons sur les molécules PDL1/ B7H1 et FasL.

a) Programmed death ligand 1

Programmed death ligand 1 (PD-L1) connu aussi sous le nom de B7-H1 (B7 homolog 1) ou CD274 est un des deux ligands du récepteur PD-1. Il peut être exprimé par les cellules de la lignée hématopoïétique dont les cellules T, cellules B, monocytes, CD et macrophages activés, mais aussi par les cellules des tissus non hématopoïétiques avec un taux d'expression variant entre intermédiaire et élevé détecté dans le cœur, le muscle squelettique, le placenta, les poumons, les reins et le foie. La voie PD-1/PD-L1 induit une inhibition des fonctions des cellules B et T (273). De plus, Francisco *et al.* ont proposé que PD-L1 peut induire la différenciation des LT CD4+ naïves en Treg, médiateurs clé de la tolérance périphérique induisant la suppression des cellules T effectrices (274). PD-L1 peut aussi transmettre un signal inhibiteur en se liant à B7.1 (275).

Il a été démontré que les CSM-MO expriment PD-L1 et que son expression est augmentée par l'INF-γ. L'inhibition de l'expression de PD-L1 par les CSM restaure la prolifération des cellules T montrant l'effet crucial que jouerait ce ligand, dont l'expression est stimulée par l'INF-γ, dans l'immunosuppression assurée par les CSM (276,277). L'expression de PD-L1 a été aussi démontrée sur les CSM du cordon ombilical. Tipnis *et al.* ont montré qu'en plus de l'inhibition de la prolifération des cellules T, PD-L1 intervient dans l'induction des Treg et l'inhibition de la différenciation des CD (234). Plus tard, Luz-Crawford et al. ont démontré le rôle de l'augmentation de l'expression de PDL-1 dans l'immunosuppression exercée par les CSM sur les cellules Th17 matures (278). Très récemment, les effets de PD-L1 sur l'adhésion, la migration et l'immunosuppression relatives aux CSM de placenta ont été prouvés (220,279,280).

b) Fas ligand

L'interaction entre la molécule Fas et son ligand Fas-L à la surface d'une cellule provoque la destruction de cette cellule par un mécanisme de mort cellulaire programmée ou apoptose. Cette interaction peut avoir lieu entre une cellule cible portant la molécule Fas et une cellule tueuse portant la molécule FasL, ou à la surface d'une même cellule portant ces deux molécules (281). Le mode d'action de l'axe Fas/FasL a été déjà mentionné précédemment.

Akiyama *et al.* ont confirmé la contribution de FasL dans l'induction de l'apoptose des cellules T médiée par les CSM (282). Le mécanisme décrit repose sur une augmentation de la sécrétion, par les CSM, de la protéine-1 chimiotactique des monocytes (MCP-1 : *monocyte chemotactic protein*) qui à son tour recrute les cellules T pour déclencher leur apoptose par le système Fas. Les cellules T apoptotiques stimulent la sécrétion d'importantes concentrations de TGF-β par les macrophages menant alors à une augmentation des Treg CD4+CD25+Foxp3+. L'inhibition de l'expression de FasL par les CSM réduit significativement l'effet immunosupresseur ainsi que l'apoptose exercés sur les cellules T (220).

Chapitre 5 : Influence du pourcentage de sérum sur le comportement des CSM-GW

I. Introduction

La première partie de ce projet de thèse consistait différencier les CSM-GW en cellules endothéliales-« like » pour ensuite étudier les capacités immunomodulatrices de ces dernières. Pour réaliser la première étape de ce travail, il était essentiel de mettre au point un protocole de différenciation endothéliale qui soit bien adapté au type cellulaire utilisé. Les travaux du laboratoire pendant une dizaine d'années ont réussi à développer un protocole efficace pour activer les surfaces de culture (verre, le plastique, matrice d'artères décellularisées, …) et les rendre adhérantes vis-à-vis de divers types cellulaires. Il s'agit des films multicouches de polyélectrolytes type PAH/PSS. Les résultats ont mis en évidence une amélioration, *in vitro,* de l'adhésion, la viabilité et la différenciation endothéliale des EPC (8) et des CSM-MO (70). Si la construction $(PAH\text{-}PSS)_3$-PAH (en terminant par une couche chargée positivement) a donné des résultats encourageant avec les EPC et les CSM-MO, il en était pas de même pour les CSM-GW ce qui laisse suggérer que ces dernières ont un comportement différent *in vitro*. En effet, les CSM-GW forment, après 10 jours de culture, des structures nodulaires, phénomène présentant un facteur limitant pour une utilisation en ingénierie vasculaire. Deux approches ont été proposées pour essayer de remédier à ce problème :

- La modification de la charge de la dernière couche des films en terminant alors par PSS, la nouvelle structure sera $(PAH\text{-}PSS)_4$. (283).
- L'évaluation de l'effet de la teneur du milieu de culture en sérum de veau fœtal (SVF) sur le comportement des CSM-GW ensemencées sur les 4 bicouches de PAH/PSS, c'est l'approche adaptée dans l'étude qu'on va présenter.

II. Texte de l'article

Cet article a été publié dans le journal « Biomedical Materials and Engineering » suite à une communication affichée dans le programme des 7èmes journées scientifiques du « Pôle Lorrain d'Ingénierie du Cartilage ».

Bio-Medical Materials and Engineering 23 (2013) 273–280
DOI 10.3233/BME-130751
IOS Press

Influence of serum percentage on the behavior of Wharton's jelly mesenchymal stem cells in culture

C. Harmouch [a,b,*], R. El-Omar [a,b,*], P. Labrude [a], V. Decot [a,c], P. Menu [a,*,**] and H. Kerdjoudj [d]

[a] *UMR 7365 CNRS-Université de Lorraine, MoPA, Vandœuvre-les-Nancy, France*
[b] *Reviva Regenerative Medicine Center, Middle East Institute of Health, Bsalim, Lebanon*
[c] *CHU de Nancy, Unité de Thérapie Cellulaire et Tissulaire, Vandœuvre-les-Nancy, France*
[d] *UFR Odontologie, SFR CapSanté, Université de Reims Champagne-Ardenne, Reims, France*

Abstract.
BACKGROUND: Mesenchymal stem cells (MSCs) are multipotent cells able to differentiate into several lineages with valuable applications in regenerative medicine. MSCs differentiation is highly dependent on physicochemical properties of the culture substrate, cell density and on culture medium composition.
OBJECTIVE: In this study, we assessed the influence of fetal bovine serum (FBS) level on Wharton's jelly (WJ)-MSCs behavior seeded on polyelectrolyte multilayer films (PEMF) made of four bilayers of poly-allylamine hydrochloride (PAH) as polycation and poly-styrene sulfonate (PSS) as polyanion.
METHODS: MSCs isolated from WJ by explants method were amplified until the third passage. Their phenotypic characterization was performed by flow cytometry analyses. MSCs were seeded on PEMF, in Endothelial growth medium-2 (EGM-2) supplemented by either 5% or 2% FBS. Cell's behavior was monitored for 20 days by optical microscopy and immunofluorescence.
RESULTS: Until 2 weeks on glass slides, no difference was observed whatever the FBS percentage. Then with 5% FBS, MSCs formed three-dimensional spheroids on PSS/PAH after 20 days of culture with a nuclear aggregate. Whereas, with 2% FBS, these spheroids did not appear and cells grown in 2D conserved the fibroblast-like morphology.
CONCLUSIONS: The decrease of FBS percentage from 5% to 2% avoids 3D cell spheroids formation on PAH/PSS. Such results could guide bioengineering towards building 2D structures like cell layers or 3D structures by increasing the osteogenic or chondrogenic differentiation potential of MSCs.

Keywords: MSCs, fetal bovine serum, spheroids, tissue engineering

AUTHOR COPY

1. Introduction

Cell sources considerations hamper progress in many areas of tissue engineering, including vascular regeneration [1]. Despite significant progress toward development of biomaterials and methods to cultivate 3D vascular constructs, cell sourcing remains a major challenge for tissue engineering. Mature

*These authors contributed equally to this work.
**Address for correspondence: Pr. Patrick Menu, UMR 7365 CNRS-Université de Lorraine, Bâtiment Biopôle, Faculté de Médecine, B.P. 184, 54505 Vandœuvre-les-Nancy Cedex, France. Tel.: +33 3 83 68 54 57; Fax: +33 3 83 68 54 09; E-mail: patrick.menu@univ-lorraine.fr.

0959-2989/13/$27.50 © 2013 – IOS Press and the authors. All rights reserved

cells from tissue of origin may be difficult to obtain and suffer from limited proliferative capacity, which may further decline as a function of donor age and health. Isolation of smooth muscle and endothelial cells injures the donor site and may also be limited by the health and age of the patient. Moreover, mature cell amplification decease their function and involve cell dedifferentiation [2]. On the other hand, multipotent and pluripotent stem cells have tremendous potential to provide large numbers of cells with a great differentiation capacity towards vascular lineages, and can be used, as an alternative source of mature cells, in engineering of functional and implantable vascular tissues. Specifically, mesenchymal stem cells (MSCs) are a promising tool and have valuable applications in regenerative medicine based on the tissue engineering concept [3].

MSCs are a population of cells which maintain a self-renewal capacity for extended periods [4,5], and have the ability to generate a large quantity of different cell types. Although bone marrow (BM) is actually the main source for both experimental and clinical studies, the use of BM-derived MSCs is not always acceptable due to the high degree of viral exposure, the possibility of donor morbidity, and the significant decreases in cell number and proliferation/differentiation capacity with age [6]. Thus investigators have worked to identify other abundant and easily attainable source of MSCs for therapeutic use. In this regard, Wharton's jelly (WJ) has been established as an alternative to BM source of MSCs [7]. MSCs isolated from the umbilical cord harvesting are of great importance because they are pluripotent which under appropriate conditions can differentiate into many cell types including neurons, cardiomyocytes, smooth muscle, insulin secreting cells, cartilage and osteocytes [8].

Several groups are studying the feasibility of using human WJ-MSCs as endothelial cell progenitors to engineer small-diameter human vessels with substantial histological and molecular similarity to native ones after optimization of the culture conditions. Indeed, studies have shown that the differentiation of MSCs is highly dependent on the mechanical environment of substrate [9,10] and on the culture medium (growth factors, serum content) [11]. One of the main components of the culture medium is fetal bovine serum (FBS). FBS may contain many components, including proteins, electrolytes, lipids, carbohydrates, attachment factors, hormones, enzymes and inhibitory factors [12]. Many of the substances in serum are related to factors that have been shown to have a large effect on the adhesion and differentiation of MSCs. Although the identities and concentrations of these substances in serum are not well characterized, we worked out the impact of the optimal concentration of FBS for the culture and differentiation of MSCs.

To improve cell adhesion and differentiation, several protocols proposed to cover conventional culture supports by molecules of the extracellular matrix like: fibronectin, collagen type I ... whereas these proteins can not allow a cell adhesion as effective as the multilayer films [13]. Our lab's studies focused on the evaluation of the effect of polyelectrolyte multilayer films (PEMF) made of polyallylamine hydrochloride (PAH) and polystyrene sulfonate (PSS), on the differentiation of progenitor cells into vascular cells. Berthelemy et al. demonstrated a significant increase of cell differentiation in contact with such a PEMF, compared to that observed on control surface [14]. The architecture corresponding to deposited PAH/PSS layers showed the best conditions for the culture of human WJ-MSC. FBS-based medium is conventional for isolation and expansion of MSCs and has been used in several clinical trials [15]. In order to optimize the culture conditions, on our selected antithrombogenic PEMF ($(PAH\text{-}PSS)_4$) which allowed an effective cell adhesion, this work focused on the influence of FBS concentration on the behavior of WJ-MSCs after one week of culture.

AUTHOR COPY

2. Material and methods

2.1. Building of Polyelectrolyte Multilayer Films (PEMF)

Anionic PSS (MW = 70,000 Da) and cationic PAH (MW = 70,000 Da) were purchased from Sigma Aldrich. The PEMF were built on cover glasses from polyelectrolyte solutions (PSS and PAH) at 1 mg/ml, dissolved in Tris (10^{-2} M)/NaCl (15×10^{-2} M) solution. Each experiment was preceded by a cleaning step of the cover glasses (diameter: 34.7 mm) for 15 min at 100°C with 10^{-2} M sodium dodecyl sulfate (SDS: Sigma Aldrich). This procedure was followed by an extensive ultrapure water rinse. Glasses were then brought in contact for 15 min at 100°C with 10^{-1} M hydrochloric acid and finally extensively rinsed with ultrapure water (Millipore). The cover glasses were then placed in 6-well plates and PAH solution was incubated for 5 min at room temperature. Then, the polyanion (PSS) was adsorbed for 5 min. Each polyelectrolyte adsorption was followed by an intensive Tris/NaCl solution rinse. Eight alternate depositions of polycationic PAH and polyanionic PSS layers were built up.

2.2. Isolation and culture of MSCs from Wharton's jelly umbilical cord

Fresh human umbilical cords were obtained after full-term births with informed consent using the guidelines approved by the CHU of Nancy. Briefly, after rinsing in Hank's Balanced Salt Solution (HBSS) (Sigma) solution, cords were aseptically stored at 4°C in sterile saline until processing. Next, umbilical cord vessels were removed manually from cord segments, and the exposed Wharton's jelly was cut into very small pieces or explants of approx 1–2 mm. These explants were cultured in proliferation medium: alpha-MEM (Lonza) supplemented with 10% decomplemented FBS (Sigma) and 1% antibiotics (Penicillin and Fungizon®). Medium was changed every 2 days until the third passage. WJ-MSCs were used at the fourth passage and accordingly seeded at 3000 cells/cm^2 on $(PSS/PAH)_4$ film and glass slides (control) in α-MEM medium and incubated at 37°C under normoxic environment (21% O_2, 5% CO_2) and cultured until 80% of cell confluence.

2.3. Immunophenotyping

To detect cell surface antigens, cultured adherent cells after detachment with Trypsin-EDTA, were washed with phosphate-buffer saline (PBS) (Gibco). Cells were immunolabelled with the following anti-human antibodies: CD90-FITC, CD105-PE (Dako), CD34-FITC, CD45-FITC, CD73-PE, CD86-PE and HLA-DR-PE (BD Pharmingen, France). As controls, mouse IgG1-PE, IgG1-FITC and IgG1-HLA-DR (BD Pharmingen, France) were used. At least 10,000 events were acquired on BD FACS Calibur® flow cytometer, and the results were analyzed using WinMDI v2.8 software.

2.4. Cell stimulation

Once WJ-MSCs reached 80% of confluence, they were stimulated with appropriate medium (EBM-2) (Lonza) supplemented with either 5% FBS, and growth supplements (Single Quotes) including hydrocortisone, human epidermal growth factor (hEGF), vascular endothelial growth factor (VEGF), human fibroblast growth factor-b (hFGF-b), human R-3-insulin like growth factor-1 (R3-IGF-1), ascorbic acid, heparin and gentamicin/amphotericin-B. Medium was changed twice per week for 2 weeks.

AUTHOR COPY

2.5. Cell morphology

WJ-MSCs cultured on both surfaces (glass slides and $(PSS/PAH)_4$) were observed by optical microscopy (Nikon Diaphot, VFX-DX, Japan) to evaluate their morphology after 20 days of culture.

2.6. Nuclei staining

WJ-MSCs seeded on $(PAH/PSS)_4$ were incubated with DAPI (Calbiochem; vwr international), DNA intercalating agent, for 5 min at room temperature. Different fields were observed by fluorescence microscopy (Zeiss microscopy, Japan) and then cell's behavior was compared in photographs.

3. Results

3.1. Characterization of WJ-MSCs

Results are representative of those obtained using 3 umbilical cords. MSCs displayed a homogeneous fibroblast-like morphology with a positive expression of CD73, CD90 and CD105 (MSCs surface antigen markers), and a negative expression of CD34, CD45 (hematopoietic lineage markers), HLA-DR (MHC-class II) and CD86 (co-stimulatory molecule). Because WJ-MSCs expressed mesenchymal stem cells markers and did not express hematopoietic markers, they may be all considered mesenchymal origin.

3.2. Influence of FBS percentage on the morphology of WJ-MSCs

Microscopic observation showed that, after 20 days, MSCs cultured with 5% FBS formed three-dimensional spheroids on $(PSS/PAH)_4$. Spheroids did not appear when FBS percentage was reduced from 5% to 2% and cells grew, on $(PSS/PAH)_4$, in a monolayer aspect conserving the fibroblast-like morphology. MSCs cultured on glass slides, with 5% FBS showed normal monolayer growth after 20 days and reduction of FBS percentage to 2% had no effect on the behavior of these cells (Fig. 1).

3.3. Influence of FBS percentage on the nuclei repartition of WJ-MSCs

We investigated characteristics of spheroids (three dimensional) compared to monolayer cells (two dimensional) in order to further characterize them. DAPI staining showed nuclear aggregates when MSCs were cultured with 5% FBS on (PSS/PAH). Once percentage of FBS was reduced to 2%, a regular repartition of nuclei appeared. MSCs cultured on glass slides showed a normal repartition of nuclei whatever FBS percentage (Fig. 2). These results are consistent with those of optical microscopy.

4. Discussion

Stem cells have the ability to renew themselves and can be differentiated into specialized types: neurons, cardiomyocytes, muscle, insulin secreting cells, cartilage and osteocytes, upon numerous inductions. They are considered as good cell sources for tissue engineering. However, pluripotent stem cells can lose their stemness properties due to the *in vitro* culture environment. Embryonic stem cells (ESCs)

AUTHOR COPY

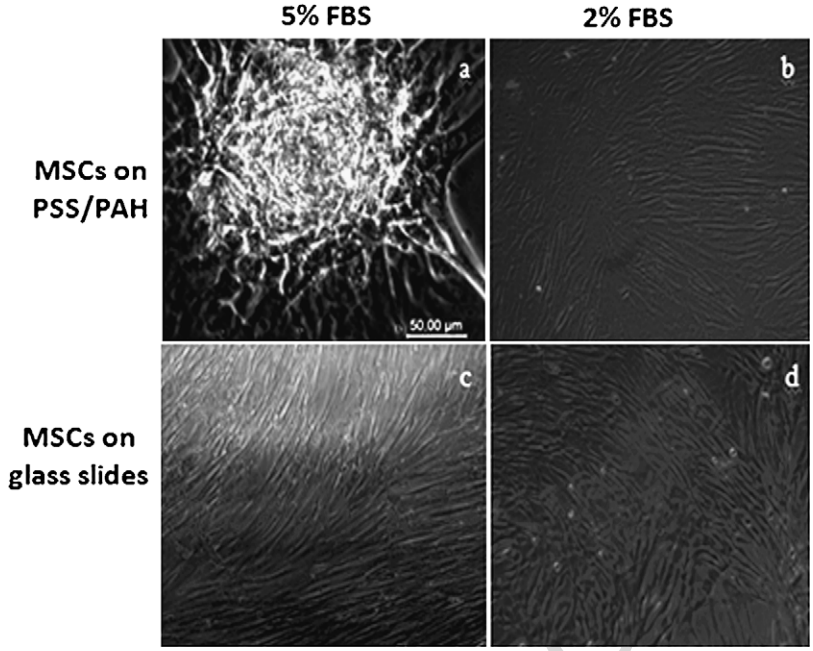


Fig. 1. Effect of FBS percentage on the WJ-MSCs cultured on PSS/PAH films and on glass slides in appropriate medium (EGM-2, Lonza®). Morphology of cells cultured on PSS/PAH and glass slides after 20 days in appropriate medium with 5% (a), (c) and 2% FBS (b), (d). The scale bar represents 50 µm (Nikon Diaphot, VFX-DX).

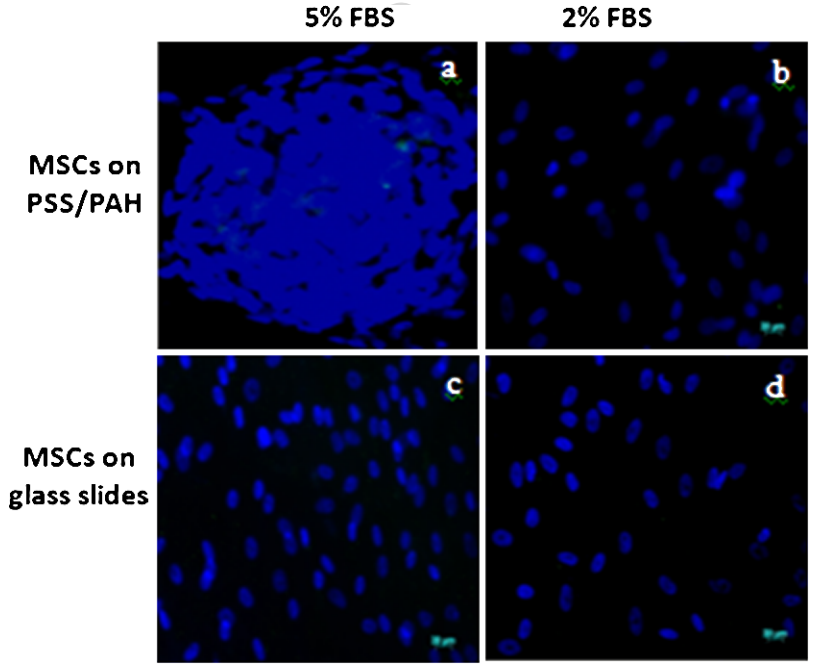


Fig. 2. Effect of FBS percentage on the WJ-MSCs cultured on PSS/PAH films and on glass slides in appropriate medium (EGM2, Lonza®). Photos of MSCs immunostained with DAPI after 20 days of culture in appropriate medium with 5% (a), (c) and 2% FBS (b), (d) (Zeiss microscopy, objective ×20). (Colors are visible in the online version of the article; http://dx.doi.org/10.3233/BME-130751.)

would be perfect because of their capacity to differentiate into virtually every kind of specialized cell in human body. However, the use of fertilized eggs to harvest ESCs is ethically controversial and involve teratoma formation after their implantation [16], which has rendered their clinical application difficult. On the contrary, tissue-specific adult stem cells, particularly MSCs, exhibit few ethical issues regarding their procurement, and thus have drawn much attention to their potential application in tissue engineering [16].

Different studies showed that MSCs behavior is highly dependent on physicochemical properties of the culture substrate. Recent literature has shown that collagen coating allowed an effective MSCs adhesion but it's essential for platelet aggregation and activation [17]. Moreover, fibronectin coated surfaces had enhancing effect on cell adhesion, however it suffers from being hydrolyzed and so there is a need for another substrate for clinical use [13].

In this report, we have used $(PAH\text{-}PSS)_4$ films as substrate for mesenchymal stem cells differentiation. Cell types such as endothelial cells [18] fibroblasts [19] osteoblastic cells [20] and hepatocytes [21] have been cultured on these films. As a general rule, adhesion and proliferation on these films are very good, which may be attributed partly to the presence of sulfonate groups. Moreover anti-inflammatory and antithrombogenic properties of this PEMF were also a reason for their selection [22]. Before seeding WJ-MSCs on this chosen support, we have examined their immune phenotype. No single marker was identified so far predictably defining MSC. Traditionally culture expanded MSCs are described to be negative for hematopoietic markers including CD45, CD14, CD34, as well as for the endothelial markers CD31, CD144. On the contrary MSCs express CD29, CD44, CD73, CD90, CD105 and CD146. In addition, MSCs are described by the expression of HLA class I but the absence of HLA class II and co-stimulatory molecules such as CD80 and CD86 [7,23]. Indeed our cells satisfied this panel.

We induced MSCs culture in commercial medium (EGM-2) supplemented with 5% FBS as recommended by Lonza. After a week of culture, MSCs were organized to form 3D spheroids on PAH-PSS architecture which was not the case on glass slides. Since studies have shown that the comportment of WJ-MSCs is highly dependent on mechanical environment of matrices [9] and on the culture conditions (growth factors, serum content, O_2 percentage . . .) [24], we worked out the percentage of FBS in EGM-2 medium and observed that within 2% FBS, cells developed in monolayers and remained fibroblast-like morphology.

Growing stem cells as spheres has been described in many research fields, such as tumourigenesis, pharmacogenetics, embryoid body formation from ESCs, and neurospheres from neuroprogenitors [25]. Bone marrow-derived MSCs have been induced to form 3D spheroids in recent years by culturing cells in microwells [26] or on micropatterned surfaces [26,27]. hBMSC spheroids on microfabricated surfaces had a more efficient osteogenic [25] or adipogenic differentiation [26,27]. However, no study has examined the automatic spheroid formation on a flat biomaterial, the stemness gene expression associated with MSC spheroids, or their chondrogenesis potential.

5. Conclusion

Therefore, the reduction of the percentage of FBS from 5% to 2% avoids 3D cell spheroids formation on PAH/PSS. Such structures may serve to maintain the self-renewal of MSCs and could guide bioengineering towards building 2D structures like cell layers or 3D structures by increasing the osteogenic or chondrogenic differentiation potential of MSCs. After solving the problem of spheroid like aspect, we will expand our study towards the expression of endothelial markers.

AUTHOR COPY

Acknowledgements

The first two authors have a financial support of Reviva Regenerative Medicine Center, Middle East Institute of Health, Bsalim, Lebanon.

References

[1] Z. Gong, G. Calkins, E.C. Cheng, D. Krause and L.E. Niklason, Influence of culture medium on smooth muscle cell differentiation from human bone marrow-derived mesenchymal stem cells, *Tissue Eng. Part A* **15**(2) (2009), 319–330.
[2] V.K. Bajpai and S.T. Andreadis, Stem cell sources for vascular tissue engineering and regeneration, *Tissue Eng. Part B Rev.* **18**(5) (2012), 405–425.
[3] J.L. Santos, D. Pandita, J. Rodrigues, A.P. Pego, P.L. Granja and H. Tomas, Non-viral gene delivery to mesenchymal stem cells: methods, strategies and application in bone tissue engineering and regeneration, *Curr. Gene Ther.* **11**(1) (2011), 46–57.
[4] S.P. Bruder, N. Jaiswal and S.E. Haynesworth, Growth kinetics, self-renewal, and the osteogenic potential of purified human mesenchymal stem cells during extensive subcultivation and following cryopreservation, *J. Cell Biochem.* **64**(2) (1997), 278–294.
[5] P.A. Conget and J.J. Minguell, Phenotypical and functional properties of human bone marrow mesenchymal progenitor cells, *J. Cell Physiol.* **181**(1) (1999), 67–73.
[6] L. Moroni and P.M. Fornasari, Human mesenchymal stem cells: A bank perspective on the isolation, characterization and potential of alternative sources for the regeneration of musculoskeletal tissues, *J. Cell Physiol.* **228**(4) (2012), 680–687.
[7] T. Margossian, L. Reppel, N. Makdissy, J.F. Stoltz, D. Bensoussan and C. Huselstein, Mesenchymal stem cells derived from Wharton's jelly: comparative phenotype analysis between tissue and *in vitro* expansion, *Biomed. Mater. Eng.* **22**(4) (2012), 243–254.
[8] N. Tsagias, I. Koliakos, V. Karagiannis, M. Eleftheriadou and G.G. Koliakos, Isolation of mesenchymal stem cells using the total length of umbilical cord for transplantation purposes, *Transfus. Med.* **21**(4) (2011), 253–261.
[9] S.B. Anderson, C.C. Lin, D.V. Kuntzler and K.S. Anseth, The performance of human mesenchymal stem cells encapsulated in cell-degradable polymer-peptide hydrogels, *Biomaterials* **32**(14) (2011), 3564–3574.
[10] S. Diederichs, S. Roker, D. Marten, A. Peterbauer, T. Scheper, M. van Griensven et al., Dynamic cultivation of human mesenchymal stem cells in a rotating bed bioreactor system based on the Z RP platform, *Biotechnol. Prog.* **25**(6) (2009), 1762–1771.
[11] A. Apel, A. Groth, S. Schlesinger, H. Bruns, P. Schemmer, M.W. Buchler et al., Suitability of human mesenchymal stem cells for gene therapy depends on the expansion medium, *Exp. Cell Res.* **315**(3) (2009), 498–507.
[12] J. van der Valk, D. Brunner, K. De Smet, A. Fex Svenningsen, P. Honegger, L.E. Knudsen et al., Optimization of chemically defined cell culture media – replacing fetal bovine serum in mammalian *in vitro* methods, *Toxicol. In Vitro* **24**(4) (2010), 1053–1063.
[13] A. Tiwari, H.J. Salacinski, G. Punshon, G. Hamilton and A.M. Seifalian, Development of a hybrid cardiovascular graft using a tissue engineering approach, *FASEB J.* **16**(8) (2002), 791–796.
[14] N. Berthelemy, H. Kerdjoudj, C. Gaucher, P. Schaaf, J.F. Stoltz, P. Lacolley et al., Polyelectrolyte films boost progenitor cell differentiation into endothelium-like monolayers, *Adv. Mat.* **20**(14) (2008), 2674–2678.
[15] E.M. Horwitz, D.J. Prockop, L.A. Fitzpatrick, W.W. Koo, P.L. Gordon, M. Neel et al., Transplantability and therapeutic effects of bone marrow-derived mesenchymal cells in children with osteogenesis imperfecta, *Nat. Med.* **5**(3) (1999), 309–313.
[16] I.G. Cohen and E.Y. Adashi, Human embryonic stem-cell research under siege – battle won but not the war, *N. Engl. J. Med.* **364**(22) (2011), e48.
[17] C.B. Weinberg and E. Bell, A blood vessel model constructed from collagen and cultured vascular cells, *Science* **231**(4736) (1986), 397–400.
[18] C. Boura, P. Menu, E. Payan, C. Picart, J.C. Voegel, S. Muller et al., Endothelial cells grown on thin polyelectrolyte mutlilayered films: an evaluation of a new versatile surface modification, *Biomaterials* **24**(20) (2003), 3521–3530.
[19] C. Brunot, B. Grosgogeat, C. Picart, C. Lagneau, N. Jaffrezic-Renault and L. Ponsonnet, Response of fibroblast activity and polyelectrolyte multilayer films coating titanium, *Dent. Mater.* **24**(8) (2008), 1025–1035.
[20] P. Tryoen-Toth, D. Vautier, Y. Haikel, J.C. Voegel, P. Schaaf, J. Chluba et al., Viability, adhesion, and bone phenotype of osteoblast-like cells on polyelectrolyte multilayer films, *J. Biomed. Mater. Res.* **60**(4) (2002), 657–667.
[21] C.R. Wittmer, J.A. Phelps, C.M. Lepus, W.M. Saltzman, M.J. Harding and P.R. Van Tassel, Multilayer nanofilms as substrates for hepatocellular applications, *Biomaterials* **29**(30) (2008), 4082–4090.

AUTHOR COPY

[22] T. Boudou, T. Crouzier, K. Ren, G. Blin and C. Picart, Multiple functionalities of polyelectrolyte multilayer films: New biomedical applications, *Adv. Mat.* **21**(4) (2009), 1–27.
[23] M.M. Carvalho, F.G. Teixeira, R.L. Reis, N. Sousa and A.J. Salgado, Mesenchymal stem cells in the umbilical cord: phenotypic characterization, secretome and applications in central nervous system regenerative medicine, *Curr. Stem. Cell Res. Ther.* **6**(3) (2011), 221–228.
[24] I. Rosova, M. Dao, B. Capoccia, D. Link and J.A. Nolta, Hypoxic preconditioning results in increased motility and improved therapeutic potential of human mesenchymal stem cells, *Stem. Cells* **26**(8) (2008), 2173–2182.
[25] T.J. Bartosh, J.H. Ylostalo, A. Mohammadipoor, N. Bazhanov, K. Coble, K. Claypool et al., Aggregation of human mesenchymal stromal cells (MSCs) into 3D spheroids enhances their antiinflammatory properties, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **107**(31) (2010), 13724–13729.
[26] W. Wang, K. Itaka, S. Ohba, N. Nishiyama, U.I. Chung, Y. Yamasaki et al., 3D spheroid culture system on micropatterned substrates for improved differentiation efficiency of multipotent mesenchymal stem cells, *Biomaterials* **30**(14) (2009), 2705–2715.
[27] Y. Miyagawa, H. Okita, M. Hiroyama, R. Sakamoto, M. Kobayashi, H. Nakajima et al., A microfabricated scaffold induces the spheroid formation of human bone marrow-derived mesenchymal progenitor cells and promotes efficient adipogenic differentiation, *Tissue Eng. Part A* **17**(3,4) (2010), 513–521.

AUTHOR COPY

III. Résultats et discussion de l'article

Les CSM sont généralement caractérisées par un profil d'expression de certains marqueurs. Elles n'expriment pas les marqueurs hématopoïétiques CD34, CD45 et CD14, les marqueurs endothéliaux tels que CD31 et CD144, les molécules du CMH-II tels que HLA-DR ni les molécules de co-stimulation tels que CD86 et CD80. Par contre, elles sont connues pour leur expression des marqueurs CD90, CD73, CD105, CD146 et CD29 avec une faible expression des molécules du CMH-I (284). La caractérisation de nos cellules montre qu'elles présentent ce panel d'expression et confirme leur caractère mésenchymateux.

Afin d'obtenir une différenciation endothéliale, les cellules ont été cultivées au 4ème passage sur les films $(PAH\text{-}PSS)_4$ à une densité de 3000 cellules/cm^2 et stimulées dans le milieu commercial (EGM2-Lonza) supplémenté avec 5% de SVF selon les recommandations du fournisseur. Après une semaine de culture, les CSM ont présenté une organisation en structures sphéroïdes tridimensionnelles sur les films mais pas sur les lames de verres considérées comme contrôles négatifs du support. Les études montrent que le comportement des CSM varie largement avec l'environnement mécanique des matrices (285) et des conditions de culture (concentration en sérum, facteurs de croissance, pourcentage d'O2…) (286). La majorité des protocoles de différenciation de CSM utilisés de nos jours utilisent des milieux supplémentés par du SVF du fait de la richesse de ce dernier en nutriments et facteurs de croissance. Alors que des concentrations comprises entre 10 et 20% sont utilisées pour l'amplification des CSM, la différenciation de ces cellules requiert généralement des concentrations variant entre 1 et 2% (287). L'effet que peut porter le sérum sur les propriétés et le comportement des CSM nous a incités à évaluer, dans nos conditions de différenciation, l'influence du SVF sur la conduite des CSM sur les films $(PAH\text{-}PSS)_4$. Les résultats obtenus montrent qu'en diminuant le pourcentage de SVF de 5% à 2%, les cellules se développent en monocouche avec une répartition régulière et normale des noyaux sans former des agrégats.

La formation de sphéroïdes tridimensionnels par les CSM, par culture dans des micropuits, a déjà été décrite par Wang *et al.* qui ont montré que ces structures ont un potentiel de différenciation ostéogénique et adipogénique (288).

Les résultats obtenus montre le pourcentage de SVF dans le milieu de culture est un facteur déterminant du comportement des CSM-GW sur les films $(PAH\text{-}PSS)_4$.

Chapitre 6 : Les propriétés immunomodulatrices des CSM-GW sont légèrement modifiées après différenciation vers un phénotype endothélial : impact sur les cellules T et NK.

I. Introduction

L'occlusion vasculaire reste la principale cause de décès dans les pays occidentaux, malgré les progrès constants réalisés dans les méthodes de traitements conventionnels pour la prise en charge de cette pathologie. Parmi ceux-ci, la chirurgie vasculaire, telle que la chirurgie de pontage de l'artère coronaire, nécessite des substituts vasculaires biologiquement actifs. Cependant, le manque de greffons autologues disponibles a conduit, au cours de la dernière décennie, au développement de l'ingénierie tissulaire vasculaire qui est devenue l'un des domaines les plus prometteurs dans la recherche, et commence à avoir du succès dans les applications cliniques. Pour l'ingénierie tissulaire vasculaire, les cellules autologues ont été considérées pendant longtemps comme les « gold standard » du fait que leur utilisation n'est pas soumise aux contraintes immunologiques et éthiques que présentent les cellules allo- ou xénogiques. Cependant, l'utilisation de cellules autologues, telles que les cellules endothéliales matures ou les cellules musculaires lisses, est confrontée à une variabilité de l'efficacité thérapeutique qui varie selon les donneurs, et à un risque de dédifférenciation des cellules pour des périodes de culture prolongées. L'idéal serait d'utiliser une source de cellules alternatives qui soient allogéniques, non immunogènes, avec un potentiel de prolifération élevé et une capacité de se différencier en cellules utiles pour l'ingénierie tissulaire vasculaire.

Le but de cette étude est d'évaluer si les CSM-GW différenciées en cellules endothéliales pourraient présenter une source alternative remplaçant les cellules autologues matures. Les CSM-GW sont reconnues pour leurs propriétés immunomodulatrices : elles sont des cellules immunoprivilégiées pouvant échapper aux mécanismes de défenses immunitaires et immunosuppressives. Ces propriétés sont très importantes et les premières à considérer en cas de transplantation *in vivo,* d'où la nécessité de vérifier si les cellules endothéliales différenciées à

partir de CSM-GW conservent ces propriétés afin de savoir si elles seront tolérées par le système immunitaire du receveur.

