



**HAL**  
open science

# L'effet immunomodulateur de cellule souche mésenchymateuse et ses exosomes sur l'activité des lymphocytes

Ye Fan

► **To cite this version:**

Ye Fan. L'effet immunomodulateur de cellule souche mésenchymateuse et ses exosomes sur l'activité des lymphocytes. Immunologie. Université Paris Saclay (COmUE), 2017. Français. NNT : 2017SACLS194 . tel-02275798

**HAL Id: tel-02275798**

**<https://theses.hal.science/tel-02275798v1>**

Submitted on 2 Sep 2019

**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.

NNT : 2017SACLS194

THESE DE DOCTORAT  
DE  
L'UNIVERSITE PARIS-SACLAY  
PREPAREE A  
"L'UNIVERSITE PARIS-SUD"

ECOLE DOCTORALE N° 568  
Signalisation et réseaux intégratifs en biologie  
Spécialité de doctorat : Immunologie

Par

**Mme Ye FAN**

L'effet immunomodulateur de cellule souche mésenchymateuse et ses exosomes sur  
l'activité des lymphocytes

**Thèse présentée et soutenue à Villejuif, le 17 juillet 2017**

**Composition du Jury :**

M. Boucheix Claude, Directeur de Recherche, Inserm, Président du Jury

M. Saas Philippe, Professeur, EFS, Rapporteur

M. John De Vos, PU-PH, Université Montpellier 1, Rapporteur

M. Antoine Dürrbach, PU-PH, Université Paris Sud, Directeur de thèse

*A mes parents...*

## *Remerciements*

Ce projet de thèse n'aurait pu être réalisé sans le soutien, j'aimerais exprimer ma profonde reconnaissance à toutes les personnes qui ont contribué de près ou de loin à la réalisation et qu'au bon déroulement de cette thèse.

Je tiens tout d'abord à remercier le Dr George UZAN et pour m'avoir accueillie au sein de son laboratoire Inserm U1197 « Régulation de la survie cellulaire et des allogreffes ».

Je remercie vivement le Pr Antoine DURBACCH pour avoir encadré ce travail avec tant d'énergie et de patience, je vous remercie pour m'avoir donné la chance de travailler sur un sujet passionnant, mais également pour votre soutien, votre disponibilité, votre enthousiasme et votre volonté de mener à bien notre projet.

Je remercie le Dr Claude BOUCHEIX d'avoir accepté de présider mon jury et de juger mon travail en qualité d'examineur, et m'aide dans la rédaction de ce manuscrit.

Je tiens également à remercier le Pr Philippe SAAS et le Pr John DE VOS qui ont généreusement accepté d'être rapporteurs de mon travail, pour leur disponibilité et pour m'avoir permis de présenter ce travail dans les meilleures conditions.

Je remercie vivement à Florence HERR et Nathalie RODERS, pour votre aide dans, conseils dans mon travail et dans la rédaction de ce manuscrit. Surtout votre enthousiasme, votre accompagnement et votre encouragement dans les 2 dernières de ma thèse ! je les garderai comme un très beau souvenir.

Je remercie également à Séverine Lecourt et Amélia pour votre gentillesse, votre aide et votre compréhension, tout ça m'aide à sortir le moment le plus difficile de ma thèse.

Un grand merci à Pierre Eid et Julien Giron-Michel qui m'ont aidée et m'ont conseillée dans mon travail.

Je remercie également à Estelle OBERLIN et Philippe MAUDUIT, pour leur aide et conseillée dans ce travail.

Je remercie les membres équipe 2 de l'unité 1197, Aurore Devocelle, Damien Arnoult, Cindy Gallerne pour leur aide et leurs conseils. Un grand merci également aux étudiants passés et présents de l'unité, en particulier Vincent, Lola, Meng, Mélanie pour votre sourire, votre bonne humeur et votre aide.

Plus personnellement, je remercie à Denis CLAY et Juan PENG, pour leur aide, leur gentillesse et toutes nos discussions, scientifiques ou non.

Enfin, merci au IFRNT, Département de Néphrologie, pour leur financement.

# TABLE DES MATIERES

<b>TABLE DES MATIERES</b> .....	<b>1</b>
<b>LISTE DES ABREVIATIONS</b> .....	<b>5</b>
<b>LISTE DES FIGURES ET DES TABLEAUX</b> .....	<b>8</b>
<b>AVANT-PROPOS</b> .....	<b>10</b>
<b>INTRODUCTION</b> .....	<b>12</b>
<b>I. LES CELLULES SOUCHES</b> .....	<b>12</b>
<b>I.1. Généralités</b> .....	12
<b>I.2. La cellule souche mésenchymateuse (CSM)</b> .....	14
<b>I.2.1. Généralités</b> .....	14
<b>I.2.2. Phénotype et Caractérisation des CSM</b> .....	15
<b>I.2.3. Localisation et sources tissulaire des CSM</b> .....	18
<b>I.2.4. Rôles physiologiques des CSM</b> .....	18
I.2.4.1. Rôle dans la niche hématopoïétique .....	18
I.2.4.2. Rôle dans la régénération tissulaire.....	20
• Homing.....	21
• Différentiation .....	21
• Plasticité .....	21
• Activité paracrine .....	21
<b>I.2.4. Rôle sur l'immunité</b> .....	21
<b>I.2.5. L'application thérapeutique : essais cliniques</b> .....	22
<b>II. IMMUNOMODULATION PAR LA CSM</b> .....	<b>23</b>
<b>II.1. Généralités</b> .....	23
<b>II.1.1. Profile immunologique des CSM (Immunogénicité)</b> .....	24
<b>II.1.2. Plasticité d'immunomodulation</b> .....	24
<b>II.1.3. Mécanismes (mode d'action)</b> .....	27

• Activité paracrine .....	27
• Contact cellulaire.....	27
<b>II.2. Immunomodulation des cellules du système immunitaire adaptatif.....</b>	<b>29</b>
<b>II.2.1. Lymphocytes T.....</b>	<b>29</b>
II.2.1.1 Généralité.....	29
II.2.1.2. Mécanismes.....	30
• L'interaction cellulaire .....	31
• Les facteurs sécrétés.....	32
• La génération de lymphocytes T régulateurs (Treg) .....	33
<b>II.2.2. Lymphocytes B.....</b>	<b>34</b>
II.2.2.1 Généralités .....	34
II.2.2.2. Mécanismes.....	36
• L'interaction cellulaire .....	36
• Les facteurs sécrétés.....	36
• La génération de lymphocytes B régulateurs (Breg).....	37
<b>II.3. Immunomodulation des cellules du système immunitaire inné.....</b>	<b>38</b>
<b>II.3.1. Cellule dendritique (DC).....</b>	<b>38</b>
<b>II.3.2. Monocyte/macrophage .....</b>	<b>40</b>
<b>II.3.3. Cellule NK (Nature Killer) .....</b>	<b>42</b>
II.3.3.1 Généralités .....	42
II.3.3.2. Fonctions effectrices des cellules NK.....	44
II.3.3.2.1. Cytotoxicité .....	45
• Cytotoxicité Naturelle .....	45
• Cytotoxicité cellulaire dépendant des anticorps (ADCC) .....	46
• Mécanismes liés à la mort cellulaire .....	47
II.3.3.2.2. Production de Cytokines .....	47
II.3.3.2.3. Prolifération .....	48
II.3.3.3. Les récepteurs des cellules NK .....	49
II.3.3.3.1. CD16/FcγRIII.....	49
II.3.3.3.2. les récepteurs de la famille de NCR.....	49

II.3.3.3.3. <i>les récepteurs du NKG2 de la super famille de lectine de type C</i> .....	50
• Les récepteurs CD94/NKG2.....	50
• Le récepteur NKG2D .....	51
II.3.3.3.4. <i>Les récepteurs KIR/CD158</i> .....	51
II.3.3.3.5. <i>Les récepteurs ILT/LIR</i> .....	52
II.3.3.3.6. <i>Autres récepteurs impliqué dans l'activation des cellules NK</i> .....	52
II.3.3.4. <i>Immunomodulation des cellules NK par les CSMs</i> .....	52
<b>II.4. Facteurs sécrétés impliqués dans l'immunomodulation de CSM</b> .....	<b>55</b>
<b>II.4.1. Interleukine 10 (IL-10)</b> .....	<b>55</b>
<b>II.4.2. Interleukine 6 (IL-6)</b> .....	<b>56</b>
<b>II.4.3. TGF<math>\beta</math></b> .....	<b>56</b>
<b>II.4.4. IDO (indoleamine-2,3-dioxygénase)</b> .....	<b>57</b>
<b>II.4.5. PGE2 (prostaglandine E2)</b> .....	<b>57</b>
<b>II.4.6. Chimioquinas</b> .....	<b>58</b>
<b>III. VESICULE EXTRACELLULAIRE (VE)</b> .....	<b>60</b>
<b>III.1. Généralités</b> .....	<b>60</b>
<b>III.1.1 Classification</b> .....	<b>61</b>
<b>III.1.2. Les VEs sécrétés par les CSM</b> .....	<b>63</b>
<b>III.2. Exosomes</b> .....	<b>65</b>
<b>III.2.1 Généralité</b> .....	<b>65</b>
<b>III.2.2. Biogenèse d'exosomes</b> .....	<b>66</b>
<b>III.2.3. Composition des exosomes</b> .....	<b>67</b>
III.2.3.1 composition protéique .....	68
III.2.3.2 composition lipidique .....	69
III.2.3.3 Les carbohydrates .....	70
III.2.3.4 composition acide nucléique.....	70
<b>III.2.4. Interaction des exosomes avec les cellules cibles</b> .....	<b>71</b>

<b>III.3. Exosomes dérivés des CSM.....</b>	<b>73</b>
<b>III.3.1. Composition des exosomes dérivés des CSM .....</b>	<b>74</b>
III.3.1.1 L'analyse protéomique .....	74
III.3.1.2 les profile d'ARN.....	75
<b>III.3.2. Rôle dans la réparation tissulaire .....</b>	<b>75</b>
<b>III.3.3. Rôle dans l'immunomodulation .....</b>	<b>76</b>
<b>OBJECTIVFS DU TRAVAIL DE THESE .....</b>	<b>79</b>
<b>RESULTATS.....</b>	<b>80</b>
<b>DISCUSSION .....</b>	<b>116</b>
1. Isolement des exosomes sécrétés par les CSM.....	117
2. Les exosomes dérivés des FL-CSM n'inhibent pas la prolifération des lymphocytes .....	118
3. Les exosomes dérivé des FL-CSM exercent une immunosuppression sur l'activation des cellules NK .....	120
<b>PERSPECTIVE.....</b>	<b>124</b>
<b>ANNEXES .....</b>	<b>125</b>
<b>REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES .....</b>	<b>131</b>



## ABREVIATIONS

<b>ADCC</b>	Antibody-dependent-cell-cytotoxicity
<b>Alix</b>	Apoptosis-linked gene-2-interaction protein X
<b>ADN</b>	Acide DesoxyriboNucleiqu
<b>AKT</b>	Protin kinase B
<b>ARN</b>	Acide RiboNucleique
<b>ARNm</b>	ARN messenger
<b>ATP</b>	Adénosine triphosphate
<b>Baso</b>	Basophils
<b>BM</b>	Bone marrow (moelle osseuse)
<b>CAR</b>	CXCL12-abundant reticular
<b>CCL</b>	Chemokine (C-C motif) ligand
<b>CCR</b>	Chemokine (C-C motif) receptor
<b>CD</b>	Cluster ou classe de différenciation
<b>ESC</b>	Cellules souches embryonnaires (Embryonic Stem cell)
<b>CMH</b>	Complexe majeur d'histocompatibilité
<b>COX</b>	Cyclooxygénase
<b>CPA</b>	Cellules présentatrices d'antigène
<b>CMV</b>	Corps multivésiculaires
<b>CS</b>	Cellules Souche
<b>CSH</b>	Cellule Souche Hématopoïétique
<b>CSM</b>	Cellule Souche mésenchymateuse
<b>CTL</b>	Cytotoxic T lymphocytes
<b>CXCL</b>	C-X-C motif ligand
<b>DAMP</b>	Damage-associated molecular pattern
<b>DC</b>	Cellules dendritiques
<b>DCi</b>	Cellules dendritiques immature
<b>DCm</b>	Cellules dendritiques mature
<b>EGF-R</b>	Epidermal growth factor receptor
<b>ERK</b>	Extracellular regulated protein kinase
<b>ESCRT</b>	Endosomal sorting complex required for transport;
<b>Eo</b>	Eosinophiles
<b>FasL</b>	Fas ligand
<b>FcγRIII</b>	Récepteur Fcγ de type III
<b>FL</b>	Fetal Liver (foi foetal)
<b>FOXP3</b>	Forkhead P3
<b>GM-CSF</b>	Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor

<b>GMP</b>	Good manufacturing Practices
<b>Gal</b>	Galectine
<b>HLA</b>	Human leukocyte antigen
<b>HGF</b>	Hepatocyte growth factor
<b>HO-1</b>	Heme oxygenase-1
<b>HPLC</b>	High-performance liquid chromatography
<b>Hsp</b>	Heat shock protein
<b>HSPG</b>	Heparan sulphate proteoglycans
<b>ICAM</b>	Intercellular adhesion molecule
<b>IDO</b>	Indoleamine-2.3-dioxygenase
<b>IFN-<math>\gamma</math></b>	Interferon- $\gamma$
<b>Ig</b>	Imunoglobuline
<b>IL</b>	Interleukine
<b>ISCT</b>	International Society for Cellular Therapy
<b>ILT</b>	Immunoglobulin like transcripts
<b>ILV</b>	Intraluminal vesicles (vésicules intraluminales)
<b>iPS</b>	Induced pluripotent stem cell
<b>ITAM</b>	Immunoreceptor tyrosine-based activating motif
<b>ITIM</b>	Immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motif
<b>KIR</b>	Killer cell immunoglobulin-like receptors
<b>LAMP</b>	Lysosome associated membrane protein
<b>LFA</b>	Leucocyte function associated antigen
<b>LIR</b>	Leukocyte Ig like Receptors de type 2
<b>mAb</b>	Monoclonal antibody
<b>MAPK</b>	Mitogen-activated protein kinase
<b>MICA/B</b>	Major histocompatibility complex class I related chain A et B
<b>MIP</b>	Macrophage inflammatory protein
<b>miARN</b>	MicroARN
<b>MLR</b>	Mixed lymphocyte reaction
<b>Mo</b>	Monocyte
<b>MV</b>	Microvésicules
<b>MVB</b>	Multivesicular body
<b>MVE</b>	Multivesicular endosome (endosome multivésiculaire)
<b>NCR</b>	Natural cytotoxicity receptors
<b>NF-<math>\kappa</math>B</b>	Nuclear Factor $\kappa$ B
<b>NK</b>	Natural Killer
<b>NKG2</b>	Natural-Killer group 2
<b>NKG2D</b>	Natural-Killer group 2 D
<b>NO</b>	Monoxyde d'azote

<b>N-SMase</b>	Neutral sphingomyelinase
<b>PAMP</b>	Pathogen-associated molecular patterns
<b>PBMC</b>	Cellule mononuclées du sang périphérique
<b>PD-1</b>	Programmed death-1
<b>PDGF-RB</b>	Platelet-derived growth factor receptor B
<b>PDL-1</b>	Programmed death ligand-1
<b>PGE2</b>	Prostaglandine E2
<b>PLAUR</b>	Plasminogen activator, urokinase receptor
<b>PVR</b>	Poliovirus Receptor
<b>RANTES</b>	Regulated on activation, normal T cell expressed and secreted
<b>RhuIL2</b>	Recombinant human interleukin 2
<b>RT-PCR</b>	Reverse transcriptase-polymerase chain reaction
<b>Serpin-B9</b>	Serine Protease inhibitor
<b>TCR</b>	T Cell receptor
<b>TfR</b>	Transferrine receptor (récepteur de la transferrine)
<b>TGFβ</b>	Transforming growth factor β
<b>Th</b>	Lymphocyte T helper
<b>Th0</b>	Lymphocyte T helper naïve
<b>TLR</b>	Toll-like receptor
<b>TNF-α</b>	Tumor necrosis factor α
<b>TNFR1</b>	Tumor-Necrosis-Factor Receptor 1
<b>TRAIL</b>	TNF-related apoptosis-inducing ligand
<b>Treg</b>	Lymphocytes T régulateur
<b>TSG-6</b>	TNF-α stimulated gene/protein6
<b>Tsg101</b>	Tumor susceptibility gene 101
<b>ULBP</b>	UL-16 binding protein
<b>VCAM</b>	Vascular cell adhesion molecule 1

## LISTE DES FIGURES ET TABLEUX

### FIGURE

- Figure.1** Isolement et différenciation des CSM in vitro déterminés par l'ISCT
- Figure.2** Représentation schématique d'une niche de cellules souche avec ses différents composants cellulaires
- Figure.3** Plasticité d'immunomodulation des CSM
- Figure.4** Immunosuppression médiée par les CSM
- Figure.5** Effet immunomodulateur des CSMs sur les lymphocytes T
- Figure.6** Effet immunomodulateur des CSM sur la cellule dendritique
- Figure.7** Effet immunomodulateur des CSM sur le monocyte/macrophage
- Figure.8** Caractérisation des cellules NK CD3-CD56+ du sang périphérique.
- Figure.9** Cytotoxicité naturelle
- Figure.10** L'interaction entre la CSM et la cellule NK
- Figure.11** Représentation schématique de la sécrétion des microvésicules de différentes origines
- Figure.12** Photos de microscopie électronique des exosomes dans le réticulocyte de mouton au cours de la maturation
- Figure.13** Représentation schématique de la biogenèse et de la sécrétion des exosomes
- Figure.14** Représentation graphique du composant d'un exosome
- Figure.15** Représentation schématique du transport des protéines et des ARN par les exosomes
- Figure.16** Expression des molécules ayant une action immunomodulatrice dans les exosomes
- Figure.17** Modèle de la structure du complexe TGF $\beta$  latent

## **TABLEAU**

**Tableau.1** Caractérisation des CSMs par immunomarquage en cytométrie de flux

**Tableau.2** Les factures solubles secrétés par les CSMs et ses cibles correspondantes

**Tableau.3** Les principales caractéristiques de trois classes d'EVs telles que la taille, l'expression du marqueur et ses contenus

# *Introduction*

## AVANT-PROPOS

L'insuffisance rénale chronique est un enjeu majeur en santé publique car elle touche une part de plus en plus importante de la population. La transplantation rénale est actuellement considérée comme le meilleur traitement de l'insuffisance rénale au stade terminale. La transplantation allogénique est associée à une réaction de rejet, qui amène à la destruction plus ou moins rapide de l'organe transplanté et impose des risques substantiels de morbidité et de mortalité. Cependant, les traitements immunosuppresseurs doivent être donnés à vie aux receveurs pour prévenir le rejet de greffe. Le développement de nouveaux immunosuppresseurs a permis des résultats satisfaisants pour l'acceptation des greffons rénaux. Actuellement, le traitement anti rejet comprend une trithérapie associant des inhibiteurs de la calcineurine (ICN), du mycophénolate mofétil (MMF) et des stéroïdes. Néanmoins les immuno-supresseurs classiques induisent des complications liées à leur effets indésirables y compris la néphrotoxicité (*Casey and Meier-Kriesche, 2011*), l'augmentation du risque de maladies cardiovasculaires (*Stoumpos, et al., 2015*) et le diabète (*Tufton et al., 2014*). Il est ainsi souhaitable d'évaluer de nouvelles thérapies, notamment des thérapies cellulaires, afin de réduire l'utilisation des traitements actuels tout en diminuant le rejet de greffe.

L'intérêt des thérapies cellulaires dans le contexte de la transplantation d'organe réside dans leurs propriétés immuno-modulatrices. Ces cellules pourraient moduler l'équilibre entre les voies effectrices et régulatrices, et ainsi promouvoir le potentiel du système immunitaire de l'hôte à contrôler la réponse immunes des allogreffés (*Wood et al., 2012*).

En particulier, les cellules souches mésenchymateuses (CSM) apparaissent comme une thérapie cellulaire prometteuse en transplantation. Les CSM ont été largement testés au cours des dernières décennies, dans des essais cliniques en raison de leurs multiples fonctions biologiques, y compris de différenciation en multilignée, de réparation tissulaires et leurs propriétés immuno-régulatrices. Cependant, de nombreuses études ont montré que, malgré l'amélioration fonctionnelle des organes greffés après la transplantation de CSM, leur différenciation ultérieure en type cellulaire approprié à l'organe greffé est rare et/ou transitoire (*Katsha et al., 2011*). L'efficacité thérapeutique des cellules souches mésenchymateuses greffées est également dépendante du microenvironnement et donc du site de transplantation.

L'ensemble de ses observations ont suggérées que les CSM exercent leurs effets thérapeutiques principalement au travers des facteurs trophiques sécrétés. De nombres d'études explorent les facteurs biologiques présents dans les milieux conditionnés par des CSM. Ces milieux sont composés d'exosomes et de facteurs solubles, et induisent certaines fonctions biologiques similaires à celles des CSM.

L'utilisation d'exosomes dérivés de CSM pourrait permettre de s'affranchir des inconvénients liés à l'usage direct de CSM (risque biologique, instabilités chromosomiques, accumulation pulmonaire). En effet, les exosomes sont des microvésicules secrétées par toutes les cellules contenant des protéines, des ARN, des lipides et sont impliquées dans la communication intercellulaire. Ils pourraient donc contenir des facteurs immunomodulateurs.

Notre étude consiste à valider l'effet d'exosomes dérivés de CSM *in vitro* sur différents types cellulaires du système immunitaire.



# INTRODUCTION

## I. LES CELLULES SOUCHES

### 1.1. Généralités

Les cellules souche (CS) sont des cellules indifférenciées, qui possèdent des propriétés d'auto-renouveaulement et de différenciation. Ces cellules sont capables d'une part de s'auto-renouveler, c'est-à-dire qu'elle se divise en donnant naissance à des cellules filles identiques à la cellule mère (division symétrique ) pendant une période indéfinie pour maintenir leur population. D'autre part, les CS sont capables de se différencier en d'autres types cellulaires, possédant une morphologie et une fonction qui sont spécifiques du tissu. Cette propriété suit une division cellulaire asymétrique, qui donne naissance à deux cellules filles différentes, l'une identique à la cellule mère et l'autre engagée dans une voie de différenciation spécifique.

Les CS sont plus souvent classées en fonction de leur pouvoir de différenciation:

- *les cellules souches totipotentes*, théoriquement capables de donner naissance à toutes les lignées cellulaires d'un individu y compris les annexes embryonnaires. Ces cellules sont issues des premières divisions du zygote jusqu'au quatrième jour du développement. dont le stade de morula.
- *Les cellules souches pluripotentes* pouvant engendrer toutes les lignées cellulaires sauf les annexes embryonnaires. Elles correspondent aux cellules issues du stade blastocytes jusqu'au stade fœtal.
- *Les cellules souches multipotentes* qui constituent les cellules souches dites fœtales ou adultes, pouvant se différencier en un nombre limité de cellules spécialisées et originaires du même feuillet embryonnaire. Ce sont par exemple les cellules souches hématopoïétiques.
- *Les cellules souches unipotentes* sont des cellules capables de ne se différencier qu'en un seul type cellulaire mais qui gardent leur pouvoir d'auto-renouveaulement.

Cependant, les CS peuvent également être classés en fonction de leur origine. Il existe trois types de CS :

- *les cellules souches embryonnaires (ES)*, qui sont issues de la masse interne du “blastocyste”, une structure de 16-40 cellules issues des divisions de l’ovocyte fécondé. Implanté dans l’utérus, le blastocyste entier peut se développer en un fœtus viable. Au stade de blastocyste (5ème jour de développement), chacune des cellules de sa masse interne est pluripotente, voire totipotente puisqu’elle peut donner tous les feuilletts embryonnaires (mésoderme, endoderme, ectoderme) et les tissus qui en dérivent. Une fois le blastocyste dissocié, les cellules embryonnaires perdent la possibilité de se développer ultérieurement en un embryon. Cependant, elles peuvent être *cultivées in vitro* à l’infini tout en conservant leur caractère de “pluripotence” et gardent un génome intact. Il est donc possible d’obtenir des millions de cellules embryonnaires pluripotentes à partir d’un petit nombre de cellules embryonnaires de blastocyste. Placées dans des conditions de culture précises, ces cellules ont également la capacité de se différencier en une variété de cellules matures spécialisées correspondant à tous les tissus de l’organisme (le sang, le muscle, le cartilage, les neurones,....)
- *les cellules souches fœtales* sont des cellules multipotentes, qui sont issues de tissus fœtaux à un stade beaucoup plus tardif (5 à 9 semaines) que le stade de blastocyste embryonnaire. Elles sont généralement issues d’une interruption volontaire de grossesse et sont déjà en partie déterminées et spécifiques du tissu. Ces cellules ont plusieurs avantages : un meilleur adressage après leur greffe, une plus grande multipotentialité et une plus faible immuno-génicité comparées aux cellules souches adultes. De plus, leur utilisation est moins controversée du point de vue éthique que les ES (*O’Donoghue and Fisk, 2004*).
- *les cellules souches des tissus adultes*, sont présentes dans plusieurs tissus et sont, pour la plupart, déjà engagées dans un programme tissulaire spécifique, ce qui explique leur hétérogénéité. Même si certaines d’entre elles peuvent conduire à la formation ou à la régénération de tissus distincts (multipotence), elles ne sont pas comme leurs homologues embryonnaires, totipotentes. Chez l’adulte, ces cellules servent à réparer les tissus lésés, malades, ou simplement vieillissants.

Depuis 2006, une nouvelle catégorie de CS a été identifiée, ce sont les ***induced Pluripotent Stem Cells (iPS)***. Les iPS sont des cellules souches issues de la reprogrammation par manipulation génétique de cellules différenciées. L’introduction de facteurs de transcription identifiés dans les CS embryonnaires, Oct3/4, Sox2, KLF4, et c-Myc, dans des cellules différenciées induit une dédifférenciation de celles-ci leur conférant ainsi des propriétés de

pluripotence. Cette découverte par *Yamanaka* et son équipe en 2006 permet de contourner les limites inhérentes à l'utilisation des CS embryonnaires en clinique (éthique, risque de rejet) et a valu à leur auteur le prix Nobel de médecine en 2012 (*Takahashi and Yamanaka, 2006*).

## **I.2 La cellule souche mésenchymateuse (CSM).**

### **I.2.1 Généralité**

En 1960, *Alexander Friedenstein*, décrit pour la première fois, l'existence des cellules immatures issues de la moelle osseuse de rongeurs, et capables de développer, après implantation sous la capsule rénale du tissu fibreux et de l'os en plus de la moelle osseuse. Il remarqua également la formation d'une colonie cellulaire de morphologie fibroblastique adhérente au plastique à partir de cellules stromales de la moelle osseuse de rongeurs. Ainsi il a été mis en évidence que ce type cellulaire est capable de former des colonies *in vitro*, nommées Colony-Forming Unit-Fibroblasts (CFU-F) (*Friedenstein et al., 1970*). Les capacités d'autorenouvellement et de différenciation caractéristiques de ces cellules ont été montrées, plus tard, par l'équipe d'*Owen* (*Owen and Friedenstein, 1988*). En 1991, l'équipe de *Caplan* a introduit le nom de cellules souches mésenchymateuses (CSM) pour caractériser cette population de cellules à l'origine notamment du stroma médullaire, de l'os, du cartilage et des fibroblastes (*Caplan, 1991*). Par la suite, la capacité d'autorenouvellement des CSM a été démontrée lors d'une étude décrivant leur division pendant plusieurs générations sans changement de morphologie ni perte de leur pouvoir de différenciation (*Bruder et al., 1997*). La démonstration *in vivo* de leurs capacités d'autorenouvellement arrivera beaucoup plus tard, en 2007, avec le travail de l'équipe de *P. Bianco* (*Sacchetti et al., 2007*). En 1999, l'équipe de *Pittenger* avait rapporté la possible multipotence des CSM, ces cellules sont capables de se différencier en cellules mésodermiques *in vitro*, plus précisément en chondroblastes, ostéoblastes, et adipocytes ou fibroblastes, toutes ces cellules appartenant à la voie mésodermique (*Pittenger et al., 1999*). En outre, les CSM peuvent donner naissance à des cellules matures provenant des trois feuilletts embryonnaires avec l'ajout de facteurs spécifiques *in vitro* ou d'agents déméthylants de l'ADN. Ainsi des cellules spécialisées du feuillet ectodermique (*Qian et al., 2008*), neuroectodermique (*Khoo et al., 2008*), et endodermique (*Campard et al., 2008*) peuvent être obtenues. L'ensemble de ces travaux ont permis l'identification, parmi la population des CFU-F, de cellules possédant des propriétés

biologiques de cellules souches. Bien que, l'origine des CSM ont été longtemps considérée comme mésodermique, il a été cependant montré qu'au niveau embryonnaire, elles dérivait de différentes sources embryonnaires et notamment du neuroépithélium de la crête neurale. Ces CSM seraient particulièrement impliquées dans l'établissement des niches médullaires de cellules souches hématopoïétiques (CSH).

La proportion de CSM parmi l'ensemble des cellules nucléées est estimée, au niveau de la moelle osseuse, à 0,01 à 0,0001 % (*Roberts 2004*). Leur quantité est encore plus faible dans le sang de cordon et le sang périphérique. Cette faible proportion nécessite leur expansion *in vitro* avant toute utilisation clinique. De nombreux travaux ont étudié le phénotype membranaire des cellules obtenues à confluence et au cours de passages suivants. Ces études ont clairement montré que les cellules adhérentes constituaient une population de cellules mésenchymateuses distincte des populations hématopoïétiques ou endothéliales. Plus de 50 protéines de membrane caractérisent les CSM cultivées dans les conditions standardisées établies par les équipes du projet européen Genostem (*Charbord et al., 2011; Delorme et al., 2008*)

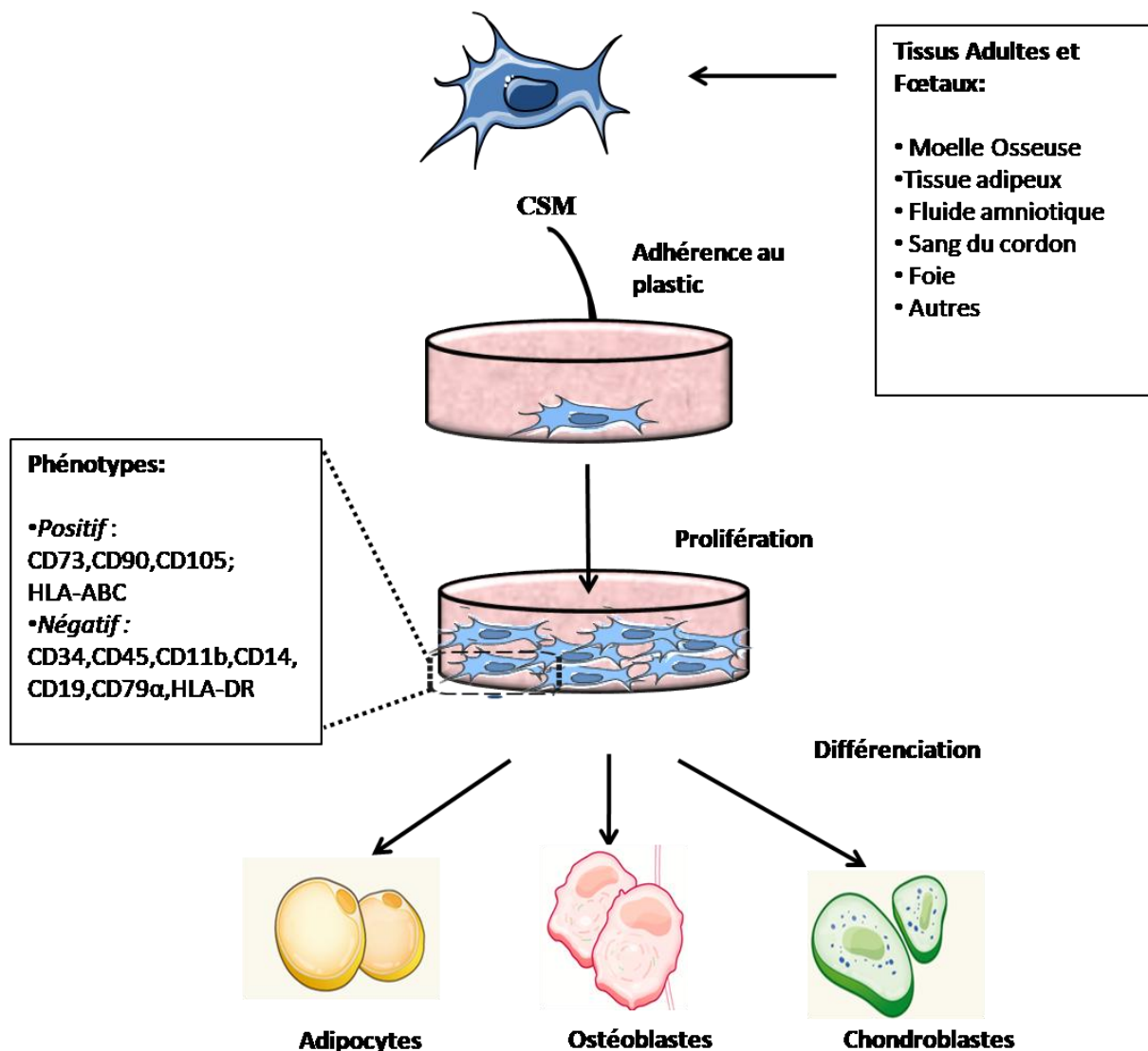
### **I.2.2. Phénotype et Caractéristion des CSM**

Les CSM sont des cellules d'apparence fibroblastique qui présentent de nombreux antigènes de surface. La caractérisation précise des CSM n'est pourtant pas évidente puisque, à l'heure actuelle, aucun marqueur spécifique n'a pu être identifié. De plus, il existe une variabilité d'expression de certains marqueurs en fonction de l'origine tissulaire des CSM.