Cette étude est la première, à notre connaissance, à évaluer l'immunogénicité et l'immunosuppression des CSM-GW après différenciation en cellules endothéliales pour une utilisation en ingénierie tissulaire vasculaire. Afin de tester les effets immunomodulateurs avant et après différenciation sur la prolifération et activation des cellules immunitaires, nous avons réalisé des co-cultures avec des CMN du sang périphérique, des cellules T et NK, puis nous avons essayé d'identifier les facteurs et mécanismes impliqués dans ces effets.

II. Article

La version présentée ci-dessous n'est pas la version finale, des manipulations sont toujours en cours pour compléter au mieux les résultats et faire les analyses statistiques. La version définitive à soumettre est prévue pour fin août.

Immunomodulatory properties of Wharton's jelly mesenchymal stem cells are slightly modified after differentiation towards an endothelial phenotype: impact on T and NK cells.

Reine El Omar*§, Yu Xiong*†§, Huguette Louis‡§, Monique Gentils*§, Gabriel Dostert*§, Patrick Menu*§, Jean-François Stoltz*†§, Emilie Velot*§ and Véronique Decot*†§

* CNRS UMR UL 7365, Bâtiment Biopôle, Faculté de médecine, 9 Avenue de la Forêt de Haye, 54500 Vandœuvre-lès-Nancy, France

† CHU de Nancy, Unité de Thérapie Cellulaire et Tissus, allée du Morvan, 54511 Vandœuvre-lès-Nancy, France.

‡ Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM), U1116, Faculté de Médecine, Vandœuvre-lès-Nancy, France;
§ FR 3209, CNRS-INSERM-Université de Lorraine-CHU, Nancy, France;

Running title: immunomodulatory properties of mesenchymal stem cells after endothelial differentiation

Corresponding author:

-Dr Decot Véronique

Email: v.decot@chu-nancy.fr

Tel: 0033-383157937

Fax: 0033-83154858

Abstract

Wharton's Jelly mesenchymal stem cells (WJ-MSCs) are promising candidates for tissue engineering by virtue of their important immunomodulatory functions that allow them to escape immune recognition and to suppress several immune cells functions. However, few studies have investigated the effect of MSCs differentiation on these functions. To this end, we sought to determine the impact of endothelial differentiation on the immunomodulatory capacities of WJ-MSCs. After differentiation, endothelial like cells (ELCs) were positive for CD31, VE-Cadherin and VEGF-R2 and able to uptake acetylated low density lipoproteins. The expression of HLA-DR and CD86 involved in MSCs immunoprivilege was still weak after differentiation. ELCs or WJ-MSCs were then co-cultured with peripheral blood mononuclear cells (PBMCs), purified T or NK cells either in direct contact or not. The proliferation and phenotype of immune cells were analyzed and the mediators secreted by ELCs and WJ-MSCs were quantified. The inhibition of immune cells proliferation by both WJ-MSCs and ELCs was associated with metalloproteinases (MMPs)-2 and -9 detection in co-culture supernatants. IL-6, IL-1β, PGE2 and particularly IDO expressions were upregulated in ELCs upon stimulation by CD3+ T and NK cells, suggesting their possible involvement in the allosuppression. ELCs co-cultured with T cells were able to generate CD25+ T cells, which were shown to be a CD4+CD25+Foxp3+ regulatory subset. Direct contact with ELCs or WJ-MSCs with NK Cells showed a decrease of the activating receptor NKG2D. Moreover, we demonstrated that direct co-cultures with ELCs induce CD73 expression on NK cells, a mechanism that may induce adenosine secretion by NK cells and lead to an immunosuppressive function. Taken together, ours results showed that ELCs obtained following WJ-MSCs differentiation remain mainly immunosuppressive but their action depends on the immune cell type.

Keywords: Stem cells, NK cells, T cells, endothelial-like cells, immunsuppression, immunoprivilege

I. Introduction

Vascular occlusion remains the leading cause of death in Western countries, despite conventional treatment approaches. Among these, vascular surgery with coronary artery bypass requires biologically responsive vascular substitutes. The lack of available autologous grafts has led over the past decade to the development of vascular tissue engineering. The use of autologous cells for vascular tissue engineering have been considered for a long time as the gold standard, because they are not surrounded by the immunological and ethical issues of allo- or xenogenic cells. However, isolation, expansion, and quality of autologous cells, such as mature endothelial cells or smooth muscle cells, suffer from donors' variability and prolonged *in vitro* culture, which induced dedifferentiation. The alternative would be to use an allogeneic source of cells, with a high proliferation potential and the ability to differentiate into cells useful for vascular tissue engineering (1).

Mesenchymal stem cells (MSCs) are a rare population of multipotent precursors that can be isolated from several tissue sources, such as bone marrow or adipose tissue, and also differentiated into different lineages under appropriate induction conditions (2). Due to their many beneficial properties described in the last years, these cells have been considered as promising therapeutic tools for tissue repair. Upon the available MSCs sources, Wharton's jelly, a neonatal connective tissue of the umbilical cord, is among the most promising. Wharton's jelly MSCs (WJ-MSCs) are more primitive than MSCs isolated from other tissue sources. They have non-invasive accessibility and their use does not trigger ethical controversy. Their high proliferative potential, their differentiation capacity and their immunomodulatory properties made them good candidates to be used in an allogeneic context. Indeed, MSCs are considered as immunoprivileged cells because of their weak cell surface expression of class II human leukocyte antigen (HLA-II) and co-stimulatory molecules (3). They are also immunosuppressive because they release many anti-inflammatory and immune-suppressive factors leading to the inhibition of several functions (proliferation, production of soluble factors and cellular toxicity) exerted by diverse immune cells such as T-, B-, dendritic- and natural killer (NK) cells (4). Another important property of MSCs is the modulation of immune responses through the generation of regulatory T cells (Tregs) (5). Immune suppression by MSCs seems to be a multifactorial process involving both direct cell-to-cell interactions and contact-independent mechanisms through the secretion of soluble factors (6). The precise mechanisms and factors

implicated in the immunosuppressive effects of MSCs still remain unclear. Direct contact immunosuppressive effects appear to be mediated by molecular interactions leading to the inhibition of activation signals. Among the immunomodulatory molecules expressed by MSCs cell surface, B7-H1 (CD274), B7-H3 (CD276) and B7-H4 from the B7 family (7), class 1b MHC molecules, CD200 and its receptor CD200R (8,9) seemed to be involved. Among the soluble factors, transforming growth factor-β (TGF-β), indoleamine-2,3-dioxygenase (IDO), interleukins-6 and 10, prostaglandin E2 (PGE2), matrix metalloproteinases (MMP) or adenosine are under investigations (3,10). More particularly, PGE2 and IDO are able to inhibit PBMCs or T cells proliferation and activation. These 2 mediators seem also involved in the inhibition of NK cells, which are very early recruited on the inflammatory site of injured tissues, and the down regulation of functional NK receptors (11,12).

Despite their immunoprivileged capacity, MSCs used for tissue engineering are usually differentiated into the required type of cells. Reported studies on MSCs hypoimmunogenicity are mostly based on *in vitro* or *in vivo* experiments using undifferentiated cells. One of the most interesting enquiries in regenerative medicine is, whether these cells, upon differentiation into the local cell types of the transplantation site, would retain their immunoprivileged and immunomodulatory properties. Such a question became critical in view of the fact that an allogeneic engineered tissue must be tolerated by the host immune system to remain functional and avoid rejection.

While there is a lot of available literature on the immunological features of bone marrow MSCs after differentiation into adipose, cartilage or bone cells (13,14), neurons (15) or endothelial cells (16,17), very few studies have been performed on the immunological properties of WJ-MSCs after differentiation (18).

In the present study, we investigated the immunosuppressive and immunoprivileged characters of WJ-MSCs after differentiation towards an endothelial phenotype, in order to use them for vascular tissue engineering. To this end, endothelial differentiation was triggered by seeding WJ-MSCs on poly(allylamine hydrochloride) (PAH) and poly(styrene sulfonate) (PSS) multilayer films in presence of EGM^{TM}-2 for two weeks. Then, we performed co-cultures of endothelial-like cells (ELCs) with PBMCs, T cells or NK cells to evaluate the immunomodulatory effects of WJ-MSCs before and after differentiation, on immune cells

proliferation and phenotype. We also tried to identify the soluble mediators involved in these effects.

Ours results showed that endothelial like cells (ELCs) obtained after WJ-MSCs differentiation remain immunoprivileged and immunosuppressive and that their action vary depending on the immune cell type.

II. Material and Methods

Reagents were provided by Sigma-Aldrich (Germany), unless specified otherwise.

WJ-MSCs isolation and culture

Fresh human umbilical cords were obtained after birth delivery and informed consent using the guidelines approved by the University Hospital Center of Nancy. Cords were stored in Hank's balanced salt solution (HBSS) before tissue processing to obtain MSCs. After blood vessels removal, the exposed Wharton's jelly was collected and cut into very small pieces which were then cultured in Alpha Minimum Eagle Medium (α-MEM, Lonza, France) at 37ºC and in 5% CO_2 in a six-well plate. The medium was supplemented with 10% heat inactivated fetal bovine serum (FBS), 100 IU/ml Penicillin/100 µg/ml Streptomycin, 2 mM L-glutamine, and 205 mg/ml Fungizon®. Medium was changed every three days. Expansion of WJ-MSCs was obtained with successive cycles of trypsinization and seeding.

Induction of endothelial differentiation

When reaching confluence at the 3rd passage, WJ-MSCs were collected and seeded at a density of 3000 cells/cm^2 in a 24-well plate on $(PAH/PSS)_4$ polyelectrolyte multilayer film coated glasses as described elsewhere (19). Non covered glasses were used as a negative control for the differentiation. The cells were cultured in αMEM medium until reaching 60% of confluence on treated or non-treated glass. The medium was next replaced by endothelial basal medium (EBM-2, Lonza, France) or differentiation medium which consisted of endothelial growth medium-2 (EGM™-2: EBM-2 with growth factors; Lonza, France) for two weeks. Medium was changed every two days. EBM-2 is supplemented with 0.5% heat inactivated FBS, 100 IU/ml Penicillin/100 µg/ml Streptomycin, 2 mM L-glutamine, and 205 mg/ml Fungizon®. As control, cells were cultured either on non-coated or coated glasses with EBM-2. Cells were monitored

daily by optical microscopy (Nikon, UFX-DX, Japan) to evaluate their morphology. Following 15 days of culture under the differentiation conditions with EGM-2, cells were termed as endothelial like cells (ELCs). Both WJ-MSCs and Human Umbilical Vein Endothelial Cells (HUVECs) were respectively used as negative and positive controls (20,21). HUVECs were isolated according to Jaffe *et al*. (22) and cultivated in EBM-2 this time supplemented with 10% heat inactivated FBS. Medium was replaced every two days. Cells were used as a control at the second passage of culture.

Endothelial like Cells characterization

Endothelial differentiation was verified by Western blot. Total protein from samples was extracted using RIPA buffer supplemented with EDTA-free protease inhibitor cocktail (Roche, Germany). Total protein concentration was determined by using DC™ Protein Assay (Bio-Rad, France). 20 µg of proteins from each sample were loaded on on 4-20% Mini-Protean® TGX precast gels (Bio-Rad, France) and electrophoresed at 200 V for 1 h. The proteins were then transferred to PVDF membranes. The membranes were incubated in blocking agent consisting of 5% BSA in Tris-buffered saline/Tween (TBST, pH: 7.4) for CD-31, vascular endothelial (VE)-Cadherin and glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH), or 5% milk /TBST for vascular endothelial growth factor receptor (VEGF-R)2, for 1h at room temperature. Primary antibodies to GAPDH (1/1000, Santa Cruz, sc-51906), VEGF-R2 (1/1000, Cell Signaling Technology, 55B11), VE-cadherin (1/1000, Abcam, ab33168) and CD31 (1/1000, Dako, M0823) were incubated overnight at 4°C. Membranes were then washed with TBST three timesand incubated for 1h at room temperature with the appropriate horseradish peroxidase (HRP) conjugated secondary antibodies: goat anti-mouse for CD31 and goat anti-rabbit for VEGF-R2, VE-Cadherin and GAPDH. Membranes were washed three times, and HRP was detected by enhanced chemiluminescence (ECL, Santa Cruz, USA). CD31, VE-Cadherin and VEGFR-2 are endothelial phenotype markers. GAPDH was used as loading control.

Endothelial cells have the ability to incorporate acetylated low density lipoprotein (Ac-LDL). ELCs functionality was assessed using an Ac-LDL uptake assay. The specificity of the Ac-LDL uptake by cells was qualitatively observed using 1,1'-dioctadecyl-3,3,3',3'-tetramethylindo-carbocyanine perchlorate labeled Ac-LDL (Dil-Ac-LDL, 0.8 µg/mL for four hours; Life

Technologies, France). Cells were then washed and fixed with 4% paraformaldehyde for 15 min at room temperature. A nucleus staining was performed using 4', 6'-diamidino-2-phenylindole (DAPI, Sigma Aldrich, St Louis). Cells were visualized using fluorescence microscopy (Leica DMI3000 B) after using the appropriate excitation and emission filters for Rhodamin B ($554nm_{Ex}/571nm_{Em}$) and DAPI ($364nm_{Ex}/454nm_{Em}$).

PBMCs, T cells and NK cells isolation

Peripheral blood samples were obtained from healthy volunteers who gave informed consent for blood collection and biological studies using the guidelines approved by a French blood collection center. Peripheral Blood Mononuclear Cells (PBMCs) were prepared with Ficoll density gradient centrifugation (Lymphocyte separation medium, Eurobio, France, density: 1.077 g/ml). After the washing step, the cells pellet was either suspended in complete Roswell Park Memorial Institute medium (RPMI)-1640 medium (Eurobio, France) supplemented with 10% human AB serum before counting to be used as unsorted PBMCs or suspended in magnetic-activated cell sorting buffer (PBS, 0.5% Human serum albumin, 2mM EDTA) before sorting. The cell suspension was incubated with anti-CD3 magnetic particles (Miltenyi Biotec, Germany) for 15 minutes at 4°C using 20 µl for 10^7 cells. Cells were washed and passed through a LD magnetic-activated cell sorting separation column (Miltenyi Biotec, Germany). Unbound cells containing NK cells were counted, and the proportion of NK population, before expansion, was evaluated by flow cytometry. The positive fraction containing T cells was eluted with the separation buffer after removing the column from the magnetic field and the purity of this population was also evaluated by flow cytometry before expansion. NK Cells were expanded 14 days in presence 50 ng/ml IL-15 (Miltenyi Biotec, Germany) as previously described (23). The medium was changed every two days, and the concentration of the cells adjusted to 1.10^6/ml. CD3+ T cells were resuspended at 1.10^6/ml in RPMI-1640 medium supplemented with 10% SAB, 2 mM glutamine, 1 µg/mL streptomycin, 1 UI/mL penicillin, in presence of 5 µg/ml of phytohemagglutinin (PHA). After 3 days of culture, 100 µg/ml IL-2 (R&D System, France) was added to the culture medium. The medium supplemented with IL-2 was changed every two days until day 14.

In vitro assays for testing WJ-MSCs or ELCs immunomodulatory effects on PBMCs proliferation

One way mixed lymphocyte reaction

To determine if WJ-MSCs or ELCs have functions as alloantigens presenting cells, one-way mixed lymphocyte reaction (MLR) was performed. WJ-MSCs (2.10^5 per well) were plated in duplicate in 24-well plate and allowed to adhere to the plate 24 hours before co-culture. ELCs differentiated in 24-well plate were used 14 days after of culture in EGM-2. Freshly isolated PBMCs were then added to the wells at a 1:1 ratio and allowed to proliferate during 4 days. PBMCs seeded alone were used as control. Co-cultures were performed either by putting the two cell populations in direct contact or by separating them using a transwell membrane (TW; pore size: 0.4µm; Millicell® Inserts, Dutscher, France). After 4 days of culture, non-adherent immune cells, adherent ELCs and WJ-MSCs and supernatants were respectively collected for DNA quantification, RNA extraction and cytokine dosage.

Mitogen stimulated PBMCs proliferation

To estimate the effects of WJ-MSCs or ELCs on Phytohemagglutinin (PHA)-stimulated proliferative response of allogeneic PBMCs, freshly isolated responder PBMCs (2.10^5/well), stimulated with 10 µg/ml PHA (Oxoid, France), were added to WJ-MSCs or ELCs cultures, previously seeded as described above. Cultures of unstimulated and PHA-stimulated PBMCs seeded without WJ-MSCs or ELCs were used as controls. Co-cultures were performed either by putting the two cell populations in direct contact or by separating them using a transwell membrane.

WJ-MSCs and ELCs co-cultures with T cells or NK cells

Immune cells (expanded T or NK cells) were cultured in duplicates at 2.10^5 cells per well in 24-well plates with WJ-MSCs and ELCs at a ratio of 1:1 in RPMI-1640 10% FBS, IL-2 100 µg/ml for co-cultures with T cells, and in α-MEM 10% FBS, 50 ng/ml IL-15 for those with NK cells either in direct contact or separated by a transwell system for 4 days. For inhibition experiments, the cells were cultured in presence of 6 µmol of the MMPs inhibitor SB-3CTand 1 mmol of the IDO inhibitor 1 methyl tryptophan (1MT).

Measure of immune cells proliferation

DNA of immune cells (PBMCs, T cells or NK cells) in co-culture was measured as a marker of cell quantity using a Hoechst 33258 dye (Invitrogen, USA). After adding 100 µl of Hoechst buffer [10 mM de Tris base, 1mM EDTA (Merck, K13490018), 0.1M NaCl (VWR, 08L18005)], cell suspensions were lysed by sonication for 15 minutes. 900 µl of Hoechst solution (0.1 µg / mL) were then added to each sample. Samples were distributed in triplicates in a black-walled and bottomed 96-well plate. Calf thymus DNA was used as a standard to determine DNA quantity in samples. Fluorescence was measured with an excitation wavelength at 348 nm and emission wavelength at 456 nm.

Flow cytometry

Cells (1.10^6) were incubated in cell staining buffer (PBS, 0.5% human serum albumin (HAS)) and stained with diluted fluorescein isothiocyanate (FITC), phycoerythrin (PE) or allophycocyanin (APC) conjugated antibodies (CD25 FITC, CD3 APC , forkhead box P3 (FoxP3) PE, CD73 PE, CD90 FITC, CD105 PE, CD34 PE, CD45 FITC, and corresponding isotype controls from BD Pharmingen; HLA-DR PE, CD86 PE, CD16 FITC, CD56 APC, NKG2D PE and corresponding isotype controls from Miltenyi Biotec) for 30 minutes at room temperature followed by 2 washes in staining buffer. For intracellular staining of FoxP3, cells were fixed with 1% paraformaldehyde and permeabilized with PBS 0.5% HSA, 0.1% Triton™ X-100. Labeled Cells were acquired on a FACS Canto I (BD Biosciences, USA) and 100 000 events were analyzed using FACS Diva Software (BD Biosciences, USA). Immune cells were phenotyped after co-culture with or without WJ-MSCs or ELCs in direct contact or separated by a transwell, and in presence or absence of IDO or MMPs inhibitors. NK cells were identified as CD16+CD56+ cells, on which the expression of NKG2D and CD73 was determined. Regulatory T cells (Tregs) were identified as CD25+FoxP3+ cells gated on the CD4+ population. T cells were identified as CD3+ cells, on which the CD25 marker was analyzed. WJ-MSCs phenotype was checked before and during differentiation into ELCs by analyzing the expression of CD73, CD90 and CD105 and the absence of expression of CD34 and CD45. The expression of two immunological markers, HLA-DR and CD86 was monitored before and during differentiation.

RNA extraction and Real-Time polymerase chain reaction

After removing the suspension of lymphocytes from co-cultures, adherent cells were carefully washed twice with PBS, then lysed with 1 ml of Qiazol lysis reagent (Qiagen, USA) and kept at -80°C until further processing. Total RNA was extracted using RNeasy Micro kit (Qiagen, USA) according to manufacturer's instructions. First-strand cDNA was synthesized with the iScript cDNA synthesis kit (Bio-Rad, France) using 20 µl of reaction mixture containing 100 ng of total RNA, 4 µl of 5x iScript Reaction Mix. 1: 10 diluted cDNA samples were then used, and in the case of negative controls, cDNAs were replaced by RNase/DNase free water. QRT-PCR was carried out in duplicates using 20 µl of reaction mixture that contained 4 µl of reverse transcription mixture, 0.3 µmol/l of both primers, and 10 µl of iTaq Universal SYBR® Green Supermix (Bio-Rad, France). Cycling parameters were 10 min at 95°C, 40 amplification cycles were performed with each cycle consisting of 95°C for 15 sec followed by the primers annealing temperature (Tm) for 1 min (table I). Analyses and fold differences were determined using the comparative cycle threshold (C_T) method. Fold change was calculated from the $\Delta\Delta C_T$ values with the formula $2^{-\Delta\Delta CT}$ and data are relative to control values. The generation of single amplicon products was confirmed by melt curve analysis. Gene expression was normalized to the level of RP29 housekeeping gene.

Cytokine determination in cell culture supernatants by cytokine bead array

Interleukin-12p70 (IL-12p70), tumor necrosis factor (TNF), IL-10, IL-6, IL-1β and IL-8 concentration were quantitatively measured in culture supernatants using the BD cytometric bead array (CBA) Inflammation kit (BD Bioscience, USA). Operations were performed according to the manufacturer's instructions. 50 µl of culture supernatants were mixed with 50 µl of the mixed capture beads and 50 µl of the Human Inflammation PE Detection Reagent. The tubes were incubated at room temperature for 3 hours in the dark, followed by a wash step. The samples were then resuspended in 300 µl of wash buffer before acquisition on the BD FACSCanto™ flow cytometer. The data were analyzed using the CBA software. Standard curves were generated for each cytokine using the mixed bead standard provided in the kit and the concentration of cytokine in the cell supernatant was determined by interpolation from the appropriate standard curve.

SDS-PAGE zymography for the detection of MMP-2 and MMP-9

Supernatants from different conditions were collected and analyzed as previously shown (24). Briefly, sample were mixed with 2X non-reducing loading buffer (10% SDS SDS, 0.5M Tris-HCl pH 6.8, 0.1% bromophenol blue, glycerol) and equal volumes of each sample were loaded in 8% SDS-polyacrylamid gels copolymerized with 3 mg/ml type A Gelatin from porcine skin (G-6144, Sigma) and 3 mg/ml type B Gelatin form bovine skin (G-6650) and run for 2 hours at 100 V. After electrophoresis, the gels were rinsed three times for 20 min at room temperature in renaturing buffer [2.5% Triton^{TM} X-100 (T8532, Sigma)], and then incubated overnight at 37°C in developing buffer (containing, per liter, 50 mM of Tris-base, 0.2% of Brij-35, 200 mM NaCl, 5 mM $CaCl_2$, pH 7.6). After the incubation, staining was performed for 15 min at room temperature in 0.1 % Coomassie blue / 10% acetic acid solution, and gels were then destained appropriately. Areas of gelatinolytic activity appeared as clear bands on a blue background where the proteases have digested the substrate. Gels were finally scanned with a GS-800 calibrated imaging densitometer (Bio-Rad, France) and analyzed using image J software.

Statistical analysis

Data are presented as mean ± SEM for each condition. Pairwise comparisons were performed using one-factor ANOVA with Fisher correction (Statview IVs, Abacus Concepts Inc., Berkley, CA). Differences were considered significant for p (rejection level of the null-hypothesis of equal means) values < 0.05.

III. Results

A. Characterization of the endothelial like cells

Morphological changes

Before the induction of differentiation and to ensure their mesenchymal nature, WJ-MSCs were phenotyped and were found positive for the expression of CD90, 105 and 73 and negative for the expression of CD34 and CD45 (data not shown). Because EGM-2 was shown to induce endothelial differentiation in human amniotic fluid derived stem cells (25), mesenchymal stromal cells (26) and previous results of our team have shown that $(PAH\ PSS)_4$ polyelectrolyte multilayer films improve WJ-MSCs (27) and endothelial cells culture (28), these 2 stimuli were

either used alone or combined to induce endothelial differentiation of WJ-MSCs. The results showed that the differentiation into an endothelial phenotype was induced by cultivating WJ-MSCs at the 4th passage, seeded on $(PAH/PSS)_4$ coated glasses, in presence of EGM-2 (0.5% FBS). After 2 weeks of culture, cells underwent a distinct process of morphological transformation from spindle to caudated or oval shape with eccentric nuclei (figure 1-A: a). Cells seeded on films or on glass in EBM-2, as well on glass in EGM-2 showed no morphological difference with undifferentiated WJ-MSC (figure 1-A: b, c and d).

Phenotype, HLA-DR and CD86 expressions and functionality of ELCs

To determine whether the expression of WJ-MSCs markers was modified along the differentiation with EGM-2, the expression of CD90, 105 and 73 was monitored at 5, 10 and 15 days of culture. An around 50% decrease of mesenchymal markers CD105 and CD90 was observed at day 5. This decrease is the same at day 15 for CD90 and goes on under 20% for CD105.. The expression of CD73 did not change whatever the day. As the absence of HLA-DR and co-stimulatory molecules CD86 (B7-2) are mainly responsible of MSCs immunoprivilege, we examined their expression, knowing that CD86 is one of the co-stimulatory molecules that combine with T cells CD28 along their differentiation. The expression of HLA-DR was faintly positive in ELCs, it increased from 1.5%±0.1% at day 5 to 2.1%±0.8% at day 15. Concerning CD86, the expression of the co-stimulatory molecule went from1.5%±0.8% at day 5 to 1.9%±0.8% at day 15 (figure 1-C).

CD31, VE-cadherin and VEGF-R2 are three endothelial-specific markers known to play an important role in the endothelium maturation during angiogenesis process (29,30). Therefore, the expression of these 3 endothelial markers by ELCs was next evaluated and compared to HUVECs and naïve WJ-MSCs used as positive and negative controls respectively. Western blot analysis confirmed the endothelial phenotype of cells seeded on films and treated with EGM-2. with A positive expression of CD31, VE-Cadherin and VEGF-R2 was detected in ELCs as in HUVECs, whereas naïve WJ-MSCs were negative (figure 1-B: c).

The last characteristic of endothelial cells we tested was the ability of ELCs to take up ac-LDL. We observed that differentiated cells also have the ability to incorporate Dil-Ac-LDL, a typical

function of endothelial cells (figure 1-D: c). Parallel experiments with HUVECs and WJ-MSCs served respectively as positive and negative controls.

B. Immune characterization of the endothelial like cells

ELCs do not stimulate allogeneic PBMCs proliferation and inhibit the proliferation of mitogen-stimulated PBMCs.

Several studies reported that MSC-mediated immunosuppression involves both cell contact-dependent and –independent mechanisms through the release of soluble factors (31). In order to probe the role of cell contact in ELCs immunomodulation, experiments were performed with and without a transwell system that prevented direct contact between the two cell populations.

To address whether ELCs could act as antigen presenting cells and stimulate the proliferation of PBMCs, differentiated cells were incubated with an equal number of non-activated PBMCs for 3 days either with or without cell contact in a one way MLR assay. As shown in figure 2 A, ELCs and WJ-MSCs significantly suppress the proliferation of PBMCs (respectively 0.13 µg/ml and 0.16 µg/ml versus 0.4 µg/ml for PBMCs alones; $p<0.05$) and this effect was mainly observed when cells were cultured in direct contact but not separated by a transwell system. We next investigated if ELCs can inhibit the proliferation of mitogen-stimulated PBMCs. ELCs were incubated with equal number of PBMCs in presence of PHA for 3 days. The proliferation of PBMC stimulated with PHA served as a positive control. Results showed, first, that ELCs inhibited significantly PBMCs proliferation in response to PHA, and second, that this inhibition was only observed in cell-cell contact co-cultures (0.32 µg/ml versus 0.75 µg/ml for PHA-PBMC; $p<0.01$). The immunosuppressive effect of native WJ-MSCs was confirmed as PHA stimulated PBMC proliferation was significantly inhibited in a direct cellular contact with WJ-MSC (0.43 µg/ml versus 0.75 µg/ml for PHA-PBMCs alone; $p<0.05$). Mitogen-stimulated PBMCs proliferation was almost restored in transwell co-cultures (approximately 0.76 µg/ml for both co-cultures versus 0.75 for PHA-PBMCs alone), showing a major role of cellular contact in the immunosuppressive effect mediated by ELCs as well as WJ-MSCs.

Cytokine profile in ELCs/PBMCs and WJ-MSCs/PBMCs co-culture supernatants

To identify whether the suppressive effect was influenced by cytokines secreted by ELCs or WJ-MSCs or not, IL-1β, IL-6, IL-8, IL-10, IL-12p70 and TNF-α were quantified in the cell culture

supernatants of culture using a BD CBA. Concentration of cytokines detected in conditioned medium of PHA-activated PBMCs cultured in absence of WJ-MSCs or ELCs was considered as positive control.

WJ-MSCs and ELCs induced a total inhibition of IL-12p70 secretion compared to the positive control, and a reduction in the concentrations of TNF-α, IL-8, IL-10. We detected an increase of the concentration of IL-6 in both co-cultures with a greater concentration in ELCs/PBMCs co-culture (16022.1 pg/ml versus 5438.73 pg/ml for PHA-PBMCs alone) in comparison with WJ-MSCs/PBMCs co-culture (9201.97 pg/ml versus 5438.73 pg/ml for activated PBMCs alone). IL-1β concentration was augmented only in WJ-MSCs/PBMCs co-culture (1958.16 pg/ml versus 126.3 pg/ml for PHA-PBMCs alone), it was unchanged in ELCs/PBMCs co-culture.

Impact of ELCs on T and NK cells after co-culture

To reduce the interference from other cellular components such as B cells, monocytes and dendritic cells, we decided to investigate the effect of WJ-MSCs on T and NK cells. We isolated CD3+ T cells (purity >98%) and amplified them in presence of PHA and IL-2 for 15 days. CD3 negative cells were cultured for 15 days, in presence of IL-15 to amplify NK cell population. Purity of NK population was checked before co-cultures and reached 90%. NK and T cells were then cultured in the presence or absence of WJ-MSCs and ELCs, and either allowed or prevented cell-cell contact. Proliferation of activated T or NK cells was considered 100% of proliferation response (positive control).

1. Immunosuppressive effects of ELCs observed on T cells

T cells are major effectors of adaptive immunity. A large number of data confirmed the immunosuppressive effect mediated by MSCs on T-cells (32–38). In agreement with previous reports, our results showed that WJ-MSCs significantly reduced proliferation of CD3+ cells (43.01%±2.71%), and this inhibition was more pronounced in co-cultures with cell-cell contact. Transwell co-cultures partially restored CD3+ proliferation (57.81%±21.81%). A greater inhibition in the proliferation of CD3+ was observed in presence of ELCs, with a proliferation reaching 36.51%±10.92%, and this inhibition was also partially restored in transwell conditions (73.78%±0.63%) (figure 3-A).

MMPs have been identified to possess a broad range of substrate specificity that includes inflammatory mediators and other cytokines, which means that they are involved in the regulation of immune response and cell proliferation (39–41). As MSCs and mature endothelial cells are both able to secrete these mediators and as they were recently shown to be involved in immunomodulatory effects (39,40), we wanted to determine whether WJ-MSCs and ELCs express soluble active forms of MMP-2 and -9. To this end, we proceeded to detect their activity by gelatin zymography. As shown in figure 3-B1, MMP-2 and MMP-9 were readily detected in WJ-MSCs and ELCs cultures and MMP-2 were increased in both co-cultures, only in the direct contact condition. To assess the suppressive effect of MMPs on T cell proliferation, we next examined the ability of a MMP inhibitor, SB-3CT to restore T cell proliferation. The addition of SB-3CT, a specific inhibitor of MMP-2 and MMP-9, restored slightly the proliferation of T cells (42.18±0.475% and 54.16±2.98 for respectively co-cultures with ELCs and WJ-MSCs) (figure 3-B2), indicating that MMP-2 and -9 are weakly involved in ELCs and WJ-MSCs mediated T cells-immunosuppression. In contrast, no effect of the inhibitor was seen in a transwell system.

We next explored candidates as mediators of the suppression driven by ELCs. As IDO, IL-1β IL-6, PGE2, HGF and TGF-β were reported as mediators of T cell suppression by MSCs, we examined the expression of these genes related to MSCs immunomodulatory functions before and after endothelial differentiation upon co-cultures with T cells. WJ-MSCs or ELCs without T cells were considered as controls and expression levels were normalized using the housekeeping gene RP29 and compared to these controls. After co-culture with T cells, expression of IL-6 was 30 and 15.3 fold higher than the controls for ELCs and WJ-MSCs respectively. Regarding the transwell condition, the expression of IL-6 was reduced for WJ-MSCs whereas was increased for ELCs. The expression of IL-1β after co-culture was 24.15 and 25.13 fold higher for ELCs and WJ-MSCs respectively than in controls. Furthermore, we detected a higher expression of IL-1β in ELCs than in WJ-MSCs with a marked increase in the transwell condition for ELCs. Expression level of COX-2, the enzyme producing PGE2, was almost similar in all the conditions. Concerning IDO, in presence of a direct interaction between T cells and WJ-MSCs, there was a high expression level of this enzyme, which was reduced by approximately 5 fold when cells were separated by a transwell. The analysis of the enzyme expression in ELCs in contact co-cultures showed firstly, than the enzyme was

expressed 12.82 fold higher than in the control and secondly, that the expression was 7 fold higher in the contact condition than in transwell. However, the expression of IDO in ELCs was 5.22 and 7.4 fold lower compared to WJ-MSCs in contact or in transwell conditions respectively. No changes in the expression of HGF, COX-1, and TGF-β were detected in any of these conditions (data not shown) (figure 3-C).

ELCs induce the generation of T cell subsets displaying a regulatory phenotype

As an inhibition of T cells proliferation was observed after co-culture with WJ-MSCs or ELCs, we hypothesized that a hyporesponsiveness to IL-2 could be involved. This hypothesis was based on the paper of Ding *et al.*, where they showed that the inhibition of T cells proliferation was due to a shedding of the IL-2 receptor CD25, mediated by MMPs (39). As we detected MMPs in the cell supernatant of ELCs and WJ-MSCs / T cells co-culture, we next explored whether the presence of MMPs in these co-cultures could affect CD25 expression. The flow cytometry analysis showed a clear increase of CD25+ T cells percentage after co-culture with ELCs or WJ-MSCs in direct interaction (59.1% and 42.6%) compared to T cells alone (18.6%) (figure 4-A). The percentage of cells expressing IL-2 receptor was also slightly increased in presence of a transwell system. If MMPs were involved in the shedding of CD25, the addition the MMPs inhibitor should increase the percentage of cells expressing CD25. Therefore, we performed co-cultures in presence of SB-3CT, inhibitor of MMP-2 and MMP-9, since we reported an enhanced expression of these two enzymes in co-cultures. After co-culture with ELCs or WJ-MSCs, in presence of SB-3CT, the percentage of T cells expressing CD25 was similar for the cells cultured without SB-3CT either in contact or separated by a transwell (figure 4-B).

Among the candidates explored as mediators of the immunosuppression, IDO was particularly increased after co-culture with WJ-MSCs or ELCs. As it is considered one of the principal immunosuppressive factors secreted by human MSCs and as it was among the most expressed factors in our co-cultures, we investigated the effect of its inhibition by 1MT on CD25 expression. We could not notice any remarkable effect on the CD25+ T cells neither after co-culture with WJ-MSCs or ELCs nor with ELCs in presence of a transwell. However, the percentage of T cells expressing the IL-2 receptor was lower after culture with WJ-MSCs separated by a transwell system in presence of 1MT (figure 4-B).

When searching for candidate immunosuppressive factors, we also noticed an increase in the expression of COX-2, an enzyme involved in the production of PGE2. PGE2 was described to be a mediator that affects T cell activation, proliferation, and as such, it has been shown to decrease proliferation, and promote adaptive Tregs (CD4+CD25+FoxP3+) differentiation (42). Taking into consideration PGE2 properties, we decided to investigate whether the population CD25+ we detected after co-culture with WJ-MSCs or ELCs expressed FoxP3 which is a master marker of regulatory T cells (Tregs). Interestingly, after performing a gating on the CD4+ population, we detected an increase of CD25+FoxP3+ population in co-cultures in comparison with activated T cells alone which was higher in co-cultures with ELCs (75% versus 23% for T cells alone) than with WJ-MSCs (62% versus 23% for T cells alone) (figure 4-C). Thus, we confirmed that WJ-MSCs generate Tregs as already shown in previous studies (43–45). Moreover, we showed that after endothelial differentiation, ELCs were also able to induce a bigger population of Tregs than did WJ-MSCs. As IDO was also shown to be involved in the generation of Tregs, we tested the effect of the inhibitor 1MT on the percentage of CD4+CD25+FoxP3+ T cells. Concerning the results observed after co-culture of T cells with WJ-MSCs in presence of 1MT, we observed a slight decrease of the percentage representing 3% of inhibition, when cells were co-cultured in contact, whereas the percentage reached 21% of inhibition when cells were separated by a transwell. No effect of the IDO inhibitor was detectable on Tregs generated by co-culture either in contact or separated from ELCs (figure 4-C).

We also investigated the effect of MMPs on Tregs. Surprisingly, a decrease of the T regs percentage was observed in every condition with SB-3CT either in contact or in transwell. The maximum of the inhibition of Tregs generation was seen when T cells were cultured in direct contact with ELCs where the percentage of Tregs dropped from 75% to 64% (figure 4-C).

2. Immunosuppressive effects of ELCs observed on NK cells

NK cells are major effector of innate immunity and are the first cells involved in the recognition of allogeneic cells. Many studies have shown that MSCs can impair NK cell functions in both contact and transwell conditions (46–48). In our study, we wanted to determine whether WJ-MSCs differentiated into ELCs retain the same properties. We first

evaluated if the differentiation has an impact on the capability of ELCs to inhibit NK cells proliferation mediated by IL-15. NK cells proliferation observed in presence of IL-15 were considered as control and considered as 100%. ELCs were able to reduce NK cells proliferation to 49.84±7.23% in contact cultures versus 49±14.45% in transwell cultures. We also observed, in agreement with the literature that WJ-MSCs before differentiation, inhibit NK cells proliferation, either in contact or separated from activated NK cells with a proliferation reaching 54.48%±13.06% and 59.50%±12.75% respectively (figure 5-A).

As MMPs were shown to have immunomodulatory effects on NK cells (49), the same procedure as described above was applied to detect the activity of MMP-2 and MMP-9 in the co-cultures with NK cells. We detected a higher activity of MMP-2 in ELCs/NK cells direct co-culture than in transwell in comparison with ELCs alone (figure 5-B1). MMP-2 was also detected in the supernatant of NK cells co-cultured in contact with WJ-MSCs. Regarding MMP-9, this metalloproteinase was detected in the supernatant of ELCs alone, but the expression of the enzyme was lower in the co-culture conditions either in contact or separated by a transwell. We next wanted to examine whether the addition of a MMP inhibitor was able to restore NK cells proliferation. We observed that the addition of SB-3CT did not have any effect on the proliferation of NK cells co-cultured with or without cell-cell contact with WJ-MSCs or ELCs (figure 5-B2). These results suggested that inhibiting MMPs alone is not efficient enough to restore NK cells proliferation and other mediators may be involved in this phenomenon. Then, after 3 days of co-culture with activated NK cells, we evaluated the expression by ELCs and WJ-MSCs of the same genes that were tested above (figure 5-C). The expression profile changed from the one observed after co-culture with T-cells. In fact, IDO, IL-6 and IL-1β expressions were higher in ELCs than in WJ-MSCs, but the expression of COX-2 was lower in ELCs than in WJ-MSCs. HGF, COX-1 and TGF-β were also explored after co-culture of NK cells with ELCs or WJ-MSCs and results showed an absence of their expression in all the tested conditions (data not shown).

Impact of co-culture on NK cell markers expression

To investigate whether WJ-MSCs and ELCs could affect NK cells markers expression, experiments in which NK-cell phenotype was analyzed by flow cytometry were performed, and compared to the phenotype detected after co-cultures with WJ-MSCs or ELCs with or

without cell-contact (figure 6-A and -B). After 15 days of expansion in presence of IL-15, NK cells phenotyping showed two populations: one expressing CD16 and CD56 and the other expressing CD56 but not CD16. The percentage of each population represented 50.6% and 49.1% for the CD16+CD56+ and CD16-CD56+ subsets respectively. The intensity of expression of CD56 was similar for the two subsets. After co-culture with WJ-MSCs, we observed a change in the repartition of the two subsets. As shown with the left black arrow, the cell population expressing CD16 and CD56high was not longer detected and a new population appeared which was CD16+ but with a lower expression of CD56 (figure 6-A). Furthermore, we also observed an increase of the CD16-CD56+ population which reached 75.7%. In contrast, this phenomenon was not observed with WJ-MSCs separated from NK cells by a transwell, as the CD16+CD56+ population percentage was increased compared to NK cells alone or in contact with WJ-MSCs. On the other hand, the percentage of CD16-CD56+ population decreased from 75.1% to 38% when WJ-MSCs were not in direct contact. Regarding the phenotype of NK cells cultured in direct contact or not with ELCs, no change in the repartition of the two NK subsets was observed as the percentages of the two populations remained similar to the control. As MMPs were shown to modify CD16 expression on NK cells (50,51), we next examined whether the MMPs inhibitor was able to modify NK cells phenotype after co-culture. Interestingly, we observed that the CD16+CD56+ population which disappeared after co-culture with WJ-MSCs in direct contact, was partially restored after the addition of SB-3CT ((figure 6-A, middle black arrow). However, the addition of the inhibitor did not significantly modify the subsets repartition either for the condition with WJ-MSCs without cell contact or with ELCs with or without cell contact. As IDO was shown to be a strong inhibitor of NK cell functions (47) and as this mediator was strongly expressed by ELCs and WJ-MSCs either in cell contact or not, we examine whether the IDO inhibitor modify NK cell phenotype after co-culture. Surprisingly, we also observed a partial restoration of the CD16+CD56+ population when adding 1MT to the co-culture WJ-MSCs/NK, but less than observed with SB-3CT (19.3% versus 30.7% respectively; shown by right black arrow). In contrast, 1MT did not significantly modify the subsets repartition either for the condition with WJ-MSCs without cell contact or with ELCs with or without cell contact.

NKG2D is a highly conserved C-type lectin-like membrane glycoprotein expressed on essentially all NK cells and is considered as an activating receptor. Many studies have shown that a loss of NKG2D expression was observed after NK cells were cultured with MSCs (47,52). Therefore, we examined the NKG2D expression on NK cells after co-culture with ELCs and compare it with the expression observed on NK cells cultured alone or with WJ-MSCs. As shown in figures 6-C and –D, after co-cultures with WJ-MSCs and ELCs in direct contact condition, NK cells displayed a decreased expression of the activating receptor NKG2D with respect to NK cells cultured alone (mean fluorescence intensity (MFI) of 5706±451 and 6164±532 on NK cells in direct contact with respectively WJ-MSCs and ELCs versus 9718±859 on NK cells alone). Interestingly, the expression of NKG2D was partially restored on NK cells cultured without cell contact with WJ-MSCs or ELCs. To evaluate the possible role of MMPs or IDO in this phenomenon, NKG2D expression was determined after adding SB-3CT or 1-MT to the cell co-cultures. Regarding NK cells cultured with WJ-MSCs, no effect of the MMPs inhibitor was seen when NK cells were in direct contact. A minor restoration of NKG2D expression was observed on NK cells separated by a transwell but this trend did not reach statistical significance. Concerning NK cells co-cultured with ELCs, no effect of the MMPs inhibitor was seen either with or without cell contact. Considering the effect of the IDO inhibitor, we observed that 1MT did not modify the expression of NKG2D on NK cells in co-culture. Taken together, these results suggested that, as already proven for MSCs (47,52), differentiated cells were able to induce a decrease of NKG2D expression on NK cells and that this mechanism involved also other mediators than IDO, MMP-2 or MMP-9.

NK cells acquire CD73 expression upon exposure to WJ-MSCs and ELCs

Very recently Chatterjee *et al.* illustrated that human NK cells co-cultured with MSCs acquired CD73 expression and that CD73+ NK cells had the ability to convert adenosine monophosphate (AMP) into adenosine. Adenosine has been shown to be a powerful immunosuppressive factor that regulate various immune cells (10,53,54). As we observed that CD73 was the only WJ-MSCs marker which expression was not modified during differentiation (figure 1-B), we wanted to determine whether CD73 could be transferred on NK cells after co-culture with ELCs. Expression of CD73 by activated NK cells cultured in absence

of WJ-MSCs and ELCs was considered as control. The MFI of CD73 on activated NK cells, cultured alone, was 195±55. However, after 3 days of co-culture with ELCs, we noticed an important increase of CD73+ NK cells population in direct contact condition only, with a MFI reaching 1978+/-1500. An uptake of the CD73 was also seen on NK cells cultured with WJ-MSCs as observed by Chatterjee *et al.*, with a MFI reaching 1074±287. Regarding the impact of the two inhibitors on the CD73 uptake, we observed that culturing NK cells with ELCs with or without cell contact in presence of the two inhibitors increased the CD73 uptake. The same results were not observed after culture with WJ-MSCs as only SB-3CT seemed to increase the CD73 uptake but not 1MT.

IV. Discussion

Regeneration of blood vessels for the treatment of vascular-related diseases is one of the most important research areas in tissue engineering based on endothelial cells (ECs) (21,55,56). Numerous studies demonstrated the importance of endothelial cells in the repair of damaged endothelium and the neoformation of blood vessels (57). They also might ameliorate perfusion in patients with vascular related diseases, such as peripheral arterial disease or myocardial infarction disease (58,59). However, the use of mature endothelial cells in tissue engineering is subjected to many limitations such as the laborious autologous cell isolation required for generating vascular conduits (60) and the loss of their proliferative potential and function once expanded *in vitro* (61). In order to overcome these limitations, researchers have been searching for other substitutes. MSCs can be easily obtained and differentiated into ECs, which make them an excellent alternative. Moreover, the low immunogenicity and immunosuppressive capacities enable the use of allogeneic MSCs without the need for an immunosuppressive therapy after transplantation, thus further alleviating the availability of MSCs as cellular component for tissue engineering (60).

In recent years, many researchers have focused on MSCs from Wharton's jelly. Wharton's jelly is the main component of the extracellular matrix of umbilical cord. It is known to contain a population of fibroblast-like cells that are commonly identified as MSCs (62). Several studies were particularly interested in the application of WJ-MSCs in vascular tissue engineering and more specifically in their capacity of endothelial differentiation (21,63,64). In this study, we tried to obtain endothelial like cells (ELCs) from WJ-MSCs seeded on $(PAH\text{-}PSS)_4$ polyelectrolyte films and cultured in a commercial medium "Endothelial Growth Medium-2" (EGM-2, Lonza). Identifying WJ-MSCs differentiation into ECs was first evaluated through morphological changes. Interestingly, EGM-2 stimulated WJ-MSCs seeded on films appeared to proceed endothelial differentiation with a noticeable morphological change after 2 weeks of culture, in contrast with other studies where no morphological changes were observed (64–67).

A kinetic follow of the expression of some mesenchymal markers by ELCs revealed that during the differentiation process, there was a decrease in the expression of CD105 and CD90, but ELCs retained a CD73 expression similar to non-differentiated cells. These results are

different from those obtained by Gaafar *et al*. who showed that ELCs differentiated from adipose tissue-MSCs retained the expression of CD73, CD90 and CD105 at a same level of non-differentiated MSCs (66). The loss of mesenchymal markers may be related to a better endothelial differentiation potential of WJ-MSCs compared to adult MSCs which would confirm the study published by Chen *et al.* in 2009 (21). CD73 is a 5'-ectonuleotidase that uses extracellular adenosine monophosphate (AMP) to produce adenosine and is expressed abundantly on endothelial cells (68–71). Adenosine triphosphate (ATP) is physiologically released into the extracellular space through regulated transport. Additional ATP is released by the lytic cells at sites of injury. On resting vascular endothelium, extracellular ATP is dephosphorylated to adenosine diphosphate (ADP) and further to AMP by CD39 and much further to adenosine by CD73. ATP is pro-inflammatory, whereas produced adenosine is anti-inflammatory and regulates several molecules and mechanisms involved in leukocyte extravasation. Moreover, adenosine inhibits immune reactions by decreasing cytokine release from the vasculature and leukocytes (53). It also increases endothelial cell barrier function by phosphorylation of tight junction-associated proteins (72). Thus, the high expression of CD73 by our ELCs shed the light on one of the many functions of endothelial cells and may be considered as one of the tests to check endothelial functionality.

To assess endothelial differentiation, we choose to determine the expression of some endothelial-related markers that play important roles in physiological processes of endothelium maturation. ELCs showed a positive expression of CD31, VE-Cadherin and VEGF-R2 after a two-week induction. The results were the same as those obtained with HUVECs. CD31, VE-cadherin and VEGF-R2 are three endothelial-specific markers known to play an important role in the endothelium maturation during angiogenesis process (29). VEGF-R2, one of the two major receptors of VEGF, plays a major role *in vivo* but also associates with MMPs to form capillary-like structures *in vitro*. Its expression is up-regulated after MSCs differentiation in the presence of VEGF, which is an important growth factor for the endothelial differentiation (73). VE-Cadherin was shown to be necessary for the repair of damaged vascular diseases and for vascular genesis (74). CD31, also known as platelet endothelial cell adhesion molecule-1 (PECAM-1), is a transmembrane hemophilic receptor known to have various roles in vascular biology including angiogenesis, platelet function, and thrombosis (75). Our result concerning CD31 expression is in contrast with the studies of Oswald *et al.* (67) and Janeczek *et al.* (26), who did not show a

CD31 expression on differentiated bone marrow (BM)-MSCs. The expression of these markers by differentiated WJ-MSCs seems to contribute to the promotion of the endothelial differentiation; however a successful differentiation should further be verified at the functional level. Among endothelial functions, we evaluated the capacity of EGM-2 stimulated WJ-MSCs to incorporate acetylated low-density lipoprotein (Ac-LDL) and results showed that ELCs were positively marked. Some studies have shown that uptake of Ac-LDL by endothelial cells is modulated by shear stress (76,77), whereas our results show that EGM-2 alone with $(PAH\text{-}PSS)_4$ polyelectrolyte films in a static culture condition was enough to induce Ac-LDL incorporation by ELCs, as well as the induction of the expression of endothelial markers at the protein level.

Emerging data showed that MSCs could modulate innate and adaptive immunity by several mechanisms, thus their immunomodulatory properties have a great significance with respect to the potential clinical use of MSCs (62,78). The main question that the present study tried to answer is whether immune regulatory properties of MSCs are modified by MSCs differentiation towards an endothelial phenotype. Previous studies showed that MSCs immunoprivilege relies on the absence of expression of HLA-DR and CD86. Some authors showed that the lack of expression of co-stimulatory molecules such as CD80 and/or CD86 by MSCs could induce T cells anergy, which is a mechanism by which MSCs could induce immunosuppression (7). Previous studies showed that chondrogenic-, adipogenic- and osteogenic-like cells that were differentiated from WJ-MSCs do not express these two molecules (13,14,62). In agreement with the mentioned study, we demonstrated that only 1.9% of ELCs expressed CD86, this very low expression may be responsible of the anergic state in T cells. HLA-DR expression was also hardly detectable, suggesting that even after differentiation, ELCs remained immunoprivileged, in contrast with previous reports showing that *in vitro* differentiation of allogeneic BM-MSCs into myogenic, smooth muscle, endothelial (16) and neuronal (15) lineages increased significantly the expression of MHC-II.

The immunogenic and immunosuppressive properties of ELCs derived from WJ-MSCs in allogeneic conditions were examined. To identify the immunogenic state of cells, we studied their ability to be recognized as allogeneic by HLA-mismatched PBMCs in mixed lymphocyte reaction (MLR) using ELCs or WJ-MSCs as stimulating cells and PBMCs as responder cells. ELCs were not immunogenic as they did not stimulate allogeneic PBMCs in co-culture. Then, to

investigate whether the immunosuppressive effect of WJ-MSCs is retained after endothelial differentiation, we tested the ability of ELCs to modulate PHA-stimulated PBMCs alloproliferation. In fact, the suppressive effect was enhanced by ELCs in comparison with WJ-MSCs, and it was in majority exerted in the cellular contact condition. Similar results were shown after differentiation of MSCs into adipose, bone and cartilage lineages (13,14,79). Even if immunosuppression seems to be mediated by a direct contact, we wanted to know if there were any alterations in the secretion of some key pro- and anti-inflammatory cytokines in the supernatants of co-culture in comparison with the PHA-activated PBMCs alone considered as positive control. Interestingly, we detected an increase in the concentrations of IL-6, this increase was more important in ELCs/PHA-activated PBMCs. IL-6 is known to be one of MSCs-secreted factors that appears to be involved in a series of immunosuppressive actions (80–83). Recently, Li *et al.* had a contradictory result showing that the differentiation of MSCs into myogenic, endothelial and smooth muscle cells resulted in an IL-6 downregulation. They speculated that this downregulation was dependent on differentiation and not on cell phenotype (84). They suggested that IL-6 levels contribute to the rejection of allogeneic MSCs after implantation. We observed also an inhibition of TNF-α secretion after co-cultures in the presence of WJ-MSCs or ELCs. TNF-α is a one of the pro-inflammatory cytokines secreted by immune cells that "license" the MSCs and increases their immunosuppressive capacity (85,86). Thus, ELCs retained the capacity to inhibit pro-inflammatory cytokine secretion. Previously, it has been shown that IL-10 is important in BM-MSCs and umbilical cord blood-MSCs mediated immunosuppression and that it is involved in the generation of Tregs (43,86–88). Unexpectedly, we observed a decrease in IL-10 concentrations in both ELCs and WJ-MSCs co-cultures. Moreover, we detected lower concentrations of IL-8 in both co-cultures, which is an inflammatory cytokine produced by MSCs and known to induce chemotaxis by activating neutrophils (89). This result is in agreement with the study of Hoogdjuin *et al*., who showed a decreased IL-8 secretion by MSCs upon stimulation with INF-γ, in comparison with non-stimulated MSCs, suggesting that MSC-mediated chemotaxis targets neutrophils only under non-inflammatory conditions (90). Several studies reported an increased expression of IL-1β, an anti-inflammatory cytokine, by MSCs in inflammatory conditions(91) ; we had the same results only in WJ-MSCs co-cultures.

These results are important because, *in vivo*, WJ-MSCs and ELCs act on many of the leukocyte subsets involved directly or indirectly in regulating the immune system. However, to

our knowledge, there are no reports yet elucidating the effects of differentiated cells on: (1) CD3+ T-cell enriched population, which is important in the context of graft versus host disease as they are the major effector cells in this disease (92); (2) NK cells, as they represent the major effector of the innate immune response exhibiting a critical role in early host defense against infections and cancer (52). Such effects need to be investigated as it is critical to know whether the immune privilege of WJ-MSCs and ELCs is maintained in the context of this type of response, especially in an allogeneic context.

To assess this, we analyzed the immunosuppressive effects of WJ-MSCs and differentiated ELCs on the proliferation of a CD3+ activated T-cell enriched population. We noted that ELCs, and to a lesser extent WJ-MSCs suppressed the proliferation of activated CD3+ T cells, and this inhibition was more noticeable in the cell-cell contact condition. Inhibition of CD3+ T cells by human BM-MSCs (86,93–95), umbilical cord blood-MSCs (86), placenta-MSCs (86,96) and umbilical cord-MSCs (38,97) had already been described in the literature; however, we are the first to show that endothelial differentiation of MSCs do not alter this capacity.

Although, inhibition of NK cell proliferation by MSCs from different sources (47,48,52,98–100) in both contact and transwell conditions (48) has been described by previous studies, others have reported a higher expansion and cytotoxicity of NK cells when co-cultured with WJ-MSCs (101), as well as an inability of WJ-MSCs to inhibit the activation of a subset of NK cells (100) [$CD56^{bright}$, a subset known to produce cytokines after activation with low natural cytotoxicity (63)]. Our data indicated that WJ-MSCs not only inhibited NK cells proliferation, independently from cellular contact, but also maintained this immunosuppressive function once differentiated into ELCs.

Our secondary goals were then to find out the mechanisms by which WJ-MSCs and ELCs exert their immunosuppression on NK and T cells. In an examination of candidate molecules that may be involved, we investigated the possible implication of MMP-2 and MMP-9. In fact, besides the important role of MMPs in the modification of the extracellular matrix, cell mobilization and cell-extracellular matrix interactions, it has been shown that MMPs have other substrates such as cytokines and inflammatory mediators, thus having an effect on the regulation of the immune response and cell proliferation (41,102). Ding *et al.* have found that MMP-2 and

MMP-9 play an important role in the suppressive activity of murine BM-MSCs and that blocking these two MMPs restored totally T-cell proliferation (39). MMP-2 and MMP-9 were both detected in the supernatants of ELCs co-cultured with T or NK cells; however the addition of SB-3CT did not have a major effect on restoring T or NK cells proliferation suggesting that ELCs effect on T or NK cells proliferation is due to a combination of mediators.

Inhibition of T and NK cells functions is mediated in part by soluble factors produced by MSCs. As numerous candidates have been identified as actors in MSC immunomodulation, expression levels of seven factors (IDO, IL-6, IL-1β, COX-2, TGF-β, HGF and COX-1) by ELCs and WJ-MSCs were evaluated after 3 days of "direct" and "transwell" co-cultures with activated T and NK cells. ELCs showed a higher expression of IL-6 and IL-1β in NK and T cells co-cultures in comparison with WJ-MSCs. Prevention of cellular contact had only a minor effect on their expression levels. Concerning IDO, this enzyme was mainly detected in ELCs when they were co-cultured with NK cells in direct contact, but was also present when the cells were separated. This expression was also detected after co-culture with T cells, but less than with NK cells. COX-2, the PGE2 producing enzyme was mainly detected in ELCs after co-culture with T cells, either in contact or not. However this downregulation was much more pronounced in co-cultures with NK cells. In contrast with other studies (32,103), we observed a lack of TGF-β, HGF and COX-1 expression by ELCs and WJ-MSCs in all culture conditions. To sum up, our data offer an interesting clue regarding the secretory profile of differentiated cells in an *in vitro* inflammatory microenvironment, which may be in part responsible of their immunosuppressive capacities.

The inhibition of T-cell proliferation might be related to the downregulation of activation markers expressed on T cells such as CD25, the IL-2 receptor that is rapidly induced by antigenic or mitogenic T-cell stimulation. Several studies have described the effect of MSCs on the expression of CD25 and reported either a downregulation or no effect (86,94,104,105). In these studies, the dowregulation of the CD25 expression was shown to inhibit T cells proliferation mediated by IL-2. To test the hypothesis that ELCs also downregulated CD25, we analyzed CD25 expression on T cells after co-culture. Unexpectedly, we found that direct co-cultures with ELCs but also with WJ-MSCs induced an increase of CD25 expression. Since this result is not correlated with the observed inhibition of T-cell proliferation, we supposed this

increase of CD25 was due to a proliferation of a Tregs population, as it was previously shown by Selmani *et al.* (88) and others (43,78,86,99). Indeed, our results were consistent with previous studies as we noticed an important increase of CD4+CD25+FoxP3+ population in direct co-cultures with MSCs in comparison with the controls. More interestingly, ELCs also induced a high percentage of this population. Among the mediators secreted by MSCs, IDO is one of the factors that were shown to contribute to the generation of regulatory T cells subset (106–109); however, our inhibition experiments did not allow us to conclude of a role of IDO in the generation of Tregs, neither do MMP-2 and MMP-9. As our results also showed a high expression of COX-2, the enzyme producing PGE2 and as this prostaglandin was described to promote adaptive Tregs differentiation (42), it is possible that the generation of Tregs we observed in our study was mediated by PGE2.

Next, we wanted to evaluate the impact of ELCs on NK cells phenotype after co-culture and focused our analysis on three main NK markers: CD16, CD56 and NKG2D. The use of CD16 and CD56 allowed us to distinguish two subsets after NK cells expansion with IL-15: CD16+CD56+ and CD16-CD56+ subsets, but the intensity of CD56 was similar between the two subsets. After co-culture with ELCs either in contact or not, no change in the subset repartition was observed and this result was not modified after the use of SB-3CT or 1MT. In contrast, the CD16+CD56+ population was no longer observed after co-culture with MSCs. This was due to two phenomena: a loss of CD16, which was seen by an increase of the CD16-CD56+ population and a reduction of the CD56 expression, which lead to the apparition of a CD56dim population. Surprisingly, after adding IDO and MMPs inhibitor in co-cultures, this population was partially restored. This latter result is in agreement with studies showing that MMPs are involved in the shedding of CD16, which occurred after NK cells activation and place NK cells in a refractory phase (50).

We next examined the impact of co-culture of NK cells with ELCs on NKG2D expression. We focused our interest on this receptor because some reports have described that MSCs inhibitory effects are closely related to the downregulation of activating receptors, especially NKG2D (47). We showed a decrease in the surface expression of NKG2D activating NK receptor when NK cells were cultured in contact with ELCs. This result is in agreement with a very recent paper published by Chauveau *et al.*, where they demonstrated that endothelial cells

activation and proliferation modulate NKG2D activity (110). We also observed that preventing the contact between NK cells and ELCs limits this downregulation. Regarding WJ-MSCs, the same results as Spaggiari *et al.* were observed. Taken together, these results showed that ELCs retain the same properties as MSCs of down modulating NKG2D even after differentiation. As Spaggiari *et al.* highlighted the role of IDO and PGE2 in this phenomenon, we tested the effect of 1MT on the restoration of NKG2D expression. However in our study, addition of 1MT had no effect on the restoration of NKG2D expression either this ELCs or with WJ-MSCs. The restoration of NKG2D expression may require the inhibition of more than one mediator.

Characterization of ELCs showed a high expression of CD73 on their surface, so we wanted to investigate whether CD73 may have an impact on ELC mediated immunomodulation. As mentioned before, CD73 is a 5'-ectonuleotidase that uses extracellular AMP to produce adenosine. Besides the cited roles of adenosine in the endothelial microenvironment, it was shown that adenosine is a potent immunosuppressor involved in the inhibition of IL-2, CD25, IFN-γ and TNF-α expression and decreases cytolytic ability of cytotoxic T cells (111,112). Very recently, it has been proven that NK cells acquire expression of CD73 after a co-culture with MSCs and that CD73+NK cells had the ability to convert AMP into adenosine. Our results confirm that not only NK cells could acquire CD73 expression upon co-culture with WJ-MSCs, but also showed that the proportion of CD73+NK cells was more important after co-culture with ELCs. Further studies should verify if the up-regulation of CD73 on NK cells will be accompanied by increased enzyme activity. It would be interesting also to determine the mechanism by which NK cells acquire this marker. A recent study has stated that human CD4+CD39+ regulatory T cells produce adenosine upon co-expression of surface CD73 or a contact with CD73+ exosomes or CD73+ cells (113). Saldanha-Araujo *et al.* have shown increased levels of CD73 expression on the cell surface of CD4+ T cells and CD4+CD25+ Tregs after a co-culture with BM-MSCs (114), we are currently investigating whether a co-culture with WJ-MSCs will induce the same effect before and after endothelial differentiation.

In conclusion, we were able to differentiate WJ-MSCs into endothelial-like cells using simple culture conditions depending mainly on endothelial inductive medium EGM-2 on $(PAH/PSS)_4$ substrate. From the above analysis, we can conclude that WJ-MSCs and ELCs share many immunomodulatory properties. Both of them are non-immunogenic and

immunosuppressive, lack MHC II molecules and co-stimulatory molecules, can inhibit and impair T cells and NK cells functions by producing immunomodulatory soluble factors, generate a regulatory T cells subset, moreover they can induce CD73 expression on NK cells. However, the intensity of expression of soluble mediators was different between ELCs and WJ-MSCs. It depends also on the immune cells type they are co-cultured with. We also noticed that a direct cell contact or not influence the expression of the mediator. It is worth mentioning that: **(1)** MSCs are highly sensitive to the microenvironment and modulate their multiple functions according to the external conditions, **(2)** MSCs have different characteristics depending on the source from where they are derived, **(3)** immune cells functions vary from each donor, **(4)** culture and differentiation protocols may have an important impact on the behavior of MSCs and the obtained differentiated cells. Thus it is difficult to compare results concerning MSCs immunomodulation and this explains the discrepancies we had with other published data. Our findings allow a further characterization of differentiated cells which is based on the preservation of the immunomodulatory properties of naïve mesenchymal stem cells and not only based on the expression of specific markers of the mature desired phenotype. This may be an additional benefit promoting the reparative capacity of generated endothelial like cells, which can be used for generating vascular grafts or can provide both organ recellularization and restoration of a physiological microenvironment without being rejected by the immune system of the patient. Further studies are needed to clearly decipher the molecules or soluble factors responsible of their immunosuppressive effects even after differentiation.

Table 1. List of PCR primers and corresponding annealing temperatures used for the present study.

Name	Annealing temp. (°C)	Forward Primer	Reverse Primer
RP29	60	5'-CATAGGAAGCTGGGAGCAAG-3'	5'-GCCCTCCAATCAGTCTTCTG-3'
IDO 1	60	5'-TCACAGACCACAAGTCACAGC-3'	5'-AGTTGGCAGTAAGGAACAGCA-3'
IL-6	60	5'-GGTACATCCACGGCATCT-3'	5'- GTGCCTCTTTGCTGCTTTCAC-3'
IL-1β	60	5'-CTGATGGCCCTAAACAGATGAAG-3'	5'-GGTCGGAGATTCGTAGCAGCTGGAT-3'
COX-1	62	5'-AAACCCTACACCTCCTTCCAG-3'	5'-CTCCAACGCATCAATGTCTCC-3'
COX-2	62	5'-GCTGGAACATGGAATTACCCA-3'	5'-CTTTCTGTACTGCGGGTGGAA-3'
TGFβ1	60	5′-AACAATTCCTGGCGCTACCTC-3′	5′-TGCCGCACAACTCCAGTG-3′
B7-H1	64	5'-TGCCTTGGTGTAGCACTGAC-3'	5'-CGTCTCCTCCAAATGTGTATCA-3'
B7-H4	64	5'-CAGATGCTGGCACCTACAAA-3'	5'-ATTCACTTCCGGCATGCTGA-3'
CD95L	64	5'-CACACAGCATCATCTTTGGAG-3'	5'-AAATGGGCCACTTTCCTCAG-3'

Figure legends

Figure 1. Validation of the endothelial character. (A) ***Cell morphology***. EGM-2 stimulated (a, b) and unstimulated (c, d) WJ-MSCs morphology on $(PAH\text{-}PSS)_4$ coated glass slide (a, c) and on glass slide (b, d) was investigated by inverted optical microscopy (Nikon Diaphot, UFX-DX, Japan; ×10 magnification, scale bar = 100 µm). Only EGM-2 stimulated WJ-MSCs (a) showed a slight morphological evolution from fibroblastic to polygonal shape. **(B)** ***Markers expression by stimulated WJ-MSCs seeded on $(PAH\text{-}PSS)_4$ films, during the differentiation culture with EGM-2.*** Expression of 3 mesenchymal markers (CD73, CD90, and CD105) and 2 immune markers (HLA-DR and CD86) was evaluated at 5, 10 and 15 days of differentiation period by flow cytometry. Data represent the average of positive cells from three independent experiments. Error bars indicate SEM. **(C)** ***Protein expression of endothelial markers***. CD31, VE-cadherin and VEGF-R2 expressions by cells cultured in the four conditions were determined by Western blot: (c) EGM-2/$(PAH\text{-}PSS)_4$, (d) EGM-2/glass slide, (e) EBM-2/$(PAH\text{-}PSS)_4$, (f) EBM-2/glass slide. Endothelial cells extracted from vein umbilical cord (HUVECs) were used as positive control (b), and WJ-MSCs as a negative control (a). GAPDH was used as a loading control. **(D)** ***Endothelial like cell functionality.*** Acetylated low-density lipoprotein (ac-LDLs) uptake by unstimulated (e and f) and EGM-2 stimulated (c and d) WJ-MSCs on $(PAH\text{-}PSS)_4$. HUVECs were used as positive control (b). Nuclei counter-staining with DAPI appeared in blue, whereas uptake ac-LDLs appeared in red. (×40 oil objective, scale bar = 50 µm).

Figure 2. Immune characterization of endothelial like cells: interactions with PBMCs. (A) ***Study of the immunogenicity of endothelial like cells and their immunosuppressive capacity on PBMCs.*** Non-activated and phytohemagglutinin (PHA)-activated peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) were co-cultured in the presence of WJ-MSCs or ELCs at a ration 1:1 of WJ-MSCs/ELCs: PBMCs. Co-cultures were prepared in the presence or absence of cell-cell contact; the latter were performed using transwell chambers. Proliferation of PBMCs was assessed by quantifying DNA using Hoechst 33258 dye. Data are shown as the mean±SEM for the DNA concentrations (µg/ml) (n=3). *, **, *** indicate a statistically significant difference with respectively $p<0.05$, $p<0.01$ and $p<0.005$. **(B)** ***Analysis of cytokine concentrations in co-culture supernatants using CBA assay.*** PHA-activated PBMCs were co-cultured in presence or absence of WJ-MSCs and ELCs at 1:1 ratio of WJ-MSCs /ELCs: PBMCs. IL12p70, TNF-α, IL-6, IL-8, IL-10 and IL-1β concentrations in cell-free supernatants were determined with a cytometric bead array after 3 days of culture. Cytokines concentration detected in conditioned medium of activated PBMCs in absence of WJ-MSCss or ELC were considered as basal expression of such cytokines. Data are shown as the mean±SEM of the cytokine concentration in pg/ml (n=3). *IL: interleukin; TNF: tumor necrosis factor; SEM: standard error of mean.*

Figure 3. (A) ***Effect of WJ-MSCs and ELCs on the proliferation of activated T cells***. Activated T cells were co-cultured in the presence of WJ-MSCs or ELCs at a 1:1 ration of WJ-MSCs/ELCs: T cells. Co-cultures were prepared in the presence or absence of cell-cell contact; the latter were performed with transwell chambers. Proliferation of activated T cells cultured in absence of MSCs or ELCs was the positive control (100% of proliferation). Proliferation of T cells was determined, after 3 days of culture, by DNA quantification using Hoechst 33258 dye. ***(B) Representative zymogram of the contribution of MMP-2 and MMP-9 in WJ-MSCs and ELCs mediated T cells immunosuppression. (B1)*** Supernatants of co-cultures were collected to detect MMP-9(82kDa) and MMP-2(63kDa) by gelatin zymography. ELCs and WJ-MSCs are considered as controls. ***(B2)*** SB-3CT, a MMPs inhibitor, was added to the co-cultures and proliferation of activated T cells was measured by quantifying their DNA using Hoechst 33258 dye. Proliferation of activated T cells alone was the positive control (100% of proliferation). For figures A and B2, data are shown as the mean±SEM of DNA concentration in µg/ml from 2 independent experiments. ***(C)*** **Expression levels of MSCs secreted immuoregulatory factors.** IDO, IL-6, IL-1β and COX-2 mRNA expression in WJ-MSCs and ELCs of direct and transwell co-cultures with activated CD3+ T cells were determined by qRT-PCR. WJ-MSCs and ELCs cultured alone were considered as controls. Results were normalized using the housekeeping gene ribosomal protein (RP)29 and compared to controls and are shown as mean±SEM of fold change (n=2). *IDO: indoleamine-2,3-dioxygenase, IL-6: interleukin 6, IL-1β: interleukin 1β, COX-2: cyclooxygenase 2 ; WJ-MSCs: Wharton's jelly mesenchymal stem cells, ELCs: endothelial like cells, SEM: standard error of mean.*

Figure 4. WJ-MSCs and ELCs induce the generation of T cell subsets displaying a regulatory phenotype. Activated CD3+ cells were co-cultured in the absence or presence of WJ-MSCs and ELCs with SB-3CT (MMP-2 and MMP-9) inhibitor or 1methyl tryptophan (1MT IDO inhibitor). Co-cultures were performed with both direct contact or transwell conditions. After 3 days of co-culture, the percentages of CD3+CD25+, from different conditions are shown in figures A and B. The percentages of CD25+FoxP3+ population were determined on the CD4+ population (C). CD3+CD25+FoxP3+ cells detected in activated T cells cultures in absence of WJ-MSCs, ELCs and inhibitors were considered as controls. Data shown in A and C are representative dot plots from one experiment. Data shown in B are the mean fluorescence intensity ±SEM of the percentages of CD3+CD25+ cells (n=2).