En 2006, l'International Society for Cellular Therapy (ISCT) (*Dominici et al., 2006*) a proposé des standards de caractérisation des CSM (**Figure.1**), qui comprennent:

- Capacité d'adhérence cellulaire au plastique *in vitro* dans des conditions de culture standards.
- Un phénotype cellulaire défini par cytométrie en flux en utilisant un panel d'antigènes de surface dont l'expression est positive et un panel d'antigènes dont l'expression est négative (**Tableau 1**)
- Un potentiel de différenciation multipotent *in vitro* dans des conditions standards vers les trois voies mésenchymateuses : ostéoblastes, chondroblastes et adipocytes

Les cellules souches n'étant pas différenciées, elles sont généralement dépourvues de marqueurs spécifiques. Donc aucun de ces marqueurs ne peut être considéré individuellement comme spécifique des CSM. L'ensemble des marqueurs n'est pas été suffisant pour définir la population en l'absence des critères fonctionnels de différenciation en précurseurs adipocytaires, ostéogéniques et chondrogéniques (*Charbord and Casteilla, 2011*)



**Figure 1. Isolement et différenciation des CSM *in vitro* déterminés par l'ISCT.**

*Des CSM ont été isolées par leur capacité d'adhérence au plastic de plusieurs tissus adultes et foetaux. Dans la condition standard, ces cellules présentent lors de l'expansion in vitro une morphologie fibroblastique. Les marqueurs phénotypiques les plus courants sont CD105, CD73, CD90. Il n'y a pas de marqueurs de lignages hématopoïétiques ni d'HLA de classe II.*

*In vitro*, les CSM sont multipotentes et peuvent se différencier en adipocytes, ostéoblastes et chondroblastes.

Près d'une décennie plus tard, les critères de l'ISCT ne sont pas entièrement résolus du fait de la complexité et l'hétérogénéité des préparations de CSM. Notre compréhension de la fonction des différentes sous populations et leur contribution à l'homéostasie tissulaire et à la régénération *in vivo* reste limitée. La mise au point de définitions reposant sur les caractéristiques des CMSs *in vitro* n'a malheureusement pas aidé à résoudre les caractéristiques de ces cellules *in vivo*, puisqu'il existe des preuves d'une différence de marqueur d'expression génique globale entre les cellules fraîchement isolées ou cultivées (Harichandan et al., 2013)

### **Phénotype:**

#### **Expression d'antigènes de surface spécifiques**

Ag présents à la surface des CSM ( $\geq 95\%$ )	Ag absents de la surface de CSM ( $\leq 2\%$ )
CD73+ (SH3/4, ecto5' nucléotidase)	CD19- (lymphocytes B)
CD90+ (Thy-1)	CD34- (progeniteurs hematopoietiques/cellules endotheliales)
CD105+ (endoglin, SH2)	CD45- (marqueur leucocytaire)
	CD79 $\alpha$ - (lymphocytes B)
	HLA-D – ( en l'absence de stimulation par l'interféron $\gamma$ )
	CD11b- or CD14 – (monocytes et macrophages)

**Tableaux 1 : Caractérisation des CSM par immunomarquage en cytométrie en flux d'après Dominici et al. 2006**

### **I.2.3. Localisation et sources tissulaire des CSM**

Après la découverte initiale des CSM dans la moelle osseuse, la moelle osseuse fut considérée comme la source la plus sûre et la plus accessible de CSM. Cependant, d'autres CSM ayant des caractéristiques biologiques similaires ont été isolées à partir d'une grande variété d'autres tissus fœtales ou adultes : le tissu adipeux (*Zuk et al., 2001*), le liquide amniotique (*Anker et al., 2003*), le placenta (*Sabapathy et al., 2012*), la veine et les artères du cordon ombilical (*Erices et al., 2000; Capelli et al., 2011*), la gelée de Wharton du cordon (*Wang et al., 2004*), le sang périphérique (*Chong et al., 2012*), le cartilage (*Alsalameh et al., 2004*), la pulpe dentaire (*Gronthos, 2011*), le foie (*Campagnoli et al., 2001; Najimi et al., 2007*), le cerveau (*Kang et al., 2010*), le poumon (*Lama et al., 2007*).

Cette large distribution dans les différentes parties de l'organisme a mis en évidence un rôle potentiel des CSM dans la réparation des tissus et la régénération tout au long de la vie de l'individu.

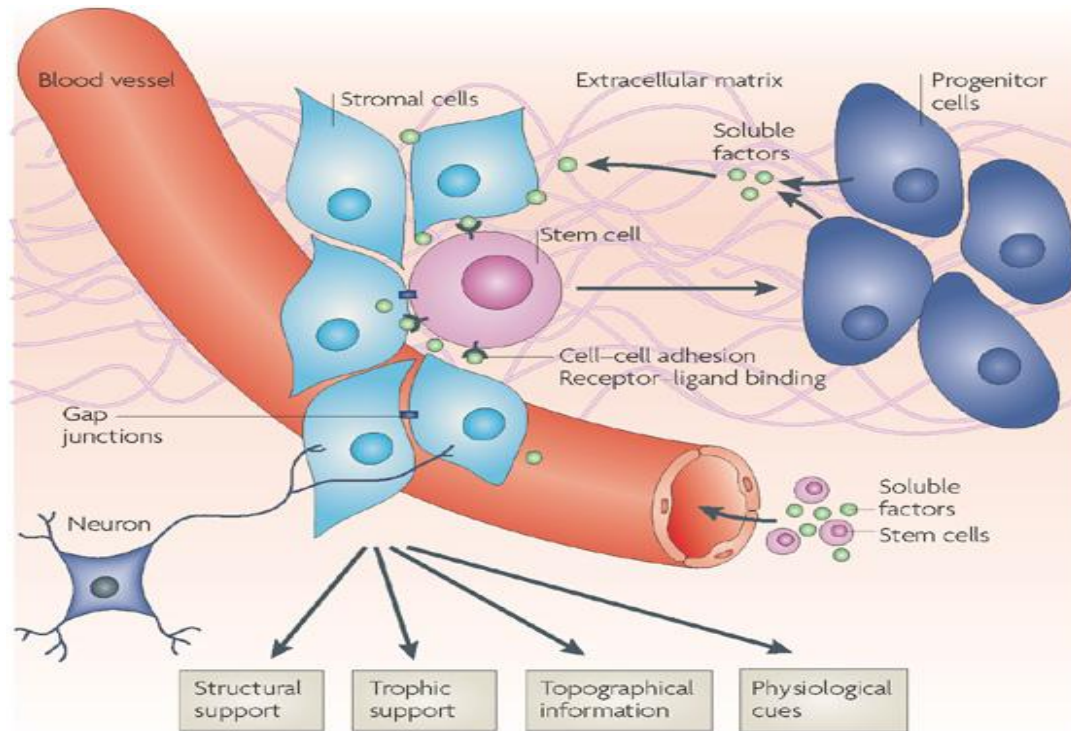
### **I.2.4. Rôles physiologiques des CSM**

Bien que l'étude des CSM se soit beaucoup accrue au cours de la dernière décennie (**Figure 2**), la fonction de CSM *in vivo* reste mal définie. Les CSM exercent des fonctions spécifiques dépendantes du tissu d'origine et du contexte physiologique dans lequel elles se trouvent.

#### **I.2.4.1. Rôle dans la niche hématopoïétique :**

Le système immunitaire dérive de CSH de la moelle. Les CSH reconstituent des centaines de milliards de cellules sanguines par jour tout en se maintenant pendant des décennies à travers un ensemble des processus intrinsèques et extrinsèques (*Ding et al., 2012*). Il a été proposé que les cellules souches hématopoïétiques résident dans un microenvironnement confiné et distinct appelé niche (*Morrison and Scadden, 2014*). Ces niches contrôleraient la différenciation, l'apoptose ou encore l'expansion des cellules souches tissulaires. Elles comprennent les cellules souches et les cellules stromales qui communiquent entre elles par interactions directes ou par l'intermédiaire des facteurs solubles. Ces niches sont également vascularisées afin d'apporter les facteurs systémiques et de permettre la migration des cellules souches. Enfin, des neurones ont été identifiés au sein des niches de cellules souches participant à la régulation de leur mobilisation (*Jones and Wagers, 2008*).

Dans la moelle, les CSM semblent présenter un rôle prédominant. En effet, elles ont été identifiées comme une composante majoritaire des niches de CSH de médullaires recevant les afférences des nerfs adrénériques (*Katayama et al., 2006; Méndez-Ferrer et al., 2010*) et participant à la fois au contrôle de la différenciation des CSH (*Schürch et al., 2014*) et au recrutement des cellules hématopoïétiques matures (*Shi and Pamer, 2011*)



**Figure 2. Représentation schématique d'une niche de cellules souches avec ses différents composants cellulaires** La niche est une structure complexe et dynamique qui transmet et reçoit des signaux à travers des médiateurs cellulaires et acellulaires. Ce schéma représente une structure de niche hypothétique, qui résume les composants connus des niches de mammifères précédemment décrites: la cellule souche elle-même, les cellules stromales, les facteurs solubles, la matrice extracellulaire, l'innervation, le réseau vasculaire et les composants d'adhésion cellulaire. Il est important de noter que bien que de nombreux composants de niche soient conservés, il est peu probable que chaque niche inclut nécessairement tous les composants répertoriés. Leur composition et leur structure va varier en relation avec leur fonction tissulaire. (*Jones and Wagers, 2008*).

La différenciation des CSM en ostéoblastes dans une fonction de maintien de l'homeostasie osseuse a été rapidement décrite, *in vitro* (*Taichman et al., 2001, 1997*). Des expériences *ex vivo* montrent que des CSM favorisent la survie et la prolifération des CSH en culture mixte (*Dexter et al., 1977*). Plus tard, d'autres études *in vivo* ont démontré que des ostéoblastes dérivés des CSM contribuent à la régulation des cellules hématopoïétiques primitives (*Calvi et al., 2003; Zhang et al., 2003*). Les ostéoblastes sont la première population mésenchymateuse décrite dans les niches chez les mammifères adultes. Elles tapissent la surface de l'os à la



surface endostéale et sont une composante cruciale de la niche en jouant un rôle de régulateur lors de nombreuses étapes du développement hématopoïétique (*Garrett and Emerson, 2009*). Ils expriment des ligands membranaires, des récepteurs d'adhésion et des cytokines qui contribuent au maintien et à la régulation des CSH dans la niche. D'autre part, les CSH sont retrouvées dans des régions adjacentes aux vaisseaux sanguins sinusoidales dans la moelle osseuse. Ces cellules sont à proximité d'une sous-population de CSM Nestin<sup>+</sup> et des cellules CAR (*CXCL12-abundant reticular*), qui expriment des facteurs régulateurs de CSH (*Méndez-Ferrer et al., 2010; Sugiyama et al., 2006*). Et la déplétion sélective par des anticorps antiNestin<sup>+</sup> des CSM ou des cellules CAR ont un impact direct sur le nombre de CSH et leur homéostasie (*Méndez-Ferrer et al., 2010*). Récemment, des études de *Isern* et ses collègues ont montré que les CSM médullaires impliquées dans le renouvellement tissulaire et les CSM jouant un rôle dans la régulation des niches des CSH n'avaient pas les mêmes origines embryonnaires. En effet, les CSM Nestin<sup>+</sup> originaires du neuroépithélium de la crête neurale, au travers de la synthèse de CXCL12, sont indispensables pour assurer la migration des CSH du foie vers la moelle osseuse à la naissance et ainsi pour constituer les niche médullaires de CSH, tandis que les CSM Nestin<sup>-</sup> issus du feuillet mésodermiques semblent avoir un rôle de progéniteurs des tissus osseux et articulaires (*Isern et al., 2014*). Des études ultérieures sur la compréhension des systèmes de régulation de l'ensemble des mécanismes complexes lors de l'hématopoïèse sont en cours. L'identification des sous-populations des CSM de différentes origines et leur rôle dans la régulation de l'hématopoïèse constitue un enjeu pour le développement clinique

#### **I.2.4.2. Rôle dans la régénération tissulaire.**

Chez le mammifère adulte, un traumatisme sévère provoque la mise en place d'un processus de réparation spontanée qui, le plus souvent, ne permet pas le maintien de l'intégrité tissulaire. La transplantation *in vivo* de CSM dans ces situations a mis en évidence leurs propriétés de réparation. Plusieurs propriétés des CSM ont démontré *in vitro* et *in vivo*, appartement des nouvelles clés à la médecine régénérative et l'ingénierie tissulaire:

- *Homing* :

Les CSM ont la capacité de migrer jusqu'au site de la lésion ou au niveau d'un foyer inflammatoire et de stimuler localement la prolifération et la différenciation des cellules progénitrices grâce à leurs capacités chimiotactiques (*Devine et al., 2003*).

- *Différentiation :*

Les CSM sont des cellules souches multipotentes puisqu'elles ont la capacité de se différencier dans certaines conditions en plusieurs tissus mésenchymateux incluant: l'os, le cartilage, le tendon, le muscle, le tissu adipeux. Elles sont donc considérées comme des progéniteurs des tissus dérivant majoritairement du mésoderme.

- *Plasticité :*

Les CSM sont capables de se transdifférencier, ce qui leur confère une plasticité importante ainsi qu'une grande flexibilité. De plus, elles pourraient également se différencier en des cellules d'origine non mésodermiques telles que les hépatocytes, des cellules neurales et des cellules épithéliales (*Wang et al., 2011*).

- *Activité paracrine :*

Lors de l'injection de CSM, la proportion de CSM qui se différencient au niveau du tissu lésé est trop faible pour expliquer leurs capacités de réparation de la lésion. Des travaux récents de thérapie cellulaire utilisant les CSM indiquent que les effets bénéfiques observés, suite à la greffe de ces cellules, sont principalement due à leur activité paracrine. Les CSM produisent un large panel de molécules telles que des cytokines, des chimiokines et des facteurs de croissance conférant des propriétés intéressantes dans l'homéostasie et la réparation tissulaire (*Wang et al., 2011*).

#### **I.2.4. Rôle sur l'immunité**

Les CSM interagissent de manière étroite avec les cellules de l'immunité innée et adaptative au travers d'interactions directes et indirectes, et sont décrites comme ayant un rôle de modulateur de certaine fonction des cellules immunitaires. L'interaction des CSM avec les cellules immunitaires sera abordée dans la Chapitre II.

### **I.2.5. L'application thérapeutique : essais cliniques.**

Les CSM sont de bonnes candidates dans le cas de thérapies cellulaires car elles présentent l'avantage d'être facilement isolables à partir d'une grande variété de tissus, mais également à cause de leur prolifération importante et rapide.

La consultation de la base de données officielle de l'institut national de la santé des Etat Unis le 18 janvier 2016 montre plus de 578 essais cliniques utilisant des cellules souches mésenchymateuses pour diverses applications thérapeutiques. La majorité de ces études sont en phase I (27.6%) et II (21.6%), ou en phase I/II (41.9%). Ces essais sont réalisés afin d'évaluer le potentiel biomédical des CSM dans la réparation de l'os, du cartilage et pour le traitement des pathologies cardiovasculaires, des maladies hépatiques, rénales, ou pulmonaires, ainsi que sur des pathologies à composante immune telle que la maladie du greffon contre l'hôte (GVHD) et des maladies auto-immunes (*Chen et al., 2016*).

## II. IMMUNOMODULATION PAR LA CSM

### II.1 Généralités

Le thème immunomodulation est défini comme la manipulation du système immunitaire, soit par l'amélioration (stratégie immunopotentialisation), soit par la suppression (stratégie d'immunosuppression) des réponses immunitaires. L'immunomodulation peut être réalisée par différents agents, appelés immunomodulateurs, y compris des anticorps monoclonaux, des cytokines, des glucocorticoïdes, des adjuvants, de la lumière ultraviolette, ou la photothérapie (*Dhama et al., 2015*). Diverses stratégies d'immunomodulation sont aujourd'hui évalué comme traitement ou dans le but de remplacé les traitements existant.

L'immunomodulation est l'une des propriétés la plus décrite des CSM. Ces cellules peuvent interagir avec les cellules de l'immunité innée et adaptative. Les CSM ont été naturellement considérées comme des candidates intéressantes dans le traitement des désordres immunitaires. Ces effets immunorégulateurs ont été largement décrits *in vitro* et *in vivo*. En 1984, *Ilstad* et *Sachs* décrivent un délai du rejet d'allogreffe par des souris irradiées puis reconstituées avec des cellules de moelle osseuse du donneur, ces cellules étant déplétées en lymphocytes T. Le rejet d'une greffe d'un donneur tierce n'étant, au contraire, pas rejeté (*Ildstad and Sachs, 1984*). Par la suite les travaux de *Bartholomew* et ses collègues ont montrés que les CSM, suppriment la prolifération *in vitro* des lymphocytes T qu'ils soient activés dans des réactions lymphocytaires mixtes (MLR), ou stimulées par des activateurs polyclonaux, *in vivo*. Egalement, les CSM peuvent prolonger la survie de greffe de la peau chez des babouins (*Bartholomew et al., 2002*). Depuis ces premiers résultats, de nombres études ont démontrées que les CSM affectent la fonction de différents types de cellules immunitaires effectrices. En 2005, *Glennie* et al, ont montré que des CSM murines pourraient inhiber la prolifération de lymphocyte B *in vitro* (*Glennie et al., 2005*). Il a été également démontré que les CSM interfèrent avec la différenciation, la maturation et les fonctions des cellules dendritiques (DC) (*Beyth et al., 2005; Zhang et al., 2004*). Plus tard, il a été démontré que les CSM inhibent l'activation et la prolifération des cellules NK (Nature killer) (*Sotiropoulou et al., 2006; Spaggiari et al., 2006*). La découverte des capacités d'immunomodulation des CSM sur des différentes cellules immunitaires a soulevé d'importance possible médicale. A présent, des études précliniques et cliniques en tant que traitement potentiel pour le traitement de maladies auto-immunes et la modulation des

réponses inflammatoires sont nombreuses (*Figuroa et al. 2012; Kim and Cho 2013; Sánchez-Berná, Santiago-Díaz, and Jiménez-Alonso 2015; Zhao, Ren, and Han 2016*).

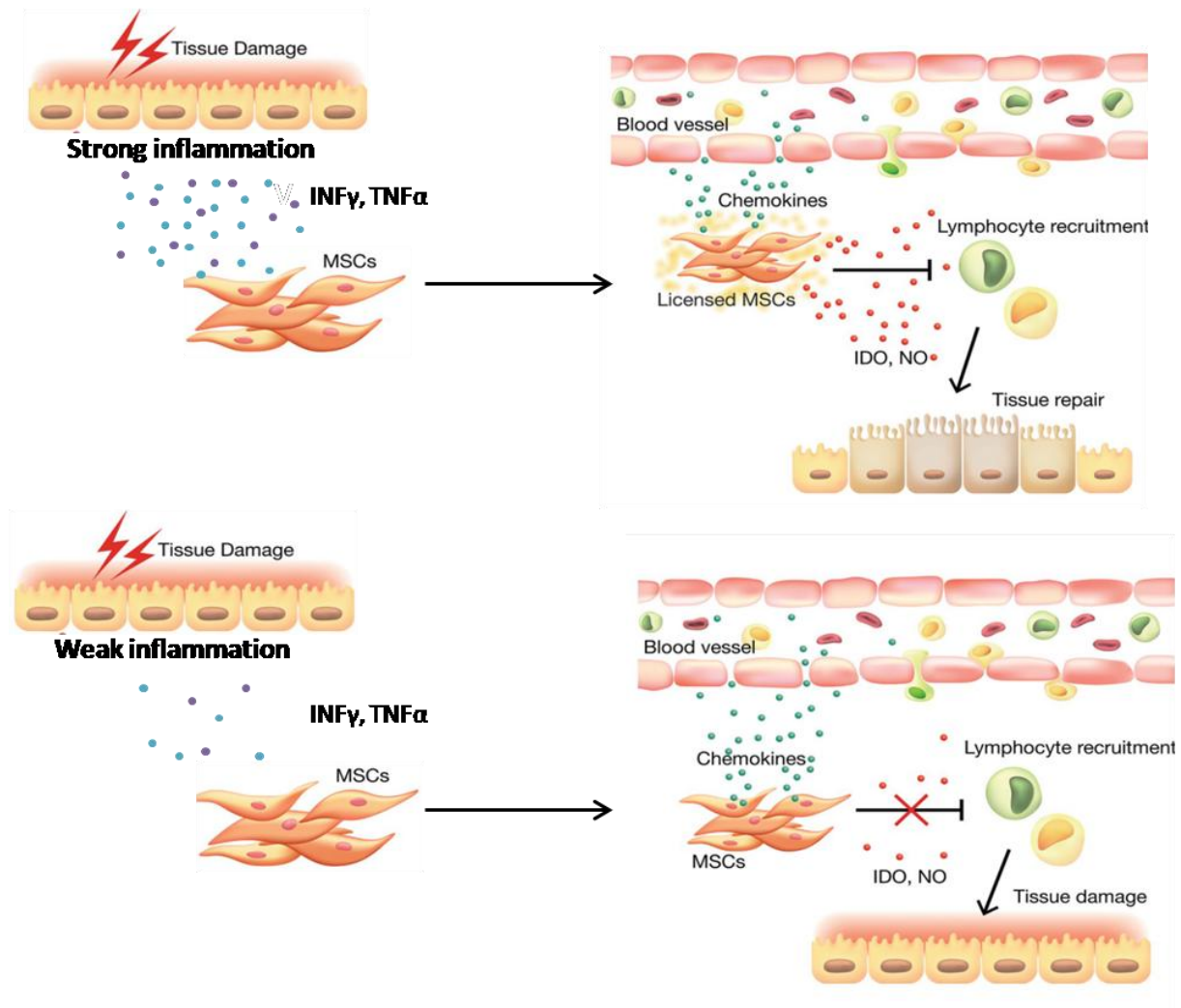
### **II.1.1. Profil immunologique des CSM (Immunogénicité)**

L'intérêt de thérapie cellulaire à l'aide de CSM est non seulement dû à leur capacité immunomodulatrice puissante et mais est aussi dû à leur capacité de réparation. De plus pour être utilisées les CSM doivent être phénotypiquement acceptables par le receveur en complément de leurs fonctions immunorégulatrices. Bien que les CSM autologues soient le plus couramment utilisées pour les essais cliniques, leur capacité immunomodulatrice décline avec l'âge (*Charron, 2013*). De plus la production des cellules GMP (*Good Manufacturing Practices*) industrielle coûte très chère. Par conséquent, l'utilisation de CSM allogéniques devient le plus répandue provenant des jeunes individus sains. *In vitro*, un système de co-culture montre que les CSM autologues et allogéniques présentent le même potentiel immunomodulateur, ce qui indique que ces effets sont indépendants des complexes majeurs d'histocompatibilité (CMH) (*Le Blanc et al., 2003*). Bien que les CSM soient isolées à partir de différents tissus et présentent une diversité des profils d'expression de marqueurs endothéliaux et stromaux, toutes les CSM expriment faiblement certains antigènes de surface, dont les molécules de CMH de classe I et les molécules de co-stimulation (CD40, CD80 et CD86) ainsi qu'une absence d'expression des molécules de CMH de classe II (*Najar et al., 2012*). L'ensemble de ces profils permet aux CSM n'être pas reconnues comme alloantigènes par le système immunitaire de receveurs et se soustraire au rejet, contribuant ainsi à leur hypo-immunogénicité.

### **II.1.2. Plasticité d'immunomodulation**

Les CSM peuvent détecter activement le microenvironnement inflammatoire autour d'elles, et puis moduler la fonction des différentes cellules immunitaires au sein de l'hôte (**Figure 3**) (*Bernardo and Fibbe, 2013*). La capacité immunomodulatrice des CSM dépend des types et des concentrations des médiateurs inflammatoires présents dans le microenvironnement. En fait, différents états inflammatoire peuvent influencer le phénotype et le comportement des CSM, ce qui suggère leur capacité d'adaptation pour assurer l'immunomodulation. Pendant la phase

aiguë de l'inflammation, la propriété de régulation de la réaction immunitaire par les CSM est potentialisée par l'exposition à différentes cytokines pro-inflammatoires à forte concentration telle que le TNF- $\alpha$ , INF- $\gamma$  ou l'IL-1 $\alpha$  ou l'IL-1 $\beta$ . Les CSM adoptent un phénotype immunosuppresseur. L'INF- $\gamma$  semble être le facteur majeur qui renforce l'activité immunomodulatrice des CSM en stimulant notamment la production des certains facteurs inhibiteurs (par exemple : IDO, PGE2 chez l'homme et NO chez le souris) et diverses chimiokines (par exemple CXCL-9, CXCL-10) (*Li et al., 2012a*). Par contre, lorsque l'inflammation est faible (inflammation chronique) les CSM se polarisent vers un phénotype pro-inflammatoire. La faible concentration des cytokines pro-inflammatoires est suffisante pour induire une augmentation de la production des chimiokines mais n'est pas suffisante pour induire une expression substantielle des facteurs inhibiteurs. Dans ce contexte, les CSM sont capables de recruter des lymphocytes autour d'elles mais sans action immunosuppressive sur la fonction lymphocytaire, conduisant à une inflammation plus importante. (*Renner et al., 2009*). De plus, certaines études ont trouvé qu'avec une faible dose d'INF- $\gamma$ , les CSM agissaient comme des cellules présentatrices d'antigène (CPA) et pouvaient donc activer les cellules T (*Chan et al., 2006; François et al., 2009*).



**Figure 3** *Plasticité d'immunomodulation des CSM modifié d'après Kim and Cho, 2016.* Sur un site de lésion tissulaire, en réponse aux stimuli pro-inflammatoires, tels que la sécrétion des cytokines pro-inflammatoires à un niveau élevé par les effecteurs de l'immunité innée, comme l' $INF\gamma$  et le  $TNF\alpha$ , les CSM se polarisent pour acquérir un phénotype immunosupresseur. Les CSM immunosuppressives produisent des chimiokines qui attirent les lymphocytes sur le site de la lésion, et des molécules immunosuppressives tels que l'IDO et le NO. Ces dernières suppriment les fonctions effectrices des lymphocytes recrutés. En conséquence, la réponse immunitaire est atténuée et la réparation des tissus est induite. Cependant, lorsque l'inflammation est faible ou absente, la concentration d' $INF\gamma$  et de  $TNF\alpha$  est modérée. La production de chimiokines par les CSM est maintenue et recrute des lymphocytes sur le site inflammatoire, mais la production d'IDO et de NO par les CSM est insuffisante pour contrôler les fonctions lymphocytaire (Kim and Cho, 2016).

La notion que les CSM peuvent être éduquées (*licensing*) par des stimuli inflammatoires, soulève la possibilité de contrôler la fonction des CSM *in vivo* dans différentes pathologies. Aussi cette éducation des cellules *ex vivo* par des cytokines pro-inflammatoires, en augmentant l'effet immunosuppresseur des CSM a été suggérée pour améliorer leur efficacité clinique (*Marigo and Dazzi 2011*).

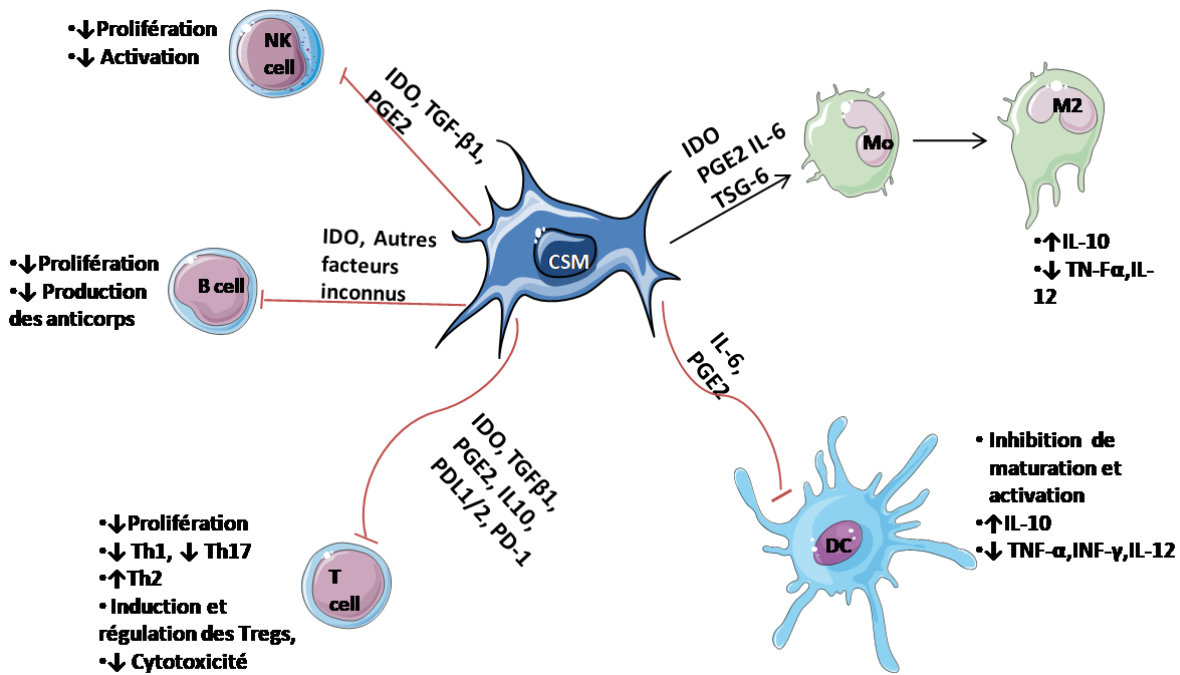
### II.1.3.Mécanismes (mode d'action)

Bien que les CSM soient connues pour leur capacité à moduler la réponse immune en interagissant avec des cellules de l'immunité innée et adaptative, les mécanismes exacts impliqués dans ces effets des CSM, ne sont pas encore clarifiés. Des études publiées ont montré que ces effets immunomodulateurs étaient liés à des interactions avec diverses cellules immunitaires par l'intermédiaire de mécanismes différents et complexes faisant intervenir des mécanismes contact dépendent ou des facteurs secrétés (*Fayyad-Kazan et al., 2016*)

- Activité paracrine : ces cellules sécrètent des substances biologiquement actives, dépendent des microenvironnements (des facteurs de croissance, des cytokines et de chimiokines).
- Contact cellulaire : qui implique une interaction physique entre des différents antigènes membranaires des CSM avec leurs cibles respectives exprimées sur des cellules immunitaires.

En ce sens, les CSM ne peuvent pas être définies comme des cellules immunitaires mais plutôt comme des coordinateurs du système immunitaire (*Hoogduijn, 2015*). De nombreux facteurs et des cytokines ont été signalés comme pouvant prendre part à ces effets régulateurs des CSM, impliquant des voies divergentes. Un grand nombre d'études se focalisent sur le rôle paracrine, suggérant que des facteurs secrétés sont les médiateurs principaux impliqués dans l'immunomodulation des CSM. A l'inverse, certaines études aussi suggèrent que le contact cellulaire est plus important (*Jiang et al., 2005; Krampera et al., 2003*). Plus tard, d'autres acteurs ont indiqué que l'immunosuppression médiée par les CSM combine contact cellulaire et facteurs solubles (*English et al., 2009a*).





**Figure 4 : Immunosuppression médiée par le CSM : modifié d'après Qui ?** Les CSM influencent le fonctionnement de nombreuses cellules immunitaires. Elle peuvent supprimer la prolifération des lymphocytes T auxiliaires (Th) et cytotoxiques. En outre, la différenciation en Th2 et lymphocytes T régulateurs (Treg) est déclenchée, ce qui entraîne un environnement anti-inflammatoire. Les CSM inhibent la maturation des cellules dendritiques (DC). Les monocytes sont aussi ciblés par les CSM pour se différencier en phénotype M2 qui est un phénotype anti-inflammatoire. Ainsi, la prolifération et la fonction effectrice des lymphocytes B et cellules NK (nature killer cell) sont également inhibées par les CSM (Gazdic et al., 2015).

Dans le système immunitaire, les cellules immunitaires et non immunitaires sont étroitement liées ensemble et forment un réseau complexe de communication cellulaire permettant l'organisation de la réponse immunitaire vis-à-vis de stimuli extérieurs. Ainsi, la complicité de l'interaction des CSM et diverses cellules immunitaires est souvent la résultante d'une combinaison de ces deux mécanismes. De nombreuses recherches sont en cours pour mieux comprendre les mécanismes immunomodulateurs des CSM pour améliorer leur efficacité clinique.

## **II.2. Immunomodulation des cellules du système immunitaire adaptatif.**

Les cellules de l'immunité adaptative sont les principales cellules médiatrices de maladies auto-immunes telles que le diabète de type I ou la sclérose en plaque. Elles sont également impliquées lors de réaction du greffe contre l'hôte (GVHD) ou du rejet d'allogreffe. Ainsi l'inhibition de l'activation, de la prolifération et de l'activité de ces cellules par le CSM a été explorée au cours des 20 dernières années.

### **II.2.1. Lymphocytes T**

#### **II.2.1.1. Généralité**

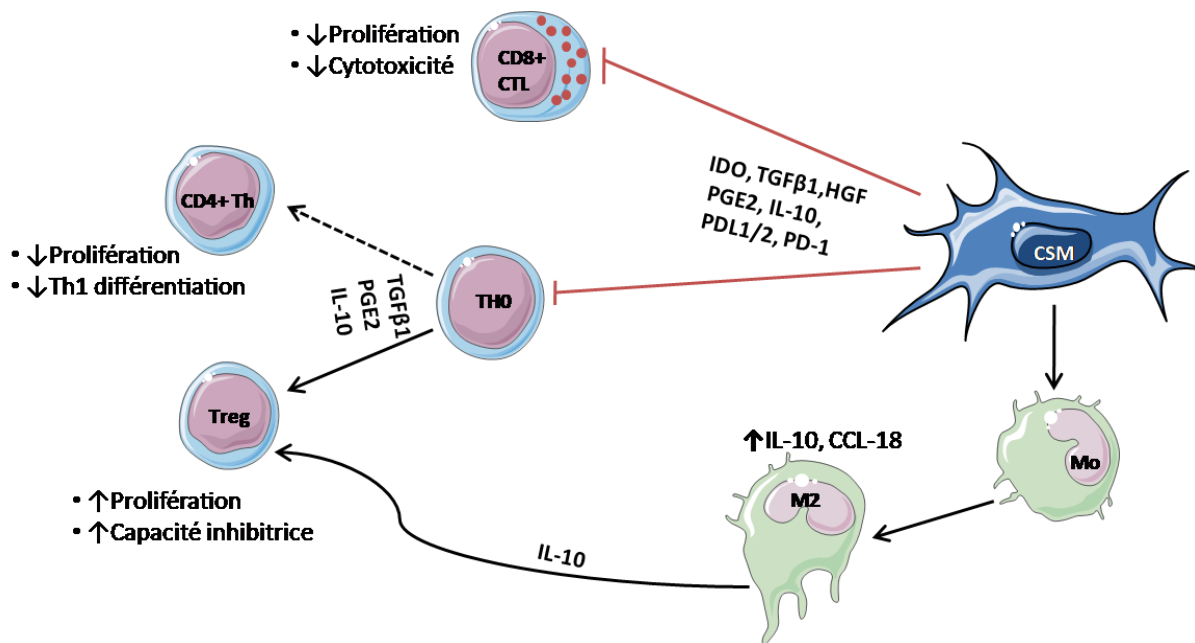
L'activation des lymphocytes T induit des fonctions effectrices diverses, qui sont des médiateurs primaires de nombreuses maladies auto-immunes, inflammatoires ainsi que du rejet de greffe et de la maladie du greffon contre l'hôte.