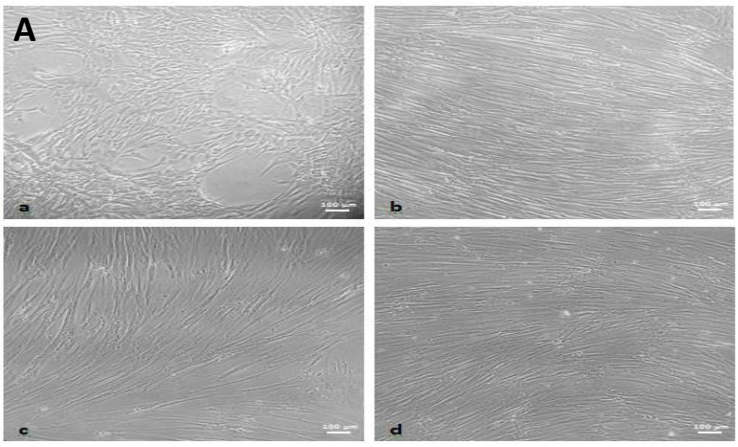
Figure 5. (A) ***Effect of WJ-MSCs and ELCs on the proliferation of activated NK cells***. Activated NK cells were co-cultured in the presence of WJ-MSCs or ELCs at a 1:1 ratio of WJ-MSCs/ELCs : NK cells. Co-cultures were prepared in the presence or absence of cell-cell contact; the latter were performed with

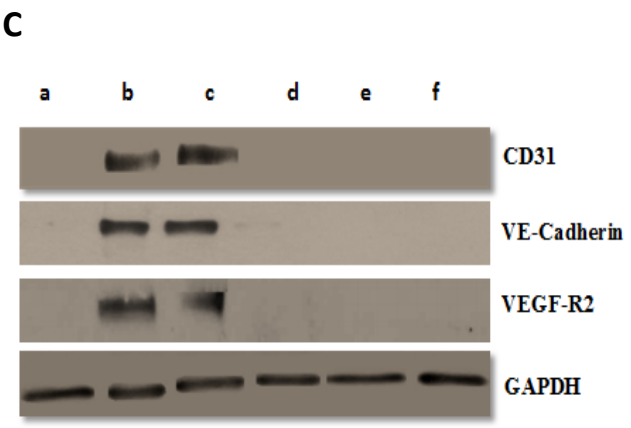
transwell chambers. Proliferation of activated NK cells cultured in absence of WJ-MSCs or ELCs was the positive control (100% of proliferation). Proliferation of NK cells was determined, after 3 days of culture, by DNA quantification using Hoechst 33258 dye. ***(B) Representative zymogram of the contribution of MMP-2 and MMP-9 in WJ-MSCs and ELCs mediated NK- immunosuppression. (B1)*** Supernatants of co-cultures were collected to detect MMP-9(82kDa) and MMP-2(63kDa) by gelatin zymography. ELCs and WJ-MSCs are considered as controls. ***(B2)*** SB-3CT, a MMPs inhibitor, was added to the co-cultures and proliferation of activated NK cells was measured by quantifying their DNA using Hoechst 33258 dye. Proliferation of activated NK cells alone was the positive control (100% of proliferation). For figures A and B2, data are shown as the mean±SEM of DNA concentration in µg/ml from 2 independent experiments.. ***(C)*** **Expression levels of MSCs secreted immuoregulatory factors.** IDO, IL-6, IL-1β and COX-2 mRNA expression in WJ-MSCs and ELCs of direct and transwell co-cultures with activated NK cells were determined by qRT-PCR. WJ-MSCs and ECLs cultured alone were considered as controls. Results were normalized using the housekeeping gene ribosomal protein (RP)29 and compared to controls and are shown as mean±SEM of fold change (n=2). *IDO: indoleamine-2,3-dioxygenase, IL-6: interleukin 6, IL-1β: interleukin 1β, COX-2: cyclooxygenase 2 ; WJ-MSCs: Wharton's jelly mesenchymal stem cells, ELCs: endothelial like cells, SEM: standard error of mean.*

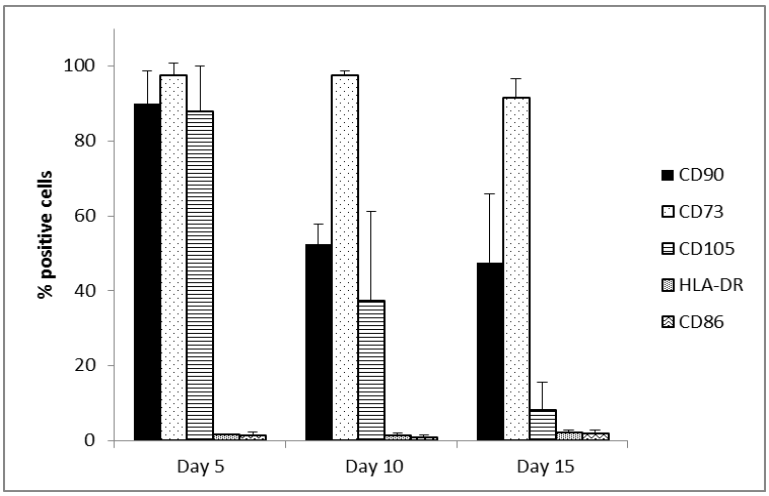
Figure 6. WJ-MSCs and ELCs mediated modulation on NK cell phenotype. Activated NK cells were co-cultured in the absence or presence of WJ-MSCs and ELCs with SB-3CT (MMP-2 and MMP-9 inhibitor) or 1methyl tryptophan (1MT, IDO inhibitor). Co-cultures were performed with both direct contact or transwell conditions. After 3 days of co-culture, distributions and percentages of CD16+CD56+ population in different culture conditions was determined and are shown respectively in A and B. Expression of NKG2D, was also assessed in different culture conditions (C and D). CD16+CD56+ and NKG2D+ cells detected in activated NK cells without ELCs or WJ-MSCs were considered as controls. Data shown in A and C are representative dot plots from one experiment. Data in B and D are shown as the mean fluorescence intensity ±SEM of the percentages of CD16+CD56+ and NKG2D respectively (n=2).

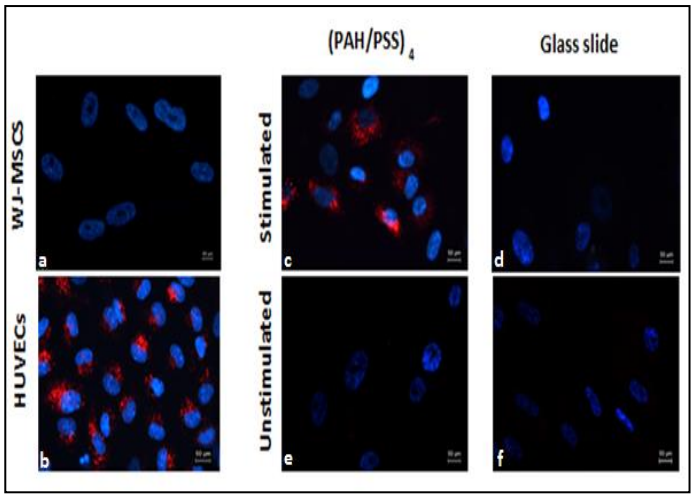
Figure 7. **WJ-MSCs and ELCs induce CD73 expression on NK cells.** Activated NK cells were co-cultured in the absence or presence of WJ-MSCs and ELCs with SB-3CT (MMP-2 and MMP-9 inhibitor) or 1methyl tryptophan (1MT, IDO inhibitor). Co-cultures were performed with both direct contact or transwell conditions. After 3 days of co-culture, CD73 expression on NK cells was determined by flow cytometry. CD73+ cells detected in activated NK cells without

WJ-MSCs and ELCs were considered as controls. (A) Data are shown as representative dot plots from one experiment in A and as mean fluorescence intensity ±SEM of CD73 in B (n=2).

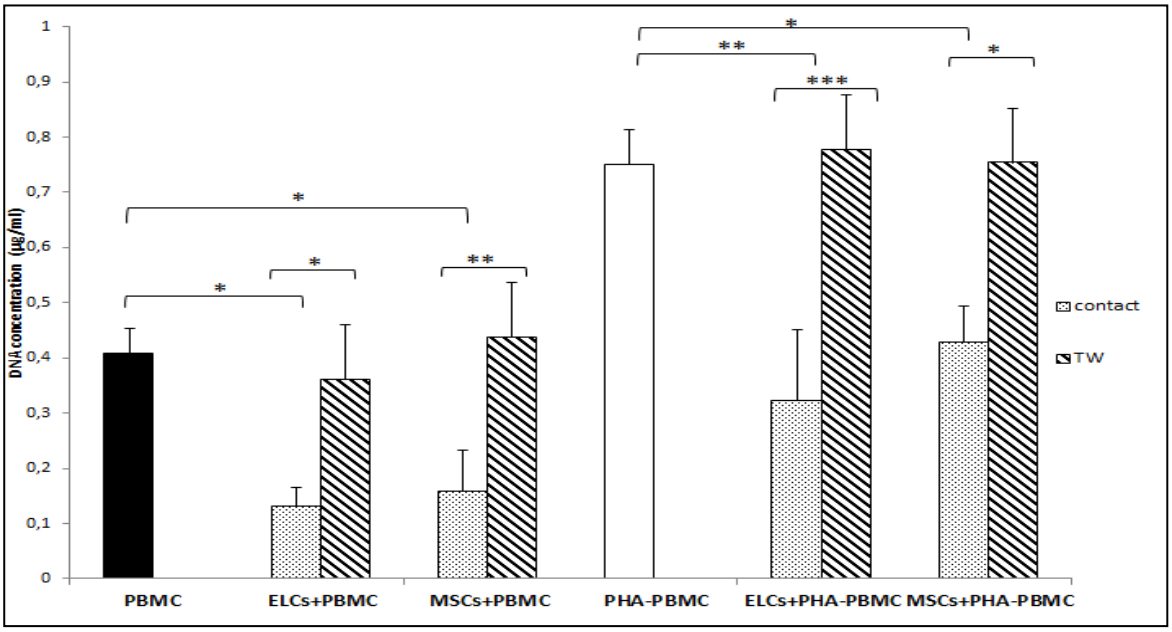

A
a
b
c
d


C
a
b
c
d
e
f
CD31
VE-Cadherin
VEGF-R2
GAPDH

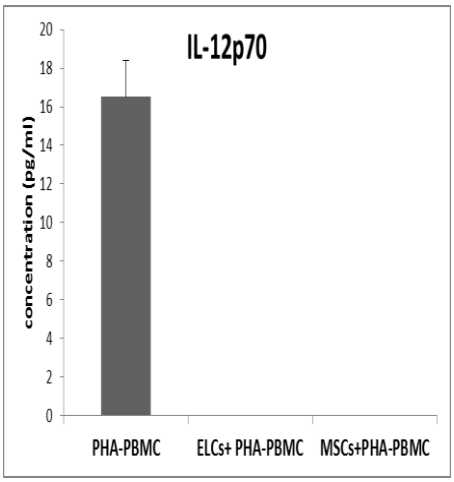

B
% positive cells
100
80
60
40
20
0
Day 5
Day 10
Day 15
CD90
CD73
CD105
HLA-DR
CD86

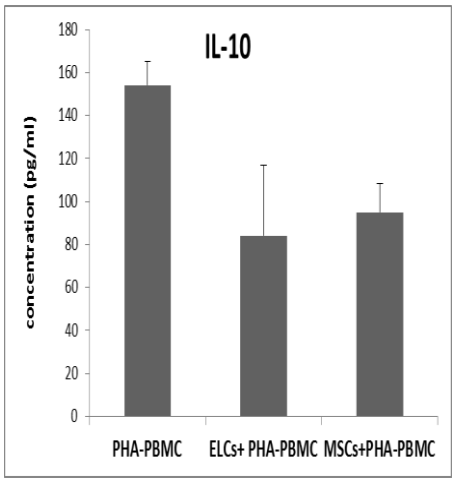

D
(PAH/PSS)4
Glass slide
WJ-MSCs
HUVECs
Stimulated
Unstimulated
a
b
c
d
e
f

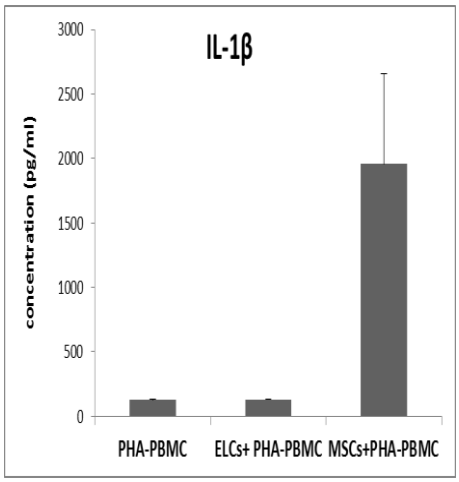
A

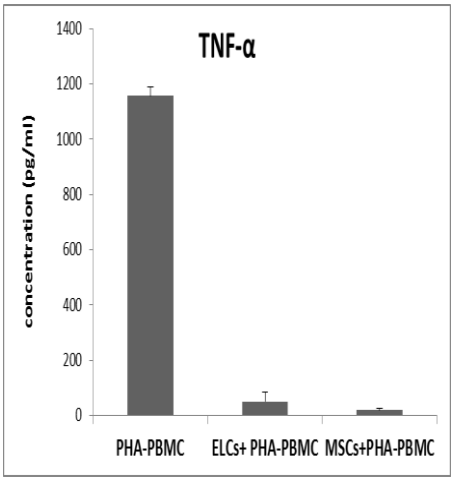

DNA concentration (µg/ml)
contact
TW
PBMC
ELCs+PBMC
MSCs+PBMC
PHA-PBMC
ELCs+PHA-PBMC
MSCs+PHA-PBMC

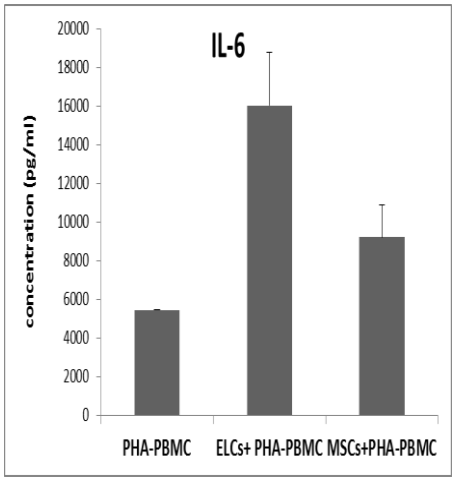
B

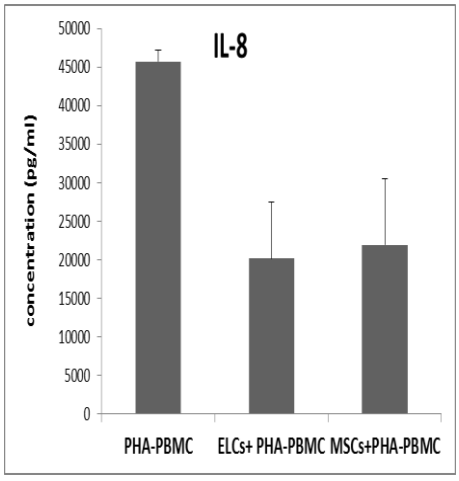

IL-12p70
concentration (pg/ml)
PHA-PBMC
ELCs+ PHA-PBMC
MSCs+PHA-PBMC

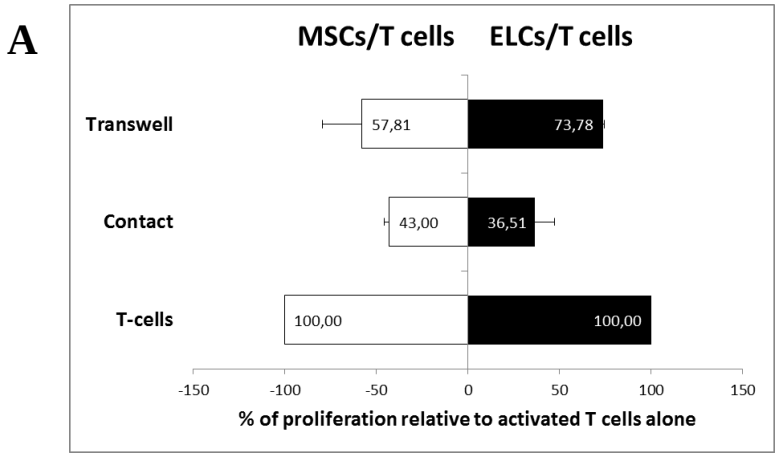

IL-10
concentration (pg/ml)
PHA-PBMC
ELCs+ PHA-PBMC
MSCs+PHA-PBMC

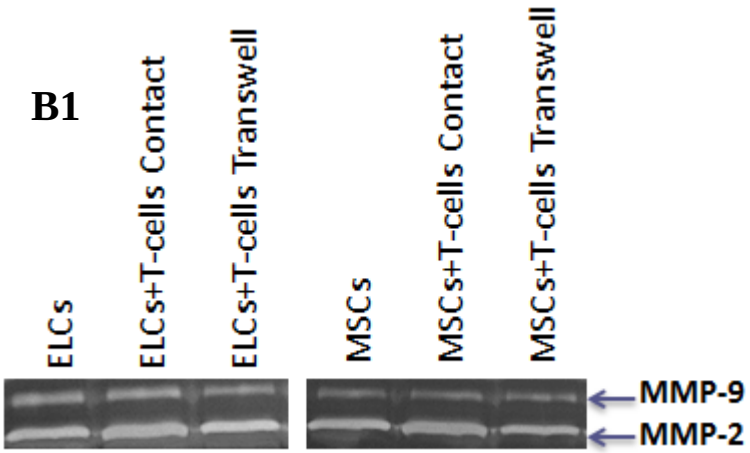

IL-1β
concentration (pg/ml)
PHA-PBMC
ELCs+ PHA-PBMC
MSCs+PHA-PBMC

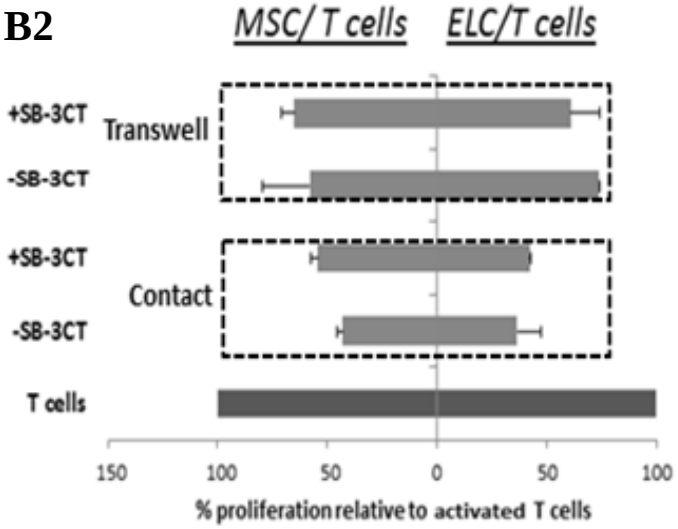

TNF-α
concentration (pg/ml)
PHA-PBMC
ELCs+ PHA-PBMC
MSCs+PHA-PBMC

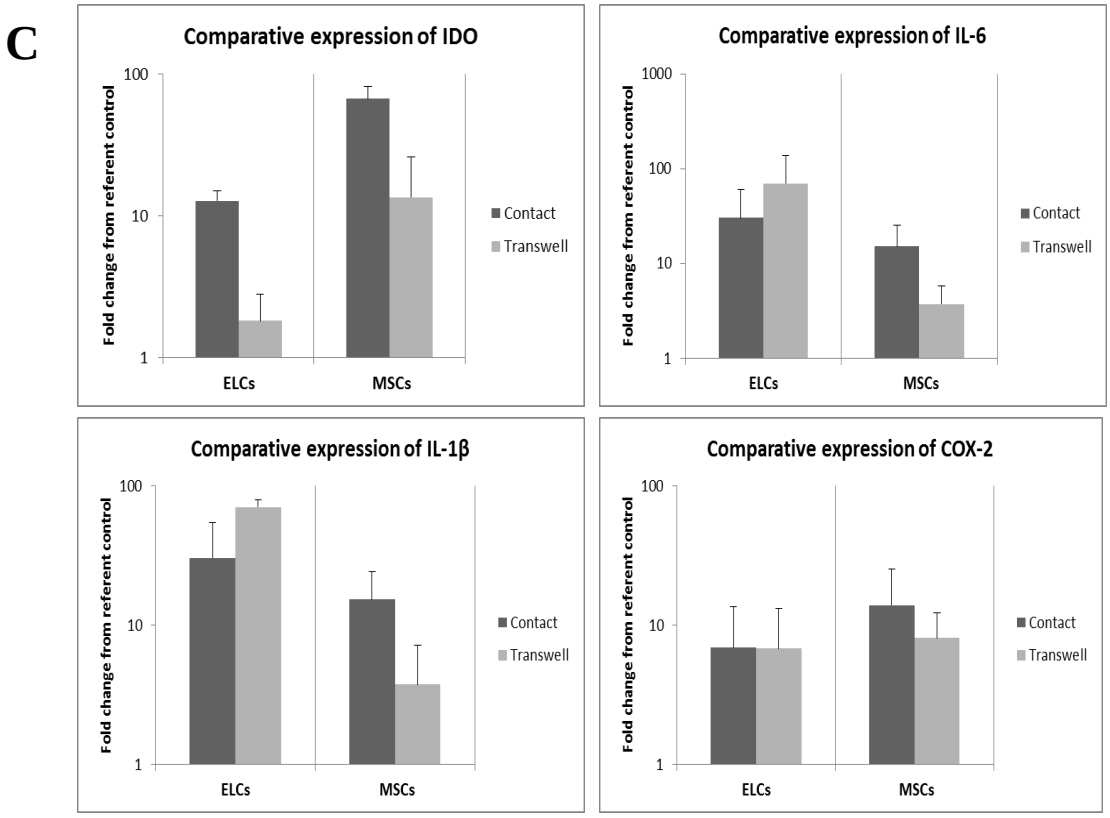

IL-6
concentration (pg/ml)
PHA-PBMC
ELCs+ PHA-PBMC
MSCs+PHA-PBMC

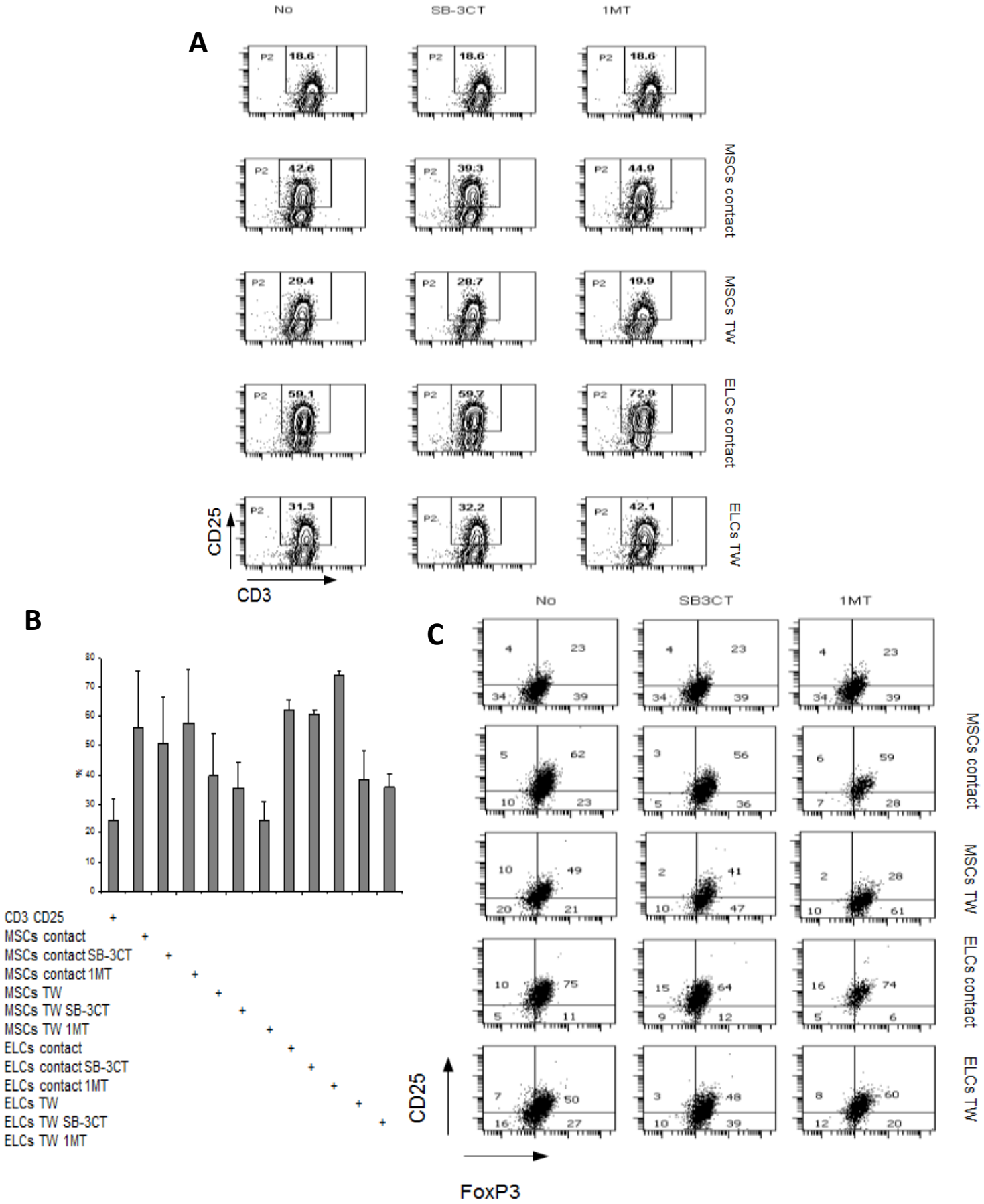

IL-8
concentration (pg/ml)
PHA-PBMC
ELCs+ PHA-PBMC
MSCs+PHA-PBMC


A
MSCs/T cells
ELCs/T cells
Transwell
Contact
T-cells
57,81
73,78
43,00
36,51
100,00
100,00
-150
-100
-50
0
50
100
150
% of proliferation relative to activated T cells alone

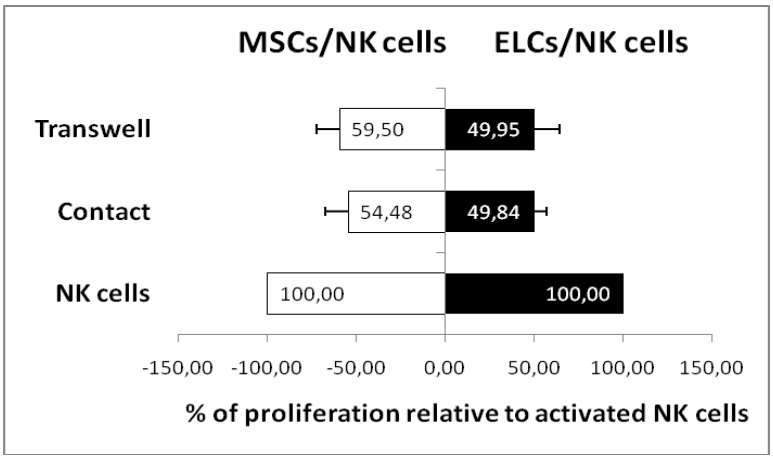

B1
ELCs
ELCs+T-cells Contact
ELCs+T-cells Transwell
MSCs
MSCs+T-cells Contact
MSCs+T-cells Transwell
MMP-9
MMP-2


B2
MSC/ T cells
ELC/T cells
+SB-3CT
Transwell
-SB-3CT
+SB-3CT
Contact
-SB-3CT
T cells
150
100
50
0
50
100
% proliferation relative to activated T cells

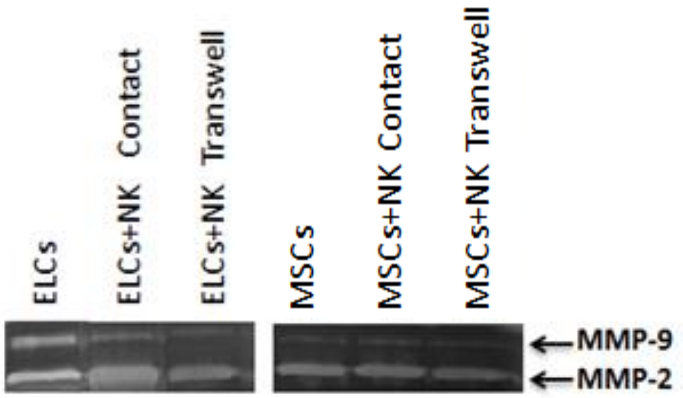

C
Comparative expression of IDO
Comparative expression of IL-6
Comparative expression of IL-1β
Comparative expression of COX-2
Fold change from referent control
100
10
1
1000
Contact
Transwell
ELCs
MSCs


A
No
SB-3CT
1MT
MSCs contact
MSCs TW
ELCs contact
ELCs TW
CD25
CD3
B
CD3 CD25 +
MSCs contact +
MSCs contact SB-3CT +
MSCs contact 1MT +
MSCs TW +
MSCs TW SB-3CT +
MSCs TW 1MT +
ELCs contact +
ELCs contact SB-3CT +
ELCs contact 1MT +
ELCs TW +
ELCs TW SB-3CT +
ELCs TW 1MT +
C
No
SB3CT
1MT
MSCs contact
MSCs TW
ELCs contact
ELCs TW
CD25
FoxP3

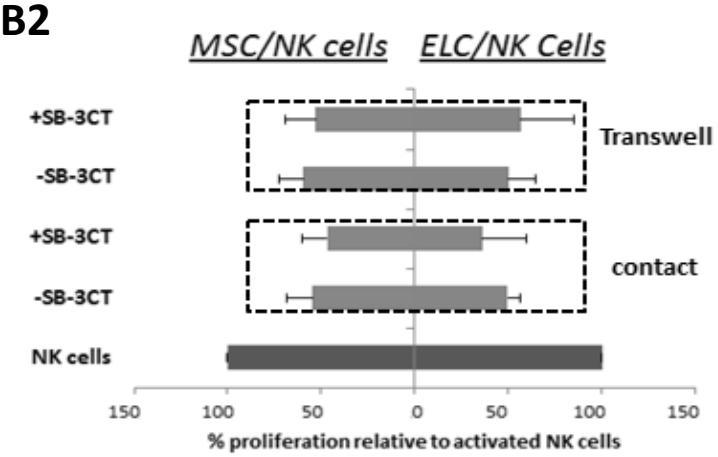
A


MSCs/NK cells
ELCs/NK cells
Transwell
59,50
49,95
Contact
54,48
49,84
NK cells
100,00
100,00
-150,00 -100,00 -50,00 0,00 50,00 100,00 150,00
% of proliferation relative to activated NK cells

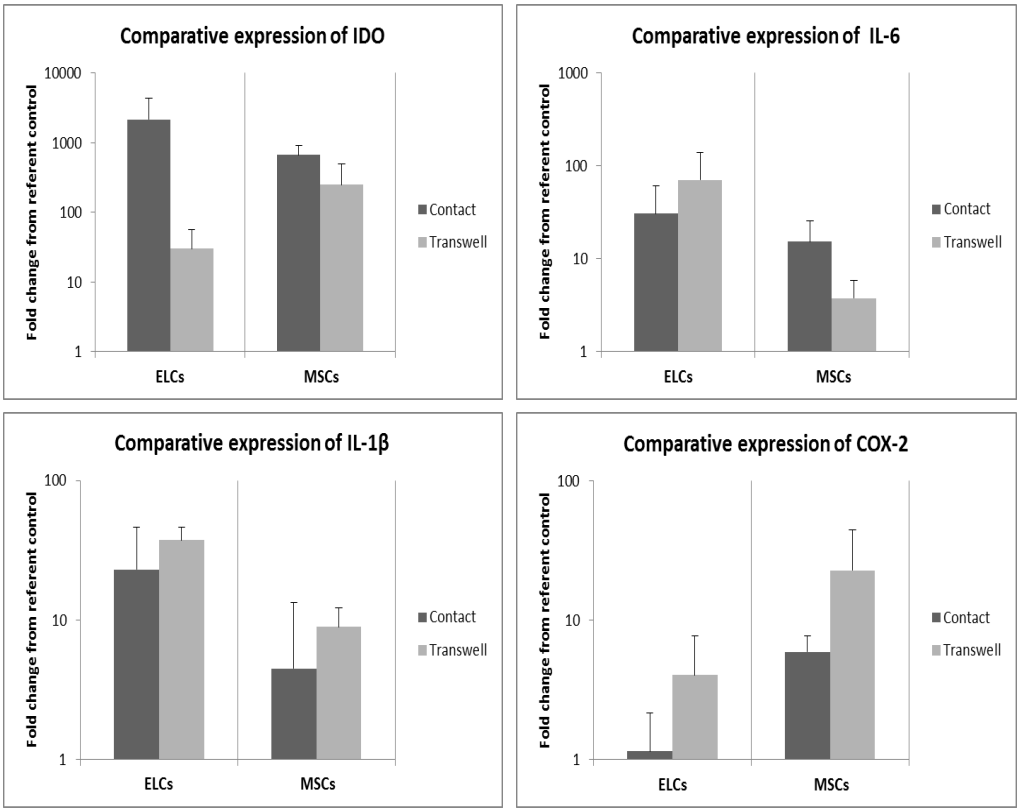
B1

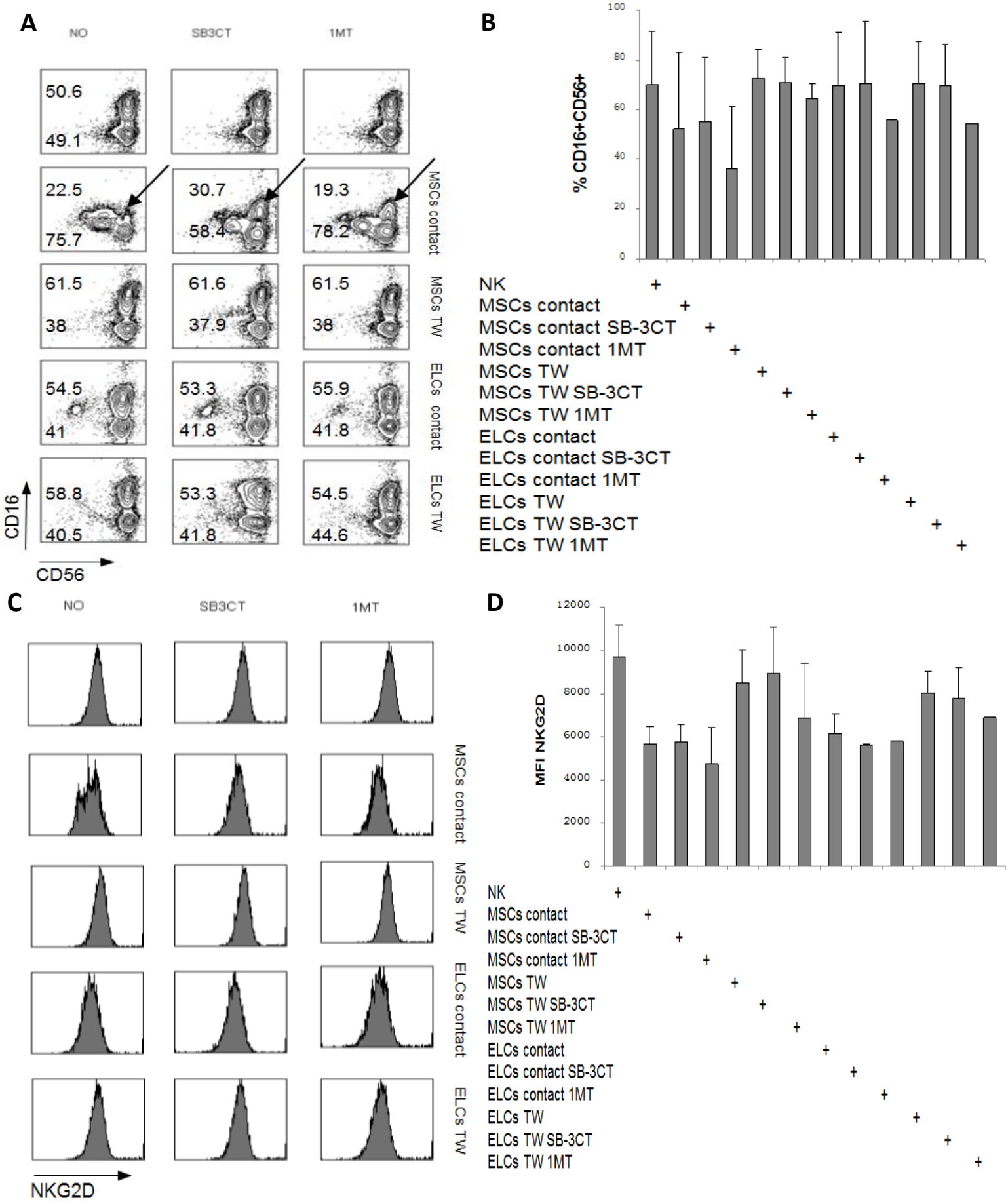

ELCs
ELCs+NK Contact
ELCs+NK Transwell
MSCs
MSCs+NK Contact
MSCs+NK Transwell
MMP-9
MMP-2

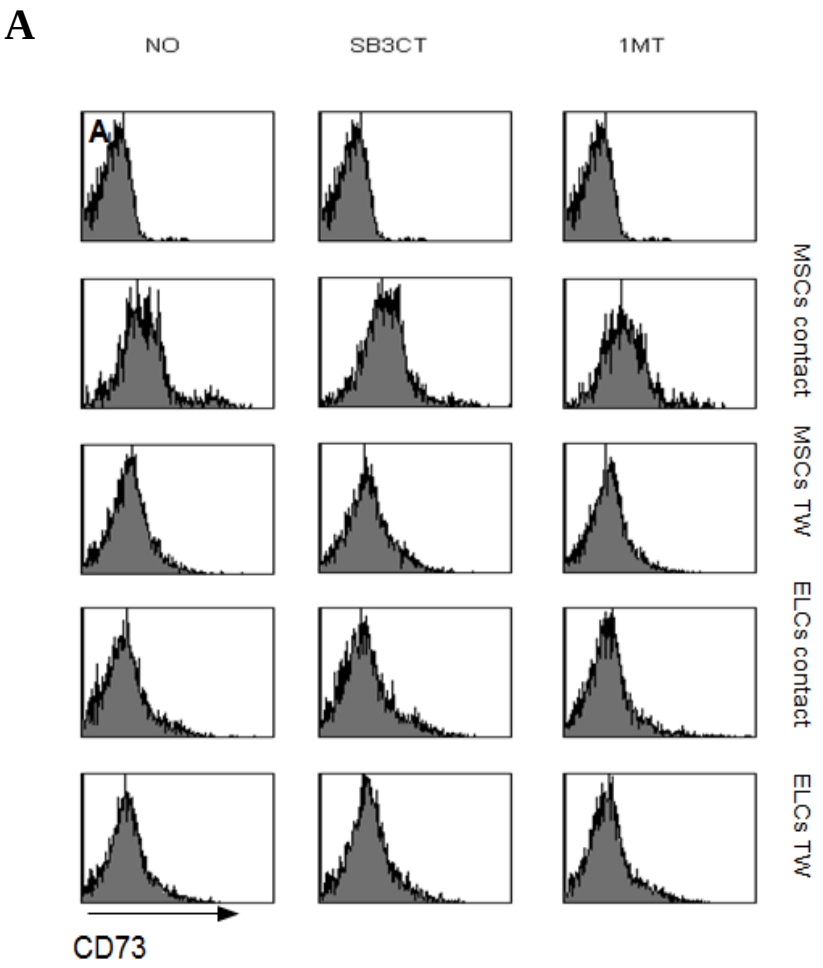
B2


MSC/NK cells
ELC/NK Cells
+SB-3CT
-SB-3CT
+SB-3CT
-SB-3CT
NK cells
Transwell
contact
150 100 50 0 50 100 150
% proliferation relative to activated NK cells

C


Comparative expression of IDO
Comparative expression of IL-6
Comparative expression of IL-1β
Comparative expression of COX-2
Fold change from referent control
Contact
Transwell
ELCs
MSCs


A
NO
SB3CT
1MT
50.6
49.1
22.5
75.7
30.7
58.4
19.3
78.2
MSCs contact
61.5
38
61.6
37.9
61.5
38
MSCs TW
54.5
41
53.3
41.8
55.9
41.8
ELCs contact
58.8
40.5
53.3
41.8
54.5
44.6
ELCs TW
CD16
CD56
B
% CD16+CD56+
100
80
60
40
20
0
NK +
MSCs contact +
MSCs contact SB-3CT +
MSCs contact 1MT +
MSCs TW +
MSCs TW SB-3CT +
MSCs TW 1MT +
ELCs contact +
ELCs contact SB-3CT +
ELCs contact 1MT +
ELCs TW +
ELCs TW SB-3CT +
ELCs TW 1MT +
C
NO
SB3CT
1MT
MSCs contact
MSCs TW
ELCs contact
ELCs TW
NKG2D
D
MFI NKG2D
12000
10000
8000
6000
4000
2000
0
NK +
MSCs contact +
MSCs contact SB-3CT +
MSCs contact 1MT +
MSCs TW +
MSCs TW SB-3CT +
MSCs TW 1MT +
ELCs contact +
ELCs contact SB-3CT +
ELCs contact 1MT +
ELCs TW +
ELCs TW SB-3CT +
ELCs TW 1MT +


A
NO
SB3CT
1MT
MSCs contact
MSCs TW
ELCs contact
ELCs TW
CD73
B
MFICD73
7000
6000
5000
4000
3000
2000
1000
0
NK
MSCs contact
MSCs contact SB-3CT
MSCs contact 1MT
MSCs TW
MSCs TW SB-3C
MSCs TW 1MT
ELCs contact
ELCs contact SB-3CT
ELCs contact 1MT
ELCs TW
ELCs TW SB-3CT
ELCs TW 1MT

1. Kurobe H, Maxfield MW, Breuer CK, Shinoka T. Concise review: tissue-engineered vascular grafts for cardiac surgery: past, present, and future. Stem Cells Transl Med. 2012 Jul;1(7):566–71.

2. Caplan A. Why are MSCs therapeutic? New data: new insight. J Pathol. 2009;217(2):318–24.

3. De Miguel MP, Fuentes-Julián S, Blázquez-Martínez A, Pascual CY, Aller MA, Arias J, et al. Immunosuppressive properties of mesenchymal stem cells: advances and applications. Curr Mol Med. 2012 Jun;12(5):574–91.

4. Hass R, Kasper C, Böhm S, Jacobs R. Different populations and sources of human mesenchymal stem cells (MSC): A comparison of adult and neonatal tissue-derived MSC. Cell Commun Signal CCS. 2011;9:12.

5. Mandapathil M, Hilldorfer B, Szczepanski MJ, Czystowska M, Szajnik M, Ren J, et al. Generation and accumulation of immunosuppressive adenosine by human CD4+CD25highFOXP3+ regulatory T cells. J Biol Chem. 2010 Mar 5;285(10):7176–86.

6. Cuerquis J, Romieu-Mourez R, François M, Routy J-P, Young YK, Zhao J, et al. Human mesenchymal stromal cells transiently increase cytokine production by activated T cells before suppressing T-cell proliferation: effect of interferon-γ and tumor necrosis factor-α stimulation. Cytotherapy. 2014 Feb;16(2):191–202.

7. La Rocca G, Corrao S, Lo Iacono M, Corsello T, Farina F, Anzalone R. Novel immunomodulatory markers expressed by human WJ-MSC: an updated review in regenerative and reparative medicine. Open Tissue Eng Regen Med J. 2012;5:50–8.

8. Najar M, Raicevic G, Jebbawi F, De Bruyn C, Meuleman N, Bron D, et al. Characterization and functionality of the CD200-CD200R system during mesenchymal stromal cell interactions with T-lymphocytes. Immunol Lett. 2012 Aug 30;146(1-2):50–6.

9. Pietilä M, Lehtonen S, Tuovinen E, Lähteenmäki K, Laitinen S, Leskelä H-V, et al. CD200 positive human mesenchymal stem cells suppress TNF-alpha secretion from CD200 receptor positive macrophage-like cells. PloS One. 2012;7(2):e31671.

10. Whiteside TL, Mandapathil M, Schuler P. The role of the adenosinergic pathway in immunosuppression mediated by human regulatory T cells (Treg). Curr Med Chem. 2011;18(34):5217–23.

11. Yen BL, Chang CJ, Liu K-J, Chen YC, Hu H-I, Bai C-H, et al. Brief report--human embryonic stem cell-derived mesenchymal progenitors possess strong immunosuppressive effects toward natural killer cells as well as T lymphocytes. Stem Cells Dayt Ohio. 2009 Feb;27(2):451–6.

12. Song H, Park H, Kim J, Park G, Kim Y-S, Kim SM, et al. IDO metabolite produced by EBV-transformed B cells inhibits surface expression of NKG2D in NK cells via the c-Jun N-terminal kinase (JNK) pathway. Immunol Lett. 2011 May;136(2):187–93.

13. Le Blanc K, Tammik C, Rosendahl K, Zetterberg E, Ringdén O. HLA expression and immunologic properties of differentiated and undifferentiated mesenchymal stem cells. Exp Hematol. 2003 Oct;31(10):890–6.

14. Liu H, Kemeny DM, Heng BC, Ouyang HW, Melendez AJ, Cao T. The immunogenicity and immunomodulatory function of osteogenic cells differentiated from mesenchymal stem cells. J Immunol Baltim Md 1950. 2006 Mar 1;176(5):2864–71.

15. Liu C-T, Yang Y-J, Yin F, Wang X, Yu X-H, Wang Q-H, et al. The immunobiological development of human bone marrow mesenchymal stem cells in the course of neuronal differentiation. Cell Immunol. 2006 Nov;244(1):19–32.

16. Huang X-P, Sun Z, Miyagi Y, McDonald Kinkaid H, Zhang L, Weisel RD, et al. Differentiation of allogeneic mesenchymal stem cells induces immunogenicity and limits their long-term benefits for myocardial repair. Circulation. 2010 Dec 7;122(23):2419–29.

17. Li P, Li S-H, Wu J, Zang W-F, Dhingra S, Sun L, et al. Interleukin-6 downregulation with mesenchymal stem cell differentiation results in loss of immunoprivilege. J Cell Mol Med. 2013 Sep;17(9):1136–45.

18. Liu S, Yuan M, Hou K, Zhang L, Zheng X, Zhao B, et al. Immune characterization of mesenchymal stem cells in human umbilical cord Wharton's jelly and derived cartilage cells. Cell Immunol. 2012 Jul;278(1–2):35–44.

19. Harmouch C, El-Omar R, Labrude P, Decot V, Menu P, Kerdjoudj H. Influence of serum percentage on the behavior of Wharton's jelly mesenchymal stem cells in culture. Biomed Mater Eng. 2013;23(4):273–80.

20. Xu Y, Meng H, Li C, Hao M, Wang Y, Yu Z, et al. Umbilical cord-derived mesenchymal stem cells isolated by a novel explantation technique can differentiate into functional endothelial cells and promote revascularization. Stem Cells Dev. 2010 Oct;19(10):1511–22.

21. Chen M-Y, Lie P-C, Li Z-L, Wei X. Endothelial differentiation of Wharton's jelly-derived mesenchymal stem cells in comparison with bone marrow-derived mesenchymal stem cells. Exp Hematol. 2009 May;37(5):629–40.

22. Jaffe EA, Nachman RL, Becker CG, Minick CR. Culture of human endothelial cells derived from umbilical veins. Identification by morphologic and immunologic criteria. J Clin Invest. 1973 Nov;52(11):2745–56.

23. Decot V, Voillard L, Latger-Cannard V, Aissi-Rothé L, Perrier P, Stoltz JF, et al. Natural-killer cell amplification for adoptive leukemia relapse immunotherapy: comparison of three cytokines, IL-2, IL-15, or IL-7 and impact on NKG2D, KIR2DL1, and KIR2DL2 expression. Exp Hematol. 2010 May;38(5):351–62.

24. Velot E, Haas B, Léonard F, Ernens I, Rolland-Turner M, Schwartz C, et al. Activation of the adenosine-A3 receptor stimulates matrix metalloproteinase-9 secretion by macrophages. Cardiovasc Res. 2008 Nov 1;80(2):246–54.

25. Zhang P, Baxter J, Vinod K, Tulenko TN, Di Muzio PJ. Endothelial differentiation of amniotic fluid-derived stem cells: synergism of biochemical and shear force stimuli. Stem Cells Dev. 2009 Nov;18(9):1299–308.

26. Janeczek Portalska K, Leferink A, Groen N, Fernandes H, Moroni L, van Blitterswijk C, et al. Endothelial differentiation of mesenchymal stromal cells. PloS One. 2012;7(10):e46842.

27. Rammal H, Beroud J, Gentils M, Labrude P, Menu P, Kerdjoudj H, et al. Reversing charges or how to improve Wharton's jelly mesenchymal stem cells culture on polyelectrolyte multilayer films. Biomed Mater Eng. 2013;23(4):299–309.

28. Boura C, Menu P, Payan E, Picart C, Voegel JC, Muller S, et al. Endothelial cells grown on thin polyelectrolyte mutlilayered films: an evaluation of a new versatile surface modification. Biomaterials. 2003 Sep;24(20):3521–30.

29. Ferrara N. Vascular endothelial growth factor: basic science and clinical progress. Endocr Rev. 2004 Aug;25(4):581–611.

30. Marelli-Berg FM, Clement M, Mauro C, Caligiuri G. An immunologist's guide to CD31 function in T-cells. J Cell Sci. 2013 Jun 1;126(Pt 11):2343–52.

31. Kronsteiner B, Wolbank S, Peterbauer A, Hackl C, Redl H, van Griensven M, et al. Human mesenchymal stem cells from adipose tissue and amnion influence T-cells depending on stimulation method and presence of other immune cells. Stem Cells Dev. 2011 Dec;20(12):2115–26.

32. Di Nicola M, Carlo-Stella C, Magni M, Milanesi M, Longoni PD, Matteucci P, et al. Human bone marrow stromal cells suppress T-lymphocyte proliferation induced by cellular or nonspecific mitogenic stimuli. Blood. 2002 May 15;99(10):3838–43.

33. Tse WT, Pendleton JD, Beyer WM, Egalka MC, Guinan EC. Suppression of allogeneic T-cell proliferation by human marrow stromal cells: implications in transplantation. Transplantation. 2003 Feb 15;75(3):389–97.

34. Ren G, Zhao X, Zhang L, Zhang J, L'Huillier A, Ling W, et al. Inflammatory cytokine-induced intercellular adhesion molecule-1 and vascular cell adhesion molecule-1 in mesenchymal stem cells are critical for immunosuppression. J Immunol Baltim Md 1950. 2010 Mar 1;184(5):2321–8.

35. Glennie S, Soeiro I, Dyson PJ, Lam EW-F, Dazzi F. Bone marrow mesenchymal stem cells induce division arrest anergy of activated T cells. Blood. 2005 Apr 1;105(7):2821–7.

36. Weiss ML, Anderson C, Medicetty S, Seshareddy KB, Weiss RJ, VanderWerff I, et al. Immune Properties of Human Umbilical Cord Wharton's Jelly-Derived Cells. STEM CELLS. 2008;26(11):2865–74.

37. Yoo KH, Jang IK, Lee MW, Kim HE, Yang MS, Eom Y, et al. Comparison of immunomodulatory properties of mesenchymal stem cells derived from adult human tissues. Cell Immunol. 2009;259(2):150–6.

38. Tipnis S, Viswanathan C, Majumdar AS. Immunosuppressive properties of human umbilical cord-derived mesenchymal stem cells: role of B7-H1 and IDO. Immunol Cell Biol. 2010 Nov;88(8):795–806.

39. Ding Y, Xu D, Feng G, Bushell A, Muschel RJ, Wood KJ. Mesenchymal Stem Cells Prevent the Rejection of Fully Allogenic Islet Grafts by the Immunosuppressive Activity of Matrix Metalloproteinase-2 and -9. Diabetes. 2009 Aug 1;58(8):1797–806.

40. Park M-J, Shin J-S, Kim Y-H, Hong S-H, Yang S-H, Shin J-Y, et al. Murine mesenchymal stem cells suppress T lymphocyte activation through IL-2 receptor α (CD25) cleavage by producing matrix metalloproteinases. Stem Cell Rev. 2011 Jun;7(2):381–93.

41. Nissinen L, Kähäri V-M. Matrix metalloproteinases in inflammation. Biochim Biophys Acta. 2014 Mar 14;

42. Kalinski P. Regulation of immune responses by prostaglandin E2. J Immunol Baltim Md 1950. 2012 Jan 1;188(1):21–8.

43. Yan Z, Zhuansun Y, Chen R, Li J, Ran P. Immunomodulation of mesenchymal stromal cells on regulatory T cells and its possible mechanism. Exp Cell Res. 2014 May 15;324(1):65–74.

44. Luz-Crawford P, Kurte M, Bravo-Alegria J, Contreras R, Nova-Lamperti E, Tejedor G, et al. Mesenchymal stem cells generate a CD4+CD25+Foxp3+ regulatory T cell population during the differentiation process of Th1 and Th17 cells. Stem Cell Res Ther. 2013 Jun 4;4(3):65.

45. Melief SM, Schrama E, Brugman MH, Tiemessen MM, Hoogduijn MJ, Fibbe WE, et al. Multipotent stromal cells induce human regulatory T cells through a novel pathway involving skewing of monocytes toward anti-inflammatory macrophages. STEM CELLS. 2013 Sep 1;31(9):1980–91.

46. Maria Spaggiari G, Moretta L. Cellular and molecular interactions of mesenchymal stem cells in innate immunity. Immunol Cell Biol. 2013 Jan;91(1):27–31.

47. Spaggiari GM, Capobianco A, Abdelrazik H, Becchetti F, Mingari MC, Moretta L. Mesenchymal stem cells inhibit natural killer-cell proliferation, cytotoxicity, and cytokine production: role of indoleamine 2,3-dioxygenase and prostaglandin E2. Blood. 2008 Feb 1;111(3):1327–33.

48. DelaRosa O, Sánchez-Correa B, Morgado S, Ramírez C, del Río B, Menta R, et al. Human adipose-derived stem cells impair natural killer cell function and exhibit low susceptibility to natural killer-mediated lysis. Stem Cells Dev. 2012 May 20;21(8):1333–43.

49. Lee B-K, Kim M-J, Jang H-S, Lee H-R, Ahn K-M, Lee J-H, et al. A high concentration of MMP-2/gelatinase A and MMP-9/gelatinase B reduce NK cell-mediated cytotoxicity against an oral squamous cell carcinoma cell line. Vivo Athens Greece. 2008 Oct;22(5):593–7.

50. Grzywacz B, Kataria N, Verneris MR. CD56(dim)CD16(+) NK cells downregulate CD16 following target cell induced activation of matrix metalloproteinases. Leukemia. 2007 Feb;21(2):356–359; author reply 359.

51. Harrison D, Phillips JH, Lanier LL. Involvement of a metalloprotease in spontaneous and phorbol ester-induced release of natural killer cell-associated Fc gamma RIII (CD16-II). J Immunol Baltim Md 1950. 1991 Nov 15;147(10):3459–65.

52. Sotiropoulou PA, Perez SA, Gritzapis AD, Baxevanis CN, Papamichail M. Interactions between human mesenchymal stem cells and natural killer cells. Stem Cells Dayt Ohio. 2006 Jan;24(1):74–85.

53. Bouma MG, van den Wildenberg FA, Buurman WA. Adenosine inhibits cytokine release and expression of adhesion molecules by activated human endothelial cells. Am J Physiol. 1996 Feb;270(2 Pt 1):C522–529.

54. Hasko G, Linden J, Cronstein B, Pacher P. Adenosine receptors: therapeutic aspects for inflammatory and immune diseases. Nat Rev Drug Discov. 2008 Sep;7(9):759–70.

55. Hu Y, Davison F, Zhang Z, Xu Q. Endothelial replacement and angiogenesis in arteriosclerotic lesions of allografts are contributed by circulating progenitor cells. Circulation. 2003 Dec 23;108(25):3122–7.

56. Nowak G, Karrar A, Holmén C, Nava S, Uzunel M, Hultenby K, et al. Expression of vascular endothelial growth factor receptor-2 or Tie-2 on peripheral blood cells defines functionally competent cell populations capable of reendothelialization. Circulation. 2004 Dec 14;110(24):3699–707.

57. Levenberg S, Rouwkema J, Macdonald M, Garfein ES, Kohane DS, Darland DC, et al. Engineering vascularized skeletal muscle tissue. Nat Biotechnol. 2005 Jul;23(7):879–84.

58. Schächinger V, Assmus B, Britten MB, Honold J, Lehmann R, Teupe C, et al. Transplantation of progenitor cells and regeneration enhancement in acute myocardial infarction: final one-year results of the TOPCARE-AMI Trial. J Am Coll Cardiol. 2004 Oct 19;44(8):1690–9.

59. Tateishi-Yuyama E, Matsubara H, Murohara T, Ikeda U, Shintani S, Masaki H, et al. Therapeutic angiogenesis for patients with limb ischaemia by autologous transplantation of bone-marrow cells: a pilot study and a randomised controlled trial. Lancet. 2002 Aug 10;360(9331):427–35.

60. Vater C, Kasten P, Stiehler M. Culture media for the differentiation of mesenchymal stromal cells. Acta Biomater. 2011 Feb;7(2):463–77.

61. Prasad Chennazhy K, Krishnan LK. Effect of passage number and matrix characteristics on differentiation of endothelial cells cultured for tissue engineering. Biomaterials. 2005 Oct;26(28):5658–67.

62. La Rocca G, Lo Iacono M, Corsello T, Corrao S, Farina F, Anzalone R. Human Wharton's jelly mesenchymal stem cells maintain the expression of key immunomodulatory molecules when subjected to osteogenic, adipogenic and chondrogenic differentiation in vitro: new perspectives for cellular therapy. Curr Stem Cell Res Ther. 2013 Jan;8(1):100–13.

63. El Omar R, Beroud J, Stoltz JF, Menu P, Velot E, Decot V. Umbilical cord mesenchymal stem cells: the new gold standard for mesenchymal stem cell based therapies? Tissue Eng Part B Rev. 2014 Feb 19;

64. Gang EJ, Jeong JA, Han S, Yan Q, Jeon C-J, Kim H. In vitro endothelial potential of human UC blood-derived mesenchymal stem cells. Cytotherapy. 2006;8(3):215–27.

65. Doan CC, Le TL, Hoang NS, Doan NT, Le VD, Si Do M. Differentiation of Umbilical Cord Lining Membrane-Derived Mesenchymal Stem Cells into Endothelial-Like Cells. Iran Biomed J. 2014 Apr 15;18(2):67–75.

66. Gaafar TM, Abdel Rahman HA, Attia W, Hamza HS, Brockmeier K, El Hawary RE. Comparative characteristics of endothelial-like cells derived from human adipose mesenchymal stem cells and umbilical cord blood-derived endothelial cells. Clin Exp Med. 2014 May;14(2):177–84.

67. Oswald J, Boxberger S, Jørgensen B, Feldmann S, Ehninger G, Bornhäuser M, et al. Mesenchymal stem cells can be differentiated into endothelial cells in vitro. Stem Cells Dayt Ohio. 2004;22(3):377–84.

68. Grünewald JK, Ridley AJ. CD73 represses pro-inflammatory responses in human endothelial cells. J Inflamm. 2010 Feb 5;7(1):10.

69. Jalkanen S, Salmi M. VAP-1 and CD73, Endothelial Cell Surface Enzymes in Leukocyte Extravasation. Arterioscler Thromb Vasc Biol. 2008 Jan 1;28(1):18–26.

70. Narravula S, Lennon PF, Mueller BU, Colgan SP. Regulation of Endothelial CD73 by Adenosine: Paracrine Pathway for Enhanced Endothelial Barrier Function. J Immunol. 2000 Nov 1;165(9):5262–8.

71. Ohta M, Toyama K, Gutterman DD, Campbell WB, Lemaître V, Teraoka R, et al. Ecto-5'-nucleotidase, CD73, is an endothelium-derived hyperpolarizing factor synthase. Arterioscler Thromb Vasc Biol. 2013 Mar;33(3):629–36.

72. Comerford KM, Lawrence DW, Synnestvedt K, Levi BP, Colgan SP. Role of vasodilator-stimulated phosphoprotein in PKA-induced changes in endothelial junctional permeability. FASEB J. 2002 Apr 1;16(6):583–5.

73. Hoeben A, Landuyt B, Highley MS, Wildiers H, Van Oosterom AT, De Bruijn EA. Vascular endothelial growth factor and angiogenesis. Pharmacol Rev. 2004 Dec;56(4):549–80.

74. Gory-Fauré S, Prandini MH, Pointu H, Roullot V, Pignot-Paintrand I, Vernet M, et al. Role of vascular endothelial-cadherin in vascular morphogenesis. Dev Camb Engl. 1999 May;126(10):2093–102.

75. Woodfin A, Voisin M-B, Nourshargh S. PECAM-1: a multi-functional molecule in inflammation and vascular biology. Arterioscler Thromb Vasc Biol. 2007 Dec;27(12):2514–23.

76. Niwa K, Kado T, Sakai J, Karino T. The effects of a shear flow on the uptake of LDL and acetylated LDL by an EC monoculture and an EC-SMC coculture. Ann Biomed Eng. 2004 Apr;32(4):537–43.

77. Fischer LJ, McIlhenny S, Tulenko T, Golesorkhi N, Zhang P, Larson R, et al. Endothelial differentiation of adipose-derived stem cells: effects of endothelial cell growth supplement and shear force. J Surg Res. 2009 Mar;152(1):157–66.

78. English K, Ryan JM, Tobin L, Murphy MJ, Barry FP, Mahon BP. Cell contact, prostaglandin E2 and transforming growth factor beta 1 play non-redundant roles in human mesenchymal stem cell induction of CD4+CD25Highforkhead box P3+ regulatory T cells. Clin Exp Immunol. 2009;156(1):149–60.

79. Montespan F, Deschaseaux F, d&#xe9, ric, Sens&#xe9, b&#xe9, et al. Osteodifferentiated Mesenchymal Stem Cells from Bone Marrow and Adipose Tissue Express HLA-G and Display Immunomodulatory Properties in HLA-Mismatched Settings: Implications in Bone Repair Therapy. J Immunol Res. 2014 Apr 30;2014:e230346.

80. Bouffi C, Bony C, Courties G, Jorgensen C, Noël D. IL-6-dependent PGE2 secretion by mesenchymal stem cells inhibits local inflammation in experimental arthritis. PloS One. 2010;5(12):e14247.

81. Djouad F, Charbonnier L-M, Bouffi C, Louis-Plence P, Bony C, Apparailly F, et al. Mesenchymal Stem Cells Inhibit the Differentiation of Dendritic Cells Through an Interleukin-6-Dependent Mechanism. STEM CELLS. 2007 Aug 1;25(8):2025–32.

82. Chan C-K, Wu K-H, Lee Y-S, Hwang S-M, Lee M-S, Liao S-K, et al. The comparison of interleukin 6-associated immunosuppressive effects of human ESCs, fetal-type MSCs, and adult-type MSCs. Transplantation. 2012 Jul 27;94(2):132–8.

83. Najar M, Rouas R, Raicevic G, Boufker HI, Lewalle P, Meuleman N, et al. Mesenchymal stromal cells promote or suppress the proliferation of T lymphocytes from cord blood and peripheral blood: the importance of low cell ratio and role of interleukin-6. Cytotherapy. 2009;11(5):570–83.

84. Li P, Li S-H, Wu J, Zang W-F, Dhingra S, Sun L, et al. Interleukin-6 downregulation with mesenchymal stem cell differentiation results in loss of immunoprivilege. J Cell Mol Med. 2013;n/a–n/a.

85. Aggarwal S, Pittenger MF. Human mesenchymal stem cells modulate allogeneic immune cell responses. Blood. 2005 Feb 15;105(4):1815–22.

86. Castro-Manrreza ME, Mayani H, Monroy-García A, Flores-Figueroa E, Chávez-Rueda K, Legorreta-Haquet V, et al. Human Mesenchymal Stromal Cells from Adult and Neonatal Sources: A Comparative In Vitro Analysis of Their Immunosuppressive Properties Against T Cells. Stem Cells Dev. 2014 Feb 24;140224074517006.

87. Ryan JM, Barry F, Murphy JM, Mahon BP. Interferon-gamma does not break, but promotes the immunosuppressive capacity of adult human mesenchymal stem cells. Clin Exp Immunol. 2007 Aug;149(2):353–63.

88. Selmani Z, Naji A, Zidi I, Favier B, Gaiffe E, Obert L, et al. Human leukocyte antigen-G5 secretion by human mesenchymal stem cells is required to suppress T lymphocyte and natural killer function and to induce CD4+CD25highFOXP3+ regulatory T cells. Stem Cells Dayt Ohio. 2008 Jan;26(1):212–22.

89. Baggiolini M, Clark-Lewis I. Interleukin-8, a chemotactic and inflammatory cytokine. FEBS Lett. 1992 Jul 27;307(1):97–101.

90. Hoogduijn MJ, Popp F, Verbeek R, Masoodi M, Nicolaou A, Baan C, et al. The immunomodulatory properties of mesenchymal stem cells and their use for immunotherapy. Int Immunopharmacol. 2010 Dec;10(12):1496–500.

91. Zhu Y, Guan Y, Huang H, Wang Q. Human umbilical cord blood mesenchymal stem cell transplantation suppresses inflammatory responses and neuronal apoptosis during early stage of focal cerebral ischemia in rabbits. Acta Pharmacol Sin. 2014 May;35(5):585–91.

92. Duffner UA, Maeda Y, Cooke KR, Reddy P, Ordemann R, Liu C, et al. Host dendritic cells alone are sufficient to initiate acute graft-versus-host disease. J Immunol Baltim Md 1950. 2004 Jun 15;172(12):7393–8.

93. Chinnadurai R, Copland IB, Patel SR, Galipeau J. IDO-Independent Suppression of T Cell Effector Function by IFN-γ–Licensed Human Mesenchymal Stromal Cells. J Immunol. 2014 Feb 15;192(4):1491–501.

94. Le Blanc K, Rasmusson I, Götherström C, Seidel C, Sundberg B, Sundin M, et al. Mesenchymal stem cells inhibit the expression of CD25 (interleukin-2 receptor) and CD38 on phytohaemagglutinin-activated lymphocytes. Scand J Immunol. 2004 Sep;60(3):307–15.

95. Di Ianni M, Del Papa B, De Ioanni M, Moretti L, Bonifacio E, Cecchini D, et al. Mesenchymal cells recruit and regulate T regulatory cells. Exp Hematol. 2008 Mar;36(3):309–18.

96. Luan X, Li G, Wang G, Wang F, Lin Y. Human placenta-derived mesenchymal stem cells suppress T cell proliferation and support the culture expansion of cord blood $CD34^+$ cells: a comparison with human bone marrow-derived mesenchymal stem cells. Tissue Cell. 2013 Feb;45(1):32–8.

97. Manochantr S, U-pratya Y, Kheolamai P, Rojphisan S, Chayosumrit M, Tantrawatpan C, et al. Immunosuppressive properties of mesenchymal stromal cells derived from amnion, placenta, Wharton's jelly and umbilical cord. Intern Med J. 2013;43(4):430–9.

98. Bassi EJ, Aita CAM, Câmara NOS. Immune regulatory properties of multipotent mesenchymal stromal cells: Where do we stand? World J Stem Cells. 2011 Jan 26;3(1):1–8.

99. Maccario R, Podestà M, Moretta A, Cometa A, Comoli P, Montagna D, et al. Interaction of human mesenchymal stem cells with cells involved in alloantigen-specific immune response favors the differentiation of CD4+ T-cell subsets expressing a regulatory/suppressive phenotype. Haematologica. 2005 Apr;90(4):516–25.

100. Ribeiro A, Laranjeira P, Mendes S, Velada I, Leite C, Andrade P, et al. Mesenchymal stem cells from umbilical cord matrix, adipose tissue and bone marrow exhibit different capability to suppress peripheral blood B, natural killer and T cells. Stem Cell Res Ther. 2013;4(5):125.

101. Boissel L, Tuncer HH, Betancur M, Wolfberg A, Klingemann H. Umbilical cord mesenchymal stem cells increase expansion of cord blood natural killer cells. Biol Blood Marrow Transplant J Am Soc Blood Marrow Transplant. 2008 Sep;14(9):1031–8.

102. Parks WC, Wilson CL, López-Boado YS. Matrix metalloproteinases as modulators of inflammation and innate immunity. Nat Rev Immunol. 2004 Aug;4(8):617–29.

103. Cao Y, Sun Z, Liao L, Meng Y, Han Q, Zhao RC. Human adipose tissue-derived stem cells differentiate into endothelial cells in vitro and improve postnatal neovascularization in vivo. Biochem Biophys Res Commun. 2005 Jul 1;332(2):370–9.

104. Krampera M, Cosmi L, Angeli R, Pasini A, Liotta F, Andreini A, et al. Role for interferon-gamma in the immunomodulatory activity of human bone marrow mesenchymal stem cells. Stem Cells Dayt Ohio. 2006 Feb;24(2):386–98.

105. Ramasamy R, Tong CK, Seow HF, Vidyadaran S, Dazzi F. The immunosuppressive effects of human bone marrow-derived mesenchymal stem cells target T cell proliferation but not its effector function. Cell Immunol. 2008 Feb;251(2):131–6.

106. Curran T-A, Jalili RB, Farrokhi A, Ghahary A. IDO expressing fibroblasts promote the expansion of antigen specific regulatory T cells. Immunobiology. 2014 Jan;219(1):17–24.

107. Chung DJ, Rossi M, Romano E, Ghith J, Yuan J, Munn DH, et al. Indoleamine 2,3-dioxygenase-expressing mature human monocyte-derived dendritic cells expand potent autologous regulatory T cells. Blood. 2009 Jul 16;114(3):555–63.

108. Park M-J, Min S-Y, Park K-S, Cho Y-G, Cho M-L, Jung Y-O, et al. Indoleamine 2,3-dioxygenase-expressing dendritic cells are involved in the generation of CD4+CD25+ regulatory T cells in Peyer's patches in an orally tolerized, collagen-induced arthritis mouse model. Arthritis Res Ther. 2008;10(1):R11.

109. Curti A, Pandolfi S, Valzasina B, Aluigi M, Isidori A, Ferri E, et al. Modulation of tryptophan catabolism by human leukemic cells results in the conversion of CD25- into CD25+ T regulatory cells. Blood. 2007 Apr 1;109(7):2871–7.

110. Chauveau A, Tonnerre P, Pabois A, Gavlovsky P-J, Chatelais M, Coupel S, et al. Endothelial cell activation and proliferation modulate NKG2D activity by regulating MICA expression and shedding. J Innate Immun. 2014;6(1):89–104.

111. Hoskin DW, Mader JS, Furlong SJ, Conrad DM, Blay J. Inhibition of T cell and natural killer cell function by adenosine and its contribution to immune evasion by tumor cells (Review). Int J Oncol. 2008 Mar;32(3):527–35.

112. Häusler SFM, Montalbán del Barrio I, Strohschein J, Anoop Chandran P, Engel JB, Hönig A, et al. Ectonucleotidases CD39 and CD73 on OvCA cells are potent adenosine-generating enzymes responsible for adenosine receptor 2A-dependent suppression of T cell function and NK cell cytotoxicity. Cancer Immunol Immunother CII. 2011 Oct;60(10):1405–18.

113. Schuler PJ, Saze Z, Hong CS, Muller L, Gillespie DG, Cheng D, et al. Human CD4(+) CD39(+) regulatory T cells produce adenosine upon co-expression of surface CD73 or contact with CD73(+) exosomes or CD73(+) cells. Clin Exp Immunol. 2014 Apr 18;

114. Saldanha-Araujo F, Ferreira FIS, Palma PV, Araujo AG, Queiroz RHC, Covas DT, et al. Mesenchymal stromal cells up-regulate CD39 and increase adenosine production to suppress activated T-lymphocytes. Stem Cell Res. 2011 Jul;7(1):66–74.

Chapitre 7 : Discussion, conclusions et perspectives

L'intérêt de la régénération des vaisseaux sanguins dans le traitement des pathologies liées à une déficience vasculaire est l'un des domaines de recherche les plus importants de l'ingénierie tissulaire reposant sur les cellules endothéliales (110,289,290). De nombreuses études ont montré l'importance des cellules endothéliales dans la réparation de l'endothélium endommagé et la néoformation des vaisseaux sanguins (291). Ces cellules peuvent également améliorer la perfusion chez les patients atteints de maladies vasculaires, tels que l'artériopathie périphérique ou l'infarctus du myocarde (292,293). Cependant, l'utilisation de cellules endothéliales matures dans l'ingénierie tissulaire est soumise à plusieurs contraintes telles que l'isolement invasif des cellules autologues nécessaires pour générer des conduits vasculaires (287) et la perte de leur potentiel de prolifération ainsi que leurs fonctions, une fois mises en cultures *in vitro* (294). Pour s'affranchir de ces contraintes, les investigateurs ont essayé de trouver d'alternatives. Le fait que les CSM peuvent être isolées plus facilement et différenciées en CE permet d'envisager ces cellules comme alternative aux cellules matures. En outre, leurs faibles capacités immunosuppressives et leur hypo-immunogénicité permettent l'utilisation de CSM allogéniques sans la nécessité d'un traitement immunosuppresseur après transplantation, facilitant d'avantage l'utilisation des CSM en tant que composante cellulaire dans l'ingénierie tissulaire (287).

Au cours des dernières années, de nombreuses études se sont intéressées aux CSM de la gelée de Wharton du cordon ombilical. La gelée de Wharton est le composant principal de la matrice extracellulaire du cordon ombilical, renfermant une population de cellules « fibroblaste-like », communément identifiées comme des CSM (6). Elles figurent parmi les cellules les plus étudiées en tant qu'alternative aux CSM de la moelle osseuse, la source la plus utilisée de CSM, et apparaissent comme un outil prometteur puisqu'elles permettent d'avoir des rendements cellulaires plus importants. De plus, les CSM-GW se caractérisent par une plus importante multipotentialité puisque ce sont des cellules plus primitives que les CSM adultes d'où l'intérêt qui leur est porté en médecine régénératrice. Plusieurs études se sont notamment intéressées à l'application des CSM-GW en ingénierie tissulaire vasculaire et plus particulièrement à leur

capacité de différenciation endothéliale (295). Des études publiées antérieurement ont réussi à différencier les CSM provenant de diverses sources en cellules endothéliales (110,114,133,296–300). Dans cette étude, nous avons pu aussi obtenir des cellules endothéliales différenciées à partir de CSM-GW qui ont été ensemencées sur des films de polyélectrolytes constitués de 4 bicouches de (PAH-PSS) et cultivées dans le milieu commercial "Endothelial Growth Medium-2" (EGM-2, Lonza) complété par des facteurs de croissance et du SVF. Dans la littérature, différents protocoles de différenciation endothéliale ont été décrits utilisant des concentrations différentes en SVF: 0% (301), 2% (132), 3% (114,137) et 5% (110,299). Vu que le SVF est considéré comme un additif indésirable aux cellules développées et différenciées à des fins thérapeutiques chez l'Homme, et que le pourcentage de SVF (5%) conseillé par le fournisseur n'a pas été bénéfique pour la prolifération et la différenciation de nos cellules, nous avons testé une gamme de concentrations (données non représentées) et réussi à avoir une meilleure différenciation en réduisant le pourcentage à 0,5%. Les prochaines études viseront à éliminer complètement le SVF ou le remplacer par du lysat plaquettaire.