L'activation spécifique d'antigène et la différenciation des lymphocytes T naïf entraînent la génération de phénotypes variés de lymphocytes T qui peut être définie par l'acquisition de profils caractéristiques de sécrétion de cytokines, de mécanismes cytotoxiques ou de propriétés régulatrices (*Kaeck et al., 2002*). A la suite des réponses immunitaires adaptatives spécifiques de l'antigène, une petite proportion de lymphocytes T activés persiste en tant que cellules mémoires. Elles ont la capacité de répondre plus rapidement et plus puissamment à des rencontres secondaires avec le même antigène. Ces cellules mémoires peuvent conserver le phénotype effecteur induit lors de l'activation primaire. Lorsque ces cellules mémoires sont correctement coordonnées et régulées, la diversité des phénotypes effecteurs des lymphocytes T permet une protection immunitaire contre une multitude de pathogènes, tout en maintenant l'auto-tolérance et l'homéostasie (*Wan and Flavell, 2009*). Les réponses pro-inflammatoires excessives des lymphocytes T peuvent conduire à des maladies auto-immunes par exemple comme la sclérose en plaques ou des allergies, la maladie de Crohn ou la recto colite hémorragique, le diabète de type 1 et l'asthme (*Bai et al., 2009; González et al., 2009; Karlsson et al., 2008*). En outre, lors des greffes allogéniques de moelle osseuse (BM) ou d'organes solides, les lymphocytes T participent fréquemment à une réponse lymphocytaire allogénique entraînant une réaction du greffon contre l'hôte (GvHD) ou un rejet de greffe (*English et al., 2010*).

Les premières indications relatives à la nature immunosuppressive des CSM ont été obtenues à partir d'études avec des CSM murines, humaines et de babouin. Ces études ont démontré que ces cellules sont capables de supprimer l'activation des lymphocytes T et leur prolifération *in vitro*. Cette inhibition affecte la prolifération des lymphocytes T induite par les mitogènes (Nicola *et al.*, 2002), ou les alloantigènes (Le Blanc *et al.*, 2003), ainsi que l'activation des lymphocytes T par des anticorps CD3 et CD28 (Krampera *et al.*, 2003). Les CSM humaines sont capables d'inhiber la prolifération des lymphocytes T naïfs CD45RA et des lymphocytes T mémoires CD45RO activés par des DCs allogéniques. Mais ces cellules ont peu d'effet sur la réponse des lymphocytes T mémoires spécifiques des antigènes viraux. Les CSM inhibent également la prolifération des lymphocytes T humains en réponse à des cytokines l'IL-7 et l'IL-15 (Casiraghi *et al.*, 2016). Il a été rapporté que les CSM peuvent inhiber les effets des lymphocytes T cytotoxiques (CTL). *In vitro*, cela pourrait être dû à la suppression de la prolifération des CTL, plutôt qu'à l'inhibition directe de leur activité cytolytique (Rasmusson *et al.* 2003). Les CSM isolées à partir de diverses sources ont le même profil de suppression de la prolifération des lymphocytes T CD4+ et CD8+, ceci de manière dose-dépendante (Najar *et al.*, 2010a; Nicola *et al.*, 2002). Ces observations conduisent à des recherches scientifiques sur la compréhension sur des mécanismes impliqués dans l'immunosuppression des CSM sur des lymphocytes T. Initialement, il a été démontré que les CSM inhibent la prolifération des lymphocytes T par un mécanisme indépendant du CMH (Le Blanc *et al.*, 2003). De plus, les CSM ne provoquent pas d'apoptose des lymphocytes T (Krampera *et al.*, 2006; Zappia *et al.*, 2005) et le contact entre les CSM et les lymphocytes T entraîne l'arrêt du cycle cellulaire en phase G1 (Glennie *et al.*, 2005). L'effet suppresseur de CSM sur les lymphocytes T se produit, soit de façon directe, soit de façon indirecte pour moduler les fonctions des cellules présentatrices d'antigènes telles que les DCs, ce qui entraîne la modification de l'expression des cytokines, et l'altération de la présentation de l'antigène (Cutler *et al.*, 2010; Wang *et al.*, 2008).

### II.2.1.2. Mécanismes

Les mécanismes principaux impliqués dans la suppression des lymphocytes T par les CSM comprennent le contact cellulaires, la sécrétion des facteurs solubles et la génération des lymphocytes régulateurs (Figure 5).



**Figure 5. Effet immunomodulateur des CSM sur les lymphocytes T.** L'effet immunosuppresseur des CSM sur les LT s'exerce soit de façon directe, inhibant la prolifération et la fonction effectrice des LT par contact cellulaire ou/et sécrétion des molécules régulatrices. Soit de façon indirecte en modulant la fonction des d'autres effecteurs immunitaires.

### ➤ L'interaction cellulaire

Nicola et ses collègues ont montré, pour la première fois, que le contact cellulaire est nécessaire pour une suppression forte sur les lymphocytes T par les CSM. En utilisant un système de Transwell (filtre) pour prévenir le contact entre lymphocytes T et les CSM, les auteurs ont montré que même si la suppression se produisait dans un Transwell, la suppression étant beaucoup plus faible par rapport à la situation au cours de laquelle le contact physique était autorisé (Nicola et al., 2002). Il a été démontré que les CSM expriment, à leur surface, des intégrines (alpha1, alpha2, alpha3, alpha5, alpha6, alphaV, beta1, beta3, et beta4), des molécules adhésion intercellulaire ICAM-1, ICAM-2, VCAM-1, CD72, et LFA-3. Ces molécules sont capables de se lier à des lymphocytes T avec une haute affinité (Majumdar et al., 2003). Plus tard, une autre étude a montré que lors de la co-culture des CSM dérivés de tissus adipeux avec des cellules mononuclées du sang périphérique (PBMC : peripheral blood mononuclear cells) activées, les CSM interagissent spécifiquement avec une sous-population des lymphocytes T. De plus, Cette sous-population T qui adhéraient aux CSM aurait un

phénotype immunosuppresseur (*Quaedackers et al., 2009*). *Ren* et ses collègues ont montré que les CSM murines expriment fortement des ICAM-1 et VCAM-1 dans l'environnement inflammatoire, ainsi, des expériences *in vitro* et *in vivo* de déplétion ou du blocage de ces molécules d'adhérence conduisent à une réduction significative de l'immunosuppression médiée par les CSM de souris (*Ren et al., 2010*). Par contre, chez l'homme, ces molécules d'adhésion ne semble pas jouer de rôle crucial dans l'inhibition de la prolifération des lymphocytes T médiée par CSM (*Najar et al., 2010b*). Chez l'homme, l'engagement des molécules inhibitrices PD1 (programmed death 1) avec ses ligands PD-L1 et PD-L2 est responsable de l'inhibition des CSM sur la prolifération des lymphocytes T (*Augello et al., 2005; Chinnadurai et al., 2014*).

#### ➤ *Les facteurs sécrétés*

Des études *in vitro* ont mis en évidence que les facteurs solubles sont impliqués dans l'inhibition de lymphocytes T parce que la séparation des CSM et des PBMC par une membrane semi-perméable (transwell) n'a pas abrogé la suppression (*Klyushnenkova et al., 2005; Tse et al., 2003*). Différents médiateurs peuvent jouer un rôle dans la suppression de la prolifération des lymphocytes T induit par les CSM. Les CSM humaines inhibent l'activation des lymphocytes T via la synthèse d'indoleamine 2,3-dioxygénase (IDO) (*Meisel et al., 2004*), de PGE2 (*Ghannam et al., 2010*), de hème-oxygénase 1 (HO-1), du TGF $\beta$ , de l'HGF (hepatic growth factor), de galectines et de HLA-G (*Nasef et al., 2007*); tandis que, dans le mêmes conditions de culture, les CSM murines utilisent de l'oxyde nitrique (NO) pour atténuer la prolifération et l'activation des lymphocytes T (*Ren et al., 2009*).

Le TGF $\beta$  et le HGF sont des médiateurs importants qui jouent un rôle dans l'inhibition de la prolifération des lymphocytes T par les CSM dans des MLR (mixed lymphocyte reaction). *Nicola* et ses collègues ont montré que l'utilisation d'anticorps neutralisants dirigés contre le TGF $\beta$  et le HGF peut rétablir la prolifération des lymphocytes T (*Nicola et al., 2002*). Le TGF $\beta$  est également un inhibiteur puissant de l'activation induite par l'IL-2 sur la voie Jak-Stat dans les lymphocytes T (*Bright et al., 1997*). Au contraire, d'autres équipes ont démontré que le TGF $\beta$  n'a pas de rôle dans l'effet suppressif de CSM sur les lymphocytes T stimulés par des mitogènes (*Rasmusson et al., 2005*). L'ensemble de ces observations suggèrent que différents mécanismes soient impliqués en fonction du stimulus.

Grâce à la sécrétion de PGE2, les CSM atténuent la production d'IL-2 par les lymphocytes T et inhibent la prolifération des lymphocytes T activés (*Ghannam et al., 2010*). Les effets suppresseurs de la PGE2 sur l'activation et l'expansion des lymphocytes T comprennent : l'inhibition sur la production de l'IL-2, de l'expression du récepteur de l'IL-2 et de l'activation de JAK3 qui médient la réactivité des lymphocytes T à l'IL-2. (*Kalinski, 2012*).

Le HO-1/CO supprime la prolifération des lymphocytes T et la sécrétion d'IL- 2, par l'inhibition de la voie ERK / MAP-kinase (*Chabannes et al., 2007*).

L'IDO favorise la dégradation du tryptophane en kynurénine et toxiques métabolites (acide quinolinique et l'acide 3-hydroxy-anthranilic) qui suppriment la prolifération ou induisent l'apoptose des lymphocytes T (*Meisel et al., 2004*). Le NO inhibe la phosphorylation du transducteur de signal et l'activateur de la transcription 5 (STAT 5) dans les lymphocytes T, conduisant à l'arrêts de cycle cellulaire (*Sato et al., 2007*).

Les CSM ne sécrètent pas d'IL-10 lorsqu'ils sont cultivés seuls. Cependant, après co-culture avec des lymphocytes T, les CSM produisent de l'IL-10 et l'IL-10 est également augmenté de manière significative dans les cellules qui ont co-cultivées avec des CSM (*Rasmusson et al., 2005*). Il a également été démontré que, lors de la co-culture avec des lymphocytes T, les CSM sécrètent LIF (Leukemia inhibitory factor) et l'anticorps bloquant de cette protéine conduit à la restauration de la prolifération des lymphocytes T (*Nasef et al. 2008*). Ces résultats suggèrent l'importance des interactions cellules T/CSM dans la plasticité des propriétés immunorégulatrices des CSM.

Le Galectin-1 et le sémaphorine-3A, sont deux facteurs solubles capables d'inhiber la prolifération des lymphocytes T via la fixation à neuropilin-1. Ils sont fortement exprimés par les CSM et peuvent rendre compte de l'activité immunosuppressive de ces cellules (*Lepelletier et al., 2010*). La sécrétion du galectine-3 augmente de manière significative lorsque les CSM ont été stimulés avec le ligand de Toll-like récepteur 2 (TLR-2). En utilisant un siARN pour supprimer le galectine -3, l'effet inhibiteur des CSM sur la prolifération des lymphocytes T est réduit (*Sioud et al., 2010*).

### ➤ ***La génération de lymphocytes T régulateurs (Tregs)***

Les lymphocytes T régulateur sont une sous population de lymphocytes T, qui jouent un rôle essentiel dans la prévention de l'auto-immunité et la suppression de réponses immunitaires excessives nuisibles à l'hôte. Les premières populations de Treg identifiées étaient des

lymphocytes TCD4 (CD4+ Treg). Ces CD4+Treg sont aujourd'hui caractérisé par leur forte expression membranaire de la chaîne alpha du récepteur de l'IL-2 (CD25), et par l'expression intracellulaire d'un facteur transcription FOXP3 (*forkhead box P3*) (*Sakaguchi et al., 2008*). Des expériences menées dans un model murin montrent que les CSM peuvent promouvoir la polarisation des lymphocytes T vers un phénotype régulateur. Ce phénomène est majoré quand les CSM sont mis en présence de Th0 (T helper naïve) par rapport à des Th1 (T helper type 1) matures (*Luz-Crawford et al., 2013*). Dans des MLRs ou des cultures des lymphocytes T purifiés et activés, l'addition des CSM humaines dérivées de moelle osseuse favorisent la différenciation des lymphocytes T en cellules de phénotype CD25+ FOXP3+Treg qui sont capables de supprimer l'allo-réponse des lymphocytes T syngéniques (*English et al., 2009b*). De plus, une augmentation de la population de cellules Treg a été mise en évidence dans les PBMC stimulés par des mitogènes en présence des CSM (*Aggarwal and Pittenger, 2005*). Dans un système de MLR ou lors de la culture des lymphocytes T purifiés, l'addition des CSM dérivées de la moelle osseuse favorise la différenciation des lymphocytes T vers des lymphocytes Treg CD25+FOXP3+, médiée par PGE2 et TFGβ (*English et al., 2009b*). Récemment, une étude de co-culture de CSM/PBMCs a montré que les monocytes sont essentiels pour l'induction de Treg par les CSM. En présence des CSM, les monocytes (M0) sont différenciés vers un phénotype de macrophages de type 2 (M2), qui sécrètent CCL-18 et IL-10. Ce processus contribue indirectement à la génération des Treg (*Melief et al., 2013a*).

## **II.2.2. Lymphocytes B**

### **II.2.2.1. Généralités**

Les lymphocytes B sont un type cellulaire majeur impliqué dans les réponses immunitaires adaptatives. Les lymphocytes B sont des cellules productrices d'anticorps et ont un rôle dans la présentation antigénique. Les lymphocytes B et les réponses humorales sont de plus en plus reconnues comme des médiateurs cruciaux du rejet d'allogreffe chronique (*Redfield et al., 2011*).

Les CSM sont capables de modifier l'immunobiologie des lymphocytes B et ciblent la réponse immunitaire humorale. En effet, la prolifération, la différenciation et la production d'immunoglobulines par les lymphocytes B sont fortement affectées par les CSM. Cependant, des articles publiés qui ont étudiés les effets des CSM sur les lymphocytes B, ont montré une grande disparité dans leurs approches et leurs résultats. Les différences observées parmi les résultats sur la prolifération et la fonction des lymphocytes B de ces groupes de recherche peuvent être expliqués par le type d'isolement pratiqué, ainsi que par les différents stimuli utilisés en des lymphocytes B. Le ratio entre les lymphocytes B et les CSM est également un point important, car les ratios ayant la meilleure efficacité sont très élevés, et contrairement aux lymphocytes T, il n'y a pas d'effet dose dépendant (*Franquesa et al., 2012; Hoogduijn et al., 2008*). Certains auteurs ont décidé d'adopter un modèle plus « physiologique en utilisant des lymphocytes B non purifiés pour comprendre le rôle des CSM humaines sur les lymphocytes B *in vitro*. *Comoli* et ses collègues ont démontré l'effet inhibiteur des CSM sur des lymphocytes B du sang périphérique non purifiés. Les PBMC étaient stimulés dans une MLR, et la production d'immunoglobulines a été inhibée par l'addition des CSM. Ils ont également montré que l'effet exercé par les CSM a été supprimé par l'addition d'anticorps antiCD40 et IL-10 suggérant que la suppression de la production d'immunoglobulines par des CSM s'effectue via l'inhibition de Th2 plutôt que par un effet direct sur les lymphocytes B (*Comoli et al., 2008*). Cependant, une autre étude de *Rasmusson* et ses collègues a montré que les CSM augmentent la production d'immunoglobulines sur les lymphocytes B du sang périphérique ou spléniques non purifiés ou enrichis par une sélection négative sous une légère stimulation de mitogènes (*Rasmusson et al., 2007*). Plus tard, *Rosado* et ses collègues ont rapporté que CSM dérivées de la moelle osseuse sont capables d'inhiber la prolifération et la différenciation *in vitro* des lymphocytes B du sang périphérique non purifiés et stimulés avec du CpG. Sur les lymphocytes B purifiés, l'effet inhibiteur des CSM est seulement observé en présence des lymphocytes T (*Rosado et al., 2015*).

Les recherches menées *in vitro* sur des lymphocytes B purifiées montrent également que l'effet des CSM est divers. Elle dépend des stimuli utilisés pour induire la prolifération et /ou différenciation des lymphocytes B. *In vitro* stimulation des lymphocytes B isolés ciblant les trois signaux d'activation : les récepteurs de lymphocytes B (BCR) via un anti-Ig, l'interaction avec les lymphocytes Th via CD40/CD40L, et des cytokines appropriées (IL-2, IL-4) ou activation des récepteurs TLR via des produits microbiens, CpG et dsRNA. Certaines études ont montrées que les CSM, peuvent arrêter les lymphocytes B dans la phase G0/G1 du cycle cellulaire, inhibant la prolifération des lymphocytes B (*Corcione et al., 2006*),



ou d'augmenter la viabilité de ces cellules, inhiber la différenciation des lymphocytes B en plasmocytes induit par pDCs (*Tabera et al., 2008*). Pendant ce temps, les résultats d'autres groupes montrent que le traitement par des CSM dérivées de cordon ombilical entraînent une augmentation de la prolifération, de la différenciation des lymphocytes B purifiés de PBMC en plasmocytes et de la production d'anticorps *in vitro* (*Ji et al., 2012*). Il a été montré que les CSM expriment les TLRs (*DelaRosa and Lombardo, 2010*), l'activation de ces récepteurs induisant différents profils de la sécrétion de cytokines. La stimulation de CSM avec du CpG peuvent induire une production d'IL-6, qui peut stimuler la prolifération des lymphocytes B (*Friederichs et al. 2001; Traggiai et al. 2008*)

Toutes ces études donnent un indice sur un double effet potentiel des CSM sur les lymphocytes B. Alors que dans le système d'enrichissement apparaît que l'effet de CSM sur les lymphocytes B peut-être lié à leur action immunosuppressive sur les lymphocytes T, dans une population de lymphocytes B isolés et activés, les CSM inhibent ou augmentent la prolifération des lymphocytes B selon les stimuli utilisés.

#### **II.2.2.2. Mécanismes**

##### **➤ *Les interactions cellulaires***

Certaines études ont trouvé que l'interaction de PD-1/PDL-1 (*Augello et al., 2005; Schena et al., 2010*) et l'inhibition de la voie de signalisation en aval de BCR est responsable de la suppression des lymphocytes B par les CSM. Cependant, *Schenal* et ses collègues ont observés que le prétraitement des CSM avec l'INF- $\gamma$  est nécessaire pour leur effet inhibiteur dépendant de contacts cellulaires avec les lymphocytes B (*Schena et al., 2010*).

##### **➤ *Les facteurs sécrétés***

Contrairement, d'autres auteurs ont démontré que les mécanismes suppressifs des CSM sur les lymphocytes B sont majoritairement indépendant du contact cellulaires (*Asari et al., 2009; Corcione et al., 2006*). *Corcione* et ses collègues ont démontré que dans le système de Transwell, les CSM humaines sont capables d'inhiber la différenciation des lymphocytes B et d'altérer de la production d'IgM, IgG, et IgA. De plus, l'expression de CXCR4, CXCR5, CCR7, et l'expression de chimiokines CXCL12, CXCL13, et de ligand de CXCR4, CXCR5,

par les lymphocytes B est significativement diminuée en présence des CSM. Ces résultats suggèrent que l'influence des CSM sur les propriétés des lymphocytes B se fait via des facteurs solubles (*Corcione et al., 2006; Zhao et al., 2016*). Une étude récente, menée par *Lee* et ses collègues, a montré que le milieu conditionné de CSM, préalablement infectées par une souche de Mycoplasme, a des effets inhibiteurs sur la production d'immunoglobulines par des lymphocytes B stimulés par du lipopolysaccharides (LPS) et de l'IL-4 (*Lee et al., 2014*). Une autre étude a mis en évidence l'augmentation de la synthèse de la galectine-9 (Gal-9) lorsque les CSM sont prétraités avec l'INF- $\gamma$  et ces CSM activées sont capables d'inhiber la prolifération des lymphocytes B. Les résultats *in vivo* de la même étude, montrent que la co-administration des CSM ou des Gal-9 entraîne une réduction significative des IgG dans souris immunisées avec les facteurs de coagulation humaine VIII. Leur résultats suggèrent que Gal-9 est un médiateur majeur de l'effet suppresseur des CSM sur des cellules immunitaires y compris sur les lymphocytes B (*Ungerer et al., 2014*).

➤ ***La génération de lymphocytes B régulateurs(Breg)***

Breg est une nouvelle sous-population des lymphocytes B avec des propriétés régulatrices, qui contribuent au maintien ou à l'induction de la tolérance en régulant les réponses immunitaires. La fonction pivot de Breg est la production d'IL-10, qui inhibe les cytokines pro-inflammatoires et favorise la différenciation des Treg (*Mauri and Bosma, 2012*)

Les CSM isolées à partir de tissus adipeux humains peuvent favoriser la différenciation des Lymphocytes B en un phénotype régulateur CD19<sup>+</sup>CD24<sup>high</sup>CD38<sup>high</sup> (Breg) qui secrètent de l'IL-10 *in vitro* (*Franquesa et al., 2015*). Park et ses collègues ont observés que les CSM ont amélioré l'auto-immunité dans un modèle murin de lupus érythémateux systémique (SLE) en induisant l'expansion de Breg et la sécrétion d'IL-10 *in vivo* (*Park et al., 2015*).

## II.3 Immunomodulation des cellules du système immunitaire inné.

Les premiers effecteurs de l'inflammation suite à une infection ou à des dommages tissulaires sont les cellules de l'immunité innée. En effet les cellules représentent la première ligne de défense contre les infections, la plupart de celles-ci sont présentes avant le début de l'infection. Les CSM de par leurs capacités anti-inflammatoires, de régénération ainsi que de localisation sont des régulateurs d'intérêt des cellules de l'immunité innée.

### II.3.1. Cellule dendritique (DC)

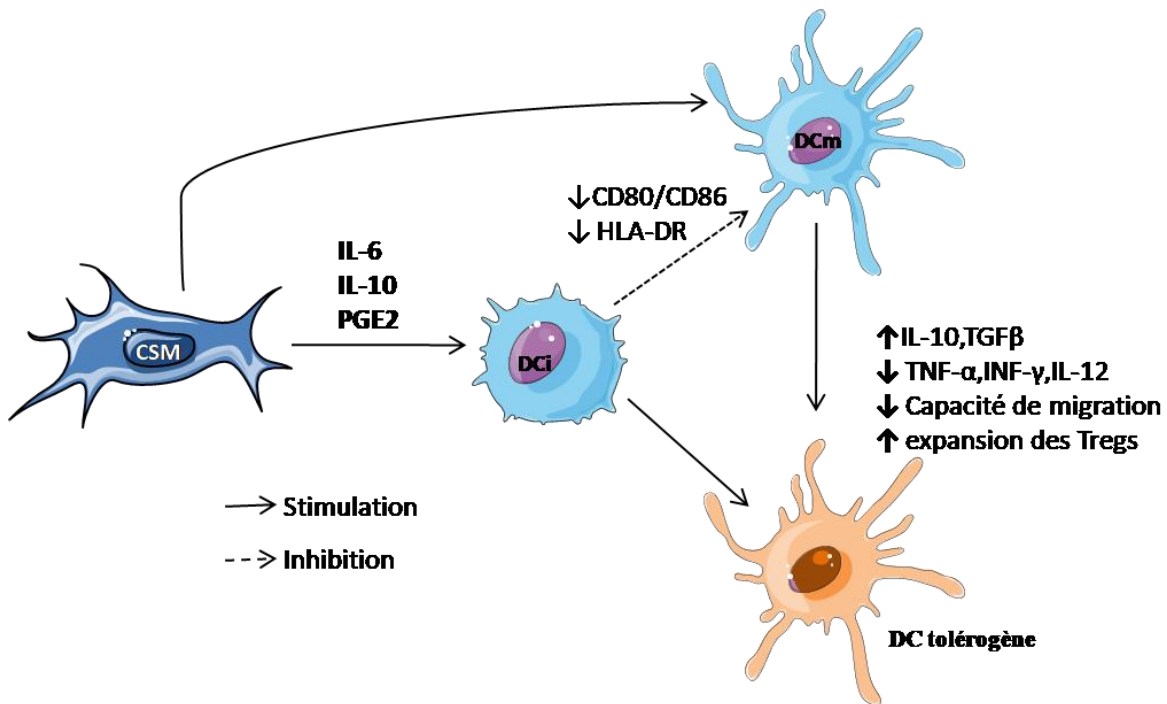
Identifiés en 1868 lors d'une étude anatomique de la peau par *Paul Langerhans*, les cellules dendritiques ont été les premières cellules découvertes du système immunitaires. Les DCs jouent un rôle crucial dans l'initiation de la réponse immunitaire en favorisant l'activation des lymphocytes T spécifique d'antigènes. Les cellules dendritiques sont des cellules présentatrices d'antigène (CPA) le plus efficaces qui activent les lymphocytes T pour initier des réponses immunitaires adaptatives, y compris les réponses prolifératives allogéniques qui peuvent être testés *in vitro* dans des réactions lymphocytaires mixtes (MLR). Les DCs immatures (DCi) expriment, à leur surface, de bas niveaux de CMH et de molécules de co-stimulation telle que CD80 et CD86. Remarquablement, au stade mature, ces molécules sont fortement exprimées. Les DCi peuvent être recrutées rapidement sur le site d'inflammation où l'Ag est capturée (*Jensen, 2007*). Après clivage de l'Ag en peptides, chargement des peptides sur les molécules du CMH et la migration vers les zones des ganglions lymphatiques de drainage, la migration des DCs accompagne leur maturation, induite par des PAMP ou des DAMP, qui induisent une modification de l'expression des récepteurs de chimiokines à leur surface (*Cravens and Lipsky, 2002*). Les DCs matures (DCm) perdent leur capacité à capturer l'Ag pendant qu'elles acquièrent la capacité de stimuler les lymphocytes T (Reis e Sousa, 2006).

En 2005, *Aggarwal* et *Pittenger* ont, pour la première fois, montrés que les CSM dérivées de la moelle osseuse peuvent influencer la réponse inflammatoire. Les CSM modifient le profil de sécrétion des cytokines par les DCs du sang périphériques, ce qui favorise une réponse pro-inflammatoire vers une réponse anti-inflammatoire ou tolérante (*Aggarwal and Pittenger, 2005*).

A la suite de cette étude, une série de recherches ont rapporté une inhibition de la différenciation et des fonctions des DCs par les CSM. Il a été démontré que la présence de CSM bloque la différenciation des monocytes CD14<sup>+</sup> et des précurseurs hématopoïétiques CD34<sup>+</sup> (dérivés du sang périphérique et du sang de cordon) en DCs (**Figure.7**) (*Nauta et al., 2006*). De plus, *Jiang* et ses collègues ont montré que les CSM inhibent l'expression de CD1a, CD80, CD86 et HLA-DR pendant la différenciation des DCs à partir de monocytes CD14<sup>+</sup>, et préviennent l'augmentation d'expression de CD86 et CD83 lors de la maturation des DCs. Les cellules obtenues alors ne présentaient pas le phénotype de cellules dendritique, mais une morphologie macrophagique (*Jiang et al., 2005*). Par la suite, une autre étude a mis en évidence la diminution de la cycline D2 dans les DCs co-cultivées avec des CSM, et un arrêt en phase G0/G1 de ces cellules (*Ramasamy et al., 2007*). Par ailleurs, l'effet inhibiteur des CSM sur la maturation des DCs est partiellement abrogé par le traitement avec un anticorps anti-IL-6, qui suggère que cette inhibition est IL-6 dépendante (*Djouad et al., 2007*). D'autre part, un système de co-culture dans lequel la synthèse de la PGE2 par les CSM est inhibée par un inhibiteur NS-398, aucune inhibition de la différenciation des DCs n'a été observée. Cela suggère que le PGE2 joue un rôle important dans l'inhibition de la maturation des DCs par les CSM (*Spaggiari et al., 2009*). *Liu* et ses collègues ont également démontrés que lors d'une co-culture des CSM avec des DCi, la sécrétion d'IL-10 par les CSM est significativement augmentée via l'activation de la voie STAT3. L'IL-10 inhibe la maturation et la sécrétion d'IL-12 par des DCs, ce qui en conséquence, atténue leur capacité à activer les lymphocytes T (*Liu et al., 2013*). En plus, les CSM peuvent induire le développement de DCs tolérogènes par une augmentation de la production de cytokines anti-inflammatoire telle que l'IL-10 et une diminution des cytokines inflammatoires telles que le TNF- $\alpha$ , l'INF- $\gamma$  et l'IL-12 (*Beyth et al., 2005*). D'autres équipes se sont intéressées à l'effet de CSM sur des DCs complètement différenciées et matures. Les DC maturées en présence de LPS et mise en présences des CSM, acquièrent la capacité de supprimer la prolifération des lymphocytes T lors d'une MLR par la production de TGF $\beta$  (*Zhao et al., 2012*).

En outre, dans un modèle murin, la co-culture des CSM avec des DCs induit une réduction de l'expression des molécules impliquées dans le l'adressage (*homing*) de DCi vers les ganglions lymphatiques, tel que CCR7 et CD49d. Des résultats similaires ont été obtenus *in vivo*, suite à l'administration intraveineuse de CSM. De même, les DCm misent en présence des CSM montrent une diminution significative de leur migration en réponse au CCL19 (*Chiesa et al., 2011; English et al., 2008*).

L'ensemble de ces études montrent que les CSM sont capables d'affecter le phénotype et la fonction des DCs en inhibant leur maturation et leur migration vers les ganglions lymphatiques et/ou éventuellement, en transformant leur différenciation en CPA moins allo-stimulatantes (**Figure.6**).



**Figure 6. Effet immunomodulateur des CSM sur la cellule dendritique.** Les CSM inhibent la maturation des cellules dendritiques immatures (DCi) en cellules dendritiques matures (DCm), en favorisant la différenciation des DCi vers un phénotype régulateur.

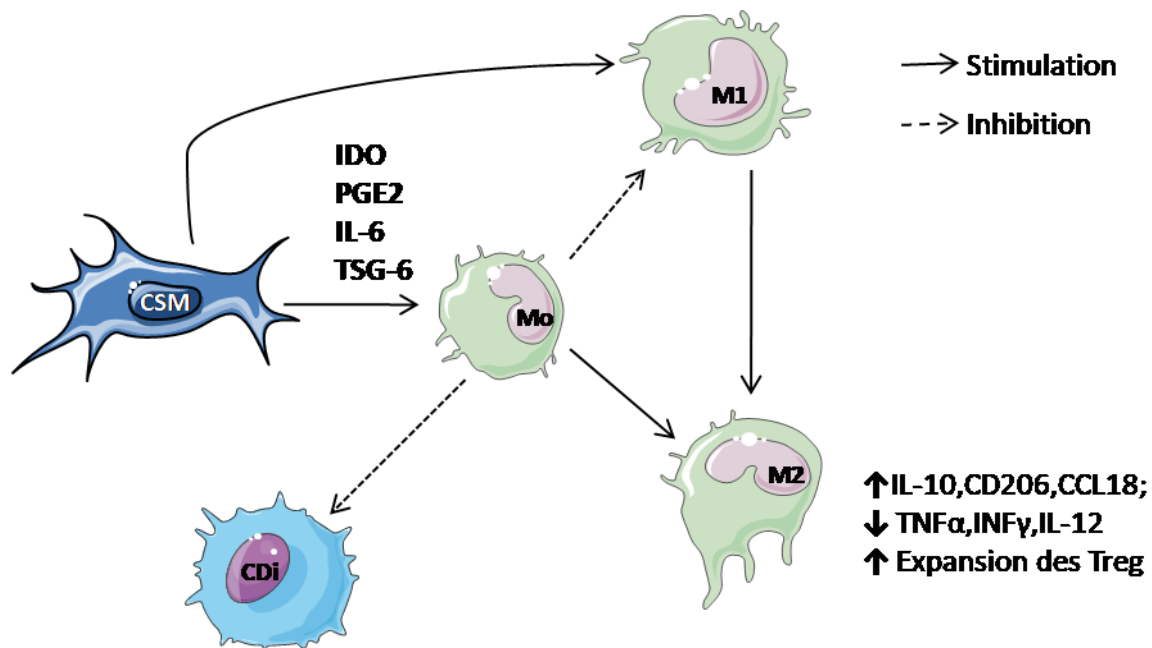
### II.3.2. Monocyte / Macrophage

Les Macrophages sont issus de la différenciation de monocytes, qui jouent un rôle clé dans le système immunitaire inné. Ils sont hautement spécialisés dans l'élimination des cellules mortes, des débris cellulaires et des microbiens. La phagocytose d'antigènes microbiens ou le contact de ceux-ci avec les récepteurs des PAMP (*pathogen-associated molecular patterns*) sert souvent de stimulus initial à l'activation (*Bianchi, 2007*). Cependant, l'activité des macrophages peut encore être amplifiée par des cytokines sécrétées par les lymphocytes T activés et par des médiateurs de la réponse inflammatoire. Les macrophages activés

expriment des taux élevés de molécules du CMH de classe II, ce qui leur permet de présenter plus efficacement les antigènes aux lymphocytes T.

Il existe de nombreuses preuves de l'immunorégulation des macrophages par les CSM (**Figure.7**), principalement lors d'une réponse inflammatoire et de la réparation des tissus lésés. Les CSM activées, par les signaux pro-inflammatoires, peuvent induire une polarisation des macrophages résidants de phénotype pro-inflammatoire classique M1 vers un phénotype anti-inflammatoire M2 (*Prockop, 2013*). Les macrophages de phénotype M2 présentent une diminution de l'activité phagocytaire qui s'accompagne d'une augmentation de la production d'IL-10 et une diminution de la production des cytokines pro-inflammatoires tel que l'IL-12 et le TNF- $\alpha$  (*Melief et al., 2013a*).

La polarisation des macrophages induite par les CSM est essentiellement dépendante de la sécrétion des facteurs solubles, dont la PGE2, le TSG-6 (TNF- $\alpha$  stimulated gene/protein6), l'IL-6 et IDO (*Choi et al., 2011; François et al., 2012; Melief et al., 2013b; Németh et al., 2009*). Les CSM activées par l'INF- $\gamma$ , le TNF- $\alpha$  et le LPS présentent une augmentation de leur sécrétion de PGE2 suite à une activation de la voie NF- $\kappa$ B. La PGE2 sécrétée se fixe sur les récepteurs EP2 et EP4 exprimés sur la surface des macrophages. Cette fixation, induit une augmentation de sécrétion de l'IL-10 par les macrophages (*Németh et al., 2009*). Dans d'autres études, le TSG-6 sécrété par les CSM activées par le TNF- $\alpha$ , interagit avec CD44 exprimé en surface des macrophages. L'interaction entre le TSG-6 et CD44 inactive la signalisation de la Voie TLR2/ NF- $\kappa$ B, et ainsi diminue la sécrétion des médiateurs pro-inflammatoires (*Choi et al., 2011*). *Melief* et ses collaborateurs ont constaté que les CSM co-cultivées avec des monocytes, sécrètent une dose plus élevée d'IL-6. Ce qui entraîne la différenciation des monocytes vers un phénotype anti-inflammatoire (*Melief et al., 2013b*). D'autre part, la sécrétion d'IDO, induit par l'exposition des CSM à un environnement inflammatoire, influence la différenciation des monocytes en macrophages de phénotype immunosuppresseur de type M2 (CD14+, CD206+) sécrétant de l'IL-10 (*François et al., 2012*). En outre, la polarisation des macrophages de M1 vers M2 induite par les CSM peut promouvoir l'expansion des Tregs. Les M2s produisent du CCL18 et de l'IL-10 qui, en conjonction avec le PGE2 et le TGF $\beta$  produit par les CSM, augmente la production de HLA-G5 par les M2s qui favorise l'expansion des Tregs (*Melief et al., 2013b*).



**Figure 7. Effet immunomodulateur des CSM sur le monocyte/macrophage.** *Les CSM inhibent la différenciation des monocytes (Mo) vers le macrophage de type 1 (M1) par contre favorisent la différenciation des Mo vers le macrophage de type 2 (M2) qui est un phénotype anti-inflammatoire. Les CSMs peuvent également inhiber in vitro l'induction des DCi par les monocytes.*

### II.3.3. Cellule NK (Nature Killer)

#### II.3.3.1. Généralités

Au début des années 1970, une nouvelle sous-population lymphocytaire a été découverte chez les souris. Ces cellules possèdent une cytotoxicité naturelle vis-à-vis des cellules tumorales. Elles ont été nommées cellules « Natural killer », ou NK (*Herberman et al., 1975; Kiessling et al., 1975*). La mise en place des fonctions NK est rapide car contrairement aux lymphocytes T et B, ce sont des effecteurs de l'immunité innée et leur activation ne nécessite pas d'étape de prolifération ni de différenciation. Les cellules NK fournissent une première ligne de défense rapidement mobilisable et assurent un rôle important dans l'immuno-surveillance des infections virales et des processus tumoraux. Ces cellules n'expriment pas les molécules membranaires et les récepteurs caractéristiques des lignées cellulaires T et B, en revanche, elles possèdent un large éventail de récepteurs inhibiteurs ou activateurs qui ont pour fonction de différencier le « soi » du « non soi » et de reconnaître différents signaux de danger.

L'intégration de tous les signaux reçus à travers ces récepteurs détermine la réponse des cellules NK.

Depuis longtemps les cellules NK ont été considérées comme des effecteurs de l'immunité innée relativement primitifs, cependant, des études récentes ont démontré qu'elles sont également considérées comme des cellules participant à la régulation de l'immunité adaptative à travers leur sécrétion de cytokines et leur capacité d'interaction avec d'autres cellules immunitaires telles que les cellules dendritiques et les lymphocytes T (*Ferlazzo and Morandi, 2014; Gasteiger et al., 2013*). Les cellules NK assurent d'autres fonctions importantes dans des contextes variés comme la transplantation d'organes, la greffe cellules souches hématopoïétiques, et dans la reproduction (*Moffett and Colucci, 2014; Tsirigotis et al., 2012; Villard, 2011*).

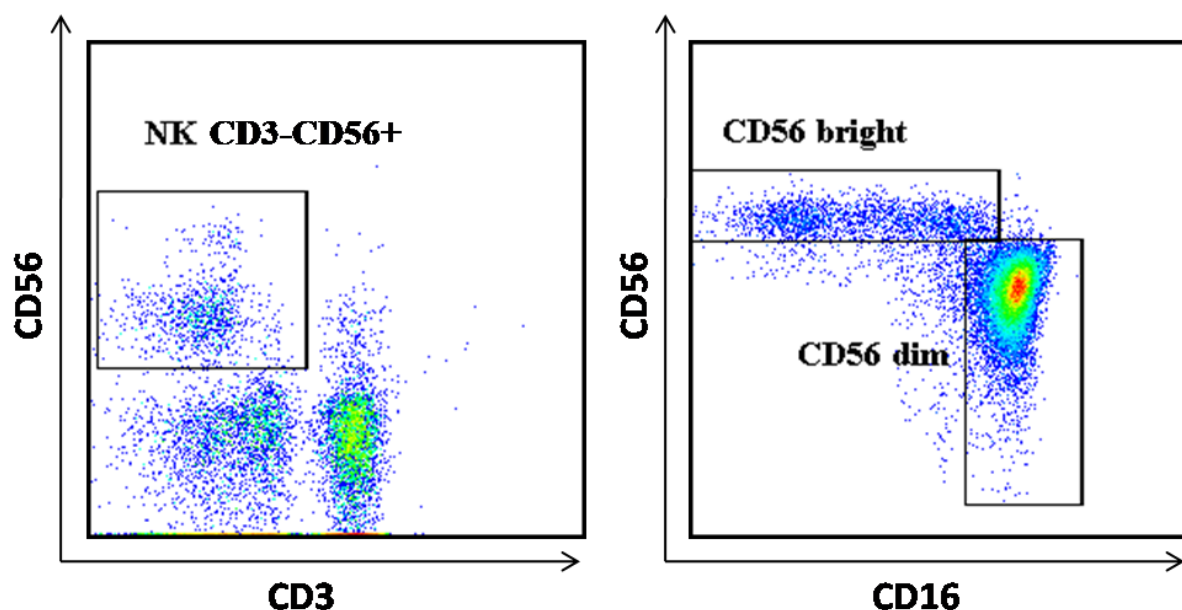
Les cellules NK sont de grands lymphocytes granuleux et représentent chez l'homme entre 5 à 20% des lymphocytes périphériques circulants (*Waldhauer and Steinle, 2008*). Leur distribution tissulaire est assez large et on les retrouve au sein de plusieurs organes lymphoïdes ou non lymphoïdes. Leur développement se déroule principalement au sein de la moelle osseuse, mais plusieurs travaux montrent que d'autres organes peuvent être des sites anatomiques potentiels de développement et de maturation de cellules NK à partir de précurseurs hématopoïétiques. Le développement des cellules NK extramédullaires permet de générer des cellules NK fonctionnellement distinctes et spécifiques de tissus (*Yu et al., 2013*).

Les cellules NK sont une population cellulaire hétérogène et il existe plusieurs sous-populations, chez l'homme et chez la souris. Chez l'homme, on définit généralement, les cellules NK circulant par l'expression membranaires de la molécule CD56 et l'absence de l'expression du récepteur des lymphocytes T et de la molécule CD3 (**Figure 8**) (*Robertson and Ritz, 1990*). Mais cette définition ne permet pas de distinguer toutes les sous population de cellules NK. L'utilisation d'autres marqueurs est souvent nécessaire pour une étude plus fine et plus exhaustive.

Chez l'homme, les cellules NK se développent à partir des progéniteurs hématopoïétiques CD34<sup>+</sup>, $\zeta$  commun aux lymphocytes T et B au sein de la moelle osseuse. A travers plusieurs stades de développement, ces précurseurs s'engagent dans la lignée NK puis acquièrent progressivement les fonctions et le phénotype de cellules NK matures possédant divers densités d'expression membranaire de CD56<sup><</sup>; Les celles NK sont donc distinguées en deux grande population : NK CD56<sup>bright</sup> et NK CD56<sup>dim</sup>. Cette distinction phénotypique reflète différentes fonctions et état de maturation (*Yu et al., 2013*).



Les cellules NK CD56<sup>bright</sup> expriment très faiblement les récepteurs inhibiteurs KIR (killer cell immunoglobulin-like receptors) et le récepteur Fc $\gamma$  de type III (Fc $\gamma$ RIII CD16). Elles sont considérées comme moins matures que les CD56<sup>dim</sup> et sont capables de produire de grandes quantités de cytokines comme l'INF- $\gamma$  et le TNF- $\alpha$ . En périphérie, les cellules NK CD56<sup>bright</sup> ne représentent que 10% des cellules circulantes alors qu'elles représentent 90% des cellules NK des ganglions lymphatiques. Contrairement aux cellules NK CD56<sup>bright</sup>, les cellules NK CD56<sup>dim</sup> représentent 90% des cellules NK du sang périphériques. Elles expriment fortement le CD16 et les récepteurs KIR et représente une sous-population de cellules NK cytotoxiques classiques et matures. (Ferlazzo et al., 2004).



**Figure 8. Caractérisation des cellules NK CD3-CD56+ du sang périphérique.** Chez l'homme les cellules NK sont distinguées en deux grande populations dans le sang périphérique, CD3-CD56<sup>bright</sup> et CD3-CD56<sup>dim</sup>

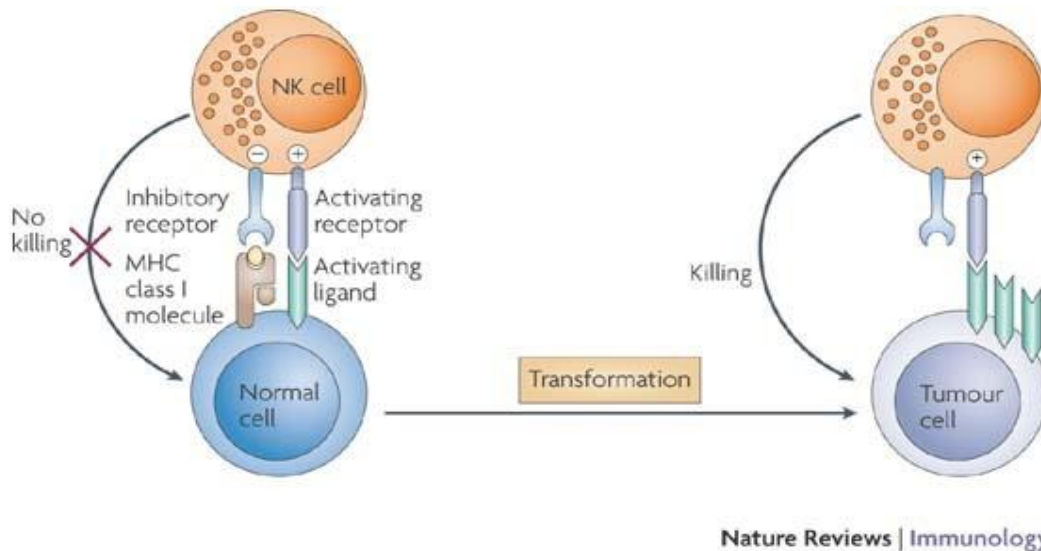
### II.3.3.2. Fonctions effectrices des cellules NK

#### II.3.3.2.1. Cytotoxicité

Les cellules NK sont capables de lyse des cellules infectées par des virus ou des cellules transformées sans activation préalable vis-à-vis de cibles qui présentent de faibles niveaux de molécules de CMH. Schématiquement, elles peuvent reconnaître les cellules cibles potentielles de deux façons différentes :

➤ *Cytotoxicité Naturelle.*

Dans le contexte viral ou tumoral, les cellules NK peuvent reconnaître les cellules anormales grâce à la détection de la baisse d'expression des molécules du CMH-I, ou un profil inhabituel d'antigènes exposées à la surface des cellules tumorales ou des cellules infectées par certains virus. La cytotoxicité naturelle se réfère à la capacité des cellules NK à lyser une cellule cible sans sensibilisation préalable et sans la reconnaissance par les anticorps. L'activation de la cellule killer naturelle (NK) est régulée par un équilibre entre des signaux médiés par des récepteurs activateurs et inhibiteurs (**Figure 9**). Lors de la transformation cellulaire, les molécules du CMH de classe I, qui sont le ligand de récepteurs inhibiteurs des cellules NK, sont souvent réduites ou perdues. En parallèle, le stress cellulaire et les lésions de l'ADN conduisent à une augmentation d'expression des ligands des récepteurs activateurs des cellules NK sur les cellules tumorales. L'ensemble de ces événements déplacent l'équilibre vers l'activation des cellules NK et induisent des fonctions effectrices cytolytiques entraînant la destruction des cellules cibles. (*Ljunggren and Kärre, 1990*). Les premières études sur les cellules NK circulantes au repos ont montré que la sous population CD56<sup>dim</sup> est plus cytotoxique que CD56<sup>bright</sup> à l'encontre des cellules tumorales. Mais après stimulation avec l'IL-2 *in vitro*, les cellules CD56<sup>bright</sup> présentent un plus fort potentiel de prolifération et acquièrent une activité cytotoxique comparables à celle de cellules CD56<sup>dim</sup> (*Nagler et al., 1989*).



**Figure 9. Cytotoxicité naturelle.** L'activation de la cellule NK est régulée par un équilibre entre les signaux médiés par les récepteurs inhibiteurs et activateurs. Lors de la transformation cellulaire, les ligands du CMH de classe I pour les récepteurs inhibiteurs sont souvent réduits ou perdus. Parallèlement, le stress cellulaire et les dommages à l'ADN conduisent à la régulation positive des ligands pour les récepteurs activateurs des cellules NK sur la cellule tumorale. Ensemble, ces événements déplacent l'équilibre vers l'activation des cellules NK et l'induction des fonctions cytolytiques entraînant une destruction des cellules cibles. Pendant la progression de la tumeur, les variants de la tumeur peuvent évoluer et exprimer plus fortement les récepteurs inhibiteurs et / ou perdre des ligands pour l'activation des récepteurs. Ces tumeurs peuvent échapper à la reconnaissance par les cellules NK. (Ljunggren and Malmberg, 2007)

- **Cytotoxicité cellulaire dépendant des anticorps** (ADCC, de *antibody-dependent cell mediated cytotoxicity*).

Les cellules NK reconnaissent les cellules cibles potentielles par l'intermédiaire d'anticorps anti-tumoraux ou antiviraux. L'exposition d'antigènes spécifiques par les cellules tumorales et/ou les cellules infectées par certains virus induit l'activation du système immunitaire et le développement d'une réponse humorale. Ensuite, les cellules NK reconnaissent les anticorps présents à la surface des cellules cibles par l'intermédiaire des récepteurs Fcγ. Les cellules NK expriment le CD16 qui est un récepteur transmembranaire pour l'extrémité carboxy-terminale de la molécule d'IgG (Fc). En particulier, les cellules NK CD56<sup>dim</sup>, expriment fortement le CD16. Ce sont les cellules le plus impliquées dans l'ADCC. L'interaction entre CD16 et ses ligands peut induire la dégranulation des cellules NK, les cellules cibles sont alors lysées par ADCC.

La cytotoxicité naturelle et l'ADCC sont des mécanismes de lyse cellulaire impliquant l'exocytose des granules lytiques qui contiennent essentiellement de la perforine et du granzyme. Suite à la reconnaissance des cellules cibles, les cellules NK forment avec cette dernière une synapse immunologique « lytique ». Elle subit alors une polarisation du cytosquelette d'actine, de l'appareil de Golgi ainsi que des microtubules, entraînant la convergence des granules cytotoxiques vers la synapse lytique. Leur contenu est alors libéré (*Mace et al., 2014*). L'ancrage et la polymérisation de la perforine au niveau de la membrane de la cellule cible forme des pores et permet la pénétration des granzymes. Ces derniers, (granzymes A et B majoritairement) sont des enzymes du type sérine-protéases capables d'induire la mort cellulaire à travers la mise en jeu de mécanismes caspases-dépendants et indépendants (*Topham and Hewitt, 2009*). L'étude d'Alter et ses collègues a démontré que l'expression de la protéine 1 membranaire associée aux lysosomes (LAMP-1, ou CD107a) est augmentée à la surface des cellules NK suite à la stimulation avec des cibles dépourvues des molécules de CMH. Le CD107a est considéré comme un marqueur de l'activation et son expression à la surface des cellules est corrélée avec la sécrétion de cytokines et l'activité lytique de NK (*Alter et al., 2004*).

➤ **Mécanismes liée à la mort cellulaire.**

Les cellules NK peuvent aussi induire l'apoptose des cellules cibles en utilisant d'autres mécanismes non dépendants de l'exocytose des granules lytiques. Ces mécanismes impliquent l'interaction directe entre les récepteurs de mort exprimés par les cellules cibles (Fas (CD95), TNFR1 (Tumor-Necrosis-Factor Receptor 1) et TRAIL), et leurs ligands exprimés par les NK (FasL(CD95L), TNF et TRAIL-R). Fas (CD95) est exprimé par de nombreuses cellules et appartient à la famille « TNF récepteur ». Ce récepteur contient un « domaine de mort » intra-cytoplasmique conservé. Suite à l'interaction avec Fas-L, Fas active indirectement le clivage des caspases et induit l'apoptose. Deux autres membres de cette famille, (TRAIL- R1) et DR5 (TRAIL- R2), transduisent également des signaux apoptotiques lors de leur liaison avec TRAIL (*Zamai et al., 1998*).

### **II.3.3.2.2. Production de Cytokines**

Les cellules NK activées, par des cytokines ou par des cellules cibles, sont capables de produire une grande variété de chimiokines telles que MIP-1 $\alpha$ , MIP-1 $\beta$ , RANTES et IL-8/CXCL8 (*Fauriat et al., 2010*). Cette production permet aux cellules NK d'amplifier la

réponse immune en recrutant d'autres cellules immunitaires, telles que les lymphocytes T, ainsi que d'autres cellules NK. Les cellules NK produisent également des cytokines pro-inflammatoires, en particulier le TNF- $\alpha$  et INF- $\gamma$ , qui sont capables d'activer les cellules dendritiques, les macrophages ainsi que les lymphocytes T. Les DCs ou les macrophages activés coopèrent à leur tour pour établir un microenvironnement propice à l'activation des cellules NK, et ce à travers la sécrétion de différentes cytokines telles que l'IL-15, L'IL-12, IL-18 et les interférons de type I (*Fauriat et al., 2010; Vivier et al., 2008*).

Les cellules NK, en particulier les CD56bright, peuvent également sécréter d'autres cytokines immuno-régulatrices telles que TNF- $\beta$ , IL-13, « Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) » ou encore la cytokine IL-10 (*Cooper et al., 2001*). La sécrétion de l'IL-10 par une fraction de cellules NK les rend capables de réprimer la prolifération et les fonctions sécrétrices des lymphocytes T en réponse à des stimuli antigéniques. Ainsi, l'IL-10 confère aux cellules NK des fonctions immunosuppressives (*Deniz et al., 2008*).

#### **II.3.3.2.3. Prolifération**

Comme pour d'autres fonctions des cellules NK, leur prolifération est différente entre les deux sous-populations en réponse à des stimuli.

Les cellules CD56bright expriment le récepteur d'IL-2 de haute affinité (IL2R $\alpha\beta\gamma$ ) et sont capables de proliférer dix fois plus que la sous-population CD56dim lors d'une stimulation avec de faibles doses (pM) d'IL-2. Les cellules CD56dim expriment le récepteur d'IL-2 d'affinité intermédiaire (IL2R $\beta\gamma$ ). Elles présentent une faible capacité d'expansion même en réponse à un traitement à forte dose de l'IL-2 (nM) mais s'accompagnent d'une augmentation de l'activité cytotoxique. Le traitement des cellules NK par de l'IL-15 à forte dose peut également induire leur prolifération via IL2R $\beta\gamma$ . Ainsi, l'IL-2 ou l'IL-15 seules sont suffisantes pour induire la prolifération des cellules NK, mais leurs effets peuvent être renforcés par des cytokines ou d'autres stimuli (*Robertson et al., 1993*). En particulier, la présence de cellules cible qui améliore la prolifération des cellules NK induite par l'IL-2 (*Baume et al., 1992*).

### **II.3.3.3. Les récepteur de NK**

L'activation des cellules NK dépend d'un équilibre complexe entre les signaux activateurs et inhibiteurs. Les cellules NK expriment constitutivement à leurs surfaces un répertoire varié de récepteurs activateurs et inhibiteurs. L'équilibre entre les signaux d'activation et d'inhibition permettent aux cellules NK de distinguer les cellules saines du « soi » et des cellules transformées ou étrangères (soi altéré, ou non soi). L'intégration de tous les signaux issus de ces récepteurs conditionne la réponse NK (**Figure 9**).

#### **II.3.3.3.1. CD16/ FcγRIII**

Comme décrit dans les paragraphes précédents, le CD16 est un récepteur de faible affinité pour le fragment Fc des IgG, qui est impliqué dans l'ACDC des cellules NK. L'engagement de CD16 sur les cellules NK induit une transduction du signal via les molécules FcεRIγ et TCRζ qui contiennent des motifs ITAM dans leurs domaines cytoplasmiques avec une augmentation du taux de Ca<sup>2+</sup> intracellulaire, et qui ensuite conduit à la dégranulation des cellules NK (*Vivier et al., 1991*).

#### **II.3.3.3.2. Les récepteurs de la famille de NCR (Natural Cytotoxicity Receptors)**

La famille des récepteurs NCRs est composée de 3 récepteurs activateurs: NKp46, NKp44 et NKp30. Ces récepteurs sont différents au plan structural, mais ils partagent beaucoup de similitudes quant à leur fonction et leurs ligands. Les NCRs ont la capacité d'activer les cellules NK et surtout d'induire la lyse directe par cytotoxicité des cellules cibles lors de l'interaction avec leurs ligands respectifs. NKp46 et NKp30 sont exprimés par les cellules NK au repos ou activées, et activent la voie de signalisation via CD3ζ/FcεRIγ. Alors que l'expression de NKp44 est exclusivement induite sur les cellules NK activées. Ces récepteurs sont capables de reconnaître des ligands qui sont principalement exprimés par les cellules tumorales ou infectées par des virus (*Sivori et al., 2014*). Ainsi NKp30 a été démontré jouer un rôle important dans l'interaction entre les cellules NK et les DCs dans les tissus. Les cellules NK sont capables de reconnaître et tuer les DCs immatures via NKp30, tandis que les DCs matures peuvent aussi moduler la prolifération et l'activation des cellules NK via ce récepteur (*Ferlazzo et al., 2002*). L'expression de NKp30 est régulée négativement par le TGFβ, qui donc affecte la fonction lytique de cellules NK sur des cellules tumorales et des

DCs (*Castriconi et al., 2003*). En outre, les NCRs peuvent reconnaître aussi d'autres ligands présents sur les champignons ou les bactéries. NKp30 a été récemment impliqué dans la lyse direct de certains champignons tels que *Cryptococcus* et *Candida* (*Li et al., 2013*).

NKp44 est capable d'interagir directement avec certaines mycobactéries, notamment le BCG (Bacille Calmette-Guérin) et participe à la reconnaissance des pathogènes bactériens par les cellules NK (*Esin et al., 2008*). En ce qui concerne la reconnaissance des cellules tumorales, il a été démontré que NKp44 est capable de se lier aux cellules tumorales via des protéoglycanes de type héparane sulfate (heparan sulphate proteoglycans (HSPG)) (*Hershkovitz et al., 2007*). L'expression des ligands NKp44 est variable sur les cellules tumorales et sensibles au traitement par la trypsine. Il est corrélée à la sensibilité à la lyse médiée par les cellules NK (*Byrd et al., 2007*).

Les récepteurs NCRs constituent donc une arme très importante qu'utilise la cellule NK pour éliminer les cellules infectées ou bien transformées par un processus tumoral. ainsi, en utilisant des anticorps bloquants, le blocage de ces récepteurs induit une inhibition de la cytotoxicité des cellules NK. De plus la densité des NCR à la surface de cellule NK est corrélée avec l'amplitude de la cytotoxicité vis-à-vis des cellules cibles (*Dupuy et al., 2012; Moretta et al., 2001*).

#### **II.3.3.3.3. Les récepteurs du NKG2 de la super famille de lectine de type C**

Les récepteurs NKG2 (Natural-Killer group 2) appartiennent à la super famille des lectines de type C. Cette famille contient des récepteurs activateurs et inhibiteurs de cellules NK. Leur expression ne se limite pas aux cellules NK, ils sont aussi exprimées par certaines sous populations des lymphocytes T.

- *Les récepteurs CD94/NKG2*

Les récepteurs CD94/NKG2 sont exprimés à la surface des cellules NK humaines sous la forme d'hétérodimères composés d'une sous-unité commune invariante, le CD94, liée de façon covalente (pont disulfure) à une autre sous-unité de la famille NKG2 : 4 formes variantes NKG2A, B, C et E qui ont une structure commune composée d'un domaine lectine, un domaine transmembranaire et un segment cytoplasmique sont connus. Selon la présence de motif d'inhibition de l'immunorécepteur dépendant de la tyrosine (immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motifs (ITIM)) dans leurs domaines cytoplasmiques et leur liaison avec des molécules adaptatrices, ils ont été classés comme récepteurs inhibiteurs (CD94/NKG2A et CD94/NKG2B) ou activateurs (CD94/NKG2C) (*Lanier, 2008*). Le complexe CD94/NKG2

reconnait la molécule du CMH-I non classique HLA-E. Cette dernière présente des peptides dérivés de séquences signal des molécules du CMH-I classiques HLA-A, HLA-B, HLA-C et de la molécule du CMH I non classique HLA-G. L'expression membranaire de la molécule HLA-E est stabilisée par la fixation de ces séquences signal. De ce fait, le niveau d'expression de HLA-E reflète le niveau de synthèse des molécules du CMH-I. Ainsi les cellules NK contrôlent indirectement le niveau d'expression des autres molécules du CMH-I et directement celui de la molécule HLA-E grâce à l'interaction de cette dernière avec les complexes CD94/NKG2 (*Braud et al., 1998; Llano et al., 1998*).

- *Le récepteur NKG2D (Natural-Killer group 2 D)*

NKG2D est un récepteur activateur, il s'agit d'un homodimère exprimé de manière constitutive sur les cellules NK, les T CD8 $\alpha\beta$ , les cellules T $\gamma\delta$ , ainsi que sur une sous population de lymphocytes NK T cell-like CD4+ cytotoxique (*de Menthon et al., 2011*). NKG2D reconnaît des ligands du soi dont l'expression est fortement induite lors d'un stress cellulaire (transformation tumorale, infection virale, lésion de l'ADN). Chez l'homme, NKG2D reconnaît et interagit avec une grande diversité de ligands tous apparentés aux molécules du CMH de classe I: les molécules MICA et MICB (Major histocompatibility complex class I related chain A et B), et les ULBPs (UL-16 binding protein) (*Eagle and Trowsdale, 2007*).

L'interaction de NKG2D avec ses ligands induit la formation d'un signal activateur. Pour pouvoir transmettre ce signal, NKG2D s'associe à la molécule adaptatrice DAP10 (*Wu et al., 1999*). NKG2D joue un rôle important dans l'élimination des cellules infectées ou tumorales. Cependant, les virus et les tumeurs ont développé plusieurs stratégies d'échappement. Parmi lesquelles, la sécrétion de facteurs solubles tels que TGF $\beta$  ou la PGE2 qui modulent l'expression, de NKG2D (*Dupuy et al., 2012; Lee et al., 2004*).

#### **II.3.3.3.4. Les récepteurs KIR/CD158**

Chez l'homme, les récepteurs KIR reconnaissent les molécules du CMH de classe I HLA-A, B et C. Chez un même individu, les différentes cellules NK expriment différentes combinaisons des récepteurs KIR. Ceci permet probablement d'augmenter leur sensibilité au changement d'expression des molécules du CMH classe I. Les KIR sont des glycoprotéines transmembranaires de type I. En fonction du nombre de leurs domaines extracellulaires, on peut distinguer deux sous-familles: KIR3D (trois domaines extracellulaires), et KIR2D (deux domaines extracellulaires). Outre le nombre de domaines extracellulaires, les récepteurs KIR diffèrent aussi par la longueur de leur domaine cytoplasmique, caractérisant ainsi les KIR



inhibiteurs et les KIR activateurs. Les récepteurs à domaine intracellulaire long (KIR2DL et KIR3DL) contiennent deux motifs ITIM qui, en recrutant les phosphatases (SHP1 et SHP2), délivrent un signal inhibiteur (*Long et al., 2001*). Au contraire, les récepteurs à domaine intracellulaire court (KIR2DS et KIR3DS) sont dépourvus de motif ITIM. En revanche, ils peuvent transmettre un signal activateur en s'associant avec la protéine adaptatrice DAP12 qui possède un motif ITAM (*Lanier et al., 1998*).

#### **II.3.3.3.5. Les récepteurs ILT/LIR (Immunoglobulin like transcripts/Leucocyte Ig like Receptors)**

Les récepteurs ILT/LIR constituent une grande famille qui comprend plusieurs récepteurs ayant une large distribution cellulaire. Le récepteur LIR1/ILT2 est un récepteur inhibiteur qui peut être exprimé par les cellules NK. Ce récepteur peut reconnaître et interagir avec des molécules du CMH-I classiques et non classiques (*Fanger et al., 1998*). Le LIR1/ILT2 est également capable de lier la protéine UL18 synthétisée par le cytomégalovirus humain (*Cosman et al., 1997*). Cette interaction inhibe les cellules NK et participe ainsi à l'échappement viral à la réponse immunitaire (*Prod'homme et al., 2007*).

#### **II.3.3.3.6. Autres récepteurs impliqués dans l'activation des cellules NK**

De nombreuses molécules sont exprimées à la surface des cellules NK qui peuvent induire ou moduler la fonction de ces cellules, tel que 2B4, CD2, LFA-1, CD28, CD69, NKR-P1. Ces récepteurs sont considérés comme corécepteurs des cellules NK, car ils ne sont pas capables d'activer les cellules NK par eux-mêmes. Par contre, ils peuvent potentialiser les mécanismes effecteurs initiés par d'autres récepteurs stimulateurs (*Tangye et al., 2000*).

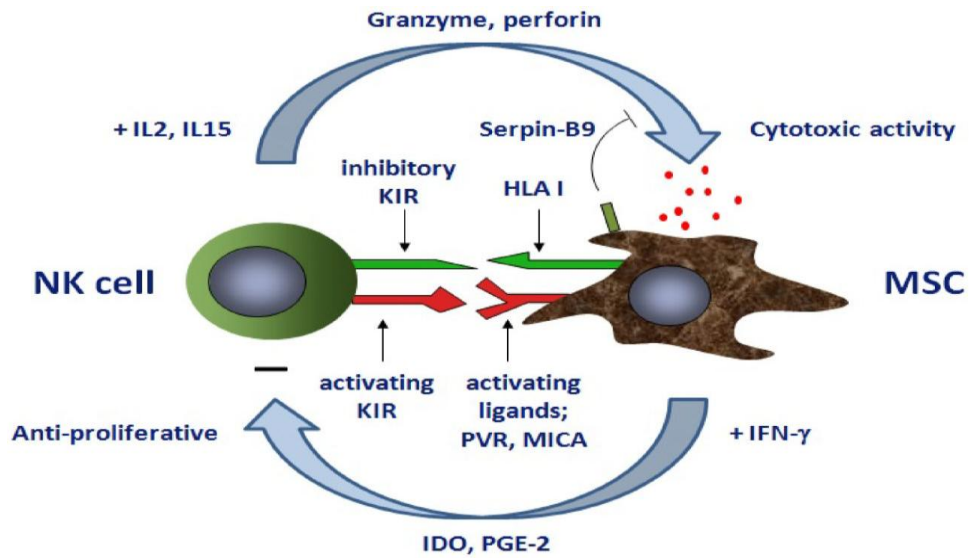
#### **II.3.3.4. Immunomodulation des cellules NK par les CSM**

De nombreuses études ont montré que les CSM peuvent inhiber la prolifération et la production d'INF- $\gamma$  à un faible ratio CSM/NK (1/1 à 1/10) (*Aggarwal and Pittenger, 2005; Sotiropoulou et al., 2006*). Ils ont montré une réduction du potentiel cytotoxique des cellules NK stimulées avec l'IL-2 pendant 4 à 5 jours lors d'une co-culture avec des CSM (*Krampera et al., 2006*).

L'interaction entre les CSM et la cellule NK est complexe (**Figure 10**), et comporte deux aspects : D'une part l'inhibition de la fonction des cellules NK par les CSM et d'autre part l'attaque cytotoxique des CSM par les cellules NK.

Il a été montré que les cellules NK activées par l'IL-2 ou l'IL-15 peuvent reconnaître et lyser les CSM pendant la co-culture (*Crop et al., 2011; Sotiropoulou et al., 2006; Spaggiari et al., 2006*). Les CSM expriment faiblement des molécules du CHM mais expriment des ligands des récepteurs activateurs de cellule NK tel que PVR (Poliovirus Receptor), MIC-A, ceci rendant les CSM comme une cible naturelle des cellules NK. La lyse des CSM par les cellules NK peut être inhibée quand les CSM sont traités par de l'INF- $\gamma$ , qui augmente l'expression des molécules de HLA de classe I à la surface des CSM (*Crop et al., 2011; Götherström et al., 2011*). Il a été montré que les CSM eux même aussi possédaient certains mécanismes pour contrebalancer leur susceptibilité à la lyse des cellules NK, tel que Serpin-B9 (Serine Protease inhibitor 9), qui joue un rôle majeur contre la lyse médiée par le granzyme-B (*El Haddad et al., 2011*). Plus récemment, certaines études ont également montré que les TLRs sont impliqués dans la modulation de l'interaction CSM/NK. Les CSM expriment une variété de TLRs et la modulation de l'interaction entre le CSM et la cellule NK via l'activation de TLRs différents de CSM (*Yagi et al., 2010*). La stimulation de TLR3 protège le CSM contre la lyse des NK, et ainsi augmente l'immunosuppression de CSM sur la cellule NK (*Giuliani et al., 2014*). En revanche, la stimulation de TLR2 réduit la capacité immunomodulatrice des CSM (*Lei et al., 2011*). Donc la pré-stimulation de TLR peut représenter un moyen possible d'induire l'immunosuppression des CSM sur l'activation des cellules NK.