L'identification de la différenciation des CSM-GW en CE a été d'abord évaluée par des changements morphologiques. Il est intéressant de noter que les CSM-GW ensemencées sur les films et cultivées en présence d'EGM-2 semblent s'engager dans la voie endothéliale en présentant un changement morphologique remarquable après 2 semaines de différenciation, ce qui contraste avec les résultats publiés dans d'autres études où aucun changement morphologique n'a été observé (114,132,296,299).

Un suivi cinétique de l'expression de certains marqueurs mésenchymateux par les CEL a révélé que pendant le processus de différenciation, l'expression de CD105 et CD90 a diminué, mais que les CEL ont conservé une expression de CD73 similaire aux cellules non-différenciées. Ces résultats diffèrent de ceux obtenus par Gaafar *et al.* qui ont montré que les CEL différenciées à partir de CSM du tissu adipeux ont conservé une expression de CD90, CD73 et CD105 avec un niveau similaire aux CSM non différenciées (296). La perte d'expression des marqueurs mésenchymateux peut être liée à un meilleur potentiel de différenciation endothélial des CSM-GW par rapport aux CSM adultes, ce qui a été déjà démontré par Chen *et al.* en 2009 (110) et plus récemment par notre groupe (données pas encore publiées). Le CD73 est une 5'-ectonucleotidase exprimée abondamment sur les CE, qui utilise l'adénosine monophosphate

(AMP) extracellulaire pour produire de l'adénosine (302–305). L'adénosine triphosphate (ATP) est physiologiquement sécrétée dans l'espace extracellulaire grâce à un mécanisme de transport régulé. De l'ATP supplémentaire est sécrétée par les cellules lytiques sur les sites de lésions. Au niveau de l'endothélium vasculaire, l'ATP extracellulaire est déphosphorylée en adénosine diphosphate (ADP) puis en AMP par le CD39 et finalement en adénosine par le CD73. L'ATP est pro-inflammatoire, alors que l'adénosine produite est anti-inflammatoire et agit sur plusieurs molécules et mécanismes impliqués dans l'extravasation des leucocytes. En outre, l'adénosine inhibe les réactions immunitaires en réduisant la sécrétion de cytokines par le système vasculaire et les leucocytes (306). L'adénosine renforce également la fonction de barrière assurée par les cellules endothéliales et cela par phosphorylation des protéines impliquées dans les jonctions serrées (307). Ainsi, l'importante expression de CD73 par nos CEL met en évidence l'une des nombreuses fonctions des CE et peut être considérée comme l'un des tests permettant de vérifier la fonctionnalité endothéliale.

Pour évaluer la différenciation endothéliale, nous avons choisi de déterminer l'expression de certains marqueurs endothéliaux jouant des rôles importants dans les processus physiologiques de maturation de l'endothélium. Après 2 semaines de différenciation, les CEL ont montré une expression positive de CD31, VE-cadhérine et VEGFR2 d'une manière similaire aux HUVEC considérées comme contrôles positifs. Le CD31, la VE-cadhérine et le VEGF-R2 sont trois marqueurs endothéliaux spécifiques connus pour leur rôle important dans la maturation de l'endothélium durant l'angiogenèse (308). Le VEGFR2, l'un des deux principaux récepteurs du VEGF, joue un rôle essentiel *in vivo* mais s'associe également aux métalloprotéinases matricielles pour former des structures de type capillaire *in vitro.* Des données publiées dans la littérature rapportent que son expression est augmentée après la différenciation des CSM en présence de VEGF qui est un facteur de croissance important pour la différenciation endothéliale (309). Il a été démontré que la VE-cadhérine est nécessaire pour la réparation des dommages induits par les pathologies vasculaires et pour la genèse vasculaire (310). Le CD31, nommé également PECAM-1 (platelet endothelial cell adhesion molecule-1), est un récepteur transmembranaire hémophilique connu pour avoir divers rôles dans la biologie vasculaire, y compris l'angiogenèse, la fonction plaquettaire, et la thrombose (311). Notre résultat concernant l'expression de CD31 est contradictoire à l'étude d'Oswald *et al.* (132) et Janeczek *et al.* (298) qui n'ont pas montré une expression de CD31 sur leur CE différenciées à partir de CSM-MO,

mais dans d'autres études l'expression de cette protéine a été fortement augmentée après la différenciation endothéliale (110,114). L'expression de ces marqueurs par les CSM-GW différenciées semble valider la réussite de la différenciation endothéliale; cependant une différenciation réussie doit être vérifiée ultérieurement au niveau fonctionnel. Parmi les fonctions endothéliales, nous avons évalué la capacité des CSM-GW stimulées par l'EGM-2 à incorporer les lipoprotéines de basse densité acétylées (Dil-LDL-Ac). Les résultats ont montré que les CEL ont été capables d'incorper les LDL. Certaines études ont montré que l'incorporation du LDL-Ac par les CE est modulée par la force de cisaillement (297,312), contrairement à nos résultats où l'EGM-2 seul combiné aux films de polyélectrolytes $(PAH\text{-}PSS)_4$ dans un état de culture statique ont été suffisants pour que nos CEL exercent cette fonction, et tout en exprimant des marqueurs endothéliaux spécifiques au niveau protéique.

De nombreuses études ont montré que les CSM pourraient moduler les réponses immunitaires innée et adaptative par plusieurs mécanismes. Hors leurs propriétés immunomodulatrices s'avèrent être d'une grande importance pour l'utilisation potentielle de ces cellules en clinique (6,267). L'objectif de cette étude a donc été d'élucider si les propriétés immunomodulatrices des CSM persistent ou sont altérées suite à la différenciation des CSM vers un phénotype endothélial.

Certains auteurs ont montré que l'absence de l'expression des molécules co-stimulatrices telles que CD80 et / ou CD86 par les CSM peut induire une anergie des cellules T, un mécanisme par lequel les CSM peuvent induire une immunosuppression (313). Des études antérieures ont montré que les cellules chondrogéniques, adipogéniques et ostéogéniques différenciées à partir de CSM-GW n'expriment pas ces deux molécules (4,6,314). Conformément à ces études, nous avons pu observer que seulement 1,9% des CEL ont exprimé le CD86 après différenciation, cette très faible expression pourrait alors induire une anergie des cellules T. Nous avons obtenu le même résultat en ce qui concerne l'expression de la molécule du complexe d'histocompatibilité de classe II, HLA-DR, contrairement aux rapports précédents montrant que la différenciation *in vitro* des CSM-MO allogéniques en cellules myogéniques, musculaires lisses, endothéliales (315) et neurales (3) ont induit significativement l'expression de cette molécule. Cela suggérerait donc que les CSM-WJ garderaient leur immunoprivilège après différenciation en CEL.

L'aspect immunogène des CEL a été ensuite évalué dans une réaction lymphocytaire mixte où ces dernières représentaient les cellules stimulantes et les CMN HLA-incompatibles représentaient les cellules répondeuses. Puisque les CEL n'ont pas induit la prolifération des cellules mononucléées (CMN), elles peuvent être qualifiées de cellules non immunogènes. Afin de déterminer si l'effet immunosuppressif des CSM-GW est conservé après la différenciation endothéliale, nous avons étudié la capacité des CEL à moduler l'alloprolifération des CMN stimulées par un mitogène, la phytohémagglutinine (PHA). Les deux populations ont été mises soit en contact direct ; soit séparées par une chambre de Boyden pour évaluer le mécanisme par lequel se fait l'immunosuppression. En effet, si une inhibition de la prolifération est observée lorsque les cellules sont séparées par la chambre, cela suggère l'implication de médiateurs solubles dans l'inhibition de la prolifération. De manière inattendue, nous avons pu observer un effet suppressif plus important des CEL que des CSM-GW et celui-ci semble être majoritairement médié par un contact cellulaire direct sans toute fois exclure l'effet de médiateurs dont la sécrétion seraient déclenchées par le contact. Des résultats similaires ont été obtenus après la différenciation des CSM en cellules adipeuses, osseuses et cartilagineuses (4,7,314). Même si l'immunosuppression semble être médiée par un contact direct, nous avons voulu savoir s'il a eu des altérations dans la sécrétion de certaines cytokines clés pro- et anti-inflammatoires dans les surnageants de co-culture en comparaison avec les CMN seules activées, considérées comme contrôle positif. De façon intéressante, nous avons détecté une augmentation des concentrations d'IL-6. Cette augmentation était plus importante dans les co-cultures de CEL / CMN activées. L'IL-6 est connue pour être l'un des facteurs sécrétés par les CSM et impliqué dans une série d'actions immunosuppressives (243–246). Récemment, Li *et al.* ont obtenu un résultat contradictoire qui montre que la différenciation des CSM en cellules myogéniques, endothéliales et musculaires lisses a induit une diminution de la sécrétion d'IL-6 et que cet effet est due à la différenciation indépendamment du type cellulaire ciblé (316). Ils ont suggéré que des faibles concentrations en l'IL-6 contribueraient au rejet des CSM allogéniques après implantation. Ainsi, notre résultat renforce l'hypothèse que les CEL peuvent être bien tolérées après implantation *in vivo*. Nous avons constaté aussi une inhibition de la sécrétion de TNF-α dans les co-cultures en présence des CSM-GW et des CEL. Le TNF-α est une des cytokines pro-inflammatoires sécrétées par les cellules immunitaires qui active les CSM et augmente leur capacité immunosuppressive (241,317). Ainsi, les CEL ont conservé la capacité d'inhiber la

sécrétion de cette cytokine pro-inflammatoire. Précédemment, il a été montré que l'IL-10 est impliquée dans l'immunosuppression médiée par les CSM de MO et du sang du cordon ombilical et aussi dans la génération de Treg (317–320). De façon inattendue, nous avons observé une diminution des concentrations de l'IL-10 dans les deux co-cultures avec CEL et CSM-GW où des plus faibles concentrations d'IL-8 ont été aussi détectées. L'IL-8 est une cytokine inflammatoire produite par les cellules souches mésenchymateuses et connue pour induire la chimiotaxie en activant les neutrophiles (321). Ce résultat est en accord avec l'étude de Hoogdjuin *et al.* qui ont montré une diminution de la sécrétion d'IL-8 par les CSM stimulées par l'IFN-γ, en comparaison avec des CSM non stimulées, ce qui suggère que la chimiotaxie médiée par les CSM n'implique les neutrophiles que dans les conditions non inflammatoires (322). Plusieurs études ont décrit une augmentation de l'expression de l'IL-1β, une cytokine anti-inflammatoire, par les CSM dans des conditions inflammatoires (49). Nous avons pu observer le même résultat obtenu uniquement dans les co-cultures avec les CSM.

Ces résultats sont importants car, *in vivo*, les CSM-GW et les CEL agissent sur la plupart des sous-ensembles de leucocytes impliqués directement ou indirectement dans la régulation du système immunitaire. Cependant, à notre connaissance, il n'existe pas encore de rapports élucidant les effets des cellules différenciées sur : **(1)** des populations enrichies en cellules T CD3+, ce qui est important dans le contexte de la GVHD comme elles sont les cellules effectrices essentielles dans cette maladie (323); et **(2)** les cellules NK qui sont les cellules effectrices principales de la réponse innée jouant un rôle essentiel dans la défense précoce de l'hôte contre les infections et le cancer (172). De tels effets doivent être étudiés car il est essentiel de savoir si le privilège immunitaire des CEL est maintenu dans le cadre de ce type de réponse, en particulier dans un contexte allogénique.

Pour commencer, nous avons analysé les effets immunosuppressifs de des CSM-GW et des CEL sur la prolifération d'une population enrichie en cellules T CD3+ activées par l'IL-2. Nous avons constaté que les CEL, et les CSM-GW dans une moindre mesure, ont inhibé la prolifération des cellules T CD3+ activées, et cette inhibition était plus marquée dans la condition où les deux populations cellulaires étaient en contact direct. L'inhibition des cellules T CD3+ par les CSM-MO humaines (317,324–326), les CSM du sang de cordon ombilical (317), les CSM placentaires (317,327) et les CSM du cordon ombilical (234,328), avait été déjà décrite

dans la littérature. Cependant, nous sommes les premiers à montrer que la différenciation endothéliale des CSM ne modifie pas cette capacité.

L'inhibition de la prolifération des cellules NK par des CSM provenant de sources différentes (172,264,268,329–331), selon des mécanismes impliquant à la fois des contacts cellule-cellule et des facteurs solubles(331), a été déjà décrite. Toutefois, d'autres travaux ont rapporté une expansion et une cytotoxicité plus importantes des cellules NK une fois co-cultivées avec des CSM-GW (332), ainsi que l'incapacité des CSM-GW à inhiber l'activation d'une sous-population de cellules NK (268) [$CD56^{bright}$, une sous-population connue pour sa production de cytokines après activation avec une cytotoxicité innée faible (295)]. Nos données ont indiqué que les CSM-GW ont non seulement inhibé la prolifération des cellules NK, indépendamment du contact cellulaire, mais aussi ont maintenu cette fonction immunosuppressive une fois différenciées en CEL.

Nos objectifs secondaires étaient donc d'identifier les mécanismes par lesquels les CSM-GW et les CEL exercent leur immunosuppression sur les cellules NK et T. Après investigation sur les molécules candidates qui peuvent être impliquées, nous avons étudié l'implication possible de la MMP-2 et MMP-9. En effet, à part le rôle important des MMP dans la modification de la matrice extracellulaire, la mobilisation des cellules et les interactions entre la cellule et la matrice extracellulaire, il a été montré que les MMP possèdent d'autres substrats tels que les cytokines et les médiateurs de l'inflammation, ayant ainsi un effet sur la régulation de la réponse immunitaire et la prolifération cellulaire (333,334). Ding *et al*. ont rapporté que les MMP-2 et MMP-9 jouent un rôle important dans l'activité suppressive des CSM-MO murines et que le blocage de ces deux MMP a totalement rétabli la prolifération des lymphocytes T (219). De manière similaire à cette dernière étude, l'augmentation modérée de la MMP-2 que nous avons détecté dans le cas des co-cultures en contact direct des cellules T CD3+ activées avec les CSM-GW et les CEL, avait un effet mineur sur leur effet immunosuppressif. Même si l'activité des MMP-2 était plus importante dans les co-cultures directes des CEL avec des cellules NK, elle n'avait pas d'effets sur la suppression médiée par les CEL, ce qui indique que cette augmentation pourrait être liée à d'autres activités connues des MMP telles que la mobilisation des cellules et les interactions cellules-matrice extracellulaire.

L'inhibition des fonctions des cellules T et NK fait intervenir en partie par des facteurs solubles produits par les CSM. Un grand nombre de candidats ont été identifiés comme acteurs dans l'immunomodulation des CSM. Les niveaux d'expression de sept facteurs (IDO, IL-6, IL-1β, de la COX-2, TGF-β, HGF et COX-1) par les CEL et les CSM-GW ont été évalués après 3 jours de co -cultures "directes" et en "transwell" avec des cellules T et NK activées. Les CEL ont montré une expression plus élevée d'IL-6 et d'IL-1β dans les co-cultures des cellules NK et T en comparaison avec les CSM. La prévention des contacts cellulaires n'a eu qu'un effet mineur sur leurs niveaux d'expression. Des résultats contradictoires ont été obtenus concernant l'expression de l'IDO. Les co-cultures avec des cellules NK ont induit une expression plus importante d'IDO par les CEL contrairement aux co-cultures avec les cellules T où son expression était plus élevée par les CSM. Dans les deux co-cultures, l'expression de l'IDO était plus importante lorsque les deux populations étaient en contact. Le COX-2 a été moins exprimé dans les CEL, mais cette diminution a été beaucoup plus prononcée dans les co-cultures avec des cellules NK. Contrairement à d'autres études (137,265), nous avons observé une expression réduite de TGF-β, HGF et de la COX-1 par les CEL et les CSM dans toutes les conditions de culture. En général, nos données offrent une piste intéressante en ce qui concerne le profil de sécrétion des cellules différenciées dans un microenvironnement d'inflammation *in vitro* qui, pourrait être responsable, en partie, de leurs capacités immunosuppressives.

L'inhibition de la prolifération des cellules T déjà démontrée pourrait être dûe à une diminution de l'expression de marqueurs activateurs exprimés à la surface de ces cellules tel que le CD25 qui est un récepteur de l'IL-2 et est rapidement induit après une stimulation antigénique ou mitogénique. De nombreuses études ont décrit l'effet que portent les CSM sur le CD25 et ont montré soit une inhibition de son expression ou une absence d'effet (230,317,325,335). D'une façon inattendue, nous avons constaté que les co-cultures directes avec les CEL et les CSM-GW ont augmenté l'expression de CD25 par les cellules T. Etant donné que ce résultat ne corrèle pas avec une inhibition de la prolifération de cellules T, nous avons procédé à une évaluation du pourcentage de cellules exprimant Foxp3+ au sein de la population CD25+. La génération d'une population de cellules T régulatrices suite à des interactions directes avec les CSM a été largement démontrée dans la littérature (267,317,320,330). En effet, nous avons eu un résultat similaire montrant une importante augmentation de la population CD25+Foxp3+ dans les co-cultures avec les CSM par rapport aux contrôles. De plus, nous avons pu observer que les CEL

ont induit une plus grande population CD25+Foxp3+. IDO a été montré comme étant l'un des facteurs contribuant à ce mécanisme (336–339). Par contre, l'utilisation d'inhibiteurs d'SB3CT ou de 1MT ont montré que les MMP et IDO n'a qu'une faible contribution dans ce phénomène.

Ensuite, nous avons voulu étudier la capacité des CSM-GW à modifier le profil d'expression de quelques marqueurs des cellules NK et de vérifier par la suite si la différenciation endothéliale altérera cette capacité.

Tout d'abord, nous avons voulu évaluer l'impact de la co-culture avec des CSM ou des ELC sur la répartition des populations CD16-CD56+ et CD16+CD56+. Nous avons pu observer une augmentation de la population CD16+CD56+ pour la plupart des conditions avec et sans transwell à une exception près, la condition où les CSM étaient cultivées en contact direct avec cellules NK. En effet, dans cette condition, nous avons pu observer une chute de la population CD16+CD56+, qui semble s'être deplacée vers la gauche, montrant une diminution de l'expression du CD56. L'ajout de l'inhibiteur de MMP et de l'inhibiteur d'IDO dans cette condition a pu restaurer la population CD16+CD56+ bien que dans une moindre mesure pour l'inhibiteur d'IDO.

NKG2D est un récepteur activateur exprimé à la surface des cellules NK et est impliqué dans l'activation de ces cellules et la lyse des cellules cibles. Des études ont montré que les CSM ont la capacité de diminuer l'expression de ce récepteur (172,264), alors que d'autres ont démontré que NKG2D déclenche la lyse des CSM par les cellules NK (340). Nos résultats vont dans le sens du premier groupe et ceci pour les co-cultures directes avec les CEL et les CSM-GW. La prévention du contact entre les deux populations n'a eu qu'un effet mineur sur l'expression de NKG2D. IDO, PGE2 et TGF-β1 sont parmi les facteurs contrôlant l'inhibition des cellules NK par les CSM (264); ce ne fut pas le cas dans notre étude puisque l'inhibition d'IDO n'a pas eu d'effet remarquable. La PGE2 pourrait y être impliquée puisqu'on a montré une augmentation de l'expression de COX-2 dans les CSM (précurseur de PGE2). En effet, il pourrait s'agir d'une action simultanée de plusieurs facteurs puisque Spaggiari *et al.* ont déjà mis en évidence qu'IDO et PGE2 agissent d'une manière synergique, l'inhibition de chaque facteur seul a été inefficace et ce n'est qu'en inhibant les deux ensemble qu'il a eu restauration des fonctions des cellules NK (264).

La caractérisation des CEL a montré une importante expression de CD73 à leur surface, alors nous avons investigué si cette expression aurait un impact sur l'immunomodulation médiée par les CEL. Comme déjà mentionné, CD73 est une 5'-ectonucléotidase utilisant l'AMP extracellulaire pour produire de l'adénosine. A part les rôles de l'adénosine dans le microenvironnement endothélial, il a été montré que c'est un immunosuppresseur puissant impliqué dans l'inhibition de l'IL-2, de CD25, des cytokines pro-inflammatoires TNF-α et INF-γ et réduit la fonction cytolytique des cellules T cytotoxiques (341,342). Très récemment, une étude a prouvé que les cellules NK acquièrent une expression de CD73 suite à une co-culture avec les CSM, et que les cellules NK CD73+ ont acquis la capacité de convertir l'AMP en adénosine. Nous avons donc voulu déterminer si les CEL après différenciation étaient capables de transférer le CD73 aux cellules NK, de manière similaire aux CSM. Nos résultats ont été impressionnants, confirmant l'acquisition de CD73 par les cellules NK après co-culture avec CSM, et que la proportion de cellules NK CD73+ était plus importante dans les co-cultures avec CEL avec une possible implication d'IDO. Il sera important de vérifier dans les prochains travaux si cette expression de CD73 par les cellules NK sera associée à une activité enzymatique, et essayer de décortiquer le mécanisme par lequel se fait le transfert de cette protéine. Une étude récente, a montré que les cellules T régulatrices CD4+CD39+ produisent de l'adénosine après une co-expression de CD73 à la surface cellulaire et que le transfert de CD73 peut être dû à un contact soit avec des exosomes CD73+, soit avec des cellules CD73+ (343). Saldanha-Araujo *et al*. ont aussi montré une augmentation d'expression de CD73 à la surface des cellules T CD4+ et des cellules T regs CD4+CD25+ après co-culture avec des CSM-MO (344), ce qui nous a incité à vérifier si une co-culture avec des CSM-GW aura le même effet avant et après différenciation (travaux en cours).

En conclusion, nous avons pu différencier les CSM-GW en CE en utilisant un protocole de différenciation simple dépendant principalement des **(1)** facteurs angiogéniques contenus dans le milieu EGM-2 sans ajout d'additifs et avec une teneur réduite en SVF et **(2)** des films $(PAH/PSS)_4$ en tant que substrat. D'après l'ensemble des résultats obtenus, il est possible de conclure que les CSM-GW et les CEL partagent plusieurs propriétés immunomodulatrices : les deux sont non immunogènes et immunosuppressives, n'expriment pas les molécules de CMH-II ni les molécules de co-stimulation, peuvent inhiber et altérer les fonctions des cellules NK et T via la production de facteurs solubles régulateurs, peuvent générer une population de T reg et

induire une expression de CD73 par les cellules NK. Cependant, l'intensité d'expression des différents médiateurs varie selon le type cellulaire.

Cependant ; il est important de mentionner que : **(1)** les CSM sont très sensibles au microenvironnement dans lequel elles se trouvent et exercent ses fonctions modulatrices selon les conditions externes, **(2)** les caractéristiques des CSM peuvent varier selon leurs sources, **(3)** les fonctions des cellules immunitaires varient entre chaque donneur, **(4)** les conditions de culture et de différenciation pourraient avoir un impacts important sur le comportement des CSM et des cellules différenciées, d'où il est difficile de comparer les résultats des études concernant l'immunomodulation par les CSM, ce qui explique les différences et les contradictions de nos résultats avec d'autres. Néanmoins, nos données permettent une caractérisation plus avancée des cellules différenciées qui est non seulement basée sur la validation du phénotype cellulaire ciblé après différenciation, mais aussi sur la vérification de maintien du caractère immunomodulateur caractérisant les CSM naïves. Cela peut être un avantage supplémentaire favorisant les capacités de réparation des CEL qui pourraient alors être utilisées en tant que source cellulaire pour la formation des substituts vasculaires, ou permettraient la recellularisation d'un organe et la restauration d'un microenvironnement physiologique sans être rejeté par le système immunitaire du patient.

Nos résultats encourageants ouvrent la voie pour de nombreux projets d'études :

- En commençant par le protocole de différenciation ; puisque notre projet est à visée thérapeutique, il serait souhaitable d'ajuster le protocole de différenciation afin qu'il ne contienne plus de SVF ou dans le cas échéant le remplacer par du lysat plaquettaire humain (LPH) puisque de nombreuses études ont montré l'efficacité du LPH pour l'expansion des CSM (345–348), et aussi a été utilisé pour des protocoles de différenciation (349–351).

- Des études sont actuellement en cours au laboratoire pour remplacer les films multicouches à base de PSS et de PAH, de nature synthétique, par des films multicouches naturels à base de chitosan et acide hyaluronique qui ont l'avantage d'être autorisés par l'agence nationale de sécurité du médicament et des produits de santé. Il serait nécessaire de refaire la même étude sur ces films pour déterminer si la nature du substrat pourrait

avoir un impact sur les propriétés immunomodulatrices des CSM et des cellules différenciées.

- La mise au point de la différenciation de CSM en cellules musculaires lisses est aussi parmi les travaux en cours au sein de l'équipe. Une fois cette différenciation est validée, il serait primordial de vérifier si les capacités immunosuppressives et la non-immunogénicité des CSM seraient maintenues ou pas.

- En ce qui concerne les facteurs solubles immunorégulateurs secrétés par les CSM et les CEL, le panel de facteurs que nous avons testé n'a pas permis d'identifier un acteur précis pouvant être impliqué. D'autres facteurs décrits dans la littérature son susceptibles d'être incriminés, et des tests d'inhibition combinés de plusieurs facteurs sont sans doute nécessaires du fait que plusieurs facteurs peuvent réagir en synergie comme déjà démontré par Spaggiari *et al.* par exemple (264).

- Les résultats démontrant le transfert de CD73 à la surface des cellules NK en co-culture avec les CSM et les CEL sont parmi les plus significatifs dans cette étude et méritent d'être d'avantage exploités. Il serait intéressant de décortiquer le mécanisme par lequel se fait le transfert de ce marqueur, est-il dû à un contact direct avec des cellules exprimant à leur surface le CD73, ou à une prise d'exosomes contenant le CD73 sécrétées par des cellules CD73+. Vérifier la fonctionnalité du CD73 à la surface des cellules immunitaires est une autre étude à envisager afin de démontrer que l'immunosuppression passe par la voie de l'adénosine et éventuellement quantifier sa production.

- Détailler les effets des CSM et des CEL sur les populations CD4+ « helper » et CD8+ « cytotoxiques » pourraient déterminer à quel étape de la réponse immunitaire nos cellules sont les plus efficaces et exercent leurs fonctions suppressives.

- Bien que nos données prouvent que les CEL maintiennent les propriétés modulatrices des CSM *in vitro*, il est possible que leur comportement change *in vivo* et qu'elles activent la réponse immunitaire. Il serait judicieux de les implanter dans un modèle animal afin de valider leur sécurité d'utilisation en amont d'essais cliniques chez l'Homme.

Bibliographie

1. Najar M, Raicevic G, Fayyad-Kazan H, Kazan HF, De Bruyn C, Bron D, et al. Immune-related antigens, surface molecules and regulatory factors in human-derived mesenchymal stromal cells: the expression and impact of inflammatory priming. Stem Cell Rev. 2012 Dec;8(4):1188–98.

2. Najar M, Raicevic G, Fayyad-Kazan H, De Bruyn C, Bron D, Toungouz M, et al. Impact of different mesenchymal stromal cell types on T-cell activation, proliferation and migration. Int Immunopharmacol. 2013 Apr;15(4):693–702.

3. Liu C-T, Yang Y-J, Yin F, Wang X, Yu X-H, Wang Q-H, et al. The immunobiological development of human bone marrow mesenchymal stem cells in the course of neuronal differentiation. Cell Immunol. 2006 Nov;244(1):19–32.

4. Liu H, Kemeny DM, Heng BC, Ouyang HW, Melendez AJ, Cao T. The immunogenicity and immunomodulatory function of osteogenic cells differentiated from mesenchymal stem cells. J Immunol Baltim Md 1950. 2006 Mar 1;176(5):2864–71.

5. Liu S, Yuan M, Hou K, Zhang L, Zheng X, Zhao B, et al. Immune characterization of mesenchymal stem cells in human umbilical cord Wharton's jelly and derived cartilage cells. Cell Immunol. 2012 Jul;278(1–2):35–44.

6. La Rocca G, Lo Iacono M, Corsello T, Corrao S, Farina F, Anzalone R. Human Wharton's jelly mesenchymal stem cells maintain the expression of key immunomodulatory molecules when subjected to osteogenic, adipogenic and chondrogenic differentiation in vitro: new perspectives for cellular therapy. Curr Stem Cell Res Ther. 2013 Jan;8(1):100–13.

7. Montespan F, Deschaseaux F, d&#xe9, ric, Sens&#xe9, b&#xe9, et al. Osteodifferentiated Mesenchymal Stem Cells from Bone Marrow and Adipose Tissue Express HLA-G and Display Immunomodulatory Properties in HLA-Mismatched Settings: Implications in Bone Repair Therapy. J Immunol Res. 2014 Apr 30;2014:e230346.

8. Berthelemy N, Kerdjoudj H, Gaucher C, Schaaf P, Stoltz J-F, Lacolley P, et al. Polyelectrolyte Films Boost Progenitor Cell Differentiation into Endothelium-like Monolayers. Adv Mater. 2008;20(14):2674–8.

9. Moby V, Boura C, Kerdjoudj H, Voegel J-C, Marchal L, Dumas D, et al. Poly(styrenesulfonate)/poly(allylamine) multilayers: a route to favor endothelial cell growth on expanded poly(tetrafluoroethylene) vascular grafts. Biomacromolecules. 2007 Jul;8(7):2156–60.

10. Coutinho D, Costa P, Neves N, Gomes ME, Reis RL. Micro-and nanotechnology in tissue engineering. Tissue Engineering [Internet]. Springer; 2011 [cited 2013 Jun 21]. p. 3–29. Available from: http://link.springer.com/chapter/10.1007/978-3-642-02824-3_1

11. Sherwood L. Physiologie humaine: A Human Perspective. De Boeck Supérieur; 2006. 774 p.

12. Langer R, Vacanti JP. Tissue engineering. Science. 1993;260(5110):920–6.

13. Cao Y, Vacanti JP, Paige KT, Upton J, Vacanti CA. Transplantation of chondrocytes utilizing a polymer-cell construct to produce tissue-engineered cartilage in the shape of a human ear. Plast Reconstr Surg. 1997;100(2):297–302; discussion 303–4.

14. Griffith LG, Naughton G. Tissue engineering--current challenges and expanding opportunities. Science. 2002;295(5557):1009–14.

15. Gaetani R, Doevendans PA, Messina E, Sluijter JP. Tissue Engineering for Cardiac Regeneration. Myocardial Tissue Engineering [Internet]. Springer; 2011 [cited 2013 Jun 21]. p. 1–27. Available from: http://link.springer.com/chapter/10.1007/8415_2011_82

16. Stock UA, Vacanti JP. Tissue engineering: current state and prospects. Annu Rev Med. 2001;52:443–51.

17. Gomes ME, Reis RL. Tissue engineering: key elements and some trends. Macromol Biosci. 2004;4(8):737–42.

18. Murphy CM, O'Brien FJ, Little DG, Schindeler A. Cell-scaffold interactions in the bone tissue engineering triad. Eur Cell Mater. 2013;26:120–32.

19. Martin I, Wendt D, Heberer M. The role of bioreactors in tissue engineering. Trends Biotechnol. 2004;22(2):80–6.

20. Dvir T, Timko BP, Kohane DS, Langer R. Nanotechnological strategies for engineering complex tissues. Nat Nanotechnol. 2011 Jan;6(1):13–22.

21. Hutmacher DW, Sittinger M, Risbud MV. Scaffold-based tissue engineering: rationale for computer-aided design and solid free-form fabrication systems. Trends Biotechnol. 2004;22(7):354–62.

22. Karageorgiou V, Kaplan D. Porosity of 3D biomaterial scaffolds and osteogenesis. Biomaterials. 2005;26(27):5474–91.

23. Kim BS, Baez CE, Atala A. Biomaterials for tissue engineering. World J Urol. 2000;18(1):2–9.

24. Tabata Y. Current status of regenerative medical therapy based on drug delivery technology. Reprod Biomed Online. 2008;16(1):70–80.

25. Shieh SJ, Vacanti JP. State-of-the-art tissue engineering: from tissue engineering to organ building. Surgery. 2005;137(1):1–7.

26. Bajpai VK, Andreadis ST. Stem cell sources for vascular tissue engineering and regeneration. Tissue Eng Part B Rev. 2012;18(5):405–25.

27. Levenberg S, Huang NF, Lavik E, Rogers AB, Itskovitz-Eldor J, Langer R. Differentiation of human embryonic stem cells on three-dimensional polymer scaffolds. Proc Natl Acad Sci U S A. 2003 Oct 28;100(22):12741–6.

28. Kim BG, Kang YM, Phi JH, Kim Y-H, Hwang DH, Choi JY, et al. Implantation of polymer scaffolds seeded with neural stem cells in a canine spinal cord injury model. Cytotherapy. 2010 Oct;12(6):841–5.

29. Numata K, Kaplan DL. Silk-based delivery systems of bioactive molecules. Adv Drug Deliv Rev. 2010 Dec 30;62(15):1497–508.

30. Hoffman AS. Hydrogels for biomedical applications. Adv Drug Deliv Rev. 2012 Dec;64, Supplement:18–23.

31. Panyam J, Labhasetwar V. Biodegradable nanoparticles for drug and gene delivery to cells and tissue. Adv Drug Deliv Rev. 2012 Dec;64, Supplement:61–71.

32. Godbey WT, Atala A. In vitro systems for tissue engineering. Ann N Y Acad Sci. 2002 Jun;961:10–26.

33. O'Rorke S, Keeney M, Pandit A. Non-viral polyplexes: Scaffold mediated delivery for gene therapy. Prog Polym Sci. 2010 Apr;35(4):441–58.

34. Curtin CM, Cunniffe GM, Lyons FG, Bessho K, Dickson GR, Duffy GP, et al. Innovative collagen nano-hydroxyapatite scaffolds offer a highly efficient non-viral gene delivery platform for stem cell-mediated bone formation. Adv Mater Deerfield Beach Fla. 2012 Feb 7;24(6):749–54.

35. Tierney EG, Duffy GP, Hibbitts AJ, Cryan S-A, O'Brien FJ. The development of non-viral gene-activated matrices for bone regeneration using polyethyleneimine (PEI) and collagen-based scaffolds. J Control Release Off J Control Release Soc. 2012 Mar 10;158(2):304–11.

36. Rose FRAJ, Oreffo ROC. Bone tissue engineering: hope vs hype. Biochem Biophys Res Commun. 2002 Mar 22;292(1):1–7.

37. O'Brien FJ. Biomaterials & scaffolds for tissue engineering. Mater Today. 2011 Mar;14(3):88–95.

38. Darling EM, Athanasiou KA. Biomechanical strategies for articular cartilage regeneration. Ann Biomed Eng. 2003 Oct;31(9):1114–24.

39. Plunkett N, O'Brien FJ. Bioreactors in tissue engineering. Technol Health Care Off J Eur Soc Eng Med. 2011;19(1):55–69.

40. Khan SN, Cammisa FP Jr, Sandhu HS, Diwan AD, Girardi FP, Lane JM. The biology of bone grafting. J Am Acad Orthop Surg. 2005 Feb;13(1):77–86.

41. Murphy CM, Matsiko A, Haugh MG, Gleeson JP, O'Brien FJ. Mesenchymal stem cell fate is regulated by the composition and mechanical properties of collagen-glycosaminoglycan scaffolds. J Mech Behav Biomed Mater. 2012 Jul;11:53–62.

42. Chao P-HG, Grayson W, Vunjak-Novakovic G. Engineering cartilage and bone using human mesenchymal stem cells. J Orthop Sci Off J Jpn Orthop Assoc. 2007 Jul;12(4):398–404.

43. Zaragoza C, Gomez-Guerrero C, Martin-Ventura JL, Blanco-Colio L, Lavin B, Mallavia B, et al. Animal models of cardiovascular diseases. J Biomed Biotechnol. 2011;2011:497841.

44. Nugent HM, Edelman ER. Tissue engineering therapy for cardiovascular disease. Circ Res. 2003 May 30;92(10):1068–78.

45. Ogle B, Cascalho M, Platt JL. Fusion of approaches to the treatment of organ failure. Am J Transplant Off J Am Soc Transplant Am Soc Transpl Surg. 2004;4 Suppl 6:74–7.

46. Yang J, Yamato M, Kohno C, Nishimoto A, Sekine H, Fukai F, et al. Cell sheet engineering: recreating tissues without biodegradable scaffolds. Biomaterials. 2005 Nov;26(33):6415–22.

47. Vinatier C, Bordenave L, Guicheux J, Amédée J. [Stem cells for osteoarticular and vascular tissue engineering]. Médecine Sci MS. 2011 Mar;27(3):289–96.

48. Réparer les vaisseaux : Bio-ingénierie cardiovasculaire [Internet]. [cited 2013 Nov 24]. Available from: http://www.inserm.fr/thematiques/technologies-pour-la-sante/dossiers-d-information/biomateriaux/reparer-les-vaisseaux-bio-ingenierie-cardiovasculaire

49. Nemeno-Guanzon JG, Lee S, Berg JR, Jo YH, Yeo JE, Nam BM, et al. Trends in Tissue Engineering for Blood Vessels. J Biomed Biotechnol. 2012;2012:1–14.