D'autre part, les CSM peuvent également altérer fortement le phénotype des cellules NK et supprimer leurs fonctions effectrices telles que la sécrétion de cytokines et la cytotoxicité. Cet effet inhibiteur des CSM est associé à une diminution de l'expression des récepteurs activateurs à la surface des cellules NK. Il est principalement médié par des facteurs solubles sécrétés par les CSM : PGE<sub>2</sub>, IDO et TGF $\beta$  (*Sotiropoulou et al., 2006; Spaggiari et al., 2008*).



**Figure 10.** L'interaction entre le CSM et la cellule NK les CSM inhibent la prolifération des cellules NK via la sécrétion d'IDO et de PGE2. Les cellules NK activées par IL2 / IL15 augmentent positivement l'expression de granzyme et de perforine et peuvent lyser les MSC allogéniques et autologues. La lyse dépend de l'expression équilibrée des ligands inhibant les récepteurs de cellules NK activant et inhibant le MSC. Serpin-B9 des MSC peut inhiber l'activité granzyme et protège ainsi la MSC de la lyse par les cellules NK. (Reinders and Hoogduijn, 2014)

## II.4. Facteurs sécrétés impliqués dans l'immunomodulation de CSM

Les effets immunomodulateurs des CSM sur différentes cellules immunitaires sont exécutés conjointement par des contacts cellulaires et des facteurs sécrétés. Bien que tous ces mécanismes ne soient pas complètement compris, de nombreuses études suggèrent que les principaux effecteurs de l'effet immunomodulateur des CSM sont des facteurs sécrétés. L'analyse du sécrétome afin de déterminer le facteur principalement responsable des effets observés est un enjeu majeur.

Les CSM sécrètent des cytokines, soit spontanément, soit après l'induction par d'autres cytokines telles que l'IFN- $\gamma$ , le TNF- $\alpha$  et l'IL-1 $\beta$ . Cependant le profil de sécrétion des cytokines des CSM est influencé par les conditions du microenvironnement local. Les cytokines pro-inflammatoires (l'IFN- $\gamma$ , l'TNF- $\alpha$  et l'IL-1 $\beta$ ) favorisent la sécrétion de cytokines anti-inflammatoires (*Gazdic et al., 2015*). Les CSM sécrètent divers facteurs solubles qui ont un effet immunomodulateur sur les cellules immunitaires innées et adaptatives, décrit dans le **Tableaux 2**.

### II.4.1. Interleukine 10 (IL-10) :

L'IL-10 est une cytokine pléiotropique, caractérisée par son effet anti-inflammatoire lié à l'induction d'une tolérance immunitaire (*Ng et al., 2013*). L'IL-10 est la cytokine la plus couramment décrite en relation avec les effets immunomodulateurs des CSM. D'après certaines études, les CSM sécrètent de l'IL-10 dans des conditions spécifiques de l'environnement inflammatoire, la présence de cytokines telle que l'IFN- $\gamma$ , le TNF- $\alpha$  et l'IL-1 $\beta$  (*Gazdic et al., 2015; Shi et al., 2010*). L'IL-10 peut supprimer les fonctions des macrophages et des neutrophiles, et inhiber la réponse de Th1 (*Kyurkchiev et al., 2014; Mocellin et al., 2005*). La fonction principale de l'IL-10 dans l'induction de tolérance immunitaire est son effet sur les CPA et en particulier sur les DCs. L'IL-10 inhibe la production des cytokines pro-inflammatoires des DCs (TNF- $\alpha$ , IL-1, IL-6, IL-8, IL-12), l'expression des molécules CMH de classe II et les molécules de co-stimulation (*Yang et al., 2006*). L'IL-10 est capable de rendre les lymphocytes T anergiques après leur interaction avec les DCs. De plus, l'IL-10 est une des cytokines liées à l'expansion des lymphocytes Treg. Ces derniers sécrètent de l'IL-10 par eux-mêmes, et ce processus a été décrit à la fois pour les Treg naturels (nTreg) et les Treg inductibles (iTreg) (*Heo et al., 2010*). Les CSM semblent

jouer aussi un rôle dans la stimulation indirecte de la sécrétion d'IL-10 par d'autres cellules immunitaires. Il a été démontré que les CSM régulent la sécrétion d'IL-10 par les PBMCs (Kyurkchiev et al., 2013), ainsi que par les macrophages tolérogènes (*Eggenhofer et al., 2014*) et les DCs tolérogènes (*Ivanova-Todorova et al., 2009*). Certaines études supposent également que les CSM induisent la génération de Treg (*Duffy et al., 2011; Gazdic et al., 2015; Ivanova-Todorova et al., 2012; Kyurkchiev et al., 2013*).

#### **II.4.2. Interleukine 6 (IL-6) :**

L'interleukine 6 est une cytokine pléiotropique, qui joue des rôles importants dans nombreux de processus tel que l'hématopoïèse, l'inflammation, la survie cellulaire, la prolifération cellulaire et l'oncogenèse (*Kishimoto, 2010; Yun et al., 2012*). L'IL-6 est généralement considérée comme une cytokine pro-inflammatoire classique, qui peut augmenter le recrutement des neutrophiles (*Scheller et al., 2011*), stimuler la prolifération des lymphocytes T (Xing et al., 1998), et avec l'IL-4, participent à la génération de la réponse des cellules Th2 (Scheller et al., 2011). Il joue également un rôle significatif dans la réponse immunitaire humorale, en stimulant la différenciation des lymphocytes B (*Kimura and Kishimoto, 2010; Kyurkchiev et al., 2014*). A l'inverse, des études récentes ont montré que cette cytokine peut jouer aussi un rôle anti-inflammatoire par la suppression de la sécrétion d'autres cytokines pro-inflammatoires (*Steensberg et al., 2003; Tilg et al., 1994*). En effet, certains travaux ont montrés que l'IL-6 en présence de TGF $\beta$  serait impliqués dans la régulation de l'équilibre entre les cellules Th17 et les Treg (*Kimura and Kishimoto, 2010; Scheller et al., 2011*). Contrairement à l'IL-10, les CSM secrètent l'IL-6 de façon constitutive mais son expression peut être potentialisée par des cytokines pro-inflammatoires (*Chan et al., 2012; Gazdic et al., 2015*). Au niveau transcriptomique et protéique, l'IL-6 possède le plus haut niveau d'expression de toutes les cytokines sécrétées par les CSM, cela suggère que l'IL-6 est à la base des effets immunomodulateurs des CSM (*Park et al., 2009*).

#### **II.4.3. TGF $\beta$ (transforming growth factor beta)**

Quantitativement, le TGF $\beta$  est l'une des cytokines immunomodulatrices la plus sécrétée constitutivement par les CSM. Il est considéré comme un médiateur principal de la régulation immunitaire et joue un rôle essentiel dans la résolution des réponses inflammatoires ainsi que

dans l'induction et le maintien de la tolérance immunitaire en influençant la prolifération, la différenciation, l'activation et la survie leucocytaire (Kyurkchiev et al., 2014). La diversité des activités modulatrices du TGFβ sur les fonctions des cellules immunitaires est assez vaste et comprend des effets tels que l'inhibition de la prolifération et les fonctions effectrices des lymphocytes T, la génération de cellules Treg à partir des lymphocytes T naïfs, l'atténuation de la production de cytokines et l'activité cytolytique des cellules NK, la suppression de l'activité des cellules B, des cellules dendritiques et des macrophages (Yoshimura and Muto, 2011).

#### **II.4.4. IDO (indoleamine-2,3-dioxygenase)**

IDO est une enzyme de catabolisme du tryptophane, elle possède des effets immunosuppresseurs et antimicrobiens. L'IDO est un immunorégulateur synthétisé par les CSM humaines, après induction par des cytokines pro-inflammatoires, principalement par l'INF-γ (Liang et al., 2013). L'IDO n'est pas un facteur exclusif pour l'immunomodulation des CSM à l'état basal, mais il est essentiel pour la suppression des CSM en présence de l'INF-γ (Gazdic et al., 2015). L'IDO soit de manière directe, soit de manière indirecte, inhibe la prolifération et induit l'apoptose des lymphocytes T et B et favorise l'expansion des cellules Treg de type 1 (IL-10+INF-γ+CD4+ ; Tr1) (Hsu et al., 2013). Ainsi la neutralisation de l'IDO induit une réduction de l'expansion de ces cellules (Erkers et al., 2013). De plus, l'IDO participe à l'inhibition de la maturation et de la fonction des DCs, et à la polarisation des DCs et macrophages vers un phénotype tolérogène (François et al., 2012; Gazdic et al., 2015).

#### **II.4.5. PGE2 (prostaglandine E2) :**

Les prostaglandines (PG) sont des produits de la cyclooxygénase (COX) synthétisés à partir de l'acide arachidonique. Il a deux forme de COX, la COX-1 qui est constitutivement exprimée à partir d'un grand nombre des tissus, tandis que la COX-2 est induite dans des conditions inflammatoires, qui préférentiellement métabolisent la PGE2 (Brock et al., 1999; Crofford, 1997), qui à un rôle de manière paracrine et autocrine sur les cellules environnantes. Les CSM sécrètent constitutivement des niveaux détectables de PGE2, mais qui est aussi inductible dans des conditions inflammatoires (Aggarwal and Pittenger, 2005; Németh et al.,

2009). Plusieurs études ont montré que le contact direct des PBMCs, des monocytes/macrophages et des cellules NK avec les CSM induit une augmentation de la production de PGE2 (Chen et al., 2010). En retour, le PGE2 régule la prolifération, la différenciation et la fonction des lymphocytes T, des cellules NK, des monocytes/macrophages, et bloque la maturation des DCs (Németh et al., 2009; Spaggiari et al., 2009; Van Elssen et al., 2011).

#### **II.4.6. Chimiokines:**

Ce sont une famille de petites protéines structurellement apparentés avec des molécules relativement petites (7.5 à 12.5kDa) avec les propriétés chimio-attractives. Les CSM sécrètent diverses chimiokines *in vitro*, telles que CCL2/3/4/5/7/20/26, CXCL1/2/5/8/10/11/12 et les CX3CL1. Il est raisonnable de supposer que les types et les combinaisons de chimiokines exprimés par des CSM peuvent varier en fonction du microenvironnement et les contacts spécifiques avec les cellules environnantes, d'autant plus que celles-ci sont des cellules immunitaires. Les cellules cibles attirées par le groupe précité de chimiokines sont des neutrophiles, les monocytes, les éosinophiles, les basophiles, les lymphocytes T et B, les DCs, les cellules NK, et progéniteurs hématopoïétique endothéliales (Meirelles et al., 2009).

Des études ont démontré que les chimiokines médiaient l'interaction entre les CSM et d'autres cellules immunitaires en attirant ces dernières à proximité des CSM, qui régulent ensuite la fonction des cellules recrutées (Li et al., 2012a; Ren et al., 2008). D'autre part, ces chimiokines secrétées par les CSM, agissent d'une manière autocrine conduisant à la migration des cellules souches vers les sites de lésion tissulaires, puis renforcent l'activité immunomodulatrice (Boomsma and Geenen, 2012; Zischek et al., 2009). L'ensemble de ces résultats supposent que les chimiokines peuvent être considérées comme un facteur crucial pour exercer l'activité immunomodulatrice des CSM *in vivo*.

Facteurs secrétés par les CSM	Cellules cible
IL-10	Mph, Neu, DCs, Th1, Treg, cellules tumorales
IL-6	Neu, Mo, DCs, B, Th2, Treg, Th17, CD8FoxP3+
TGF $\beta$	Mph, NK DCs, B, T, Treg
IDO	Mo, DCs, B, T, Tregs
PGE2	Mph, Mo, NK, DCs, T,
Chimiokines	Neu, Mo, NK, Eo, Baso, DCs, Ly

**Tableau 2. Les facteurs secrétés par les CSM et ses cibles correspondant, d'après (Kyurkchiev et al., 2014)**

*B : lymphocytes B, DCs: cellules dendritiques, Mph : macrophage, Mo : monocytes, Neu : neutrophiles, T : lymphocyte T, Treg : lymphocyte T regulateurs, Th : lymphocyte T helper, Eo Eosinophiles, Baso : Basophils, Ly : Lymphocytes. TGF- $\beta$ : transforming growth factor  $\beta$ , IDO: idoleamine-2-,3-dioxygenase, PEG2 : prostaglandine E2.*



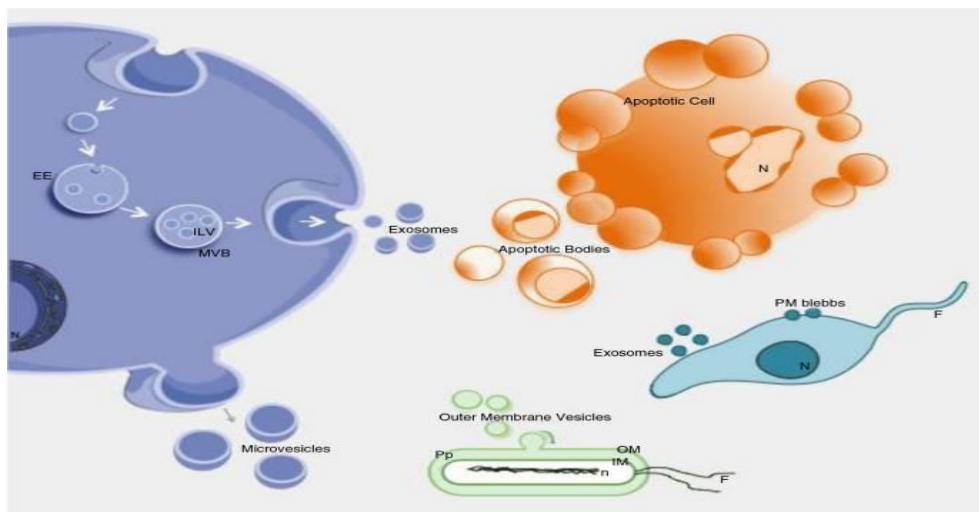
### III. VESICULES EXTRACELLULAIRES (VE)

#### III.1. Généralités

Parmi les facteurs sécrétés par les CSM, certains sont libres, solubles, alors que d'autres sont associés à des vésicules membranaires. Les vésicules extracellulaires (VEs) sont des vésicules membranaires contenant du cytosol des cellules sécrétantes, enfermées dans une bicouche lipidique. Ce mode de sécrétion est très conservé par les cellules allant d'organismes tels que des procaryotes à des eucaryotes supérieurs (**Figure 10**) (*Raposo and Stoorvogel, 2013; Waters and Bassler, 2005*). Les premières observations des VE sont qu'elles étaient produites dans divers contextes physiologiques, mais sans la prise de conscience que leur fonction est une propriété biologique cellulaire universellement partagée. En 1946, les VEs ont été observées en tant que particules pro-coagulantes dérivées de plaquettes dans le plasma normal (*Chargaff and West, 1946*). Plus tard, elles ont été dénommées « poussière de plaquette » par *Wolf* en 1967 (*Wolf, 1967*). Dans les années 1970 à 1980, des observations indépendantes de VE incluent la libération de vésicules de la membrane plasmique à partir de cellules d'adénome rectal (*De Broe et al., 1975*), des particules virales dans des cultures cellulaires humaines et du sérum bovin (*Benz and Moses, 1974; Dalton, 1975*), et la détection de vésicules, appelées prostasomes (*Stegmayr and Ronquist, 1982*), dans le liquide séminal (*Ronquist et al., 1978*). A la même époque, les premières observations de fragments membranaires provenant de tumeurs ont été faites (*Taylor et al., 1980*), elles ont également démontré une propriété pro-coagulante (*Dvorak et al., 1981*). En 1983, des études ultra-structurales détaillées ont montré que les vésicules sont également libérées à partir des corps multi-vésiculaires (MVBs : *multi-vesicular bodies*) qui proviennent d'endosomes multivésiculaires (MVE : *multivesicular endosome*) fusionnant avec la membrane cellulaire lors de la différenciation des globules rouges immatures (*Harding et al., 1984; Johnstone et al., 1987*). Une décennie plus tard, *Raposo* et ses collègues ont démontré que ces vésicules, appelées alors exosomes, isolées à partir de lymphocytes B transformés par le virus Epstein-Barr, sont capables de présenter des antigènes et d'induire des réponses des lymphocytes T (*Raposo et al., 1996*). En 2006-2007, avec la découverte que les VEs contiennent de l'ARN, y compris des microARN, les VEs ont acquis un intérêt renouvelé en tant que médiateurs de la communication cellulaire (*Ratajczak et al., 2006; Valadi et al., 2007*).

### III.1.1. Classification

La classification de ces vésicules repose sur leurs propriétés morphologiques telle que la taille et la densité, leur mécanismes de biogenèse, leurs propriétés fonctionnelles, ainsi que sur le type et le statut physiopathologiques des cellules qui les sécrètent, tels que la différenciation cellulaire, le stress, l'état stimulé ou transformé (Théry *et al.*, 2009a). Une étape importante dans le développement récent des VE, est le travail collaboratif depuis l'année 2011 des membres de la Société internationale des vésicules extracellulaires (ISEV pour *International Society of Extracellular Vesicles*: [www.isev.org/](http://www.isev.org/)) dans le but d'unifier la nomenclature et les méthodologies d'étude des VEs. A l'heure actuelle, trois grands sous-groupes de VE ont été définis (Gould and Raposo, 2013) (Figure 10, Tableaux 3).



**Figure 11. Représentation schématique de la sécrétion des microvésicules de différentes origines**

Les exosomes générés par voie endocytaire, sont sécrétés dans l'espace extracellulaire par exocytose via la fusion de CMV (MVB multivesicular bodies). Les microvésicules (ou ectosomes) générées directement par bourgeonnement de la membrane plasmique. Les corps apoptotiques sont libérés par fragmentation des cellules apoptotiques. Les procaryotes, tels que les bactéries et les parasites sont également capables de sécréter des VE. OVM (outer membrane vesicles). Elles sont formées par bourgeonnement vers l'extérieur de la membrane externe des bactéries Gram négatives. EE : early endosome ; iLV : intraluminal vesicles ; N : Nucleus ; Pp : periplasm ; OM : outer membrane ; IM : inner membranes ; F : flagella (Yáñez-Mó *et al.*, 2015).

- **les exosomes** sont une population homogène avec un diamètre de 30 à 150nm et une densité de 1.09 à 1.18 g/ml. Ils ont des marqueurs associés, tels que Alix, Tsg101 (tumor susceptibility gene protein 101), et les tétraspanines (CD9, CD63, CD81) (Greening *et al.*,

2015; Théry et al., 2006) . Ils ont une origine endosomale, et sont stockés et libérés par exocytose via la fusion de corps multivésiculaires (MVBs) avec la membrane plasmique (Mathivanan et al., 2010)

- **les microvésicules (MVs)**, aussi connu comme les ectosomes, sont de plus grosses particules, avec un diamètre de 200 à 1000nm et représentent une population de vésicules relativement hétérogènes. La formation des MVs se fait par bourgeonnement de petites protubérances cytoplasmiques suivies par leur détachement du plasma. Par conséquent, il a été suggéré que la composition de la membrane des microvésicules reflète celle des cellules mères d'une manière plus étroite que celle des exosomes (EL Andaloussi et al., 2013).
- **les corps apoptotiques** : sont des grosse particules avec un diamètre de 1 à 5µm et ayant une densité à 1.16 à 1.23g/ml (Théry et al., 2001a). Ils sont libérés lors de la fragmentation des membranes plasmiques qui se produit pendant l'apoptose.

Des caractéristiques spécifiques ont été proposées pour ces sous-groupes d'EV., mais il existe actuellement un manque de marqueurs spécifiques largement acceptés pour distinguer ces populations (Kalra et al., 2013; Tauro et al., 2012). Cela s'explique en partie par le manque de normalisation des procédures d'isolement et des méthodes de caractérisation des sous-groupes d'EV. Cependant, dans la littérature, la nomenclature est incompatible, et le terme «microvésicules » est souvent utilisé comme générique pour englober les exosomes et les MVs (Lai et al., 2015a), tandis que les corps apoptotiques ont l'activité et un contenu distinct avec ces deux premières (Tableau 3)

Type d'EVs	Caractéristiques			
	Origine	Taille	Marqueurs	Contenues
<b>Exosomes</b>	Origine endosomal, libérés par fusion de CMV à membrane plasmique	30-150nm	Tétraspansins (CD9, CD63 et CD81) composant ESCRT, Alix et Tsg101	Protéines cytoplasmiques avec la présence d'ARNm, miARN, et d'autres ARNs non codant

<b>Microvésicules</b>	Bourgeonnement direct de la membrane plasmique	200-1000nm	Intégrines, sélectines, tétraspanins et des marqueurs cellulaires liés à la membrane.	Protéines cytoplasmiques avec la présence d'ARNm, miARN, et d'autres ARNs non codant
<b>Corps apoptotiques</b>	La fragmentation de la membrane plasmique au cours de l'apoptose	1-5µm	Phosphatidyl-sérine et des marqueurs cellulaires liés à la membrane	fragments nucléaires, organelles, protéines cytoplasmiques

**Tableau 3 : Les principales caractéristiques de trois classes d'EVs tels que la taille, l'expression du marqueur et leur contenu.** *CMV: corps multivésiculaires. ESCRT: endosomal sorting complex required for transport; Alix: apoptosis-linked gene-2-interaction protein X; miARN : microARN ; ARNm : ARN message*

### III.1.2. Les VEs sécrétées par les CSM.

L'effet paracrine des CSM est décrit dans le chapitre précédent, de nombreuses études ont montré que ces cellules synthétisent et sécrètent un large spectre des facteurs solubles qui jouent un rôle clé dans les fonctions régénératives et immunomodulatrices. Une grande partie des efforts initiaux pour identifier les agents thérapeutiques actifs dans la sécrétion des CSM sont concentrés sur des petites molécules telles que des cytokines, des facteurs de croissance, des chimiokines. En 2009, *Bruno* et ses collègues ont démontré que les CSM sécrètent des microvésicules de diamètre 80nm à 1 µm qui ont un effet de protection contre les lésions tubulaires aiguës rénales (*Bruno et al., 2009*). En 2010, un autre groupe a ensuite montré que les CSM sécrètent une classe spécifique de VE appelés exosomes avec un diamètre de 40 à 100nm, qui ont une origine endosomale et expriment des marqueurs spécifiques des exosomes

tels que Alix, TSG101 et Tetraspanins (*Lai et al., 2010a*). Depuis lors des VEs ont été de plus en plus rapportées comme l'agent thérapeutique important, sécrété par les CSM (*Akyurekli et al., 2015*). De nos jours, les CSM ont été signalées comme sécrétant plusieurs classes de VEs dénommées microvésicules, microparticules et exosomes. Cependant, il est évident que ces différentes classes de VEs représentent des entités biologiques distinctes. Une partie de la confusion des résultats réside dans le fait que ces VEs n'ont pas de critères physiques et biochimiques bien clairs pour être définies et pour différencier chaque catégorie de VEs (*Yeh Yeo et al., 2013*).

Comme décrit précédemment, les VEs sont impliquées dans la communication cellulaire lors du transfert des biomolécules fonctionnellement actives (**Tableau 3**), et ainsi, peuvent être exploitée pour un usage thérapeutique d'une manière similaire à leurs cellules parentales. Certaines études *in vivo* ont déjà montré que les VEs dérivées des CSM ont des effets thérapeutiques encourageants dans divers modèles animaux. Par exemple, les VEs ont montré un potentiel régénératif, une augmentation de l'angiogenèse dans un modèle de maladie cardiovasculaire (*Lai et al., 2010a; Sluijter et al., 2014*) ; une réduction de la fibrose dans un modèle d'insuffisance rénale (*Gatti et al., 2011; He et al., 2012*), et u une inhibition de l'inflammation artérielle et une réduction de l'hypertension pulmonaire (*Lee et al., 2012; Zhu et al., 2014*). Leur isolement à partir de CSM est potentiellement reproductible. En outre, par rapport aux thérapies à base de cellules entières, les EVs peuvent offrir des avantages spécifiques du point de vue de la sécurité des patients, comme elles possèdent une plus faible propension à déclencher des réponses immunitaires innées/ adaptatives et l'incapacité à former directement des tumeurs (*Mokarizadeh et al., 2012*), ou à former des agglomérats dans les vaisseaux pulmonaires (*Toma et al., 2009*).

## III.2. Exosomes

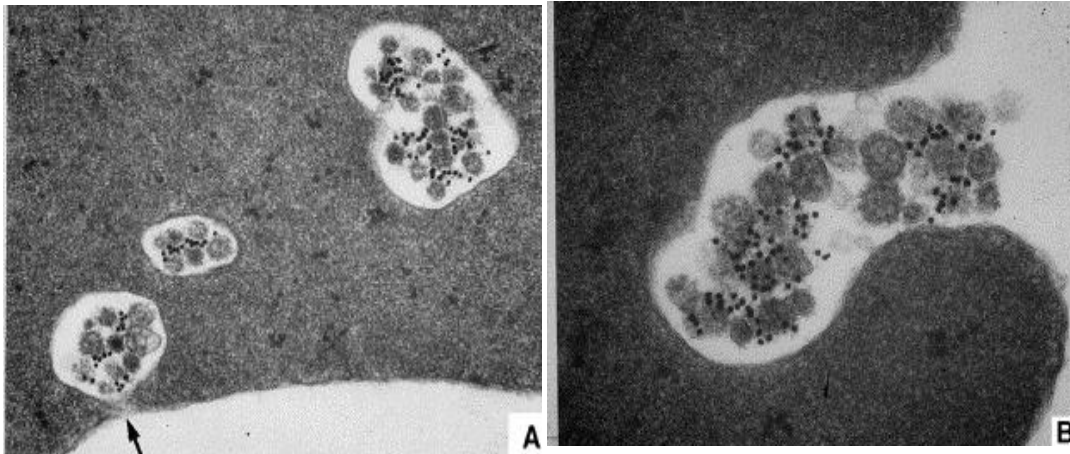
### III.2.1 Généralité

Actuellement, parmi les VEs, les mieux caractérisées sont les exosomes. Le terme «exosome» provient de la contraction de deux mots d'origine grecque: 'exô' (hors de) et 'sôma' (le corps). Depuis leur découverte dans les années 80, les exosomes suscitent un intérêt grandissant sur PubMed (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gate2.inist.fr/pubmed>), le nombre de publications répertoriées est passé de 5 articles référencés entre 1980 et 1989, à 25 publications (dont 3 revues scientifiques) dans les années 90, puis à 705 publications (dont 148 revues scientifiques) entre 2000 et 2010 et à 2545 publications (dont 737 revues scientifiques) entre 2010 et 2016.

Préalablement considérés comme les transporteurs de déchets cellulaires qui permettent l'élimination des protéines qui ne sont plus indispensables à la cellule, les exosomes sont de plus en plus considérés comme des vésicules intervenant dans la communication intercellulaire et dans les processus immunologiques de présentation d'antigènes (*Pant et al., 2012; Pegtel et al., 2010; Théry et al., 2009b*). Plusieurs types de cellules ont été décrites comme sources d'exosomes *in vitro* tels que les cellules hématopoïétiques, les lymphocytes B, les lymphocytes T, les cellules dendritiques, les mastocytes et les plaquettes (*Heijnen et al., 1999; Quah and O'Neill, 2000; Raposo et al., 1996; Skokos et al., 2002*), les cellules épithéliales intestinales, les cellules de Schwann, les cellules neuronales, les adipocytes, et les cellules tumorales (*Fauré et al., 2006; van Niel et al., 2001; Simons and Raposo, 2009*), etc. Les exosomes sont trouvés *in vivo* dans plusieurs liquides biologiques tels que l'urine, le plasma, le liquide séminal, le liquide amniotique, les épanchements pleuraux malins, l'ascite, le liquide de lavage broncho-alvéolaire, le liquide synovial et le lait maternel (*Raposo and Stoorvogel, 2013*).

La notion d'exosomes est apparue au cours des années 80, période pendant laquelle l'équipe de R. Johnstone étudiait le devenir du récepteur de la transferrine (TfR) lors de la maturation des réticulocytes de mouton en érythrocytes. Le TfR est la protéine majoritaire de la membrane plasmique des réticulocytes, le devenir de ce récepteur a été suivi grâce à l'utilisation d'anticorps monoclonaux couplés à des billes d'or colloïdal. En microscopie électronique (ME), il a été observé un phénomène d'endocytose de la protéine membranaire, suivi d'une concentration croissante au sein de vésicules présentes dans un compartiment

endosomal dont la taille augmentait au fur à mesure que des vésicules marquées apparaissaient (*Johnstone et al., 1987*). Enfin, la fusion de cet endosome avec la membrane plasmique aboutissait à la libération, dans le milieu extracellulaire, du marquage spécifique de la protéine d'intérêt au sein de nano-vésicules d'un diamètre moyen de 50 nanomètres (**Figure 11**) (*Johnstone, 1992, 2005; Pan et al., 1985*).



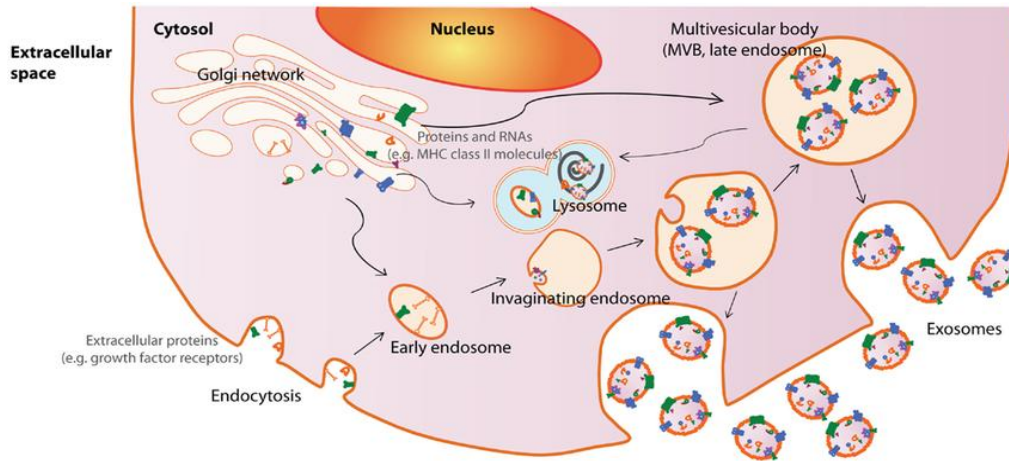
**Figure 12. Photos de microscopie électronique des exosomes dans le réticulocyte de mouton au cours de la maturation** A) Le corps multivésiculaire (MVB) contenant le récepteur de la transferrine, qui est marqué par des anticorps monoclonaux couplés à des billes d'or colloïdal. La flèche noire montre un MVB commençant à fusionner avec la membrane plasmique. B) libération des exosomes suite à la fusion des MVBs avec la membrane plasmique (*Johnstone, 2005*).

### III.2.2 Biogenèse d'exosomes.

L'analyse de la composition protéique des exosomes révèle que leur biogenèse est liée aux différentes étapes de la maturation des endosomes. Aucune protéine d'origine nucléaire, mitochondriale, du réticulum endoplasmique ou de l'appareil de Golgi n'est retrouvée au sein des exosomes, confirmant ainsi leur origine endosomale (*Théry et al., 2002a*).

Au cours de l'endocytose (**Figure 12**), différentes macromolécules présentes dans le milieu extérieur et/ou la membrane plasmique sont captées ou internalisées par les cellules. Ces molécules internalisées sont ensuite dirigées vers les différents compartiments endosomaux tels que les endosomes précoces, ce dernier va subir un processus de maturation pour devenir un endosome tardif. L'endosome tardif est à l'origine de MVB. au niveau des endosomes, une invagination de la membrane endosomale permet la formation de MVB. La fusion des MVBs avec les lysosomes aboutit à la dégradation du contenu endosomal. Ensuite, la fusion

des MVB avec la membrane plasmique permet la libération de leur contenu, les vésicules intraluminales (ILVs *intraluminal vesicles*) qui prennent le nom d'exosomes dans le milieu extérieur (*Waldenström and Ronquist, 2014*).



**Figure 13. Représentation schématique de la biogenèse et la sécrétion des exosomes.**

*Les exosomes sont libérés par les cellules lorsque les organelles intracellulaires appelés corps multivésiculaires (MVB) fusionnent avec la membrane plasmique. Les MVB sont formés par des invaginations d'endosomes tardifs, qui contiennent des molécules provenant du Golgi (par exemple, CMH de classe II) ou de la membrane plasmique (par exemple, les récepteurs du facteur de croissance). Par conséquent, les exosomes contiennent des matières cytosoliques et sont enrichis en marqueurs de protéines associés aux endosomes tels que les molécules Rab, ALIX, TSG101 ou les protéines endocytaires, tels que les récepteurs de transferrine et les clathrines (*Zhang et al., 2014a*).*

### III.2.3. Composition des exosomes

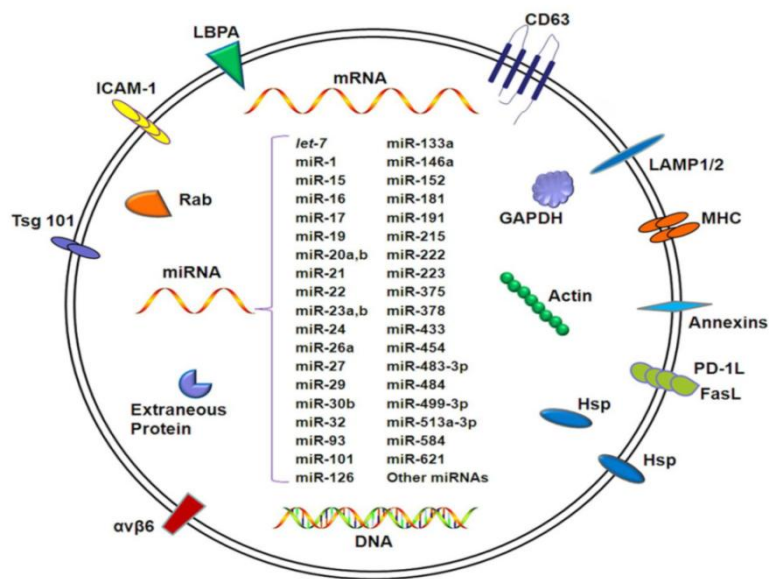
Comme décrit dans le chapitre précédent, entourée d'une bicouche lipidique, la lumière des exosomes est une fraction cytosolique, dépourvue d'organelles comme les mitochondries, le réticulum endoplasmique, le noyau ou l'appareil de Golgi (*Hu et al., 2012*).

La composition des exosomes est dépendante de leur origine cellulaire, et de l'état physiologique de la cellule qui les sécrète (*Zhang et al., 2014a*). Le contenu des exosomes comprend des protéines solubles, des protéines transmembranaires, des lipides et des acides nucléiques (**Figure13**).



### III.2.3.1. Composition protéique

La composition protéique des exosomes reflète le type cellulaire qui les a produits et leur origine endosomale. Les protéines présentes dans les exosomes révèlent également leurs possibles fonctions physiologiques et leurs propriétés d'adhésion. La base de données ExoCarta regroupe plus de 9000 protéines différentes qui ont été retrouvées dans les exosomes issus de différentes sources (ExoCarta <http://exocarta.org/index.html>). Les composants protéiques des exosomes sont distingués en deux types.



**Figure 14. Représentation graphique du composant d'un exosome.** Les exosomes portent un large panel de molécules, y compris les protéines, les ARN., qui dépendent de leur cellule d'origine, l'état physiologique et pathologique de l'hôte et les stimuli extracellulaires. Le contenu des exosomes peut être transféré des cellules d'origine aux cellules cibles, ce qui représente un réseau de communication intercellulaires élaboré (Hu et al., 2012).

Les protéines ubiquitaires que l'on retrouve dans tous les exosomes sécrétés, sont majoritairement des protéines impliquées dans la biogenèse des exosomes qui permet de caractériser les exosomes comme des vésicules dérivées de la voie endosomale, et plus particulièrement des protéines retrouvées dans les MVB (van Niel et al., 2006). Les analyses protéomiques d'exosomes d'origines différentes (des cellules et des liquides biologiques) ont démontré que ces protéines sont communément retrouvées dans tous les exosomes : les tétraspanines (CD9, CD63 et CD81), les protéines impliquées dans la biogenèse d'exosomes (Alix et Tsg101) et les protéines de choc thermique (Hsc70, Hsp90), les protéines ancrées à la

membrane via le groupement glycosyl-phosphatidylinositol (GPI), ainsi que des molécules d'adhésion telle qu'ICAM (intercellular adhesion molécule), et des intégrines. Des protéines du cytosquelette (actine, tubuline et moesine) (*Hu et al., 2012; Théry et al., 2009c*).

L'autre type de protéines qui sont des protéines spécifiques du type cellulaire et du statut physiopathologique des cellules au moment de la formation des MVBs (*Yang and Robbins, 2011; Yuyama et al., 2008*). Ces protéines sont héritées des cellules parentales comme : les molécules CMH de classe II présentent que dans les exosomes des CD4 et les lymphocytes B (*Muntasell et al., 2007; Zitvogel et al., 1998*); les granzymes et les perforines retrouvés dans ceux des lymphocytes T cytotoxiques (*Blanchard et al., 2002*).

### III.2.3.2. Composition lipidique

La base de données ExoCarta liste également tous les lipides identifiés dans les exosomes. A ce jour, >1000 lipides ont été répertoriés dans cette banque (*ExoCarta <http://exocarta.org/index.html>*). Comme décrit précédemment, les exosomes ont une origine endosomal, la composition lipidique de leur membrane est donc celle des MVB, elle-même issue de la membrane plasmique où l'endocytose a eu lieu. Contrairement à la membrane plasmique, les exosomes contiennent plus de sphingomyéline, de cholestérol, de gangliosides, de phospholipides (*phosphatidylcholines, phosphatidylsérine, et phosphatidylethanolamines, etc*). Ainsi la membrane exosomale présente un enrichissement des acides gras saturés, tel que sphingolipides (*Morel et al., 2011*). La composition lipidique particulière des exosomes leur permet d'avoir une membrane beaucoup plus rigide que celle de la membrane plasmique d'une cellule. Ceci pourrait expliquer la résistance élevée des exosomes aux changements physico-chimiques dans le milieu extracellulaire (*Yáñez-Mó et al., 2015*). *Fitzner* et ses collègues ont suggéré que l'enrichissement en phosphatidylsérine dans la couche externe de la membrane exosomale peut faciliter leur internalisation par les cellules receveuses (*Fitzner et al., 2011*). Par conséquent, la connaissance de la composition lipidique, notamment celle qui confère la stabilité et la capacité de l'internalisation des exosomes, peut être utilisée pour améliorer les systèmes de délivrance des médicaments liposomaux.

### III.2.3.3. Les carbohydrates

Les exosomes comportent des résidus saccharidiques au niveau de leur couche lipidique externe. Cette dernière est enrichie en mannose, polylactosamine, acide alpha-2,6 sialique et en complexes N-glycannes. Des travaux récents semblent indiquer qu'ils participeraient au tri et à la reconnaissance des glycoprotéines et des glycolipides entre les exosomes et les cellules cibles (*Batista et al., 2011; Vlassov et al., 2012*).

### III.2.3.4. Composition en acides nucléiques

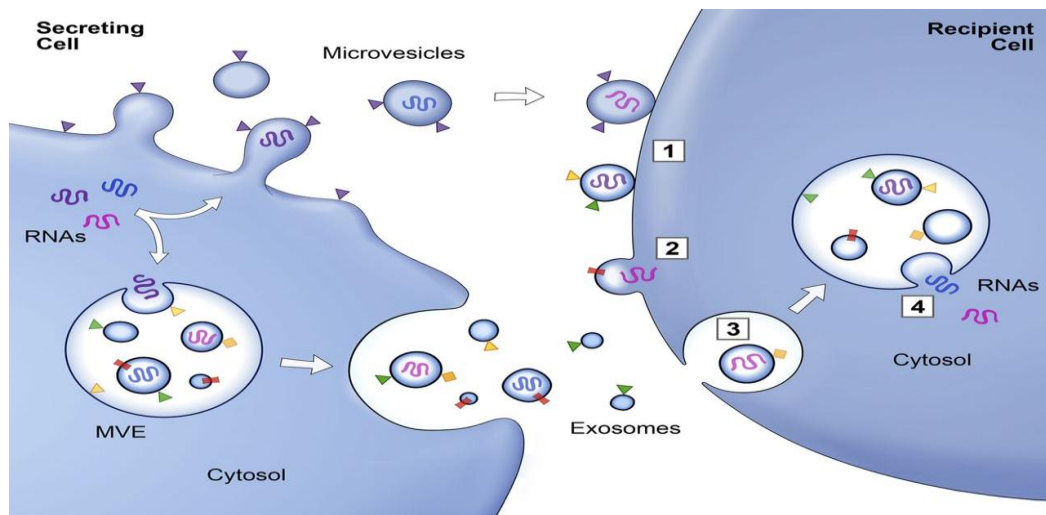
Des matériels génétiques sous forme d'acide ribonucléique (ARN messenger (ARNm) et microARNs (miARN)) sont abondants dans les exosomes. Dans ExoCarta, plus de 3000 ARNm et 2000 miARNs sont répertoriés (ExoCarta <http://exocarta.org/index.html>). De nombreux ARNs sont trouvés enrichis dans les exosomes par rapport aux profils d'ARN des cellules d'origines (*Nolte-'t Hoen et al., 2012*). Certains articles rapportent que les ARN de petite taille et non codant sont prédominant dans les exosomes par rapport à ceux retrouvés dans les cellules parentales (*Bellingham et al., 2012; Eirin et al., 2014; Miranda et al., 2014*). Les mécanismes possibles impliqués dans l'incorporation des ARN dans les exosomes ont également été identifiés (*Zaborowski et al., 2015*). Il est proposé que les modification post-transcriptionnelle à l'extrémité 3' pourra conduire des miARN à entrer dans les exosomes (*Koppers-Lalic et al., 2014*). Le processus d'incorporation des miARN serait dépendant des céramides. Leur biosynthèse est régulée par l'enzyme nSMase2 (*neutral sphingomyelinase2*). La répression par un inhibiteur biochimique de l'action de la nSMase2 (GW4869) réduit la quantité de miARNs incorporés et sécrétés par les exosomes (*Iguchi et al., 2010*).

Contrairement à l'ARN, la présence d'ADN dans les exosomes est beaucoup moins explorée jusqu'à présent. Certaines études ont montré la présence d'ADN au sein des exosomes : ADN mitochondrial dans les exosomes, donc les exosomes peuvent représenter une voie alternative par laquelle l'ADN mitochondrial modifié peut entrer dans d'autres cellules et favoriser la diffusion de divers agents pathologiques (*Guescini et al., 2010*). La présence d'ADN double brin (ADNdb) représentant l'ADN génomique (ADNg) a été détectée dans des exosomes, reflétant l'état mutationnel des cellules tumorales parentales (*Lázaro-Ibáñez et al., 2014; Thakur et al., 2014*).

### III.2.4. Interaction des exosomes avec les cellules cibles.

Les fonctions des exosomes dans les processus physiologiques et pathologiques dépendent de leur capacité d'interagir avec les cellules cibles pour délivrer leur contenu de protéines, de lipides et d'ARN (**Figure.15**). Cependant, les mécanismes mis en jeu pour ce processus sont mal définis. La capture des exosomes dépend du type de cellules receveuses, et s'effectue par l'internalisation, ou par la fusion directe des membranes exosomales et plasmiques de la cellule cible (*Christianson et al., 2013; Morelli et al., 2004*).

Egalement les exosomes peuvent être capturés par les cellules cibles selon un mécanisme de reconnaissance spécifique type ligand-récepteur (*Yáñez-Mó et al., 2015*). Par exemple, les lymphocytes T peuvent recruter des exosomes dérivés des DCs contenant des molécules de CMH de classe I et II. Le recrutement de ces exosomes par les lymphocyte T est dépendant de LFA-1 (*leukocyte function associated antigen-1*) (*Buschow et al., 2009; Nolte-'t Hoen et al., 2009*). Les tétraspanines apparaissent également être des molécules nécessaires à l'interaction des exosomes avec la membrane plasmique des cellules cibles *in vitro* et *in vivo* (*Rana et al., 2012*), en modulant les fonctions des protéines associées, y compris des protéines de la famille des intégrines (*Hemler, 2003*). Le blocage fonctionnel des tétraspanines et des intégrines, présentes à la membrane exosomale par des anticorps spécifiques, réduit jusqu'à 30% la capture des exosomes par les cellules cibles. Ceci confirme le rôle important de ces protéines pour l'accrochage des exosomes avec la cellules cible (*Théry et al., 2009b*). Après l'interaction avec les cellules cibles, les exosomes peuvent fusionner directement avec la membrane plasmique ou être internalisés par des voies endocytaires distinctes (**Figure 15**).



**Figure 15. Représentation schématique du transport des protéines et des ARN par les exosomes.** Les protéines associées à la membrane (triangle) et les protéines transmembranaires (rectangle) et les ARN (symbole incurvé) sont incorporées sélectivement dans l'ILV des MVE ou dans les MVs bourgeonnant à partir de la membrane plasmique. Les MVE fusionnent avec la membrane plasmique pour libérer les exosomes dans le milieu extracellulaire. Les MV et les exosomes peuvent s'accoupler à la membrane plasmique d'une cellule cible (1). Les vésicules liées peuvent fusionner directement avec la membrane plasmique (2) ou être endocytées (3) puis fusionner dans les endosomes (4). Les deux voies conduisent à la libération des protéines et des ARNs dans le cytosol de la cellule cible. (Raposo and Stoorvogel, 2013)

### III.2.5. Fonctions des exosomes

Les exosomes suscitent un intérêt grandissant en recherche depuis qu'il a été démontré qu'ils joueraient un rôle important dans les communications intercellulaires. La membrane lipidique des exosomes encapsule et protège leur contenu contre les enzymes dégradants présentes dans le milieu extracellulaire et les protège donc en tant que source d'information physiologiques et pathologiques. Comme elles, elles se comportent comme un vecteur doté de nombreuses protéines ou ARNs, cette caractéristique leur permet d'exercer diverses fonctions vis-à-vis la communication intercellulaire notamment sur la plan immunologique.

Les exosomes jouent un rôle complexe dans les réponses immunitaires et peuvent influencer l'immunité adaptative et innée par l'interaction avec multiples types de cellules immunitaires. Par exemple, les exosomes provenant de DCs portant des molécules du CMH II, et des molécules de costimulation (CD40, CD80 et CD86) sont immunogéniques pour les

lymphocytes T (*Roche and Furuta, 2015; Théry et al., 2002b*). Les DCs murines chargées de peptides peuvent potentialiser la cytotoxicité des lymphocytes T mais aussi celle des cellules NK (*Simhadri et al., 2008*). L'étude de *Qazi* et ses collègues a aussi démontré que les exosomes dérivés des DCs sont capables d'induire la différenciation des lymphocytes T vers un phénotype Th1 et améliorer l'immunogénicité *in vivo* (*Qazi et al., 2009*).

### **III.3. Exosomes dérivés des CSM**

En 2010, les exosomes dérivés des CSM ont été pour la première fois être étudiés chez les souris dans un modèle d'ischémie/reperfusion myocardique (*Lai et al., 2010b*), et ensuite, ils sont été testés dans plusieurs modèles de maladies. Il a été démontré que les CSM peuvent produire une plus grande quantité d'exosomes que d'autres cellules telles que des myoblastes, la lignée cellulaire de leucémie monocyttaire aiguë humaine et la lignée des cellules rénales embryonnaires humaines (HEK), etc. (*Yeh Yeo et al., 2013*). Les exosomes des CSM non seulement expriment des marqueurs membranaires communs d'exosomes mais également expriment des marqueurs membranaires des CSM, tels que CD29, CD44, CD73.

Ils portent également une grande quantité de complexe incluant des acides nucléiques, des protéines et des lipides. Leur fonctions physiologiques n'a pas été délimitée et est susceptible d'être complémentaire par rapport à la fonction générale des exosomes. Ils se comporteraient comme des vésicules de communication intercellulaires pour moduler des processus cellulaires (décrit dans le chapitre précédent), le soutien stromale des CSM et des cellules souches hématopoïétiques par le maintien du microenvironnement tissulaire et l'homéostasie. A cet effet, les exosomes dérivés des CSM peuvent avoir la capacité d'interagir avec plusieurs types de cellules voisines et provoquer des réponses cellulaires appropriées.

### III.3.1. Composition des exosomes dérivé des CSM

#### III.3.1.1. L'analyse protéomique

Initialement, la caractérisation protéomique des exosomes sécrétés à partir des CSM a été publiée par *Kim et Lai*, en 2012 (*Kim et al., 2012; Lai et al., 2012*). *Kim* et ses collègues utilisant la spectrométrie de masse pour l'analyse du protéome des exosomes, ont récoltés des exosomes par ultracentrifugation à 100000g à partir des CSM de moelle osseuse humaine. 730 protéines ont été identifiées. *Lai* et ces collègues ont distingué 857 protéines par la même technique dans des exosomes isolés à partir de CSM dérivées de cellules souches embryonnaires humaines (MSC ; huES9.E1) par chromatographie en phase liquide à haute performance (HPLC). Cependant seulement une sous-population de 315 protéines est commune dans ces deux articles, parmi laquelle, un nombre importance de protéines cytoplasmiques et membranaires telles que des marqueurs spécifiques des CSM (CD9, CD63, CD81, CD109, CD151, CD248, CD276), des récepteurs membranaires, le récepteurs B du facteur de croissance dérivé des plaquettes (platelet-derived growth factor receptor B ; PDGF-RB), le récepteur de facteur de croissance épidermique (epidermal growth factor receptor ; EGF-R) et le récepteur de l'activateur du plasminogène/urodinase (plasminogen activator, urokinase receptor ;PLAUR), qui sont impliqués dans le recrutement tissulaire ; des molécules de signalisation : RRAS/NRAS, Wnt5B, MAPK1, GNA13/GNG12, RHO, CD42, et VAV2, qui participent au contrôle de l'autorenouvellement et de la différenciation cellulaire des CSM (*Kim et al., 2012*).

A ce jour, il existe deux bases de données publiques : EVpedia et ExoCarta qui contiennent des données de la composition des exosomes de différents types cellulaires provenant de plusieurs études. Les composants protéiques dans les exosomes dérivés des CSM ne restent pas constants en raison de l'hétérogénéité des ces cellules. Par ailleurs, les variations de la condition de culture cellulaire ont une influence sur le profil de sécrétion des CSM provenant de différentes sources (*Lavoie and Rosu-Myles, 2013*). Les composants protéiques également peuvent varier selon les différents lots de CSM. Les exosomes dérivées de trois lots de CSM indépendants, par la spectrométrie de masse, mettant en évidence seulement une partie des protéines communes (*R. C. Lai et al. 2012*). Les variations des protéines des exosomes, isolés à partir des CSM des différentes sources peuvent aussi révéler des différences fonctionnelles. Par exemple, dans le cas de glioblastome, les exosomes dérivés des CSM de la moelle osseuse et du cordon ombilical, sont capables de diminuer la prolifération de la lignée de cellules de

glioblastome, alors que ceux provenant des CSM du tissu adipeux ont un effet opposé (*Del Fattore et al., 2015a*). Il est nécessaire de faire des études en plus pour comparer l'effet des exosomes dérivés des CSM provenant de différentes sources.

Dans la littérature, nous pouvons trouver quelques exemples des protéines qui étaient présentes dans des exosomes mêmes si elles ne sont pas détectées dans les cellules parentales. Les auteurs de ces articles supposent que ce phénomène peut être dû à l'existence de protéines très précises du système de tri lors de la biogénèse, ou être lié à la limitation des techniques d'indentification des protéines qui souffre très souvent de seuil de détection trop élevée ou bien nécessité de normaliser les résultats obtenus par rapport aux protéines totales (*Katsuda et al., 2013; Kim et al., 2012; Lopez-Verrilli et al., 2016; Vallabhaneni et al., 2015*).

### **III.3.1.2. Les profils d'ARN**

Comme les exosomes en général, les exosomes dérivés des CSM contiennent un nombre abondant de miARNs. Une analyse détaillée a montré que les miARNs présents dans les exosomes isolés de ES-CSM sont majoritairement sous une forme prémature (*Chen et al., 2013*). Les exosomes dérivés des CSM contiennent également une quantité importante d'ARN de transfert (ARNt). Il existe des différences remarquables entre les exosomes dérivés des CSM provenant du tissu adipeux ou de la moelle osseuse en termes d'ARN. Ces différences pourraient rendre compte de propriétés différentes des différents exosomes (*Baglio et al., 2015*).

### **III .3.2. Rôle dans la réparation tissulaire**

Un des rôles des CSM est de maintenir l'homéostasie dans les tissus dans lesquels elles sont situées. Elles sont pourtant sensibles à l'environnement. Ceci est particulièrement important lorsque le microenvironnement tissulaire est altéré par une maladie ou une blessure qui conduit à une perturbation de l'homéostasie tissulaire. Les exosomes dérivés des CSM réagissent comme un médiateur dans ce rôle car ils sont très riches en enzymes. Les exosomes dérivés des CSM pourraient restaurer la fonction normale des tissus lésés rapidement en fournissant les enzymes actives pour promouvoir l'homéostasie tissulaire (*R. C. Lai, Yeo, and Lim 2015*). La première étude sur l'efficacité thérapeutique des exosomes dérivés des CSM



est la réduction de la taille de l'infarctus du myocarde aigu dans un modèle murin d'ischémie/reperfusion (I/R) (Lai et al., 2010a, 2010b). Les lésions myocardiques sont paradoxalement dues au rétablissement du flux sanguin et de l'oxygène au niveau du tissu cardiaque ischémique. Le degré de la lésion tissulaire est proportionnel à la durée de l'ischémie. La production d'ATP dans le tissu cardiaque est réduite d'abord par la privation d'oxygène pendant l'ischémie, puis par une lésion tissulaire induite lors de la reperfusion lorsque l'alimentation en oxygène est rétablie (Rosano et al., 2008). L'analyse protéomique des tissus cardiaques reperfusés a relevé qu'ils sont appauvris pendant la reperfusion en nombreuses enzymes générant la production de l'ATP, telles que celles de l'oxydation des acides gras, de la glycolyse et du cycle de l'acide tricarboxylique (Li et al., 2012b). Cet appauvrissement en enzymes pourrait être complété ou supplé par le protéome des exosomes dérivés des CSM, qui enrichissent en enzymes glycolytiques activées et d'autres enzymes impliquées dans la production de l'ATP telle que l'adénylate kinase et nucléoside-diphosphate-kinase (Lai et al., 2013a). Cette complémentation a été mise en évidence par une augmentation du niveau d'ATP lors de la reperfusion myocardique, et cet effet est également observé dans le modèle murin (Crisan et al., 2011). D'autre part, pendant la blessure tissulaire associée à l'I/R pendant laquelle la mort cellulaire est supérieure à la prolifération cellulaire, la fonction tissulaire serait compromise. Pour restaurer la fonction des tissus, le nombre de cellules doit être augmenté pour remplacer les cellules mortes. Les cellules mourant libèrent leur l'ATP et l'ADP dans l'espace extracellulaire, qui sont ensuite dégradés rapidement en l'AMP (Lüthje, 1989). Le CD73, une ecto 5' nucléotidase présente sur les exosomes des CSM, sont capables d'hydrolyser l'AMP extracellulaires en adénosine (Forman et al., 2006), cette dernière peuvent ensuite activer ERK1/2 et AKT qui sont impliquées dans le voie de signalisation de la survie et de la prolifération cellulaire (Lai et al., 2013b).

### **III .3.3. Rôle dans l'immunomodulation**

Comme décrit dans le chapitre précédent, des facteurs solubles sécrétés par des CSM jouent un rôle important dans les fonctions immunomodulatrices des CSM. Le profil protéomique suggère que les exosomes dérivés des CSM possèdent de nombreuses protéines qui ont des fonctions immunomodulatrices (Kim et al., 2012; Lai et al., 2012).

Budoni et ses collègues ont démontré que les exosomes isolés des CSM de moelle osseuse humaine peuvent inhiber la prolifération et la différenciation des lymphocytes B dans un système de co-culture de cellules mononuclées du sang périphérique stimulées par CpG, de

manière dose dépendent, ainsi qu'inhiber la production des anticorps IgM, IgG et IgA. En outre, dans le même système de co-culture, une internalisation des exosomes dans une sous population des cellules CD86/CD19, qui correspondant aux lymphocytes B activées, a été observée en microscopie confocale (*Budoni et al., 2013*). L'effet des exosomes sur les lymphocytes T a été démontré par l'étude de *Mokarixadeh* et ses collègues. Chez les souris, ces auteurs ont trouvé que les exosomes dérivés des CSM d'origine de la moelle osseuse, inhibent la prolifération des lymphocytes T syngéniques et allogéniques. En outre, ils ont démontré que ces microparticules sont capables d'induire l'apoptose des lymphocytes T activés. Ainsi ils ont trouvé que cette inhibition est associée à une augmentation de la proportion des Treg (CD4+CD25+FoxP3+). D'autre part, une augmentation de la sécrétion de d'IL-10 et de TGFβ par des cellules lymphoïdes spléniques cultivées avec les exosomes dérivés de CSM a été observée. Ces résultats suggèrent que les exosomes sécrétés par des CSM peuvent induire la signalisation tolérogène (*Mokarizadeh et al., 2012*). Plus tard, des résultats similaires ont été observés dans des PBMCs humains cultivés et stimulés par des billes recouvertes d'anticorps CD3/CD28 (*Del Fattore et al., 2015b*). La stimulation induite par les billes, augmente la prolifération des cellules CD3+, ainsi que celle des cellules Treg. En présence de CSM, la prolifération des cellules CD3+ est inhibée, sans modifier significativement l'apoptose. Contrairement à l'effet inhibiteur des CSM, leurs exosomes n'ont pas d'effet sur la prolifération des cellules CD3+, mais ils induisent une apoptose des cellules CD3+ totales et une augmentation de la prolifération des Tregs. Cet effet induit l'augmentation du ratio Treg/Teff et est lié à la concentration de l'IL-10 dans le milieu de culture. Ils ont également trouvé que l'activité d'IDO était augmentée dans les surnageant de la culture de PBMCs avec des CSM, mais cette augmentation est absente en présence des exosomes (*Del Fattore et al., 2015b*). D'autre part, l'étude de *Kilpinen* et ses collaborateurs a trouvé que les exosomes dérivés des CSM expriment la Galectine-1 à leur surface (*Kilpinen et al., 2013*), qui favorise la prolifération et la fonction des Tregs induisent un profil tolérogène. *Chen* et ses collègues ont montré que les exosomes dérivés des CSM pouvaient inhiber la sécrétion des cytokines pro-inflammatoires tel que le TNF-α, l'IL-1β et augmenter la sécrétion des cytokines anti-inflammatoires tel que TGFβ pendant la culture des PBMCs *in vitro* (*Chen et al., 2016*).

Les résultats *in vitro* sont également supportés par des observations *in vivo* dans des modèles animaux. Dans le modèle animal de la maladie inflammatoire de l'intestin induit par dextran sulfate sodium (DSS), les souris recevant quotidiennement des exosomes dérivés de CSM ont

des lésions du côlon moins sévères que les souris contrôles non traitées. Les résultats RT-PCR quantitative sur l'ARN extrait de Côlon ont montré une forte inhibition des cytokines inflammatoires par rapport aux animaux contrôles (*Fattore et al., 2014*). Il a été également montré que le traitement avec des exosomes a retardé le rejet des greffes de peau allogéniques chez les souris, avec une augmentation du nombre de Tregs (*Zhang et al., 2014b*).

Collectivement, ces données suggèrent que les exosomes isolés à partir des CSM pourraient reproduire l'effet immunomodulateurs des CSM. Les exosomes dérivés des CSM suscitent un intérêt croissant car ils pourraient représenter un outil thérapeutique plus pratique à utiliser par rapport à leurs cellules parentales. En particulier, le stockage des exosomes est plus facile à assurer. De même, l'accumulation principale dans les poumons après une injection IV de CSM, limitant leur efficacité et leur tolérance (*Fischer et al., 2009*), ne semble pas survenir avec l'injection d'exosomes. Fait intéressant, un traitement avec les exosomes dérivés des CSM a été récemment rapporté avoir été efficace chez un patient avec GVHD résistant aux stéroïdes (*Kordelas et al., 2014*). Cependant, des travaux supplémentaires à la fois *in vitro* et *in vivo* est nécessaires afin de mieux comprendre la puissance et les mécanismes d'action de cet outil avec un potentiel rôle immunosuppresseur.

## OBJECTIF DU TRAVAIL DE THESE

Comme je l'ai décrit précédemment, les CSM sont des immunomodulateurs prometteurs en thérapies de diverses pathologies impliquant le système immunitaire, telles que du rejet de greffe, les maladies inflammatoires et auto-immunes. Cependant, des études *in vivo* ont montrées que le taux des CSM migrant sur les sites ciblés par rapport aux CSM greffées est relativement faible. Ainsi, des études ont confirmé que l'administration des CSM par la voie intraveineuse à des rongeurs induit une capture de ces cellules dans les capillaires des poumons (*François et al. 2006; Toma et al. 2009 ; Fischer et al. 2009*).

Récemment, certaines études ont suggéré que les exosomes dérivées des CSM sont capables de mimer l'immunomodulation induite par les cellules parentales sur les cellules effectrices immunitaires, telles que les lymphocytes B, T, et les cellules NK (*Budoni et al., 2013; Di Trapani et al., 2016; Mokarizadeh et al., 2012*).

L'effet thérapeutique des exosomes dérivés des CSM a été confirmé dans certains modèles animaux de maladies cardiovasculaires, inflammatoires ou de lésions tissulaires par exemple. L'injection de ces VE peuvent améliorer la réparation tissulaire et possède un effet anti-inflammatoire. De plus il a été montré, dans le modèle animale de greffe de peaux, un effet tolérogène des exosomes (*Fattore et al, 2014; Zhang et al, 2014*). Cependant les mécanismes induisant une inhibition des effecteurs de l'immunité par les exosomes n'ont été que peu étudiés.

L'objectif de cette thèse est :

- Evaluer l'effet les exosomes dérivées des CSMs sur les cellules effectrices du rejet aigues, les lymphocytes T et les cellules NK.
- Investiguer les mécanismes d'inhibition des exosomes dérivés des CSM sur les cellules NK.

# *Résultats*

## RESULTATS

Les cellules souche mésenchymateuse (CSM) présentent une puissante activité immunomodulatrice sur les lymphocytes T et les Natural Killer (NK), impliquées dans les réactions allogéniques. Les propriétés immunomodulatrices des CSM dépendent de contacts cellulaires et des facteurs sécrétés. Ainsi les exosomes produits par ces cellules pourraient constituer des nouveaux produits thérapeutiques. Nous avons donc étudié l'effet des exosomes dérivés de CSM sur les lymphocytes T et les cellules NK.

### **Conclusion du travail :**

Nous avons remarqué que les exosomes dérivés de CSM inhibent la prolifération, l'activation et la cytotoxicité des cellules NK. Contrairement aux CSM qui inhibent également les lymphocytes T, leurs exosomes n'ont pas d'effet sur leur prolifération. Nous avons mis en évidence que les exosomes portant du TGF $\beta$  et des molécules régulatrices de TGF $\beta$  telles que LAP, et TSP1. De plus, la présence d'exosomes induit une signalisation TGF $\beta$  /Smad2/3 dans les cellules NK. Enfin, leur fonction inhibitrice est abrogée en présence d'un anticorps bloquants anti-TGF $\beta$ . Dans l'ensemble, ces résultats suggèrent que les propriétés immunomodulatrices de CSMs sur les NK pourraient dépendre de la présence de TGF $\beta$  présenté ou associé aux exosomes.

## Article

# Fetal Liver Mesenchymal Stem Cell derived Exosomes impair NK cell but not T cell function

Fan Ye\*, Florence Herr, Estelle Oberlin, Amelia Vernochet, Antoine Durrbach

INSERM UMR-S1197, Villejuif, France

IFRNT, Département de Néphrologie, Hôpital Le Kremlin Bicêtre, France

Université Paris Sud

**Contact:** antoine.durrbach@aphp.fr

### Highlights

- MSC derived exosomes inhibit NK cells
- exosomes carry membrane-bound TGF $\beta$  and can induce Smad signaling in NK cells

## SUMMARY

Mesenchymal stem cells (MSCs) are powerful immunomodulators that regulate the diverse functions of immune cells involved in allogeneic reactions, such as T cells and natural killer cells (NK), through cell-cell contact or secreted factors. Exosomes secreted by MSCs may be involved in their regulatory functions, providing new therapeutic tools.

Here, we showed that MSC-derived exosomes inhibit proliferation, activation, and cytotoxicity of NK cells, but do not inhibit the proliferation of T cells. Exosomes bearing LAP, TGF $\beta$ , and TSP1, a regulatory molecule for TGF $\beta$ , induced downstream TGF $\beta$ /Smad2/3 signaling in NK cells. The inhibition of TGF $\beta$ , using a neutralizing anti-TGF $\beta$  antibody, restored NK proliferation, differentiation, and cytotoxicity, demonstrating that MSC-derived exosomes exert their inhibition on NK cell function via TGF $\beta$ .

These results suggest that MSC-derived exosomes contain biologically active immunomodulatory factors.



## INTRODUCTION

Mesenchymal stem cells (MSCs) are nonhematopoietic multipotent stem cells that can be isolated from various adult and fetal tissues, such as bone marrow, fat, liver, and umbilical cord (*Lv et al. 2014*). MSCs have been widely tested in clinical trials due to their regenerative and immunomodulatory abilities. They can downregulate functions of immune effector cells (IEC) of both innate and adaptive immunity, including T cells, NK cells, B cells, and macrophages (*Gazdic et al. 2015*). MSCs act on T cells by inhibiting their proliferation and cytotoxicity and by committing them to become regulatory cells (*Haddad et al. 2014*). They also regulate NK-cell proliferation and cytotoxicity (*Reinders and Hoogduijn 2014*). Thus, MSCs are an attractive candidate for cellular immunotherapeutics to induced tolerance in allogeneic transplantation and/or autoimmunity. The mechanism of the immunomodulatory activity of MSCs is unclear, but accumulating evidence suggests that MSCs exert their therapeutic effects mainly through the delivery of paracrine factors, including TGF $\beta$ , IDO, PEG<sub>2</sub>, and others (*Sze et al. 2007; Kyurkchiev et al. 2014*). Some of these factors are directly secreted, whereas others are released associated with secreted membranes, such as exosomes, which are important mediators of the paracrine effect of MSCs (*Kim et al. 2012; Lai et al. 2012; Lai, Yeo, and Lim 2015*).

Exosomes are 30-150-nm bilipid membrane-bound extracellular cargo vesicles, containing protein and RNA, which are actively secreted by diverse cell types. They are involved in intercellular communication through the transfer of proteins and RNA. Exosomes express tetraspanins (CD9, CD63, and CD81), TSG101, and Alix. They originate from cellular multi-vesicular endosomes (MVE) and are secreted by the cell after MVE fusion with the plasma membrane. Exosomes retain a similar phenotype as that of the original cells and, at least in part, exert some of the same functions

([Simons and Raposo 2009](#)). Several published studies have reported that MSC-derived exosomes have similar functions as those of MSCs, such as repairing injured tissues, modulating immune responses, and anti-inflammatory effects ([Yu, Zhang, and Li 2014](#); [Lai, Yeo, and Lim 2015](#)).

MSCs are used for therapeutic purposes to regulate the immune system in transplantation, autoimmunity, and regenerative medicine. They can be locally delivered, but are generally injected intravenously, despite intravascular trapping in the lungs due to their size ([Fischer et al. 2009](#)). Thus, administration of exosomes, which are smaller, should reduce lung accumulation and favor their delivery to the targeted organ.