50. Chen C-W, Corselli M, Peault B, Huard J. Human Blood-Vessel-Derived Stem Cells for Tissue Repair and Regeneration. J Biomed Biotechnol [Internet]. 2012 [cited 2013 Nov 13];2012. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3303622/

51. Wilcox JN, Scott NA. Potential role of the adventitia in arteritis and atherosclerosis. Int J Cardiol. 1996 Aug;54 Suppl:S21–35.

52. Pařízek M, Novotná K, Bačáková L. The role of smooth muscle cells in vessel wall pathophysiology and reconstruction using bioactive synthetic polymers. Physiol Res Acad Sci Bohemoslov. 2011;60(3):419–37.

53. Bonnet J. Athérosclérose. EMC - Cardiol-Angéiologie. 2005 Nov;2(4):436–58.

54. Paul J-L, Baudin B. Physiopathologie de l'athérosclérose et marqueurs précoces. Rev Francoph Lab. 2009 Feb;2009(409):41–50.

55. Hennen G. Biochimie humaine: introduction biochimique à la médecine interne. De Boeck Supérieur; 1996. 798 p.

56. Cardiologie et pathologie vasculaire - Ariel Cohen [Internet]. [cited 2014 Jan 5]. Available from: http://www.decitre.fr/livres/cardiologie-et-pathologie-vasculaire-9782909455679.html

57. Blinder Y, Mooney D, Levenberg S. Engineering approaches for inducing blood vessel formation. Curr Opin Chem Eng. 2014 Feb;3:56–61.

58. Gui L, Niklason LE. Vascular tissue engineering: building perfusable vasculature for implantation. Curr Opin Chem Eng. 2014 Feb;3:68–74.

59. Fernandez CE, Achneck HE, Reichert WM, Truskey GA. Biological and engineering design considerations for vascular tissue engineered blood vessels (TEBVs). Curr Opin Chem Eng. 2014 Feb;3:83–90.

60. Syedain ZH, Meier LA, Bjork JW, Lee A, Tranquillo RT. Implantable arterial grafts from human fibroblasts and fibrin using a multi-graft pulsed flow-stretch bioreactor with noninvasive strength monitoring. Biomaterials. 2011 Jan;32(3):714–22.

61. Menasché P. Ingéniérie des conduits vasculaires. E-Mém Académie Natl Chir. 2012;11(3):037–41.

62. Reilly GC, Engler AJ. Intrinsic extracellular matrix properties regulate stem cell differentiation. J Biomech. 2010 Jan 5;43(1):55–62.

63. De Mel A, Bolvin C, Edirisinghe M, Hamilton G, Seifalian AM. Development of cardiovascular bypass grafts: endothelialization and applications of nanotechnology. Expert Rev Cardiovasc Ther. 2008 Oct;6(9):1259–77.

64. Ravi S, Chaikof EL. Biomaterials for vascular tissue engineering. Regen Med. 2010 Jan;5(1):107.

65. Kerdjoudj H, Berthelemy N, Boulmedais F, Stoltz J-F, Menu P, Voegel JC. Multilayered polyelectrolyte films: a tool for arteries and vessel repair. Soft Matter. 2010 Aug 3;6(16):3722–34.

66. Kerdjoudj H, Berthelemy N, Rinckenbach S, Kearney-Schwartz A, Montagne K, Schaaf P, et al. Small Vessel Replacement by Human Umbilical Arteries With Polyelectrolyte Film-Treated ArteriesIn Vivo Behavior. J Am Coll Cardiol. 2008 Nov 4;52(19):1589–97.

67. Boura C, Menu P, Payan E, Picart C, Voegel JC, Muller S, et al. Endothelial cells grown on thin polyelectrolyte mutlilayered films: an evaluation of a new versatile surface modification. Biomaterials. 2003 Sep;24(20):3521–30.

68. Boura C, Muller S, Vautier D, Dumas D, Schaaf P, Claude Voegel J, et al. Endothelial cell--interactions with polyelectrolyte multilayer films. Biomaterials. 2005 Aug;26(22):4568–75.

69. Kerdjoudj H, Boura C, Moby V, Montagne K, Schaaf P, Voegel J-C, et al. Re-endothelialization of Human Umbilical Arteries Treated with Polyelectrolyte Multilayers: A Tool for Damaged Vessel Replacement. Adv Funct Mater. 2007;17(15):2667–73.

70. Moby V, Kadi A, de Isla N, Stoltz JF, Menu P. Polyelectrolyte multilayer films: effect of the initial anchoring layer on the cell growth. Biomed Mater Eng. 2008;18(4-5):199–204.

71. Berthelemy N, Kerdjoudj H, Schaaf P, Prin-Mathieu C, Lacolley P, Stoltz J-F, et al. O2 level controls hematopoietic circulating progenitor cells differentiation into endothelial or smooth muscle cells. PloS One. 2009;4(5):e5514.

72. layeredpolyelectrolyte [Internet]. [cited 2014 Feb 2]. Available from: https://www2.chemistry.msu.edu/faculty/bruening/layeredpolyelectrolyte.html

73. Félétou M. Multiple Functions of the Endothelial Cells [Internet]. 2011 [cited 2014 Jun 6]. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK57148/

74. Michiels C. Endothelial cell functions. J Cell Physiol. 2003 Sep;196(3):430–43.

75. Arts CHP, Hedeman Joosten PPA, Blankensteijn JD, Staal FJT, Ng PYY, Heijnen-Snyder GJ, et al. Contaminants from the transplant contribute to intimal hyperplasia associated with microvascular endothelial cell seeding. Eur J Vasc Endovasc Surg Off J Eur Soc Vasc Surg. 2002 Jan;23(1):29–38.

76. Arts CH, De Groot PG, Attevelt N, Heijnen-Snyder GJ, Verhagen HJ, Eikelboom BC, et al. In vivo transluminal microvascular endothelial cell seeding on balloon injured rabbit arteries. J Cardiovasc Surg (Torino). 2004 Apr;45(2):129–37.

77. Wislet-Gendebien S, Laudet E, Neirinckx V, Rogister B. Adult Bone Marrow: Which Stem Cells for Cellular Therapy Protocols in Neurodegenerative Disorders? J Biomed Biotechnol. 2012;2012:1–10.

78. Kulshreshtha S, Bhatnagar P. Recent Advances in Stem Cell Research. In: Ravi I, Baunthiyal M, Saxena J, editors. Advances in Biotechnology [Internet]. Springer India; 2014 [cited 2013 Oct 27]. p. 151–78. Available from: http://link.springer.com/chapter/10.1007/978-81-322-1554-7_9

79. Kingham E, Oreffo ROC. Embryonic and Induced Pluripotent Stem Cells: Understanding, Creating, and Exploiting the Nano-Niche for Regenerative Medicine. ACS Nano. 2013 Mar 26;7(3):1867–81.

80. Evans MJ, Kaufman MH. Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. Nature. 1981 Jul 9;292(5819):154–6.

81. Thomson JA, Itskovitz-Eldor J, Shapiro SS, Waknitz MA, Swiergiel JJ, Marshall VS, et al. Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. Science. 1998 Nov 6;282(5391):1145–7.

82. Martin GR. Isolation of a pluripotent cell line from early mouse embryos cultured in medium conditioned by teratocarcinoma stem cells. Proc Natl Acad Sci U S A. 1981 Dec;78(12):7634–8.

83. Sykova E, Forostyak S. Stem cells in regenerative medicine. Laser Ther. 2013;22(2):87–92.

84. Toh WS, Lee EH, Guo X-M, Chan JKY, Yeow CH, Choo AB, et al. Cartilage repair using hyaluronan hydrogel-encapsulated human embryonic stem cell-derived chondrogenic cells. Biomaterials. 2010 Sep;31(27):6968–80.

85. Kehat I, Khimovich L, Caspi O, Gepstein A, Shofti R, Arbel G, et al. Electromechanical integration of cardiomyocytes derived from human embryonic stem cells. Nat Biotechnol. 2004 Oct;22(10):1282–9.

86. Hwang NS, Varghese S, Lee HJ, Zhang Z, Ye Z, Bae J, et al. In vivo commitment and functional tissue regeneration using human embryonic stem cell-derived mesenchymal cells. Proc Natl Acad Sci U S A. 2008 Dec 30;105(52):20641–6.

87. Lee EJ, Xu L, Kim G-H, Kang SK, Lee S-W, Park S-H, et al. Regeneration of peripheral nerves by transplanted sphere of human mesenchymal stem cells derived from embryonic stem cells. Biomaterials. 2012 Oct;33(29):7039–46.

88. Sumi T, Tsuneyoshi N, Nakatsuji N, Suemori H. Defining early lineage specification of human embryonic stem cells by the orchestrated balance of canonical Wnt/beta-catenin, Activin/Nodal and BMP signaling. Dev Camb Engl. 2008 Sep;135(17):2969–79.

89. Singh AM, Reynolds D, Cliff T, Ohtsuka S, Mattheyses AL, Sun Y, et al. Signaling network crosstalk in human pluripotent cells: a Smad2/3-regulated switch that controls the balance between self-renewal and differentiation. Cell Stem Cell. 2012 Mar 2;10(3):312–26.

90. Park C, Afrikanova I, Chung YS, Zhang WJ, Arentson E, Fong Gh G hua, et al. A hierarchical order of factors in the generation of FLK1- and SCL-expressing hematopoietic and endothelial progenitors from embryonic stem cells. Dev Camb Engl. 2004 Jun;131(11):2749–62.

91. Lu S-J, Feng Q, Caballero S, Chen Y, Moore MAS, Grant MB, et al. Generation of functional hemangioblasts from human embryonic stem cells. Nat Methods. 2007 Jun;4(6):501–9.

92. James D, Nam H, Seandel M, Nolan D, Janovitz T, Tomishima M, et al. Expansion and maintenance of human embryonic stem cell-derived endothelial cells by TGFbeta inhibition is Id1 dependent. Nat Biotechnol. 2010 Feb;28(2):161–6.

93. Sone M, Itoh H, Yamahara K, Yamashita JK, Yurugi-Kobayashi T, Nonoguchi A, et al. Pathway for differentiation of human embryonic stem cells to vascular cell components and their potential for vascular regeneration. Arterioscler Thromb Vasc Biol. 2007 Oct;27(10):2127–34.

94. Wang ZZ, Au P, Chen T, Shao Y, Daheron LM, Bai H, et al. Endothelial cells derived from human embryonic stem cells form durable blood vessels in vivo. Nat Biotechnol. 2007 Mar;25(3):317–8.

95. Li Z, Hu S, Ghosh Z, Han Z, Wu JC. Functional characterization and expression profiling of human induced pluripotent stem cell- and embryonic stem cell-derived endothelial cells. Stem Cells Dev. 2011 Oct;20(10):1701–10.

96. Marcus AJ, Woodbury D. Fetal stem cells from extra-embryonic tissues: do not discard. J Cell Mol Med. 2008 Jun;12(3):730–42.

97. Abdulrazzak H, Moschidou D, Jones G, Guillot PV. Biological characteristics of stem cells from foetal, cord blood and extraembryonic tissues. J R Soc Interface R Soc. 2010 Dec 6;7 Suppl 6:S689–706.

98. Cananzi M, Atala A, De Coppi P. Stem cells derived from amniotic fluid: new potentials in regenerative medicine. Reprod Biomed Online. 2009;18 Suppl 1:17–27.

99. Owen M, Friedenstein AJ. Stromal stem cells: marrow-derived osteogenic precursors. Ciba Found Symp. 1988;136:42–60.

100. Weissman IL, Shizuru JA. The origins of the identification and isolation of hematopoietic stem cells, and their capability to induce donor-specific transplantation tolerance and treat autoimmune diseases. Blood. 2008 Nov 1;112(9):3543–53.

101. Schugar RC, Chirieleison SM, Wescoe KE, Schmidt BT, Askew Y, Nance JJ, et al. High harvest yield, high expansion, and phenotype stability of CD146 mesenchymal stromal cells from whole primitive human umbilical cord tissue. J Biomed Biotechnol. 2009;2009:789526.

102. Pereira WC, Khushnooma I, Madkaikar M, Ghosh K. Reproducible methodology for the isolation of mesenchymal stem cells from human umbilical cord and its potential for cardiomyocyte generation. J Tissue Eng Regen Med. 2008 Oct;2(7):394–9.

103. Campard D, Lysy PA, Najimi M, Sokal EM. Native umbilical cord matrix stem cells express hepatic markers and differentiate into hepatocyte-like cells. Gastroenterology. 2008 Mar;134(3):833–48.

104. Karahuseyinoglu S, Cinar O, Kilic E, Kara F, Akay GG, Demiralp DO, et al. Biology of stem cells in human umbilical cord stroma: in situ and in vitro surveys. Stem Cells Dayt Ohio. 2007 Feb;25(2):319–31.

105. Da Sacco S, Sedrakyan S, Boldrin F, Giuliani S, Parnigotto P, Habibian R, et al. Human amniotic fluid as a potential new source of organ specific precursor cells for future regenerative medicine applications. J Urol. 2010 Mar;183(3):1193–200.

106. Sessarego N, Parodi A, Podestà M, Benvenuto F, Mogni M, Raviolo V, et al. Multipotent mesenchymal stromal cells from amniotic fluid: solid perspectives for clinical application. Haematologica. 2008 Mar;93(3):339–46.

107. De Coppi P, Bartsch G Jr, Siddiqui MM, Xu T, Santos CC, Perin L, et al. Isolation of amniotic stem cell lines with potential for therapy. Nat Biotechnol. 2007 Jan;25(1):100–6.

108. Parolini O, Alviano F, Bergwerf I, Boraschi D, De Bari C, De Waele P, et al. Toward cell therapy using placenta-derived cells: disease mechanisms, cell biology, preclinical studies, and regulatory aspects at the round table. Stem Cells Dev. 2010 Feb;19(2):143–54.

109. Roura S, Bagó JR, Soler-Botija C, Pujal JM, Gálvez-Montón C, Prat-Vidal C, et al. Human umbilical cord blood-derived mesenchymal stem cells promote vascular growth in vivo. PloS One. 2012;7(11):e49447.

110. Chen M-Y, Lie P-C, Li Z-L, Wei X. Endothelial differentiation of Wharton's jelly-derived mesenchymal stem cells in comparison with bone marrow-derived mesenchymal stem cells. Exp Hematol. 2009 May;37(5):629–40.

111. Wu KH, Zhou B, Lu SH, Feng B, Yang SG, Du WT, et al. In vitro and in vivo differentiation of human umbilical cord derived stem cells into endothelial cells. J Cell Biochem. 2007 Feb 15;100(3):608–16.

112. Li P, Zhou C, Yin L, Meng X, Zhang L. Role of hypoxia in viability and endothelial differentiation potential of UC-MSCs and VEGF interference. Zhong Nan Da Xue Xue Bao Yi Xue Ban. 2013 Apr;38(4):329–40.

113. Wang S-H, Lin S-J, Chen Y-H, Lin F-Y, Shih J-C, Wu C-C, et al. Late outgrowth endothelial cells derived from Wharton jelly in human umbilical cord reduce neointimal formation after vascular injury: involvement of pigment epithelium-derived factor. Arterioscler Thromb Vasc Biol. 2009 Jun;29(6):816–22.

114. Doan CC, Le TL, Hoang NS, Doan NT, Le VD, Si Do M. Differentiation of Umbilical Cord Lining Membrane-Derived Mesenchymal Stem Cells into Endothelial-Like Cells. Iran Biomed J. 2014 Apr 15;18(2):67–75.

115. Coulombel L. [Adult stem cells: seing is not being]. Médecine Sci MS. 2003 Jul;19(6-7):683–94.

116. Blanpain C, Fuchs E. Epidermal homeostasis: a balancing act of stem cells in the skin. Nat Rev Mol Cell Biol. 2009 Mar;10(3):207–17.

117. Hsu Y-C, Fuchs E. A family business: stem cell progeny join the niche to regulate homeostasis. Nat Rev Mol Cell Biol. 2012 Jan 23;13(2):103–14.

118. Adult Stem Cells [Internet]. [cited 2013 Nov 17]. Available from: http://stemcellthailand.org/adult-stem-cells/

119. Roh JD, Sawh-Martinez R, Brennan MP, Jay SM, Devine L, Rao DA, et al. Tissue-engineered vascular grafts transform into mature blood vessels via an inflammation-mediated process of vascular remodeling. Proc Natl Acad Sci U S A. 2010 Mar 9;107(10):4669–74.

120. Krawiec JT, Vorp DA. Adult stem cell-based tissue engineered blood vessels: A review. Biomaterials. 2012 Apr;33(12):3388–400.

121. Cho S-W, Lim SH, Kim I-K, Hong YS, Kim S-S, Yoo KJ, et al. Small-Diameter Blood Vessels Engineered With Bone Marrow-Derived Cells. Ann Surg. 2005 Mar;241(3):506–15.

122. Lim SH, Cho S-W, Park J-C, Jeon O, Lim JM, Kim S-S, et al. Tissue-engineered blood vessels with endothelial nitric oxide synthase activity. J Biomed Mater Res B Appl Biomater. 2008 May 1;85B(2):537–46.

123. Cho S-W, Park HJ, Ryu JH, Kim SH, Kim YH, Choi CY, et al. Vascular patches tissue-engineered with autologous bone marrow-derived cells and decellularized tissue matrices. Biomaterials. 2005 May;26(14):1915–24.

124. Cho S-W, Jeon O, Lim JE, Gwak S-J, Kim S-S, Choi CY, et al. Preliminary experience with tissue engineering of a venous vascular patch by using bone marrow–derived cells and a hybrid biodegradable polymer scaffold. J Vasc Surg. 2006 Dec;44(6):1329–40.

125. Wu W, Allen R, Gao J, Wang Y. Artificial Niche Combining Elastomeric Substrate and Platelets Guides Vascular Differentiation of Bone Marrow Mononuclear Cells. Tissue Eng Part A. 2011 Mar 30;17(15-16):1979–92.

126. Cho S-W, Kim I-K, Kang JM, Song KW, Kim HS, Park CH, et al. Evidence for In Vivo Growth Potential and Vascular Remodeling of Tissue-Engineered Artery. Tissue Eng Part A. 2008 Sep 10;15(4):901–12.

127. Matsumura G, Miyagawa-Tomita S, Shin'oka T, Ikada Y, Kurosawa H. First evidence that bone marrow cells contribute to the construction of tissue-engineered vascular autografts in vivo. Circulation. 2003 Oct 7;108(14):1729–34.

128. Hashi CK, Zhu Y, Yang G-Y, Young WL, Hsiao BS, Wang K, et al. Antithrombogenic property of bone marrow mesenchymal stem cells in nanofibrous vascular grafts. Proc Natl Acad Sci U S A. 2007 Jul 17;104(29):11915–20.

129. Mirza A, Hyvelin J-M, Rochefort GY, Lermusiaux P, Antier D, Awede B, et al. Undifferentiated mesenchymal stem cells seeded on a vascular prosthesis contribute to the restoration of a physiologic vascular wall. J Vasc Surg. 2008 Jun;47(6):1313–21.

130. Melero-Martin JM, De Obaldia ME, Kang S-Y, Khan ZA, Yuan L, Oettgen P, et al. Engineering robust and functional vascular networks in vivo with human adult and cord blood-derived progenitor cells. Circ Res. 2008 Jul 18;103(2):194–202.

131. Centola M, Rainer A, Spadaccio C, Porcellinis SD, Genovese JA, Trombetta M. Combining electrospinning and fused deposition modeling for the fabrication of a hybrid vascular graft. Biofabrication. 2010 Mar 1;2(1):014102.

132. Oswald J, Boxberger S, Jørgensen B, Feldmann S, Ehninger G, Bornhäuser M, et al. Mesenchymal stem cells can be differentiated into endothelial cells in vitro. Stem Cells Dayt Ohio. 2004;22(3):377–84.

133. Bai K, Huang Y, Jia X, Fan Y, Wang W. Endothelium oriented differentiation of bone marrow mesenchymal stem cells under chemical and mechanical stimulations. J Biomech. 2010 Apr 19;43(6):1176–81.

134. Wang N, Zhang R, Wang S-J, Zhang C-L, Mao L-B, Zhuang C-Y, et al. Vascular endothelial growth factor stimulates endothelial differentiation from mesenchymal stem cells via Rho/myocardin-related transcription factor--a signaling pathway. Int J Biochem Cell Biol. 2013 Jul;45(7):1447–56.

135. Zhang L, Zhou J, Lu Q, Wei Y, Hu S. A novel small-diameter vascular graft: In vivo behavior of biodegradable three-layered tubular scaffolds. Biotechnol Bioeng. 2008 Mar 1;99(4):1007–15.

136. Miranville A, Heeschen C, Sengenès C, Curat CA, Busse R, Bouloumié A. Improvement of postnatal neovascularization by human adipose tissue-derived stem cells. Circulation. 2004 Jul 20;110(3):349–55.

137. Cao Y, Sun Z, Liao L, Meng Y, Han Q, Zhao RC. Human adipose tissue-derived stem cells differentiate into endothelial cells in vitro and improve postnatal neovascularization in vivo. Biochem Biophys Res Commun. 2005 Jul 1;332(2):370–9.

138. Harris LJ, Zhang P, Abdollahi H, Tarola NA, DiMatteo C, McIlhenny SE, et al. Availability of adipose-derived stem cells in patients undergoing vascular surgical procedures. J Surg Res. 2010 Oct;163(2):e105–112.

139. Zhang P, Moudgill N, Hager E, Tarola N, Dimatteo C, McIlhenny S, et al. Endothelial differentiation of adipose-derived stem cells from elderly patients with cardiovascular disease. Stem Cells Dev. 2011 Jun;20(6):977–88.

140. Khoo CP, Pozzilli P, Alison MR. Endothelial progenitor cells and their potential therapeutic applications. Regen Med. 2008 Nov;3(6):863–76.

141. Kirton JP, Xu Q. Endothelial precursors in vascular repair. Microvasc Res. 2010 May;79(3):193–9.

142. Prater DN, Case J, Ingram DA, Yoder MC. Working hypothesis to redefine endothelial progenitor cells. Leukemia. 2007 Jun;21(6):1141–9.

143. Medina RJ, O'Neill CL, Sweeney M, Guduric-Fuchs J, Gardiner TA, Simpson DA, et al. Molecular analysis of endothelial progenitor cell (EPC) subtypes reveals two distinct cell populations with different identities. BMC Med Genomics. 2010;3:18.

144. Fuchs S, Dohle E, Kolbe M, Kirkpatrick CJ. Outgrowth endothelial cells: sources, characteristics and potential applications in tissue engineering and regenerative medicine. Adv Biochem Eng Biotechnol. 2010;123:201–17.

145. Zisch AH. Tissue engineering of angiogenesis with autologous endothelial progenitor cells. Curr Opin Biotechnol. 2004 Oct;15(5):424–9.

146. Ladhoff J, Fleischer B, Hara Y, Volk H-D, Seifert M. Immune privilege of endothelial cells differentiated from endothelial progenitor cells. Cardiovasc Res. 2010 Oct 1;88(1):121–9.

147. Stroncek JD, Grant BS, Brown MA, Povsic TJ, Truskey GA, Reichert WM. Comparison of endothelial cell phenotypic markers of late-outgrowth endothelial progenitor cells isolated from patients with coronary artery disease and healthy volunteers. Tissue Eng Part A. 2009 Nov;15(11):3473–86.

148. Shin J-W, Lee D-W, Kim M-J, Song K-S, Kim H-S, Kim H-O. Isolation of endothelial progenitor cells from cord blood and induction of differentiation by ex vivo expansion. Yonsei Med J. 2005 Apr 30;46(2):260–7.

149. Conklin BS, Wu H, Lin PH, Lumsden AB, Chen C. Basic fibroblast growth factor coating and endothelial cell seeding of a decellularized heparin-coated vascular graft. Artif Organs. 2004 Jul;28(7):668–75.

150. Obi S, Masuda H, Shizuno T, Sato A, Yamamoto K, Ando J, et al. Fluid shear stress induces differentiation of circulating phenotype endothelial progenitor cells. Am J Physiol Cell Physiol. 2012 Sep 15;303(6):C595–606.

151. Yamamoto K, Takahashi T, Asahara T, Ohura N, Sokabe T, Kamiya A, et al. Proliferation, differentiation, and tube formation by endothelial progenitor cells in response to shear stress. J Appl Physiol Bethesda Md 1985. 2003 Nov;95(5):2081–8.

152. Brown MA, Zhang L, Levering VW, Wu J-H, Satterwhite LL, Brian L, et al. Human umbilical cord blood-derived endothelial cells reendothelialize vein grafts and prevent thrombosis. Arterioscler Thromb Vasc Biol. 2010 Nov;30(11):2150–5.

153. Au P, Daheron LM, Duda DG, Cohen KS, Tyrrell JA, Lanning RM, et al. Differential in vivo potential of endothelial progenitor cells from human umbilical cord blood and adult peripheral blood to form functional long-lasting vessels. Blood. 2008 Feb 1;111(3):1302–5.

154. Zammaretti P, Zisch AH. Adult "endothelial progenitor cells". Renewing vasculature. Int J Biochem Cell Biol. 2005 Mar;37(3):493–503.

155. Alobaid N, Alnaeb ME, Sales KM, Seifalian AM, Mikhailidis DP, Hamilton G. Endothelial progenitor cells and their potential clinical applications in peripheral arterial disease. Endothel J Endothel Cell Res. 2005 Dec;12(5-6):243–50.

156. Hristov M, Erl W, Weber PC. Endothelial progenitor cells: mobilization, differentiation, and homing. Arterioscler Thromb Vasc Biol. 2003 Jul 1;23(7):1185–9.

157. Jia L, Takahashi M, Yoshioka T, Morimoto H, Ise H, Ikeda U. Therapeutic potential of endothelial progenitor cells for cardiovascular diseases. Curr Vasc Pharmacol. 2006 Jan;4(1):59–65.

158. Neff LP, Tillman BW, Yazdani SK, Machingal MA, Yoo JJ, Soker S, et al. Vascular smooth muscle enhances functionality of tissue-engineered blood vessels in vivo. J Vasc Surg. 2011 Feb;53(2):426–34.

159. Cho S-W, Lim JE, Chu HS, Hyun H-J, Choi CY, Hwang K-C, et al. Enhancement of in vivo endothelialization of tissue-engineered vascular grafts by granulocyte colony-stimulating factor. J Biomed Mater Res A. 2006 Feb;76(2):252–63.

160. Shi Q, Bhattacharya V, Hong-De Wu M, Sauvage LR. Utilizing granulocyte colony-stimulating factor to enhance vascular graft endothelialization from circulating blood cells. Ann Vasc Surg. 2002 May;16(3):314–20.

161. Zhou M, Liu Z, Li K, Qiao W, Jiang X, Ran F, et al. Beneficial effects of granulocyte-colony stimulating factor on small-diameter heparin immobilized decellularized vascular graft. J Biomed Mater Res A. 2010 Nov;95(2):600–10.

162. Friedenstein AJ, Deriglasova UF, Kulagina NN, Panasuk AF, Rudakowa SF, Luriá EA, et al. Precursors for fibroblasts in different populations of hematopoietic cells as detected by the in vitro colony assay method. Exp Hematol. 1974;2(2):83–92.

163. Maitra B, Szekely E, Gjini K, Laughlin MJ, Dennis J, Haynesworth SE, et al. Human mesenchymal stem cells support unrelated donor hematopoietic stem cells and suppress T-cell activation. Bone Marrow Transplant. 2004 Mar;33(6):597–604.

164. Le Blanc K, Rasmusson I, Sundberg B, Götherström C, Hassan M, Uzunel M, et al. Treatment of severe acute graft-versus-host disease with third party haploidentical mesenchymal stem cells. Lancet. 2004 May 1;363(9419):1439–41.

165. Le Blanc K, Frassoni F, Ball L, Locatelli F, Roelofs H, Lewis I, et al. Mesenchymal stem cells for treatment of steroid-resistant, severe, acute graft-versus-host disease: a phase II study. Lancet. 2008 May 10;371(9624):1579–86.

166. Gao L, Liu F, Tan L, Liu T, Chen Z, Shi C. The immunosuppressive properties of non-cultured dermal-derived mesenchymal stromal cells and the control of graft-versus-host disease. Biomaterials. 2014 Apr;35(11):3582–8.

167. Li ZY, Wang CQ, Lu G, Pan XY, Xu KL. Effects of Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells on Hematopoietic Recovery and Acute Graft-Versus-Host Disease in Murine Allogeneic Umbilical Cord Blood Transplantation Model. Cell Biochem Biophys. 2014 Apr 3;

168. Jang YK, Kim M, Lee Y-H, Oh W, Yang YS, Choi SJ. Optimization of the therapeutic efficacy of human umbilical cord blood-mesenchymal stromal cells in an NSG mouse xenograft model of graft-versus-host disease. Cytotherapy. 2014 Mar;16(3):298–308.

169. Ivanova-Todorova E, Bochev I, Mourdjeva M, Dimitrov R, Bukarev D, Kyurkchiev S, et al. Adipose tissue-derived mesenchymal stem cells are more potent suppressors of dendritic

cells differentiation compared to bone marrow-derived mesenchymal stem cells. Immunol Lett. 2009 Sep 22;126(1-2):37–42.

170. Ramasamy R, Fazekasova H, Lam EW-F, Soeiro I, Lombardi G, Dazzi F. Mesenchymal stem cells inhibit dendritic cell differentiation and function by preventing entry into the cell cycle. Transplantation. 2007 Jan 15;83(1):71–6.

171. Németh K, Leelahavanichkul A, Yuen PST, Mayer B, Parmelee A, Doi K, et al. Bone marrow stromal cells attenuate sepsis via prostaglandin E(2)-dependent reprogramming of host macrophages to increase their interleukin-10 production. Nat Med. 2009 Jan;15(1):42–9.

172. Sotiropoulou PA, Perez SA, Gritzapis AD, Baxevanis CN, Papamichail M. Interactions between human mesenchymal stem cells and natural killer cells. Stem Cells Dayt Ohio. 2006 Jan;24(1):74–85.

173. Spaggiari GM, Capobianco A, Becchetti S, Mingari MC, Moretta L. 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. 2006 Feb 15;107(4):1484–90.

174. Lentz AK, Feezor RJ. Principles of immunology. Nutr Clin Pract Off Publ Am Soc Parenter Enter Nutr. 2003 Dec;18(6):451–60.

175. Janeway CA, Murphy K, Walport M. Immunobiologie. De Boeck Supérieur; 2009. 916 p.

176. DAUSSET J. [Iso-leuko-antibodies]. Acta Haematol. 1958 Oct;20(1-4):156–66.

177. Caillat-Zucman S. Génétique du système HLA. Médecine Thérapeutique Pédiatrie. 2002 May 6;5(1):54–8.

178. Doherty DG, O'Farrelly C. Innate and adaptive lymphoid cells in the human liver. Immunol Rev. 2000 Apr;174:5–20.

179. Matos ME, Schnier GS, Beecher MS, Ashman LK, William DE, Caligiuri MA. Expression of a functional c-kit receptor on a subset of natural killer cells. J Exp Med. 1993 Sep 1;178(3):1079–84.

180. Brenchley JM, Karandikar NJ, Betts MR, Ambrozak DR, Hill BJ, Crotty LE, et al. Expression of CD57 defines replicative senescence and antigen-induced apoptotic death of CD8+ T cells. Blood. 2003 Apr 1;101(7):2711–20.

181. Lopez-Vergès S, Milush JM, Pandey S, York VA, Arakawa-Hoyt J, Pircher H, et al. CD57 defines a functionally distinct population of mature NK cells in the human CD56dimCD16+ NK-cell subset. Blood. 2010 Nov 11;116(19):3865–74.

182. Alter G, Teigen N, Davis BT, Addo MM, Suscovich TJ, Waring MT, et al. Sequential deregulation of NK cell subset distribution and function starting in acute HIV-1 infection. Blood. 2005 Nov 15;106(10):3366–9.

183. Wilson MJ, Torkar M, Haude A, Milne S, Jones T, Sheer D, et al. Plasticity in the organization and sequences of human KIR/ILT gene families. Proc Natl Acad Sci U S A. 2000 Apr 25;97(9):4778–83.

184. Uhrberg M, Parham P, Wernet P. Definition of gene content for nine common group B haplotypes of the Caucasoid population: KIR haplotypes contain between seven and eleven KIR genes. Immunogenetics. 2002 Jul;54(4):221–9.

185. Aldemir H, Prod'homme V, Dumaurier M-J, Retiere C, Poupon G, Cazareth J, et al. Cutting edge: lectin-like transcript 1 is a ligand for the CD161 receptor. J Immunol Baltim Md 1950. 2005 Dec 15;175(12):7791–5.

186. Rosen DB, Bettadapura J, Alsharifi M, Mathew PA, Warren HS, Lanier LL. Cutting edge: lectin-like transcript-1 is a ligand for the inhibitory human NKR-P1A receptor. J Immunol Baltim Md 1950. 2005 Dec 15;175(12):7796–9.

187. González S, Groh V, Spies T. Immunobiology of human NKG2D and its ligands. Curr Top Microbiol Immunol. 2006;298:121–38.

188. Alvarez-Breckenridge CA, Yu J, Kaur B, Caligiuri MA, Chiocca EA. Deciphering the Multifaceted Relationship between Oncolytic Viruses and Natural Killer Cells. Adv Virol [Internet]. 2011 Dec 11 [cited 2014 Apr 27];2012. Available from: http://www.hindawi.com/journals/av/2012/702839/abs/

189. Maher SG, Romero-Weaver AL, Scarzello AJ, Gamero AM. Interferon: cellular executioner or white knight? Curr Med Chem. 2007;14(12):1279–89.

190. Cooper MA, Fehniger TA, Caligiuri MA. The biology of human natural killer-cell subsets. Trends Immunol. 2001 Nov;22(11):633–40.

191. De Maria A, Bozzano F, Cantoni C, Moretta L. Revisiting human natural killer cell subset function revealed cytolytic CD56(dim)CD16+ NK cells as rapid producers of abundant IFN-gamma on activation. Proc Natl Acad Sci U S A. 2011 Jan 11;108(2):728–32.

192. Fauriat C, Long EO, Ljunggren H-G, Bryceson YT. Regulation of human NK-cell cytokine and chemokine production by target cell recognition. Blood. 2010 Mar 18;115(11):2167–76.

193. Bryceson YT, March ME, Ljunggren H-G, Long EO. Activation, coactivation, and costimulation of resting human natural killer cells. Immunol Rev. 2006 Dec;214:73–91.

194. Afonina IS, Cullen SP, Martin SJ. Cytotoxic and non-cytotoxic roles of the CTL/NK protease granzyme B. Immunol Rev. 2010 May;235(1):105–16.

195. Pelletier S. Définition des interactions entre l'immunité innée et adaptative pendant l'infection aiguë par le virus de l'hépatite C (VHC). 2013 [cited 2014 Apr 26]; Available from: https://papyrus.bib.umontreal.ca/xmlui/handle/1866/9182

196. Valiante NM, Uhrberg M, Shilling HG, Lienert-Weidenbach K, Arnett KL, D'Andrea A, et al. Functionally and structurally distinct NK cell receptor repertoires in the peripheral blood of two human donors. Immunity. 1997 Dec;7(6):739–51.

197. Vivier E, Ugolini S, Blaise D, Chabannon C, Brossay L. Targeting natural killer cells and natural killer T cells in cancer. Nat Rev Immunol. 2012 Apr;12(4):239–52.

198. Agrawal S, Tripathi P, Naik S. Roles and mechanism of natural killer cells in clinical and experimental transplantation. Expert Rev Clin Immunol. 2008 Jan 1;4(1):79–91.

199. Lanier LL, Sun JC. Do the terms innate and adaptive immunity create conceptual barriers? Nat Rev Immunol. 2009 May;9(5):302–3.

200. Abbas AK, Lichtman AHH, Masson PL, Abbas AK, Lichtman AH, Co JS&. Les bases de l'immunologie fondamentale et clinique. Elsevier Masson; 2013. 749 p.

201. Weiskopf D, Weinberger B, Grubeck-Loebenstein B. The aging of the immune system. Transpl Int Off J Eur Soc Organ Transplant. 2009 Nov;22(11):1041–50.

202. Luckheeram RV, Zhou R, Verma AD, Xia B. $CD4^+$T cells: differentiation and functions. Clin Dev Immunol. 2012;2012:925135.

203. Love PE, Hayes SM. ITAM-mediated Signaling by the T-Cell Antigen Receptor. Cold Spring Harb Perspect Biol [Internet]. 2010 Jun [cited 2014 May 12];2(6). Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2869518/

204. Marelli-Berg FM, Clement M, Mauro C, Caligiuri G. An immunologist's guide to CD31 function in T-cells. J Cell Sci. 2013 Jun 1;126(Pt 11):2343–52.

205. Frauwirth KA, Thompson CB. Activation and inhibition of lymphocytes by costimulation. J Clin Invest. 2002 Feb;109(3):295–9.

206. Dong C, Juedes AE, Temann U-A, Shresta S, Allison JP, Ruddle NH, et al. ICOS co-stimulatory receptor is essential for T-cell activation and function. Nature. 2001 Jan 4;409(6816):97–101.

207. Tafuri A, Shahinian A, Bladt F, Yoshinaga SK, Jordana M, Wakeham A, et al. ICOS is essential for effective T-helper-cell responses. Nature. 2001 Jan 4;409(6816):105–9.