Here, we studied the immunomodulatory effect of MSC-derived exosomes, relative to that of MSCs, on the function of T cells and NK cells, which are considered to play a crucial role in allograft rejection. Bone marrow-derived MSCs have a limited effect. Thus, we used MSCs derived from human fetal liver (FL-MSC), which have been shown to have a much longer *in vitro* lifespan than BM MSCs, while exhibiting a similar immunomodulatory potential ([Giuliani, Fleury, et al. 2011](#)). We show that FL-MSC exosomes inhibit NK, but not T-cell function.

## RESULTS

### Characterization of human FL-MSC and FL-exo

Following 14 to 18 days in culture in standard medium, isolated FL-MSCs were positive for the specific MSC markers CD73, CD105, CD90, CD29, and HLA class I (HLA-ABC). They were negative for the hematopoietic markers CD45, CD34, CD31, CD14, and HLA class II (HLA-DR) (Figure 1A). Moreover, we demonstrated the multipotent ability of FL-MSC by differentiating them into osteogenic, adipogenic, and chondrogenic lineages, resulting in high extracellular deposition of calcium, accumulation of intracellular lipid droplets, and active synthesis of proteoglycans, respectively (Figure 1B).

FL-exosomes (FL-exo) were isolated by sequential centrifugation. Electron microscopy analysis of vesicles showed them to be between 60 and 100 nm in diameter (Figure 1C), corresponding to the normal size of exosomes. Immunophenotyping showed the expression of tetraspanins (CD9, CD63, CD81), which are enriched on exosomal membranes. The exosomes also expressed the mesenchymal marker CD29, but not other markers, such as CD73 and CD105. They also did not express HLA class I or II (Figure 1D) or markers specific to intracellular compartments, such as cytochrome C for mitochondria, calnexin for the endoplasmic reticulum, and syntaxin 6 for golgi (Figure 1E).

### The immunosuppressive effect of FL-exo on IEC proliferation

We compared the immunomodulatory effect of FL-MSCs and FL-exo, by activating CFSE-stained PBMCs with anti-CD3/CD28 and coculturing them at various IEC/MSC

ratios (from 1:1 to 1:16) or various concentrations of FL-exo (from 50 µg/ml to 400 µg/ml). CD3-positive lymphocytes stimulated with CD3/CD28 showed much stronger proliferation than resting PBMCs. Coculture with FL-MSCs prevented their proliferation in a ratio-dependent manner, whereas FL-exo had no effect on the proliferation of activated CD3 cells (Figure 2A).

We next tested the effect of FL-MSCs and FL-exo on NK-cell proliferation. IL-2 activated NK cells were labeled with CFSE and cocultured for seven days, with or without FL-MSCs or FL-exo, at the same IEC/MSC ratios and FL-exo concentrations used for the PBMCs. Both FL-MSC and FL-exo prevented the proliferation of activated NK cells, as assessed by the CFSE dilution assay, (Figure 2B) in a ratio- and dose-dependent manner, respectively.

These results show that FL-MSCs can inhibit both T-cell and NK-cell proliferation, whereas FL-exo affects only NK-cell proliferation.

### **FL-exo prevent IL-2-induced NK-cell activation and inhibit NK-cell cytotoxicity**

We investigated the role of FL-exo on NK-cell activation and cytotoxicity relative to that of FL-MSCs. The cytotoxicity of activated NK cells against K562 cells strongly depends on the expression of the activator receptors NKG2D and NKp30. NKG2D and NKp30 were strongly downmodulated when NK cells were treated with FL-MSCs or FL-exo (Figure 3A). This was also observed at the mRNA level when activated NK cells were treated with exosomes, as assessed by RT qPCR (Figure 3B).

We evaluated the cytotoxic degranulation capacity of NK cells by flow cytometry through the expression of CD107a (lysosomal-associated membrane protein-1, LAMP-

1) in the presence of target cells. We did not detect CD107a expression on resting NK cells following incubation for four hours with VPD450-labeled K562 target cells. However, CD107a was strongly expressed on the cell surface of activated NK cells, but was lower when activated NK cells were cocultured with FL-MSCs or FL-exo, in a ratio and concentration-dependent manner, respectively (Figure 3D). We analyzed the cytotoxic effect of NK cells on K562 target cells by Flow cytometry, by determining the incorporation of 7AAD into VPD450-labeled targeted cells. Resting NK cells exhibited minimal cytotoxicity against K562 cells, whereas IL-2-activated NK cells showed increased 7AAD staining of target cells, which was also efficiently impaired by FL-MSCs or FL-exo, in a ratio and dose dependent manner, respectively. (Figure 3E).

These data indicate that FL-exo are able to inhibit NK-cell activation and cytotoxic functions *in vitro*.

We also analyzed the phenotype of NK cells, especially their expression of CD56, since CD56-bright NK cells are associated with cytotoxic activities. Ten percent of the resting NK cells were CD56 bright. However, the proportion of the CD56-bright population increased two to three-fold when the NK cells were stimulated with IL-2. This increase was significantly less in the presence of FL-MSCs or FL-exo (Figure 3C), suggesting that both MSC and their exosomes impaired the activation, proliferation, and differentiation of NK cells.

## **Exosomes express TGF $\beta$ on their surface and induce the activation of the TGF $\beta$ /Smad pathway in NK cells**

Several soluble factors have been reported to be involved in MSC-mediated inhibition of NK cells, such as PGE<sub>2</sub>, IDO, and TGF $\beta$ . We performed a proteome analysis by mass spectrometry to identify factors that could be associated with the inhibitory effects of exosomes. This analysis showed the presence of TSP1 (data not shown), which is an activator of latent TGF $\beta$  through the conformational change of the latency associated peptide (LAP) (*Murphy-Ullrich and Poczatek, 2000*). This result was confirmed by flow cytometry, showing the surface expression of both TGF $\beta$  (Figure 4A and 4B). and TSP1 (Figure 4C and 4D) on FL-exo Immunoprecipitation of LAP, a component of the latent TGF $\beta$  complex, revealed the interaction of LAP with TSP1 and TGF $\beta$  on FL-exo (Figure 4E).

We next determined whether the inhibitory effect of exosomes on NK cell function is dependent on the surface expression of TGF $\beta$ . We investigated whether exosomes induce the TGF $\beta$ /Smad pathways. IL-2-activated NK cells do not exhibit phosphorylation of Smad2/3, as assessed by flow cytometry. We observed Smad2/3 phosphorylation following 30 minutes of TGF $\beta$  treatment. Treatment with FL-exo also induced Smad2/3 phosphorylation in NK cells (Figure 5A). We investigated the sub-cellular localization of Smad2/3 in IL-2-activated NK cells, in the presence or absence of TGF $\beta$  or FL-exo, by immunofluorescence. Almost all Smad2/3 staining remained localized in the cytoplasm in untreated NK cells. TGF $\beta$  treatment of IL-2-activated NK cells for 30 minutes induced partial translocation of Smad2/3 into the nucleus. Surprisingly, we observed complete nuclear translocation of Smad2/3 in activated NK cells following treatment with FL-exo for 30 minutes (Figure 5B). We obtained similar results in four independent experiments.

## **Reduced NK cell function is at least in part induced by exosomal TGF $\beta$**

We further investigated whether the inhibitory effect of exosomes is mediated by TGF $\beta$  by performing a functional assay using an anti-TGF $\beta$  neutralizing antibody (50  $\mu$ g/ml). IL-2-activated NK cells were culture for four days, in the presence or absence of FL-exo, and a TGF $\beta$ 1-neutralizing antibody. We then assessed NK activation and cytotoxicity by flow cytometry. The expression of the NK activating receptors NKG2D and NKp30 by activated NK cells was significantly restored by TGF $\beta$ 1-neutralizing antibodies (Figure.6A). We next analyzed the TGF $\beta$ 1-neutralizing antibody-mediated inhibition of the effect of FL-exo by CD107a expression on NK cells and 7-AAD uptake by K562 target cells. TGF $\beta$ 1-neutralizing antibodies restored the degranulation and cytolytic ability of activated NK cells inhibited by FL-exo (Figure 6B).

Our results suggest that the inhibitory effect of FL-exo on NK cells is at least partially dependent on their TGF $\beta$  expression.

## DISCUSSION

We previously reported that FL-MSCs support long-term *in vitro* expansion better than BM-MSCs, while maintaining long-lasting immunoregulatory properties. These features make FL-MSCs an attractive therapeutic tool. We also reported that MSCs exert their immunoregulatory function through various secreted factors (*Giuliani, Fleury, et al. 2011*).

Here, we demonstrated that coculture with FL-exo, as well as FL-MSCs, inhibit purified IL-2-activated NK cell functions. NK cells are responsive to IL-2 induced differentiation and activation. *In vitro* stimulation of peripheral blood NK cells by IL-2 alone induces their proliferation, in particular the CD56 bright subset (*Cooper, Fehniger, and Caligiuri 2001*). Here, we demonstrated that exosomes inhibit NK proliferation. They also inhibited the proliferation and/or differentiation of the CD56 bright cytotoxic NK subset. NK cells act in the first line of defense in immunity and their ability to lyse target cells does not depend on prior sensitization. We show that the transcription of NK-activating receptors is inhibited by MSC-derived exosomes. NKG2D is an NK-cell activating receptor that plays a major role in NK-mediated cytotoxicity by recognizing various antigens on stressed or infected cells and tumor cells (*Eagle and Trowsdale 2007*). The importance of NKG2D has been demonstrated in organ transplantation in animal models, as well as in human transplantation, magnifying innate and adaptive immune responses (*Suárez-Alvarez et al. 2009*). Depletion or inhibition of the expression of NK-activating receptors could account for the FL-exo-mediated inhibition of NK cell function. Here, we showed that decreased expression of two NK-activating receptors indeed correlates with decreased cytotoxicity of NK cells against target cells.



The modification of IL-2-activated NK-cell cytotoxicity by MSCs has been previously reported by our group (Giuliani, Oudrhiri, et al. 2011). In our coculture system, FL-exo have a similar inhibitory profile as FL-MSCs, despite the fact that MSCs are also able to inhibit the cells and associated functions of both innate and adaptive immunity (Gazdic et al. 2015). Our results show that FL-exo does not inhibit T cell proliferation, whereas the parental cells do. These data suggest that the mechanism of immunosuppression of FL-MSC derived exosomes partially recreates those of FL-MSCs. Our results are in accordance with other studies reporting variable effects of MSC-derived EVs on various immune effector cells *in vitro*. A quantitative discrepancy may be due to the source of MSCs and different experimental protocols, suggesting that the origin of the cells, the type of soluble particles produced, and the isolation method could lead to varying effects on target cells (Del Fattore et al. 2015; Blazquez et al. 2014). In our study, the analysis of the preparation of exosomes by EM and immunoblot indicated that the exosomes were relatively pure with negligible contamination by microvesicles.

NK cell function is controlled by various mechanisms. TGF $\beta$  is an important regulatory molecule that impairs NK cell expansion, cytotoxicity, and the expression of activating receptors (Pierson et al. 1996; Yang, Pang, and Moses 2010). It is an important secreted factor involved in MSC immunomodulation (Kyurkchiev et al. 2014). TGF $\beta$  has been broadly reported in tumor invasion and metastases because of their immunosuppressive effect (Padua and Massagué 2009). We showed that inhibitory functions of FL-exo on NK cells are at least partially mediated by TGF $\beta$ , using an anti-TGF $\beta$  blocking antibody. In addition, inhibition of NK cells by TGF $\beta$  occurs via the Smad-dependent pathway (Rouce et al. 2016). In our system, exosome/NK-cell coculture showed activation of the Smad signaling pathway, which

mimicked the results of TGF $\beta$  treatment of IL-2-stimulated NK cells. Moreover, the addition of anti-TGF $\beta$  restored the effector functions of NK cells, as well as NKG2D and NKp30 expression. These data suggest that FL-exo contain biologically active molecules, notably TGF $\beta$ , which impair NK-cell activation and function.

We observed the inhibitory functions of exosomes on NK cells despite extensive washing of the membranes during exosome preparation, suggesting that TGF $\beta$  is carried on the surface of exosomes. TGF $\beta$  is secreted by various cell types as an inactive precursor, called latent TGF $\beta$ , which can be activated by thrombospondin 1 (TSP1) through a proteolytic process ([Murphy-Ullrich and Poczatek 2000](#)). Mokarizadeh *et al.* used flow cytometry to demonstrate that murine BM-MSC-derived microvesicles carry membrane-bound TGF $\beta$  ([Mokarizadeh et al. 2012](#)). We show that FL-exo carry TSP1, LAP, and TGF $\beta$  on their surface. Moreover LAP and TSP1 can be coprecipitated, suggesting release of the active form of TGF $\beta$ , as previously demonstrated ([Murphy-Ullrich and Poczatek 2000](#)). Other molecules have also been associated with the inhibitory function of MSC. MSC-secreted IDO, which exerts a major inhibitory effect on T-cell and NK-cell proliferation, is strongly induced by inflammatory cytokines, such as INF $\gamma$  ([Liang et al. 2013](#)). In our study, IDO was entirely absent from exosomes isolated from the media of resting or primed MSCs (data not show).

It has been proposed that the immunomodulatory activity of MSCs is mediated by the synergism of several secreted factors or through contact-dependent mechanisms, corresponding to membrane bound factors ([Shi et al. 2012](#)). We showed that the exosomes in our system did not regulate T cell proliferation, whereas parental MSCs did. This result suggests that exosomal expression of TGF $\beta$  in our system is not sufficient for T cell inhibition. The lack of an effect of FL-exo on T cells may be due to

our exosome-production process, resulting in a low level of contamination which maybe driving partners regulating T cells. It is also possible that the regulation of T cell function by FL-MSc is dependent on cell surface-bound factors.

In conclusion, our studies provide evidence for an immunoregulatory function of FL-exo. The control of the cytotoxic activity of NK cells may be explained by biologically active tolerogenic factors carried by FL-MSc-derived exosomes. FL-exo shows great potential to become a new immunosuppressive tool.

## EXPERIMENT PROCEDURES

### Cell culture

Human Fetal livers (4-6 weeks of gestation) were obtained from women after voluntary or therapeutic abortion. Written consent was obtained from the patients in accordance with the Declaration of Helsinki. Tissue collection and use were performed according to the guidelines and with the approval of the French Biomedicine Agency. FL-MSCs were prepared as previously described ([Götherström et al. 2003](#); [Giuliani, Fleury, et al. 2011](#)). Differentiation studies were carried out as previously described ([Vater, Kasten, and Stiehler 2011](#)). All experiments were performed between passages 5 and 20. Human PBMCs were isolated from the blood of healthy volunteers by density Ficoll-Paque gradient centrifugation. NK cells were isolated from PBMCs by negative selection using the NK Cell Isolation Kit (MiltenyiBiotec), according to the manufacturer's instructions. Freshly purified CD56<sup>+</sup>CD3<sup>-</sup> NK cells of at least 95% cell purity, evaluated by flow cytometry using monoclonal antibodies (mAb) anti-CD3-PEVIO770 and anti-CD56-APC, were cultured in RPMI 1640 medium supplemented with 10% heat-inactivated human AB serum (Sigma), 2 mM L-glutamine, and 1% penicillin/streptomycin solution. Non-purified T cells were cultured in RPMI 1640 complete medium with 10% fetal bovine serum (FBS; Dominique DUTSHER, South America). The HLA class I – K562 cell line was used as a target for the analysis of NK-cell cytotoxicity and were cultured in RPMI 1640 complete medium with 10% FBS.

### Purification and characterization of FL-exo

FL-MSCs, at 80% confluence, were washed twice with phosphate-buffered saline (PBS) and then incubated with exosome-depleted FBS  $\alpha$ -MEM complete medium.

FL-exo was isolated from the supernatant of FL-MSC cultures by differential ultracentrifugation and characterized as previously described (*Théry et al. 2001*). FL-exo was determined using the micro BCA™ Protein Assay Kit (ThermoFisher). Purified exosomes were analyzed by transmission electron microscopy (IGR) to confirm particle form and size. FL-exo purity was confirmed by western blotting to assess the presence of the membrane-marker tetraspanins (anti-CD9, anti-CD63, and anti-CD81, kindly provided by Dr. Rubinstein (Ascites)) and TSG101 (R&D Systems), as previously described (*Théry et al. 2001*)

### **Immunophenotyping**

Flow-cytometry analyses of FL-MSC surface markers were performed as previously described (Giuliani, Fleury, et al. 2011). The surface phenotype of FL-MSC was assessed using specific FITC, PE, or APC-conjugated mAbs, including CD73, CD14, CD45, HLA-ABC (BD Pharmigen), CD29, CD90, HLA-DR (ImMiexmunotools), CD105, CD34, and CD31 (Miltenyi). For flow cytometry analysis of FL-exo, purified exosomes were adsorbed to 4- $\mu$ m Aldehyde/Sulfate latex beads (Life Technology). Briefly, 5  $\mu$ g FL-exo were mixed with 10  $\mu$ l latex beads for 15 min at room temperature (RT). Then, 1 ml PBS was added to each sample and they were incubated on a rotating wheel for 2 h. Then, 110  $\mu$ l 1 M Glycine was added to the samples and they were mixed at RT for 30 min. Bead-bound exosomes were collected by centrifugation for 3 min at 5000xg. The beads were washed three times with PBS/0.5% BSA and resuspended in 500  $\mu$ l PBS/0.5% BSA. Finally, 10  $\mu$ l of bead-bound exosomes was stained with specific mAbs against tetraspanins, TGF $\beta$ , TSP1 (R&D Systems), and other MSC markers.

## **Proliferation assays**

To assess the immunomodulatory capabilities of FL-MSCs and FL-exo on various lymphocyte populations, lymphocytes were activated and cultured for 4 to 7 days with mitomycin- (Sigma-Aldrich) treated FL-MSCs (25 µg/ml, 37°C, 30 min) at IEC/MSC ratios from 1:1 to 16:1 and their proliferation was analyzed by flow cytometry. Cells were stained with 5,6 carboxyfluorecein diacetate succinimidyl ester (CFSE, Molecular Probes, Eugene, OR) as previously described ([Giuliani, Fleury, et al. 2011](#); [Giuliani, Oudrhiri, et al. 2011](#)). NK cells at a concentration of  $0.5 \times 10^6$  ml were stimulated with 200 U/ml IL-2 (R&D Systems) for 7 days. For T cell activation, PBMCs at a concentration of  $0.5 \times 10^6$ /ml were stimulated with 100 ng/ml anti-CD3 (OKT3) and 100 ng/ml anti-CD28 (MiltenyiBiotec) for 4 days. Activated IECs were also cultured with FL-exo (at various concentrations from 50µg/ml to 400 µg/ml). Activated NK cells or PBMCs were used as controls. Surface markers and proliferation were evaluated by flow cytometry. The following mAbs were used to evaluate IEC surface markers: anti-CD3-PEVIO770, anti-CD16-PE, and anti-CD56-APC.

## **Cytotoxicity Assays of NK cells**

Cytotoxicity assays were performed using a flow cytometry-based method ([Park et al. 2013](#)). IL-2 stimulated NK cells from different donors were cultured or with /without FL-MSC/FL-exo, for 4 days in 96-well flat-bottom plates. The K562 cell line was used as the target. Target cells were cultured in complete RPMI medium with human AB serum and labeled with 1 µM VPD450 (BD Bioscience) for 10 min, at 37°C on day 4 to discriminate them from NK cells. NK cells were incubated with VPD450-labeled K562 target cells at a ratio of 1:2 IEC/T in 96-well flat-bottom plates. K562 cells were used alone as a negative control. After 4 h of coculture at 37°C in 5% CO<sub>2</sub>, the cell

mixtures were washed and stained with 5  $\mu$ l 7-AAD (BD Bioscience) for 15 min in the dark before analysis; CD107a degranulation and various activation receptors were also analyzed by flow cytometry using the following mAbs: anti-CD107a-FITC (BD Bioscience), anti-NKG2D-PE, and anti-NKp30-PEVIO770, (Miltenyi). The involvement of TGF $\beta$  in the immunomodulation of NK cells by FL-MSCs and FL-exo was analyzed by culturing the cells with 50  $\mu$ g/ml anti-TGF $\beta$  neutralizing antibody (R&D Systems) under the same conditions.

### **Flow cytometry**

Flow cytometric analysis of cell surface markers was performed as previously described ([Giuliani, Oudrhiri, et al. 2011](#); [Giuliani, Fleury, et al. 2011](#)). Immunophenotyping was performed on a BD Accuri™ C6 flow cytometer. The *in vitro* functional analysis of IEC was performed on an LSR Fortessa instrument using FACSDiva software (BD Bioscience).

### **Quantitative real-time RT-PCR (qPCR) for NK activating receptors**

mRNA was extracted from NK cells after 2 days in culture, with or without FL-exo, using the mRNA Catcher Plus Purification Kit (Thermo Fisher) and cDNA synthesis was performed directly in the mRNA Catcher PLUS plate using the RevertAid H Minus First Strand cDNA Synthesis Kit (ThermoFisher), according to the manufacturer's instructions. The cDNA was then stored at -20°C until used for PCR analysis. Amplification of cDNA was monitored using a QuantiNova SYBR Green PCR kit (Qiagen) on an Mx3005P qPCR System (Agilent Technologies). Pre-designed specific primers for NKG2D (FW: 5'-ACA-GCA-AAG-AGG-ACC-AGG-ATT-3'; RV: 5'-GGT-TGG-GTG-AGA-GAA-TGG-AG-3'), NKp30 (FW: 5'-CAC-TTG-CTT-CTT-CCC-GTT-TC-3'; RV: 5'-GAT-GTT-CTT-TCT-CCA-CCA-CCA-3'), and GAPDH

(FW: 5'-AATCCCATCACCATCTTCCA-3'; 5'-TGGACTCCACGACGTACTCA-3') were used for mRNA quantification for each sample (Eurogentec). Reactions were performed in a total volume of 20  $\mu$ l, which included 5  $\mu$ l cDNA sample, 2  $\mu$ l primers (10  $\mu$ M), and 10  $\mu$ l 2X SYBR Green PCR Master Mix. The PCR was performed as follows: 2 min at 95°C and 45 cycles of 5 s at 95°C, 10 s at 60°C, and one final cycle of 1 min at 95°C, and 30 s at 55°C. The amount of each receptor mRNA relative to GAPDH mRNA was calculated using the comparative CT method.

### **Immunoprecipitation**

FL-exo were lysed with 1X TNT buffer at pH7.4 containing 1 mM Orthovanadate, 0.01 mM NaPO<sub>4</sub>, 2 mM NAF, 0.03 mM NEM, 12.4 mM  $\beta$ -glycerophosphate and 1X protease inhibitor cocktail. After 30 min at 4°C, protein lysates were collected by centrifugation at 2300xg for 30 s. The supernatant was incubated with beads (Protein G sepharose fast flow, SIGMA; 20  $\mu$ l beads/100  $\mu$ l protein lysate) for 1 h at 4°C, on a rotating wheel, to eliminate non-specific binding, followed by centrifugation for 5 min at 2300xg. Supernatants were incubated with 3  $\mu$ g anti-TSP1 or 2  $\mu$ g anti-LAP overnight at 4°C on a rotating wheel. Then, 20  $\mu$ l of beads was added to the supernatants and the mixture incubated for 2 h at 4°C. After centrifugation, immune-complexed beads were collected and the supernatant used for output control. Beads were washed three times with TNT buffer and resuspended in 20  $\mu$ l Laemmli buffer, with or without  $\beta$ -mercaptoethanol, and boiled for 5 min. Supernatants containing the precipitated proteins were subjected to gel electrophoresis and transferred onto PVC membranes for western blot analyses. All Abs were obtained from R&D Systems.



### **Intracellular Phospho-Smad2/3 Assay**

Stimulated NK cells were treated with or without 400µg/ml FL-exo or 10 ng/ml human TGFβ (Miltenyi) for 30 min in 96 well flat-bottom plates. Intracellular phosphoprotein staining with anti-Phospho-Smad2/3 (BD Pharmingen) was performed as described previously (*Krutzik and Nolan 2003*). The samples were then analyzed by flow cytometry. Untreated samples were used as negative controls and samples treated with TGFβ as positive controls.

### **Immunofluorescence**

Stimulated NK cells were treated with or without 400µg/ml FL-exo or 10 ng/ml human TGFβ for 30 min in 96 well flat-bottom plates. Cells were collected, washed with PBS, and fixed with 4% PFA for 15 min at RT. Then, cells were washed and permeabilized with 0.05% Triton X-100, and incubated 30 min at RT with 10% PBS/FBS/100 mM NH<sub>4</sub>CL to block non-specific binding. Cells were stained with anti-Smad2/3 (Abcam) for 1 h, followed by Alexa Fluor 488-conjugated anti-rabbit IgG for another hour, and Hoechst for nuclear staining. Cells were then resuspended in 100 µl 10% PBS/FBS, deposited on poly-L-lysine-coated slides (Sigma-Aldrich), and incubated for 20 min at RT to attach the cells. Slides were mounted and analyzed using a Leica TCS SP5 AOBS Tandem Confocal Microscope with a Leica LAS-AF system. ImageJ software was used for colocalization analysis.

### **Statistical analysis**

GraphPad Prism software (Graph-Pad) was used for statistical analysis with the Wilcoxon test to compare treated and untreated cells. Data are expressed as the

mean  $\pm$  SEM. All experiments were performed at least three times. Differences were considered to be statistically significant for \*P < 0.05; \*\*P < 0.01; and \*\*\*P < 0.0001.

## **Acknowledgments**

## References

- Blazquez, R., Sanchez-Margallo, F.M., de la Rosa, O., Dalemans, W., Alvarez, V., Tarazona, R., and Casado, J.G. (2014). Immunomodulatory Potential of Human Adipose Mesenchymal Stem Cells Derived Exosomes on in vitro Stimulated T Cells. *Front Immunol* 5, 556.
- Chen, W., Huang, Y., Han, J., Yu, L., Li, Y., Lu, Z., Li, H., Liu, Z., Shi, C., Duan, F., et al. (2016). Immunomodulatory effects of mesenchymal stromal cells-derived exosome. *Immunol Res* 64, 831–840.
- Cooper, M.A., Fehniger, T.A., and Caligiuri, M.A. (2001). The biology of human natural killer-cell subsets. *Trends in Immunology* 22, 633–640.
- Del Fattore, A., Luciano, R., Pascucci, L., Goffredo, B.M., Giorda, E., Scapaticci, M., Fierabracci, A., and Muraca, M. (2015). Immunoregulatory Effects of Mesenchymal Stem Cell-Derived Extracellular Vesicles on T Lymphocytes. *Cell Transplant* 24, 2615–2627.
- Fischer, U.M., Harting, M.T., Jimenez, F., Monzon-Posadas, W.O., Xue, H., Savitz, S.I., Laine, G.A., and Cox, C.S. (2009). Pulmonary Passage is a Major Obstacle for Intravenous Stem Cell Delivery: The Pulmonary First-Pass Effect. *Stem Cells Dev* 18, 683–691.
- Gazdic, M., Volarevic, V., Arsenijevic, N., and Stojkovic, M. (2015). Mesenchymal stem cells: a friend or foe in immune-mediated diseases. *Stem Cell Rev* 11, 280–287.
- Giuliani, M., Oudrhiri, N., Noman, Z.M., Vernochet, A., Chouaib, S., Azzarone, B., Durrbach, A., and Bennaceur-Griscelli, A. (2011a). Human mesenchymal stem cells derived from induced pluripotent stem cells down-regulate NK-cell cytolytic machinery. *Blood* 118, 3254–3262.
- Giuliani, M., Fleury, M., Vernochet, A., Ketroussi, F., Clay, D., Azzarone, B., Lataillade, J.J., and Durrbach, A. (2011b). Long-lasting inhibitory effects of fetal liver mesenchymal stem cells on T-lymphocyte proliferation. *PLoS ONE* 6, e19988.
- Götherström, C., Ringdén, O., Westgren, M., Tammik, C., and Le Blanc, K. (2003). Immunomodulatory effects of human foetal liver-derived mesenchymal stem cells. *Bone Marrow Transplant* 32, 265–272.
- Haddad, R., Saldanha-Araujo, F., Haddad, R., and Saldanha-Araujo, F. (2014). Mechanisms of T-Cell Immunosuppression by Mesenchymal Stromal Cells: What Do We Know So Far? *BioMed Research International*, *BioMed Research International* 2014, 2014, e216806.
- Kim, H.-S., Choi, D.-Y., Yun, S.J., Choi, S.-M., Kang, J.W., Jung, J.W., Hwang, D., Kim, K.P., and Kim, D.-W. (2012). Proteomic analysis of microvesicles derived from human mesenchymal stem cells. *J. Proteome Res.* 11, 839–849.
- Krutzik, P.O., and Nolan, G.P. (2003). Intracellular phospho-protein staining techniques for flow cytometry: monitoring single cell signaling events. *Cytometry A* 55, 61–70.

- Kyurkchiev, D., Bochev, I., Ivanova-Todorova, E., Mourdjeva, M., Oreshkova, T., Belemezova, K., and Kyurkchiev, S. (2014). Secretion of immunoregulatory cytokines by mesenchymal stem cells. *World J Stem Cells* 6, 552–570.
- Lai, R.C., Tan, S.S., Teh, B.J., Sze, S.K., Arslan, F., de Kleijn, D.P., Choo, A., and Lim, S.K. (2012). Proteolytic Potential of the MSC Exosome Proteome: Implications for an Exosome-Mediated Delivery of Therapeutic Proteasome. *Int J Proteomics* 2012, 971907.
- Lai, R.C., Yeo, R.W.Y., and Lim, S.K. (2015). Mesenchymal stem cell exosomes. *Seminars in Cell & Developmental Biology* 40, 82–88.
- Liang, C., Chen, S., Wang, M., Zhai, W., Zhou, Z., Pang, A., Feng, S., and Han, M. (2013). [Synergistic immunomodulatory effects of interferon-gamma and bone marrow mesenchymal stem cells]. *ZhonghuaXue Ye XueZaZhi* 34, 213–216.
- Lv, F.-J., Tuan, R.S., Cheung, K.M.C., and Leung, V.Y.L. (2014). Concise Review: The Surface Markers and Identity of Human Mesenchymal Stem Cells. *Stem Cells* 32, 1408–1419.
- Mokarizadeh, A., Delirez, N., Morshedi, A., Mosayebi, G., Farshid, A.-A., and Mardani, K. (2012). Microvesicles derived from mesenchymal stem cells: Potent organelles for induction of tolerogenic signaling. *Immunology Letters* 147, 47–54.
- Murphy-Ullrich, J.E., and Poczatek, M. (2000). Activation of latent TGF- $\beta$  by thrombospondin-1: mechanisms and physiology. *Cytokine & Growth Factor Reviews* 11, 59–69.
- Padua, D., and Massagué, J. (2009). Roles of TGF $\beta$  in metastasis. *Cell Res* 19, 89–102.
- Park, K.-H., Park, H., Kim, M., Kim, Y., Han, K., and Oh, E.-J. (2013). Evaluation of NK cell function by flowcytometric measurement and impedance based assay using real-time cell electronic sensing system. *Biomed Res Int* 2013, 210726.
- Pierson, B.A., Gupta, K., Hu, W.S., and Miller, J.S. (1996). Human natural killer cell expansion is regulated by thrombospondin-mediated activation of transforming growth factor-beta 1 and independent accessory cell-derived contact and soluble factors. *Blood* 87, 180–189.
- Reinders, M.E., and Hoogduijn, M.J. (2014). NK Cells and MSCs: Possible Implications for MSC Therapy in Renal Transplantation. *J Stem Cell Res Ther* 4.
- Rouce, R.H., Shaim, H., Sekine, T., Weber, G., Ballard, B., Ku, S., Barese, C., Murali, V., Wu, M.-F., Liu, H., et al. (2016). The TGF- $\beta$ /SMAD pathway is an important mechanism for NK cell immune evasion in childhood B acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia* 30, 800–811.
- Shi, Y., Su, J., Roberts, A.I., Shou, P., Rabson, A.B., and Ren, G. (2012a). How mesenchymal stem cells interact with tissue immune responses. *Trends Immunol* 33, 136–143.
- Shi, Y., Su, J., Roberts, A.I., Shou, P., Rabson, A.B., and Ren, G. (2012b). How mesenchymal stem cells interact with tissue immune responses. *Trends Immunol* 33, 136–143.

- Simons, M., and Raposo, G. (2009). Exosomes – vesicular carriers for intercellular communication. *Current Opinion in Cell Biology* 21, 575–581.
- Suárez-Álvarez, B., López-Vázquez, A., Baltar, J.M., Ortega, F., and López-Larrea, C. (2009). Potential Role of NKG2D and Its Ligands in Organ Transplantation: New Target for Immunointervention. *American Journal of Transplantation* 9, 251–257.
- Sze, S.K., Kleijn, D.P.V. de, Lai, R.C., Tan, E.K.W., Zhao, H., Yeo, K.S., Low, T.Y., Lian, Q., Lee, C.N., Mitchell, W., et al. (2007). Elucidating the Secretion Proteome of Human Embryonic Stem Cell-derived Mesenchymal Stem Cells. *Mol Cell Proteomics* 6, 1680–1689.
- Théry, C., Amigorena, S., Raposo, G., and Clayton, A. (2001). Isolation and Characterization of Exosomes from Cell Culture Supernatants and Biological Fluids. In *Current Protocols in Cell Biology*, (John Wiley & Sons, Inc.), p.
- Vater, C., Kasten, P., and Stiehler, M. (2011). Culture media for the differentiation of mesenchymal stromal cells. *Acta Biomater* 7, 463–477.
- Yang, L., Pang, Y., and Moses, H.L. (2010). TGF- $\beta$  and immune cells: an important regulatory axis in the tumor microenvironment and progression. *Trends Immunol* 31, 220–227.
- Yu, B., Zhang, X., and Li, X. (2014). Exosomes Derived from Mesenchymal Stem Cells. *Int J Mol Sci* 15, 4142–4157

## FIGURE LEGENDS

### Figure 1. Characterization of FL-MSC and FL-exo.

A. FL-MSC were stained using various Abs against surface markers, or isotype control antibodies, and analyzed by flow cytometry. Black lines represent specific antibodies and dashed lines represent the corresponding isotype control.