208. Yoshinaga SK, Whoriskey JS, Khare SD, Sarmiento U, Guo J, Horan T, et al. T-cell co-stimulation through B7RP-1 and ICOS. Nature. 1999 Dec 16;402(6763):827–32.

209. Freeman GJ, Long AJ, Iwai Y, Bourque K, Chernova T, Nishimura H, et al. Engagement of the Pd-1 Immunoinhibitory Receptor by a Novel B7 Family Member Leads to Negative Regulation of Lymphocyte Activation. J Exp Med. 2000 Oct 2;192(7):1027–34.

210. Keir ME, Butte MJ, Freeman GJ, Sharpe AH. PD-1 and Its Ligands in Tolerance and Immunity. Annu Rev Immunol. 2008;26(1):677–704.

211. Zhu J, Yamane H, Paul WE. Differentiation of effector CD4 T cell populations (*). Annu Rev Immunol. 2010;28:445–89.

212. Boschetti G, Nancey S, Kanjarawi R, Almeras T, Ruel K, Kaiserlian D, et al. Réponses immunitaires au cours des MICI : implication de l'axe IL-23/Th17. Hépato-Gastro. 2012 Jun 1;19(6):446–54.

213. Benchetrit F, Gazagne A, Adotevi O, Haicheur N, Godard B, Badoual C, et al. Les lymphocytes T-CD8 : rôle dans l'immunosurveillance et l'immunothérapie antitumorale. Bull Cancer (Paris). 2003 Aug 1;90(8):677–85.

214. Rey J, Olive D, Sébahoun G, O'Callaghan T, Costello RT. Les effecteurs cytotoxiques : données récentes. Bull Cancer (Paris). 2005 Nov 1;92(11):935–43.

215. Dorothee G, Thiery J, Abouzahr S, Richon C, Chouaib S. Les cellules tueuses : voies lytiques et régulation. Hématologie. 2004 Sep 1;10(5):355–64.

216. Ma S, Xie N, Li W, Yuan B, Shi Y, Wang Y. Immunobiology of mesenchymal stem cells. Cell Death Differ. 2014 Feb;21(2):216–25.

217. Abumaree M, Al Jumah M, Pace RA, Kalionis B. Immunosuppressive properties of mesenchymal stem cells. Stem Cell Rev. 2012 Jun;8(2):375–92.

218. Chen P-M, Yen M-L, Liu K-J, Sytwu H-K, Yen B-L. Immunomodulatory properties of human adult and fetal multipotent mesenchymal stem cells. J Biomed Sci. 2011;18:49.

219. Ding Y, Xu D, Feng G, Bushell A, Muschel RJ, Wood KJ. Mesenchymal Stem Cells Prevent the Rejection of Fully Allogenic Islet Grafts by the Immunosuppressive Activity of Matrix Metalloproteinase-2 and -9. Diabetes. 2009 Aug 1;58(8):1797–806.

220. Gu Y, Xue Q, Chen Y, Yu G-H, Qing M, Shen Y, et al. Different roles of PD-L1 and FasL in immunomodulation mediated by human placenta-derived mesenchymal stem cells. Hum Immunol. 2013 Mar;74(3):267–76.

221. Ménard C, Tarte K. Immunosuppression et cellules souches mésenchymateuses: Mieux comprendre une propriété thérapeutique majeure. médecine/sciences. 2011 Mar 30;27(3):269–74.

222. Gebler A, Zabel O, Seliger B. The immunomodulatory capacity of mesenchymal stem cells. Trends Mol Med. 2012 Feb;18(2):128–34.

223. Shi M, Liu Z-W, Wang F-S. Immunomodulatory properties and therapeutic application of mesenchymal stem cells. Clin Exp Immunol. 2011 Apr;164(1):1–8.

224. Munn DH, Mellor AL. Indoleamine 2,3 dioxygenase and metabolic control of immune responses. Trends Immunol. 2013 Mar;34(3):137–43.

225. Higuchi K, Hayaishi O. Enzymic formation of D-kynurenine from D-tryptophan. Arch Biochem Biophys. 1967 May;120(2):397–403.

226. Munn DH, Zhou M, Attwood JT, Bondarev I, Conway SJ, Marshall B, et al. Prevention of allogeneic fetal rejection by tryptophan catabolism. Science. 1998 Aug 21;281(5380):1191–3.

227. Della Chiesa M, Carlomagno S, Frumento G, Balsamo M, Cantoni C, Conte R, et al. The tryptophan catabolite L-kynurenine inhibits the surface expression of NKp46- and NKG2D-activating receptors and regulates NK-cell function. Blood. 2006 Dec 15;108(13):4118–25.

228. Su J, Chen X, Huang Y, Li W, Li J, Cao K, et al. Phylogenetic distinction of iNOS and IDO function in mesenchymal stem cell-mediated immunosuppression in mammalian species. Cell Death Differ. 2014 Mar;21(3):388–96.

229. Meisel R, Zibert A, Laryea M, Göbel U, Däubener W, Dilloo D. Human bone marrow stromal cells inhibit allogeneic T-cell responses by indoleamine 2,3-dioxygenase-mediated tryptophan degradation. Blood. 2004 Jun 15;103(12):4619–21.

230. Krampera M, Cosmi L, Angeli R, Pasini A, Liotta F, Andreini A, et al. Role for interferon-gamma in the immunomodulatory activity of human bone marrow mesenchymal stem cells. Stem Cells Dayt Ohio. 2006 Feb;24(2):386–98.

231. Luo C, Jia W, Wang K, Chi F, Gu Y, Yan X, et al. Human amniotic fluid stem cells suppress PBMC proliferation through IDO and IL-10-dependent pathways. Curr Stem Cell Res Ther. 2014 Jan;9(1):36–45.

232. Jones BJ, Brooke G, Atkinson K, McTaggart SJ. Immunosuppression by placental indoleamine 2,3-dioxygenase: a role for mesenchymal stem cells. Placenta. 2007 Dec;28(11-12):1174–81.

233. DelaRosa O, Lombardo E, Beraza A, Mancheño-Corvo P, Ramirez C, Menta R, et al. Requirement of IFN-gamma-mediated indoleamine 2,3-dioxygenase expression in the modulation of lymphocyte proliferation by human adipose-derived stem cells. Tissue Eng Part A. 2009 Oct;15(10):2795–806.

234. Tipnis S, Viswanathan C, Majumdar AS. Immunosuppressive properties of human umbilical cord-derived mesenchymal stem cells: role of B7-H1 and IDO. Immunol Cell Biol. 2010 Nov;88(8):795–806.

235. Yuan Y, Lu X, Tao C, Chen X, Shao H, Huang S. Forced expression of indoleamine-2,3-dioxygenase in human umbilical cord-derived mesenchymal stem cells abolishes their anti-

apoptotic effect on leukemia cell lines in vitro. In Vitro Cell Dev Biol Anim. 2013 Dec;49(10):752–8.

236. Wada N, Menicanin D, Shi S, Bartold PM, Gronthos S. Immunomodulatory properties of human periodontal ligament stem cells. J Cell Physiol. 2009 Jun;219(3):667–76.

237. Li Z, Jiang C-M, An S, Cheng Q, Huang Y-F, Wang Y-T, et al. Immunomodulatory properties of dental tissue-derived mesenchymal stem cells. Oral Dis. 2014 Jan;20(1):25–34.

238. Naugler WE, Karin M. The wolf in sheep's clothing: the role of interleukin-6 in immunity, inflammation and cancer. Trends Mol Med. 2008 Mar;14(3):109–19.

239. Bettelli E, Carrier Y, Gao W, Korn T, Strom TB, Oukka M, et al. Reciprocal developmental pathways for the generation of pathogenic effector TH17 and regulatory T cells. Nature. 2006 May 11;441(7090):235–8.

240. Mangan PR, Harrington LE, O'Quinn DB, Helms WS, Bullard DC, Elson CO, et al. Transforming growth factor-beta induces development of the T(H)17 lineage. Nature. 2006 May 11;441(7090):231–4.

241. Aggarwal S, Pittenger MF. Human mesenchymal stem cells modulate allogeneic immune cell responses. Blood. 2005 Feb 15;105(4):1815–22.

242. Park CW, Kim K-S, Bae S, Son HK, Myung P-K, Hong HJ, et al. Cytokine secretion profiling of human mesenchymal stem cells by antibody array. Int J Stem Cells. 2009 May;2(1):59–68.

243. Bouffi C, Bony C, Courties G, Jorgensen C, Noël D. IL-6-dependent PGE2 secretion by mesenchymal stem cells inhibits local inflammation in experimental arthritis. PloS One. 2010;5(12):e14247.

244. Djouad F, Charbonnier L-M, Bouffi C, Louis-Plence P, Bony C, Apparailly F, et al. Mesenchymal Stem Cells Inhibit the Differentiation of Dendritic Cells Through an Interleukin-6-Dependent Mechanism. STEM CELLS. 2007 Aug 1;25(8):2025–32.

245. Chan C-K, Wu K-H, Lee Y-S, Hwang S-M, Lee M-S, Liao S-K, et al. The comparison of interleukin 6-associated immunosuppressive effects of human ESCs, fetal-type MSCs, and adult-type MSCs. Transplantation. 2012 Jul 27;94(2):132–8.

246. Najar M, Rouas R, Raicevic G, Boufker HI, Lewalle P, Meuleman N, et al. Mesenchymal stromal cells promote or suppress the proliferation of T lymphocytes from cord blood and peripheral blood: the importance of low cell ratio and role of interleukin-6. Cytotherapy. 2009;11(5):570–83.

247. Shabbir A, Zisa D, Lin H, Mastri M, Roloff G, Suzuki G, et al. Activation of host tissue trophic factors through JAK-STAT3 signaling: a mechanism of mesenchymal stem cell-mediated cardiac repair. Am J Physiol Heart Circ Physiol. 2010 Nov;299(5):H1428–1438.

248. Kishimoto T. IL-6: from its discovery to clinical applications. Int Immunol. 2010 May 1;22(5):347–52.

249. Kalinski P. Regulation of immune responses by prostaglandin E2. J Immunol Baltim Md 1950. 2012 Jan 1;188(1):21–8.

250. Phipps RP, Stein SH, Roper RL. A new view of prostaglandin E regulation of the immune response. Immunol Today. 1991 Oct;12(10):349–52.

251. Wang M-T, Honn KV, Nie D. Cyclooxygenases, prostanoids, and tumor progression. Cancer Metastasis Rev. 2007 Dec;26(3-4):525–34.

252. Walker W, Rotondo D. Prostaglandin E2 is a potent regulator of interleukin-12- and interleukin-18-induced natural killer cell interferon-gamma synthesis. Immunology. 2004 Mar;111(3):298–305.

253. Joshi PC, Zhou X, Cuchens M, Jones Q. Prostaglandin E2 suppressed IL-15-mediated human NK cell function through down-regulation of common gamma-chain. J Immunol Baltim Md 1950. 2001 Jan 15;166(2):885–91.

254. Mailliard RB, Alber SM, Shen H, Watkins SC, Kirkwood JM, Herberman RB, et al. IL-18-induced CD83+CCR7+ NK helper cells. J Exp Med. 2005 Oct 3;202(7):941–53.

255. Kaliński P, Hilkens CM, Snijders A, Snijdewint FG, Kapsenberg ML. IL-12-deficient dendritic cells, generated in the presence of prostaglandin E2, promote type 2 cytokine production in maturing human naive T helper cells. J Immunol Baltim Md 1950. 1997 Jul 1;159(1):28–35.

256. Obermajer N, Muthuswamy R, Lesnock J, Edwards RP, Kalinski P. Positive feedback between PGE2 and COX2 redirects the differentiation of human dendritic cells toward stable myeloid-derived suppressor cells. Blood. 2011 Nov 17;118(20):5498–505.

257. Rincón M, Tugores A, López-Rivas A, Silva A, Alonso M, De Landázuri MO, et al. Prostaglandin E2 and the increase of intracellular cAMP inhibit the expression of interleukin 2 receptors in human T cells. Eur J Immunol. 1988 Nov;18(11):1791–6.

258. Kolenko V, Rayman P, Roy B, Cathcart MK, O'Shea J, Tubbs R, et al. Downregulation of JAK3 protein levels in T lymphocytes by prostaglandin E2 and other cyclic adenosine monophosphate-elevating agents: impact on interleukin-2 receptor signaling pathway. Blood. 1999 Apr 1;93(7):2308–18.

259. Baratelli F, Lin Y, Zhu L, Yang S-C, Heuzé-Vourc'h N, Zeng G, et al. Prostaglandin E2 induces FOXP3 gene expression and T regulatory cell function in human CD4+ T cells. J Immunol Baltim Md 1950. 2005 Aug 1;175(3):1483–90.

260. Muthuswamy R, Urban J, Lee J-J, Reinhart TA, Bartlett D, Kalinski P. Ability of mature dendritic cells to interact with regulatory T cells is imprinted during maturation. Cancer Res. 2008 Jul 15;68(14):5972–8.

261. Mahic M, Yaqub S, Johansson CC, Taskén K, Aandahl EM. FOXP3+CD4+CD25+ adaptive regulatory T cells express cyclooxygenase-2 and suppress effector T cells by a prostaglandin E2-dependent mechanism. J Immunol Baltim Md 1950. 2006 Jul 1;177(1):246–54.

262. Spaggiari GM, Abdelrazik H, Becchetti F, Moretta L. 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. 2009 Jun 25;113(26):6576–83.

263. Matysiak M, Orlowski W, Fortak-Michalska M, Jurewicz A, Selmaj K. Immunoregulatory function of bone marrow mesenchymal stem cells in EAE depends on their differentiation state and secretion of PGE2. J Neuroimmunol. 2011 Apr;233(1-2):106–11.

264. Spaggiari GM, Capobianco A, Abdelrazik H, Becchetti F, Mingari MC, Moretta L. Mesenchymal stem cells inhibit natural killer-cell proliferation, cytotoxicity, and cytokine production: role of indoleamine 2,3-dioxygenase and prostaglandin E2. Blood. 2008 Feb 1;111(3):1327–33.

265. Di Nicola M, Carlo-Stella C, Magni M, Milanesi M, Longoni PD, Matteucci P, et al. Human bone marrow stromal cells suppress T-lymphocyte proliferation induced by cellular or nonspecific mitogenic stimuli. Blood. 2002 May 15;99(10):3838–43.

266. Potian JA, Aviv H, Ponzio NM, Harrison JS, Rameshwar P. Veto-like activity of mesenchymal stem cells: functional discrimination between cellular responses to alloantigens and recall antigens. J Immunol Baltim Md 1950. 2003 Oct 1;171(7):3426–34.

267. English K, Ryan JM, Tobin L, Murphy MJ, Barry FP, Mahon BP. Cell contact, prostaglandin E2 and transforming growth factor beta 1 play non-redundant roles in human mesenchymal stem cell induction of CD4+CD25Highforkhead box P3+ regulatory T cells. Clin Exp Immunol. 2009;156(1):149–60.

268. Ribeiro A, Laranjeira P, Mendes S, Velada I, Leite C, Andrade P, et al. Mesenchymal stem cells from umbilical cord matrix, adipose tissue and bone marrow exhibit different capability to suppress peripheral blood B, natural killer and T cells. Stem Cell Res Ther. 2013;4(5):125.

269. Zhao Z-G, Cao Z, Xu W, Sun L, You Y, Li F, et al. Immune protection function of multipotent mesenchymal stromal cells: role of transforming growth factor-β1. Cancer Invest. 2012 Nov;30(9):646–56.

270. Mannello F, Luchetti F, Falcieri E, Papa S. Multiple roles of matrix metalloproteinases during apoptosis. Apoptosis Int J Program Cell Death. 2005 Jan;10(1):19–24.

271. Bourlier V, Zakaroff-Girard A, De Barros S, Pizzacalla C, de Saint Front VD, Lafontan M, et al. Protease inhibitor treatments reveal specific involvement of matrix metalloproteinase-9 in human adipocyte differentiation. J Pharmacol Exp Ther. 2005 Mar;312(3):1272–9.

272. Park M-J, Shin J-S, Kim Y-H, Hong S-H, Yang S-H, Shin J-Y, et al. Murine mesenchymal stem cells suppress T lymphocyte activation through IL-2 receptor α (CD25) cleavage by producing matrix metalloproteinases. Stem Cell Rev. 2011 Jun;7(2):381–93.

273. Dai S, Jia R, Zhang X, Fang Q, Huang L. The PD-1/PD-Ls pathway and autoimmune diseases. Cell Immunol. 2014 Jul;290(1):72–9.

274. Francisco LM, Salinas VH, Brown KE, Vanguri VK, Freeman GJ, Kuchroo VK, et al. PD-L1 regulates the development, maintenance, and function of induced regulatory T cells. J Exp Med. 2009 Dec 21;206(13):3015–29.

275. Butte MJ, Keir ME, Phamduy TB, Sharpe AH, Freeman GJ. Programmed death-1 ligand 1 interacts specifically with the B7-1 costimulatory molecule to inhibit T cell responses. Immunity. 2007 Jul;27(1):111–22.

276. Sheng H, Wang Y, Jin Y, Zhang Q, Zhang Y, Wang L, et al. A critical role of IFNγ in priming MSC-mediated suppression of T cell proliferation through up-regulation of B7-H1. Cell Res. 2008 Aug;18(8):846–57.

277. Ni X, Jia Y-Q, Meng W-T, Zhong L, Zeng Y. [Expression of B7-H1 molecule on human bone marrow mesenchymal stem cells and its effects on T lymphocyte proliferation]. Zhongguo Shi Yan Xue Ye Xue Za Zhi Zhongguo Bing Li Sheng Li Xue Hui J Exp Hematol Chin Assoc Pathophysiol. 2009 Aug;17(4):990–3.

278. Luz-Crawford P, Noël D, Fernandez X, Khoury M, Figueroa F, Carrión F, et al. Mesenchymal Stem Cells Repress Th17 Molecular Program through the PD-1 Pathway. PLoS ONE. 2012 Sep 17;7(9):e45272.

279. Wang G, Zhang S, Wang F, Li G, Zhang L, Luan X. Expression and biological function of programmed death ligands in human placenta mesenchymal stem cells. Cell Biol Int. 2013 Feb;37(2):137–48.

280. Wang G, Wang F, Li H, Zhang L, Luan X. [PD-L1/PD-L2 on human placenta-derived mesenchymal stem cells inhibits the IL-17 secretion of peripheral blood T cells]. Xi Bao Yu Fen Zi Mian Yi Xue Za Zhi Chin J Cell Mol Immunol. 2013 Feb;29(2):132–6.

281. Berger A, Piqueras B, Pages F, Tartour E, Cugnenc P-H, Fridman WH. Fas, Fas ligand, tolérance immunitaire et cancer : implication dans le cancer du côlon. Bull Cancer (Paris). 1998 Feb 24;85(2):129–33.

282. Akiyama K, Chen C, Wang D, Xu X, Qu C, Yamaza T, et al. Mesenchymal-stem-cell-induced immunoregulation involves FAS-ligand-/FAS-mediated T cell apoptosis. Cell Stem Cell. 2012 May 4;10(5):544–55.

283. Rammal H, Beroud J, Gentils M, Labrude P, Menu P, Kerdjoudj H, et al. Reversing charges or how to improve Wharton's jelly mesenchymal stem cells culture on polyelectrolyte multilayer films. Biomed Mater Eng. 2013;23(4):299–309.

284. Carvalho MM, Teixeira FG, Reis RL, Sousa N, Salgado AJ. Mesenchymal stem cells in the umbilical cord: phenotypic characterization, secretome and applications in central nervous system regenerative medicine. Curr Stem Cell Res Ther. 2011 Sep;6(3):221–8.

285. Anderson SB, Lin C-C, Kuntzler DV, Anseth KS. The performance of human mesenchymal stem cells encapsulated in cell-degradable polymer-peptide hydrogels. Biomaterials. 2011 May;32(14):3564–74.

286. Rosová I, Dao M, Capoccia B, Link D, Nolta JA. Hypoxic preconditioning results in increased motility and improved therapeutic potential of human mesenchymal stem cells. Stem Cells Dayt Ohio. 2008 Aug;26(8):2173–82.

287. Vater C, Kasten P, Stiehler M. Culture media for the differentiation of mesenchymal stromal cells. Acta Biomater. 2011 Feb;7(2):463–77.

288. Wang W, Itaka K, Ohba S, Nishiyama N, Chung U, Yamasaki Y, et al. 3D spheroid culture system on micropatterned substrates for improved differentiation efficiency of multipotent mesenchymal stem cells. Biomaterials. 2009 May;30(14):2705–15.

289. Hu Y, Davison F, Zhang Z, Xu Q. Endothelial replacement and angiogenesis in arteriosclerotic lesions of allografts are contributed by circulating progenitor cells. Circulation. 2003 Dec 23;108(25):3122–7.

290. Nowak G, Karrar A, Holmén C, Nava S, Uzunel M, Hultenby K, et al. Expression of vascular endothelial growth factor receptor-2 or Tie-2 on peripheral blood cells defines functionally competent cell populations capable of reendothelialization. Circulation. 2004 Dec 14;110(24):3699–707.

291. Levenberg S, Rouwkema J, Macdonald M, Garfein ES, Kohane DS, Darland DC, et al. Engineering vascularized skeletal muscle tissue. Nat Biotechnol. 2005 Jul;23(7):879–84.

292. Schächinger V, Assmus B, Britten MB, Honold J, Lehmann R, Teupe C, et al. Transplantation of progenitor cells and regeneration enhancement in acute myocardial infarction: final one-year results of the TOPCARE-AMI Trial. J Am Coll Cardiol. 2004 Oct 19;44(8):1690–9.

293. Tateishi-Yuyama E, Matsubara H, Murohara T, Ikeda U, Shintani S, Masaki H, et al. Therapeutic angiogenesis for patients with limb ischaemia by autologous transplantation of bone-marrow cells: a pilot study and a randomised controlled trial. Lancet. 2002 Aug 10;360(9331):427–35.

294. Prasad Chennazhy K, Krishnan LK. Effect of passage number and matrix characteristics on differentiation of endothelial cells cultured for tissue engineering. Biomaterials. 2005 Oct;26(28):5658–67.

295. El Omar R, Beroud J, Stoltz JF, Menu P, Velot E, Decot V. Umbilical cord mesenchymal stem cells: the new gold standard for mesenchymal stem cell based therapies? Tissue Eng Part B Rev. 2014 Feb 19;

296. Gaafar TM, Abdel Rahman HA, Attia W, Hamza HS, Brockmeier K, El Hawary RE. Comparative characteristics of endothelial-like cells derived from human adipose mesenchymal stem cells and umbilical cord blood-derived endothelial cells. Clin Exp Med. 2014 May;14(2):177–84.

297. Fischer LJ, McIlhenny S, Tulenko T, Golesorkhi N, Zhang P, Larson R, et al. Endothelial differentiation of adipose-derived stem cells: effects of endothelial cell growth supplement and shear force. J Surg Res. 2009 Mar;152(1):157–66.

298. Janeczek Portalska K, Leferink A, Groen N, Fernandes H, Moroni L, van Blitterswijk C, et al. Endothelial differentiation of mesenchymal stromal cells. PloS One. 2012;7(10):e46842.

299. Gang EJ, Jeong JA, Han S, Yan Q, Jeon C-J, Kim H. In vitro endothelial potential of human UC blood-derived mesenchymal stem cells. Cytotherapy. 2006;8(3):215–27.

300. Silva GV, Litovsky S, Assad JAR, Sousa ALS, Martin BJ, Vela D, et al. Mesenchymal stem cells differentiate into an endothelial phenotype, enhance vascular density, and improve heart function in a canine chronic ischemia model. Circulation. 2005 Jan 18;111(2):150–6.

301. Jiang Y, Jahagirdar BN, Reinhardt RL, Schwartz RE, Keene CD, Ortiz-Gonzalez XR, et al. Pluripotency of mesenchymal stem cells derived from adult marrow. Nature. 2002 Jul 4;418(6893):41–9.

302. Grünewald JK, Ridley AJ. CD73 represses pro-inflammatory responses in human endothelial cells. J Inflamm. 2010 Feb 5;7(1):10.

303. Jalkanen S, Salmi M. VAP-1 and CD73, Endothelial Cell Surface Enzymes in Leukocyte Extravasation. Arterioscler Thromb Vasc Biol. 2008 Jan 1;28(1):18–26.

304. Narravula S, Lennon PF, Mueller BU, Colgan SP. Regulation of Endothelial CD73 by Adenosine: Paracrine Pathway for Enhanced Endothelial Barrier Function. J Immunol. 2000 Nov 1;165(9):5262–8.

305. Ohta M, Toyama K, Gutterman DD, Campbell WB, Lemaître V, Teraoka R, et al. Ecto-5'-nucleotidase, CD73, is an endothelium-derived hyperpolarizing factor synthase. Arterioscler Thromb Vasc Biol. 2013 Mar;33(3):629–36.

306. Bouma MG, van den Wildenberg FA, Buurman WA. Adenosine inhibits cytokine release and expression of adhesion molecules by activated human endothelial cells. Am J Physiol. 1996 Feb;270(2 Pt 1):C522–529.

307. Comerford KM, Lawrence DW, Synnestvedt K, Levi BP, Colgan SP. Role of vasodilator-stimulated phosphoprotein in PKA-induced changes in endothelial junctional permeability. FASEB J. 2002 Apr 1;16(6):583–5.

308. Ferrara N. Vascular endothelial growth factor: basic science and clinical progress. Endocr Rev. 2004 Aug;25(4):581–611.

309. Hoeben A, Landuyt B, Highley MS, Wildiers H, Van Oosterom AT, De Bruijn EA. Vascular endothelial growth factor and angiogenesis. Pharmacol Rev. 2004 Dec;56(4):549–80.

310. Gory-Fauré S, Prandini MH, Pointu H, Roullot V, Pignot-Paintrand I, Vernet M, et al. Role of vascular endothelial-cadherin in vascular morphogenesis. Dev Camb Engl. 1999 May;126(10):2093–102.

311. Woodfin A, Voisin M-B, Nourshargh S. PECAM-1: a multi-functional molecule in inflammation and vascular biology. Arterioscler Thromb Vasc Biol. 2007 Dec;27(12):2514–23.

312. Niwa K, Kado T, Sakai J, Karino T. The effects of a shear flow on the uptake of LDL and acetylated LDL by an EC monoculture and an EC-SMC coculture. Ann Biomed Eng. 2004 Apr;32(4):537–43.

313. La Rocca G, Corrao S, Lo Iacono M, Corsello T, Farina F, Anzalone R. Novel immunomodulatory markers expressed by human WJ-MSC: an updated review in regenerative and reparative medicine. Open Tissue Eng Regen Med J. 2012;5:50–8.

314. Le Blanc K, Tammik C, Rosendahl K, Zetterberg E, Ringdén O. HLA expression and immunologic properties of differentiated and undifferentiated mesenchymal stem cells. Exp Hematol. 2003 Oct;31(10):890–6.

315. Huang X-P, Sun Z, Miyagi Y, McDonald Kinkaid H, Zhang L, Weisel RD, et al. Differentiation of allogeneic mesenchymal stem cells induces immunogenicity and limits their long-term benefits for myocardial repair. Circulation. 2010 Dec 7;122(23):2419–29.

316. Li P, Li S-H, Wu J, Zang W-F, Dhingra S, Sun L, et al. Interleukin-6 downregulation with mesenchymal stem cell differentiation results in loss of immunoprivilege. J Cell Mol Med. 2013;n/a–n/a.

317. Castro-Manrreza ME, Mayani H, Monroy-García A, Flores-Figueroa E, Chávez-Rueda K, Legorreta-Haquet V, et al. Human Mesenchymal Stromal Cells from Adult and Neonatal Sources: A Comparative In Vitro Analysis of Their Immunosuppressive Properties Against T Cells. Stem Cells Dev. 2014 Feb 24;140224074517006.

318. Ryan JM, Barry F, Murphy JM, Mahon BP. Interferon-gamma does not break, but promotes the immunosuppressive capacity of adult human mesenchymal stem cells. Clin Exp Immunol. 2007 Aug;149(2):353–63.

319. Selmani Z, Naji A, Zidi I, Favier B, Gaiffe E, Obert L, et al. Human leukocyte antigen-G5 secretion by human mesenchymal stem cells is required to suppress T lymphocyte and natural killer function and to induce CD4+CD25highFOXP3+ regulatory T cells. Stem Cells Dayt Ohio. 2008 Jan;26(1):212–22.

320. Yan Z, Zhuansun Y, Chen R, Li J, Ran P. Immunomodulation of mesenchymal stromal cells on regulatory T cells and its possible mechanism. Exp Cell Res. 2014 May 15;324(1):65–74.

321. Baggiolini M, Clark-Lewis I. Interleukin-8, a chemotactic and inflammatory cytokine. FEBS Lett. 1992 Jul 27;307(1):97–101.

322. Hoogduijn MJ, Popp F, Verbeek R, Masoodi M, Nicolaou A, Baan C, et al. The immunomodulatory properties of mesenchymal stem cells and their use for immunotherapy. Int Immunopharmacol. 2010 Dec;10(12):1496–500.

323. Duffner UA, Maeda Y, Cooke KR, Reddy P, Ordemann R, Liu C, et al. Host dendritic cells alone are sufficient to initiate acute graft-versus-host disease. J Immunol Baltim Md 1950. 2004 Jun 15;172(12):7393–8.

324. Chinnadurai R, Copland IB, Patel SR, Galipeau J. IDO-Independent Suppression of T Cell Effector Function by IFN-γ–Licensed Human Mesenchymal Stromal Cells. J Immunol. 2014 Feb 15;192(4):1491–501.

325. Le Blanc K, Rasmusson I, Götherström C, Seidel C, Sundberg B, Sundin M, et al. Mesenchymal stem cells inhibit the expression of CD25 (interleukin-2 receptor) and CD38 on phytohaemagglutinin-activated lymphocytes. Scand J Immunol. 2004 Sep;60(3):307–15.

326. Di Ianni M, Del Papa B, De Ioanni M, Moretti L, Bonifacio E, Cecchini D, et al. Mesenchymal cells recruit and regulate T regulatory cells. Exp Hematol. 2008 Mar;36(3):309–18.

327. Luan X, Li G, Wang G, Wang F, Lin Y. Human placenta-derived mesenchymal stem cells suppress T cell proliferation and support the culture expansion of cord blood $CD34^+$ cells: a comparison with human bone marrow-derived mesenchymal stem cells. Tissue Cell. 2013 Feb;45(1):32–8.

328. Manochantr S, U-pratya Y, Kheolamai P, Rojphisan S, Chayosumrit M, Tantrawatpan C, et al. Immunosuppressive properties of mesenchymal stromal cells derived from amnion, placenta, Wharton's jelly and umbilical cord. Intern Med J. 2013;43(4):430–9.

329. Bassi EJ, Aita CAM, Câmara NOS. Immune regulatory properties of multipotent mesenchymal stromal cells: Where do we stand? World J Stem Cells. 2011 Jan 26;3(1):1–8.

330. Maccario R, Podestà M, Moretta A, Cometa A, Comoli P, Montagna D, et al. Interaction of human mesenchymal stem cells with cells involved in alloantigen-specific immune response favors the differentiation of CD4+ T-cell subsets expressing a regulatory/suppressive phenotype. Haematologica. 2005 Apr;90(4):516–25.

331. DelaRosa O, Sánchez-Correa B, Morgado S, Ramírez C, del Río B, Menta R, et al. Human adipose-derived stem cells impair natural killer cell function and exhibit low susceptibility to natural killer-mediated lysis. Stem Cells Dev. 2012 May 20;21(8):1333–43.

332. Boissel L, Tuncer HH, Betancur M, Wolfberg A, Klingemann H. Umbilical cord mesenchymal stem cells increase expansion of cord blood natural killer cells. Biol Blood Marrow Transplant J Am Soc Blood Marrow Transplant. 2008 Sep;14(9):1031–8.

333. Parks WC, Wilson CL, López-Boado YS. Matrix metalloproteinases as modulators of inflammation and innate immunity. Nat Rev Immunol. 2004 Aug;4(8):617–29.

334. Nissinen L, Kähäri V-M. Matrix metalloproteinases in inflammation. Biochim Biophys Acta. 2014 Mar 14;

335. Ramasamy R, Tong CK, Seow HF, Vidyadaran S, Dazzi F. The immunosuppressive effects of human bone marrow-derived mesenchymal stem cells target T cell proliferation but not its effector function. Cell Immunol. 2008 Feb;251(2):131–6.

336. Curran T-A, Jalili RB, Farrokhi A, Ghahary A. IDO expressing fibroblasts promote the expansion of antigen specific regulatory T cells. Immunobiology. 2014 Jan;219(1):17–24.

337. Chung DJ, Rossi M, Romano E, Ghith J, Yuan J, Munn DH, et al. Indoleamine 2,3-dioxygenase-expressing mature human monocyte-derived dendritic cells expand potent autologous regulatory T cells. Blood. 2009 Jul 16;114(3):555–63.

338. Park M-J, Min S-Y, Park K-S, Cho Y-G, Cho M-L, Jung Y-O, et al. Indoleamine 2,3-dioxygenase-expressing dendritic cells are involved in the generation of CD4+CD25+ regulatory T cells in Peyer's patches in an orally tolerized, collagen-induced arthritis mouse model. Arthritis Res Ther. 2008;10(1):R11.

339. Curti A, Pandolfi S, Valzasina B, Aluigi M, Isidori A, Ferri E, et al. Modulation of tryptophan catabolism by human leukemic cells results in the conversion of CD25- into CD25+ T regulatory cells. Blood. 2007 Apr 1;109(7):2871–7.

340. Poggi A, Prevosto C, Massaro A-M, Negrini S, Urbani S, Pierri I, et al. Interaction between human NK cells and bone marrow stromal cells induces NK cell triggering: role of NKp30 and NKG2D receptors. J Immunol Baltim Md 1950. 2005 Nov 15;175(10):6352–60.

341. Hoskin DW, Mader JS, Furlong SJ, Conrad DM, Blay J. Inhibition of T cell and natural killer cell function by adenosine and its contribution to immune evasion by tumor cells (Review). Int J Oncol. 2008 Mar;32(3):527–35.

342. Häusler SFM, Montalbán del Barrio I, Strohschein J, Anoop Chandran P, Engel JB, Hönig A, et al. Ectonucleotidases CD39 and CD73 on OvCA cells are potent adenosine-generating enzymes responsible for adenosine receptor 2A-dependent suppression of T cell function and NK cell cytotoxicity. Cancer Immunol Immunother CII. 2011 Oct;60(10):1405–18.

343. Schuler PJ, Saze Z, Hong CS, Muller L, Gillespie DG, Cheng D, et al. Human CD4(+) CD39(+) regulatory T cells produce adenosine upon co-expression of surface CD73 or contact with CD73(+) exosomes or CD73(+) cells. Clin Exp Immunol. 2014 Apr 18;

344. Saldanha-Araujo F, Ferreira FIS, Palma PV, Araujo AG, Queiroz RHC, Covas DT, et al. Mesenchymal stromal cells up-regulate CD39 and increase adenosine production to suppress activated T-lymphocytes. Stem Cell Res. 2011 Jul;7(1):66–74.

345. Schallmoser K, Bartmann C, Rohde E, Reinisch A, Kashofer K, Stadelmeyer E, et al. Human platelet lysate can replace fetal bovine serum for clinical-scale expansion of functional mesenchymal stromal cells. Transfusion (Paris). 2007 Aug 1;47(8):1436–46.

346. Doucet C, Ernou I, Zhang Y, Llense J-R, Begot L, Holy X, et al. Platelet lysates promote mesenchymal stem cell expansion: A safety substitute for animal serum in cell-based therapy applications. J Cell Physiol. 2005 Nov 1;205(2):228–36.

347. Warnke PH, Humpe A, Strunk D, Stephens S, Warnke F, Wiltfang J, et al. A clinically-feasible protocol for using human platelet lysate and mesenchymal stem cells in regenerative therapies. J Cranio-Maxillofac Surg. 2013 Mar;41(2):153–61.

348. Naaijkens BA, Niessen HWM, Prins H-J, Krijnen P a. J, Kokhuis TJA, Jong N de, et al. Human platelet lysate as a fetal bovine serum substitute improves human adipose-derived stromal cell culture for future cardiac repair applications. Cell Tissue Res. 2012 Apr 1;348(1):119–30.

349. Felka T, Schäfer R, De Zwart P, Aicher WK. Animal serum-free expansion and differentiation of human mesenchymal stromal cells. Cytotherapy. 2010 Feb 8;12(2):143–53.

350. Darzi S, Zarnani AH, Jeddi-Tehrani M, Entezami K, Mirzadegan E, Akhondi MM, et al. Osteogenic Differentiation of Stem Cells Derived from Menstrual Blood Versus Bone Marrow in the Presence of Human Platelet Releasate. Tissue Eng Part A. 2012 May 10;18(15-16):1720–8.

351. Kazemnejad S, Allameh A, Gharehbaghian A, Soleimani M, Amirizadeh N, Jazayeri M. Efficient replacing of fetal bovine serum with human platelet releasate during propagation and differentiation of human bone marrow-derived mesenchymal stem cells to functional hepatocytes-like cells. Vox Sang. 2008 Aug 1;95(2):149–58.