B. FL-MSC were cultured with or without induction media for 2 or 3 weeks to induce cell differentiation. Osteogenic differentiation was detected by ALP activity assay (BCIP/NBT) and Alizarin red staining. Adipogenesis was detected by Oil red O staining. Original magnification: x20

C. Electron microscopy analysis of exosomes isolated from FL-MSC culture medium. Isolated EVs were round, with a diameter between 30 and approximately 120 nm, Scale bar: 200 nm.

D. Representative plots of immunophenotypic analyses of FL-exo showing the expression profile of tetraspanin (CD9, CD63, and CD81) and mesenchymal stromal cell markers.

E. Whole cell lysates of FL-MSC, or FL-exo were analyzed by western blot, demonstrating expression of typical exosome markers, such as tetraspanins and TSG101, and the lack of mitochondrial (cytochrome C), ER (calnexin), Golgi (syntaxin 6), and lysosomal (lamp-2) expression markers.

## **Figure 2. FL-exo have immunosuppressive effects on NK cells**

A. Fresh, healthy-donor PBMCs (n=6) were cultured under basal conditions or with activated (antiCD3/antiCD28) FL-MSCs at various FL-MSC:PBMC ratios or FL-exo at various concentrations. Following 4 days of culture, cells were analyzed by flow cytometry. T cells were identified using anti-CD3 and their proliferation was evaluated using the CFSE dilution method. Error bars represent the mean  $\pm$ SEM of six experiments, using FL-MSCs from four different donors and FL-exo from six different preparations.

B. Sorted CD3<sup>-</sup>/CD56<sup>+</sup> NK cells (n=4) were cultured under basal conditions or with activated FL-MSCs at various FL-MSC:NK ratios or FL-exo at various concentrations. At day 7, cell proliferation was evaluated using the CFSE dilution method by flow cytometry. Graphs show the mean  $\pm$ SEM. Error bars represent mean  $\pm$ SEM of eight experiments using NK cells from four different donors, FL-MSCs from four different donors, and MSC- exosomes from eight different preparations.

Data are represented as the mean  $\pm$  SEM, \*P < 0.05. NS: non stimulate, S stimulate

## **Figure 3. FL-exo alter NK cells phenotype and cytotoxic function.**

Freshly purified CD3<sup>-</sup>/CD56<sup>+</sup> NK cells ( $5 \times 10^4$ /well) cultured under basal conditions, or stimulated with IL-2 (10ng/ml), incubated with FL-MSCs or FL-exo.

A. NK cells (n = 8) were cultured with FL-MSCs (NK: FL-MSC ratio 1:2) or FL-exo (400  $\mu$ g/ml) for 4 days. NK cells were collected and surface expression of the activating receptors NKG2D and NKp30 were assessed by flow cytometry.

B. qPCR was performed on mRNA isolated from stimulated NK cells (n=4) incubated or not with FL-exo (400 µg/ml) for 48 h. Bar graphs indicate the expression levels of the NKG2D and NKp30 transcripts. The endogenous control GAPDH was used to internally standardize the levels of gene expression. Data are expressed as the fold difference between stimulated NK cells (for which the levels of gene expression have been set to 1) and stimulated NK cells treated with FL-exo. Results were obtained with cells from four different NK cell donors.

C. The proportion of CD56-bright activated NK cells (n = 5) after culture with FL-MSCs (at NK:FL-MSC ratio of 1:2) or FL-exo (400 µg/ml) for 4 days. NK cells were collected and surface CD56 expression was assessed by flow cytometry.

D. Stimulated NK cells (n=10) cultured with FL-MSCs or FL-exo at various concentration. K562 cells were included during the last 4 hours of culture on day 4. NK cells were collected and staining with anti-CD56, antiCD107a. Fluorescence was measured by flow cytometry.

E. VPD450-labeled K562 cells were incubated with NK cells (n=5) cultured for 4 day with FL-MSCs or FL-exo at various concentrations. After 4 hours, K562 cells were stained with 7AAD. Fluorescence was measured by flow cytometry.

Data are represented as mean  $\pm$ SEM, \*P<0.05; \*\*P<0.01; \*\*\*P<0.0001, NS: non stimulate, S stimulate



#### **Figure 4 FL-exo associated TGFβ and TSP1 as molecular regulators**

Surface expression of TGFβ1 (A and B) and TSP1 (C and D) on FL-FL-exo. Results were obtained with 4 different donors and productions of FL-exo, Data are represented as mean ±SEM, \*P<0.05.

E. FL-exo were lysed and immunoprecipitated with anti-LAP

#### **Figure 5 The TGFβ1/Smad pathways suppress NK cell effectors functions.**

Freshly purified CD3-/CD56+ NK cells ( $5 \times 10^4$ / well, n=3) were stimulated with IL-2 (10ng/ml) and treated with FL-exo (400μg/ml) or TGFβ1 (10ng/ml) for 30 min.

A. P-Smad2/3 expression in NK was evaluated by flow cytometry

B. Confocal microscopy of nuclear translocation of Smad in NK cells. NK cells were immunolabeled with anti-Smad2/3 conjugated to AF488 (green). nuclei were counterstained with Hoechst (blue)

NS: non stimulate, S stimulate

#### **Figure 6 Down-regulation of NK activation is driven by FL-exo associated TGFβ1.**

Freshly purified CD3-/CD56+ NK cells (n=4) ( $5 \times 10^4$ / well) were cultured under basal condition or after stimulation with IL-2 (10ng/ml) and treated with FL-exo (400μg/ml) or TGFβ1, with or without anti-TGFβ1 (50μg/ml) for 4 days.

A. Surface expression of NKG2D and NKp30 were analyzed by flow cytometry.

B. Stimulated NK cells cultured with FL-exo, and incubated with VPD450-labeled K562 cells for 4 hours on day 4. K562 cells were stained with 7AAD and NK cells were stained with anti-CD107a. Fluorescence was measured by flow cytometry.

Data are represented as mean  $\pm$ SEM, \*P<0.05; \*\*P<0.01. , NS: non stimulate, S stimulate

### **Supplemental information:**

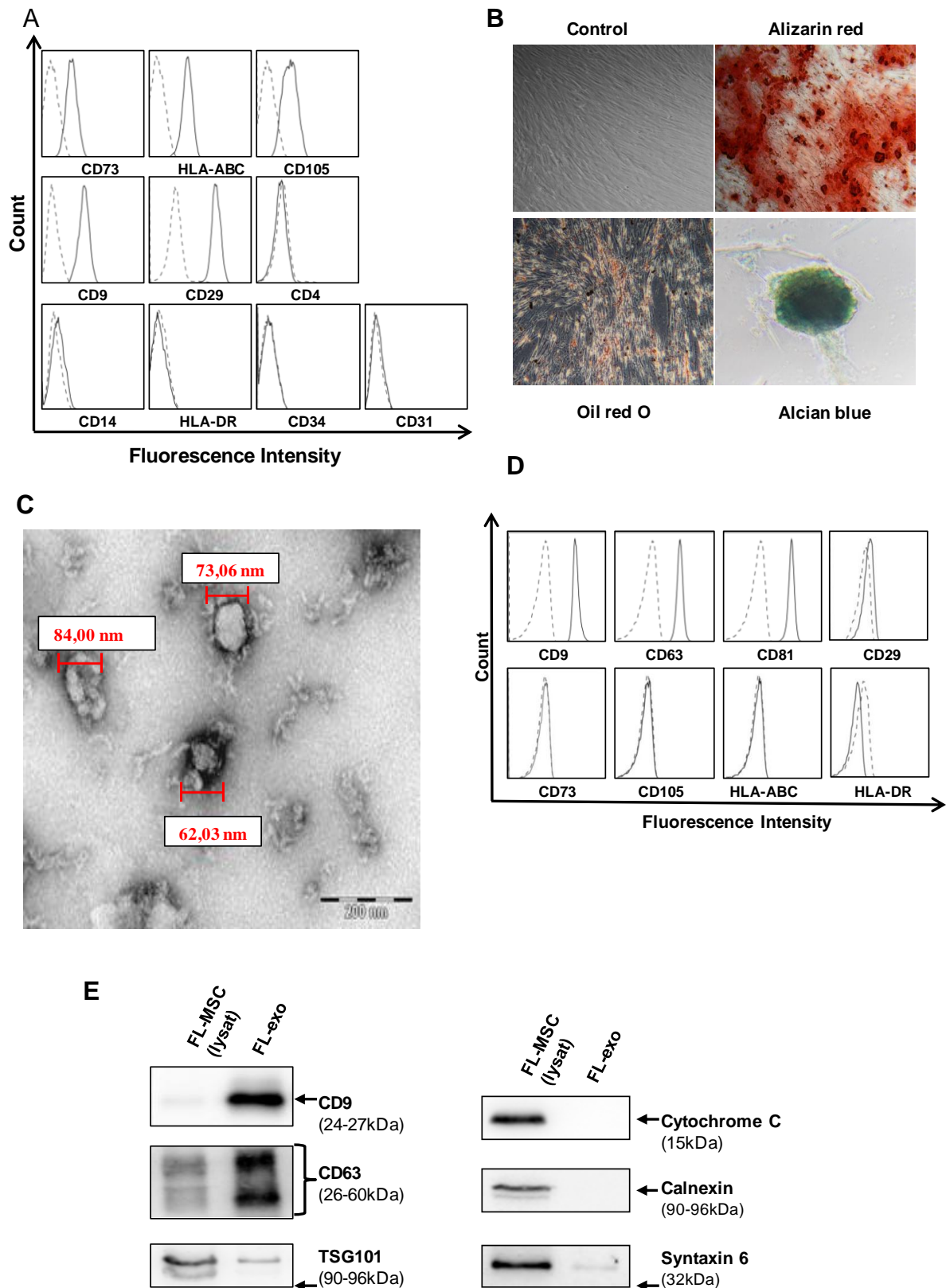
#### **Mass Spectrometric Analysis and protein identification for FL-exo**

Mass spectrometric (MS) experiments were performed using an Ultimate 3000 nano LC system (Dionex, now Thermo Fisher Scientific) online connected to an Orbitrap hybrid mass spectrometer (LTQ Orbitrap Velos, Thermo Fisher Scientific, Bremen, Germany), equipped with a nanoelectrospray ion source (Thermo Fisher Scientific).

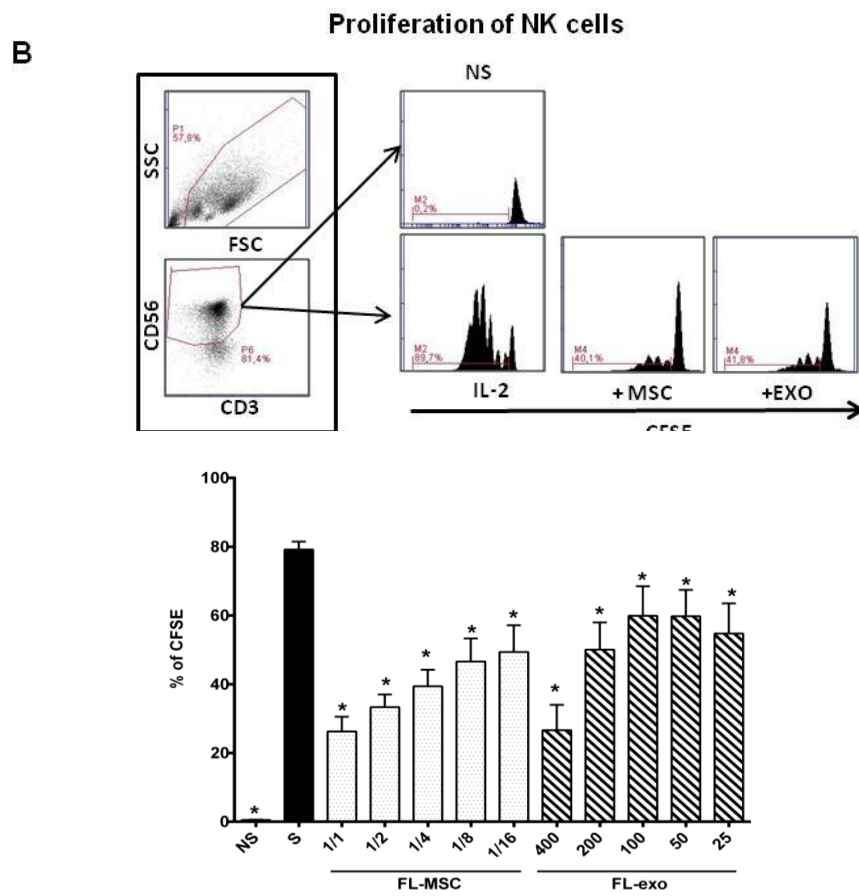
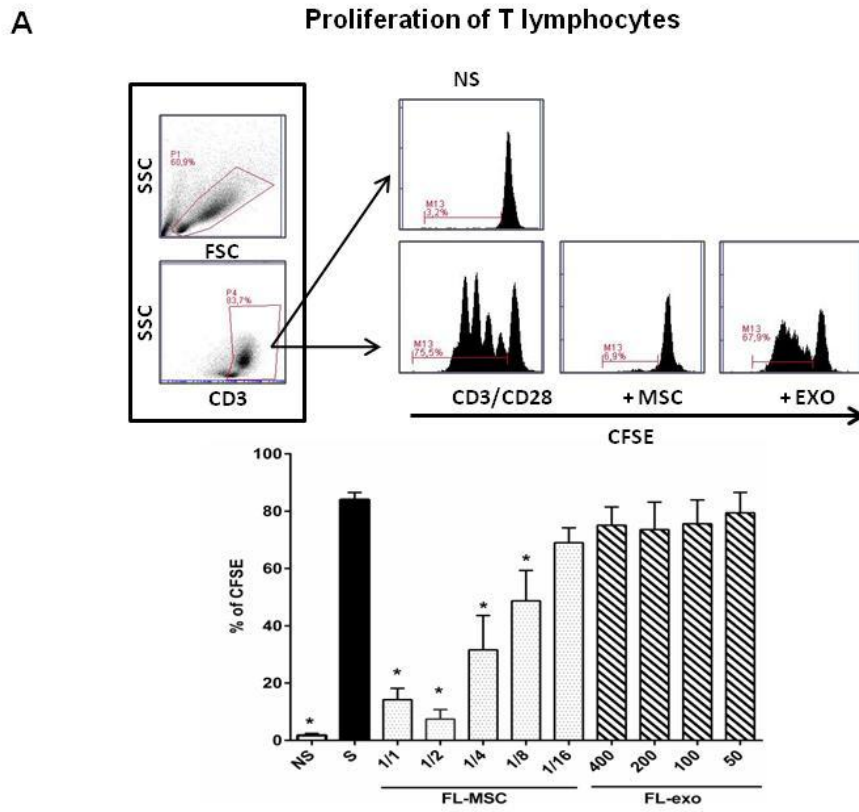
2 $\mu$ L of peptide mixtures were injected in the system by using a pre-concentration column (Acclaim PepMap C18, 100  $\mu$ m ID x 2 cm length, 5 $\mu$ m particle size and 100 Å porosity; *Thermoscientific*), then, the peptides were separated by reversed phase chromatography using a C18 column (Acclaim PepMap nanoViper C18, 75  $\mu$ m ID x 15 cm length, 2  $\mu$ m particle size, 100 Å porosity, *Thermoscientific*), in a linear 45 min LC gradient from 4% to 55% acetonitrile in 0.1% formic acid (v/v) at a flow rate of 250 nl/min and directly electrosprayed into the mass spectrometer. All solvents are HPLC Grade from Fisher Scientific.

The LTQ Orbitrap Velos was operated in the positive mode to simultaneously measure full scan MS spectra (from m/z 380–1700) in the Orbitrap analyzer at resolution R= 30 000 following isolation and fragmentation of the five most intense ions in the linear ion trap. The collision energy for the MS/MS scan events was preset at a value of 35 %, the isolation window was set at 3 m/z, dynamic exclusion option was enabled. The capillary voltage was set at 1.6 kV and the capillary temperature was 275.

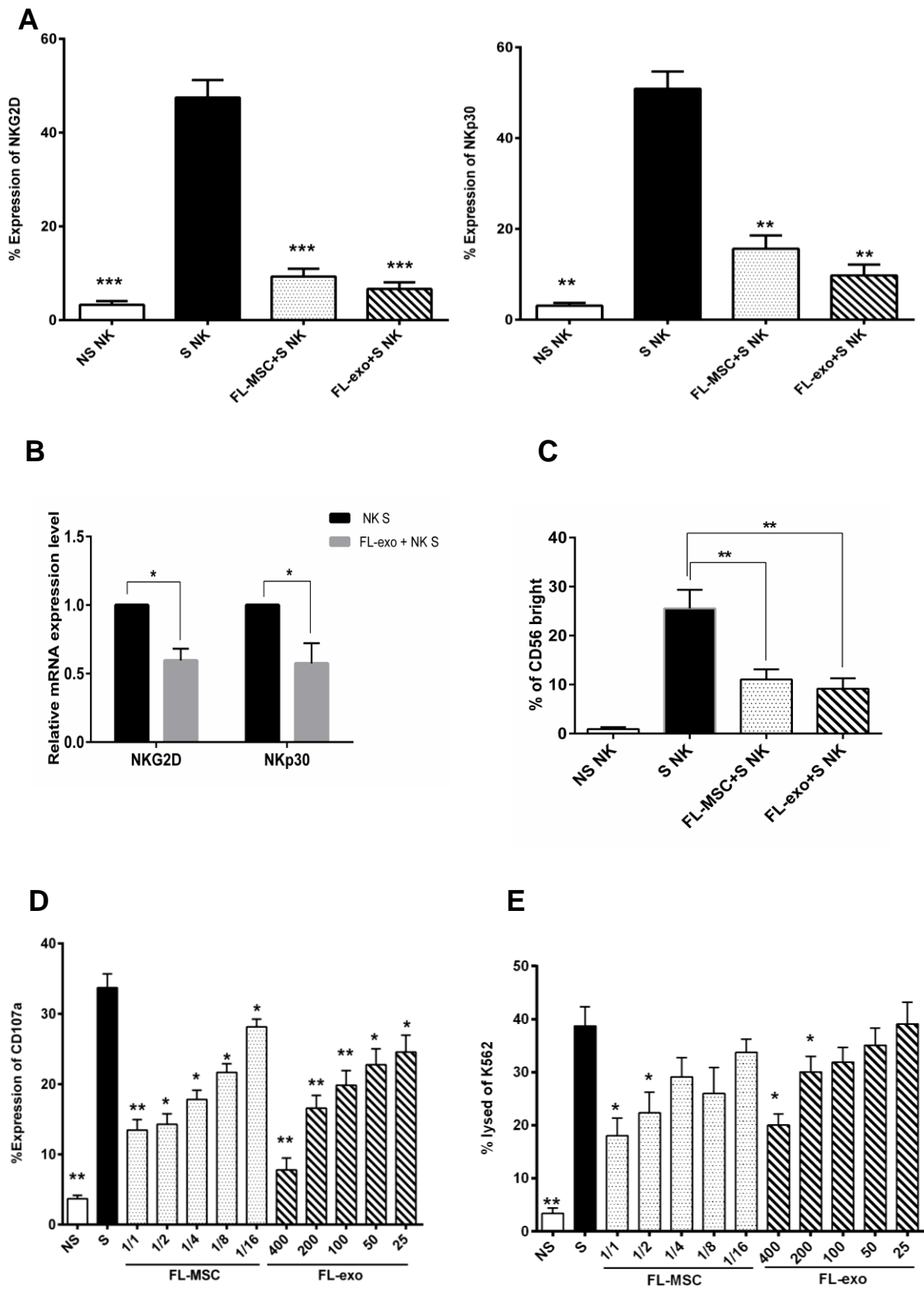
Raw MS file were processed with Proteome Discoverer (version 1.4). Peak list files were searched using SEQUEST against the human SwissProt protein database (released on Jun 2016). The search included variable modifications for oxidation of methionine, peptide N-terminal acetylation and Carbamidomethylation of cysteine was set as a fixed modification. Peptides were matched using trypsin as a digestion enzyme and one miss cleavage site was allowed. The mass error for the precursor ions (full MS) is less than 10 ppm ( $\text{error}_{\text{ppm}} = (m/z_{\text{experimental}} - m/z_{\text{exact}}) \times 10^6 / m/z_{\text{exact}}$ ). Mass error for ions from the MS/MS spectra is reported less than 0.6 Da. Peptides mass is searched between 350 Da and 7000 Da with time retention from 10 min to 60 min. Peptide identifications were validated by determination of false positives by Target decoy PSM validator. It is high if the false positive rate (FDR or false Discovery rate) is less than 1%, low if the FDR is greater than 5% and average (medium between 1 and 5 %). Peptide identification Xcorr were calculated by the correlation of MS/MS experimental spectrum compared with the theoretical MS/MS spectrum generated by the Proteome Discoverer 1.4 software.



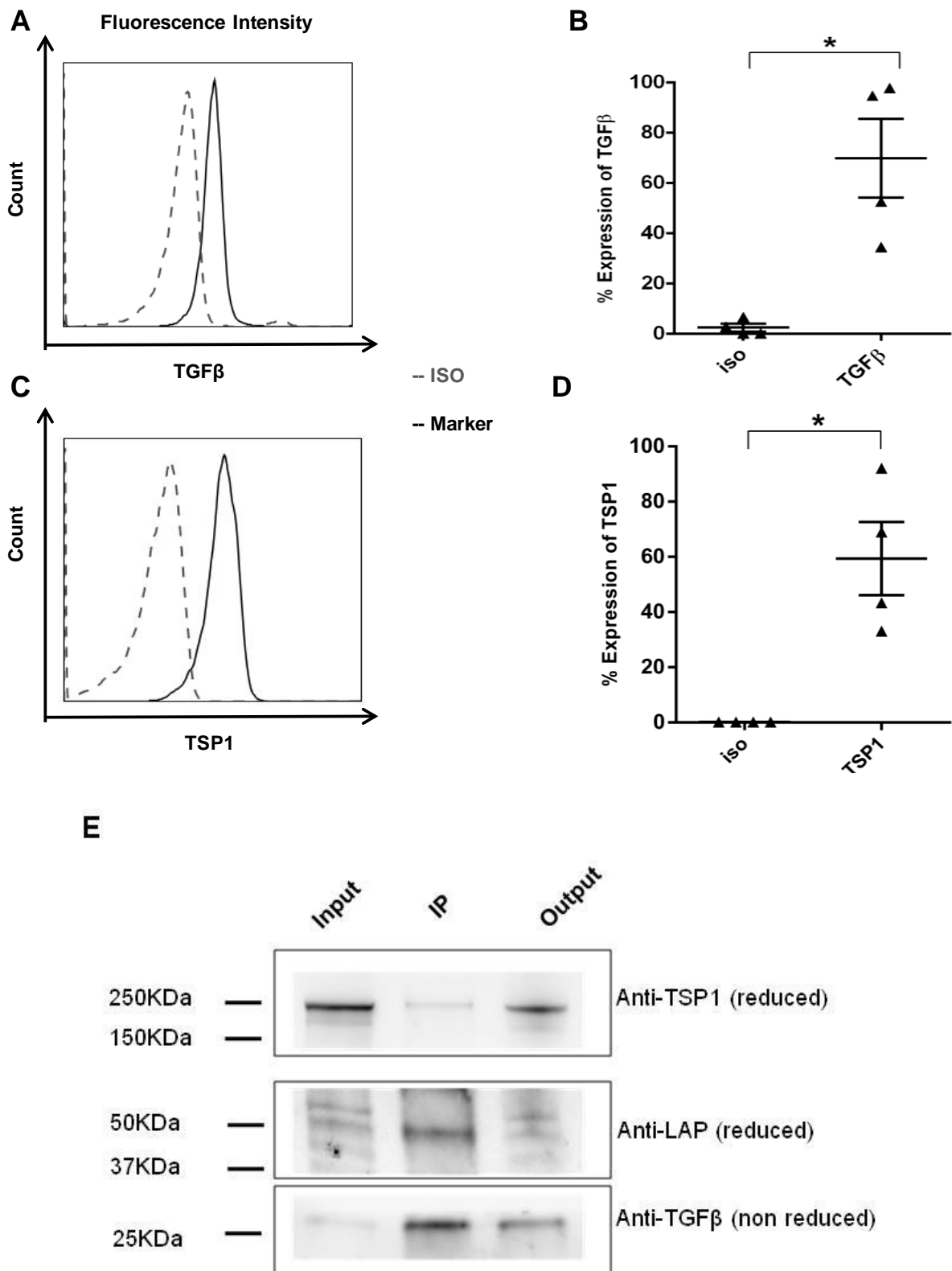
**Figure 1 Characterization of FL-MSC and FL-exo**



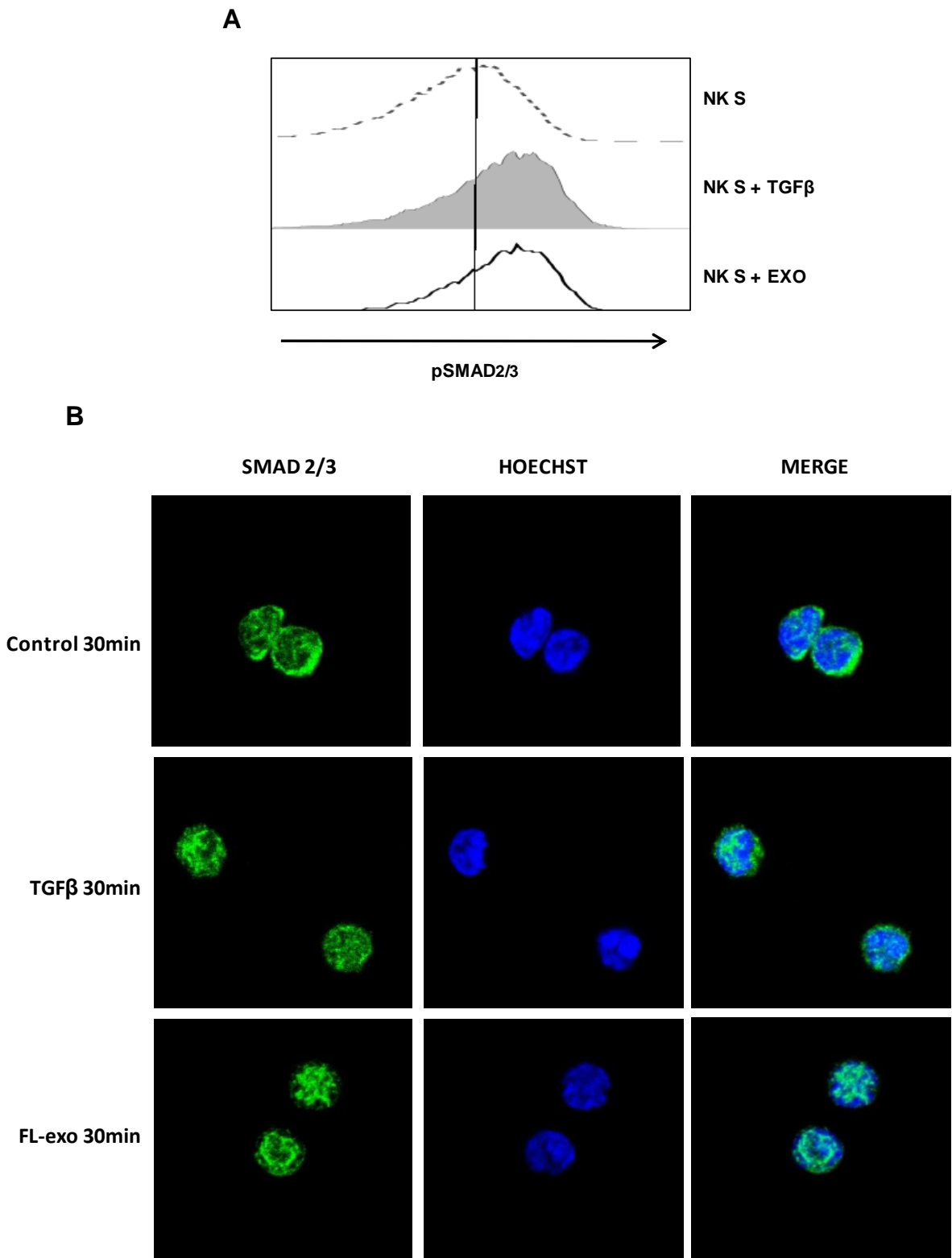
**Figure 2** FL-exo have immunosuppressive effects on NK cells



**Figure 3 FL-exo alter NK cells phenotype and cytotoxic function.**



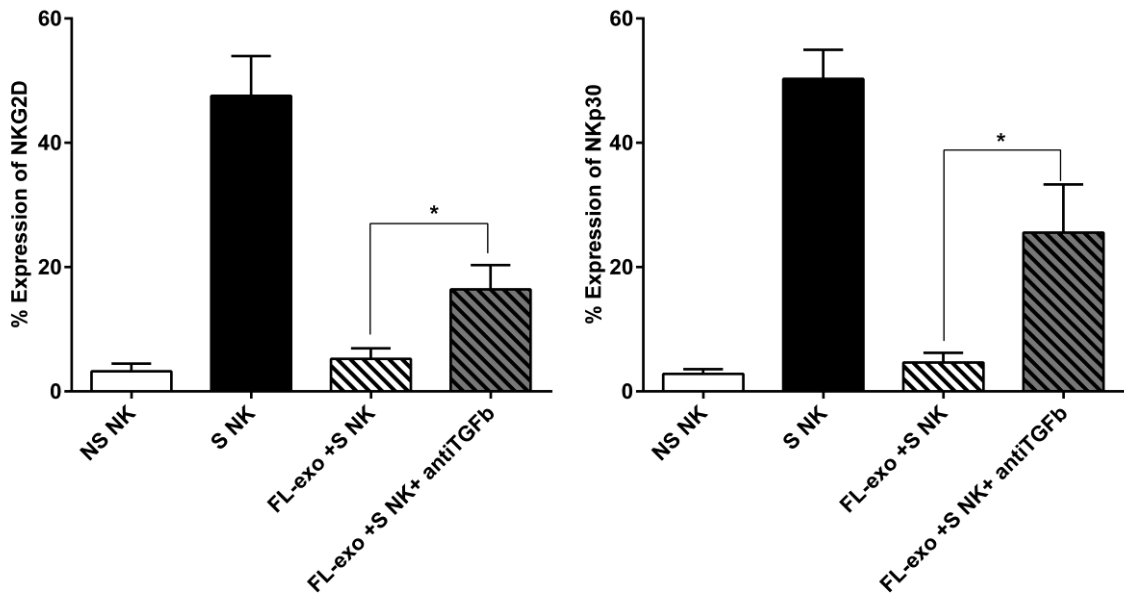
**Figure 4** FL-exo associated TGFβ and TSP1 as molecular regulators



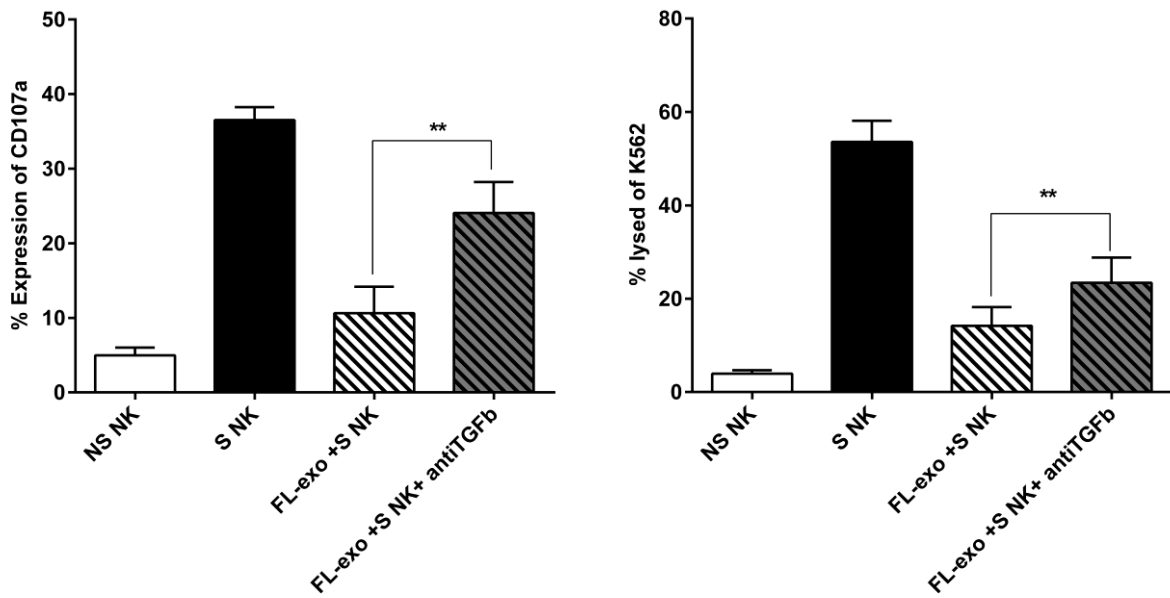
**Figure 5 TGF $\beta$ 1/SMAD pathways suppress NK cell effector functions.**



**A**



**B**



**Figure 6 Down-regulation of NK activation is driven by FL-exo associated TGFβ1.**

# *Discussion et Perspective*

## DISCUSSION

*In vitro*, les propriétés immunorégulatrices des CSM sont de courte durée. En effet, les propriétés immunorégulatrices des BM-CSM se limitent à quelques jours en culture (inférieur à 10 passages). Cela suggère que l'absence d'efficacité prolongée de ces cellules pourrait être liée à leur mort ou à une perte de leurs fonctions régulatrices. Ainsi, l'identification de CSM capables de maintenir leurs propriétés immunorégulatrices est nécessaire. Plusieurs équipes, dont la notre, se sont de ce fait, orientées vers l'obtention de CSM d'origine fœtale (foie, pancréas) ou dérivées à partir de cellules embryonnaires (ES) (*in 't Anker et al., 2004; Barberi et al., 2005; Giuliani et al., 2011a; Götherström et al., 2005; Olivier et al., 2006; Trivedi and Hematti, 2008*). Notre étude précédente, comparant les CSM du foie fœtal et les CSM adultes, a montrée que les CSM de foie foetal peuvent supporter une expansion rapide *in vitro* à long terme et, en parallèle, maintenir leurs propriétés immunorégulatrices (*Giuliani et al., 2011a*). Ces caractéristiques rendent les CSM fœtales très attrayantes à des fins thérapeutiques, pour lesquels une expansion rapide, un grand nombre de cellules et des propriétés immunorégulatrices prolongées sont nécessaires. De même, le maintien de leur fonction *in vitro* peut faciliter la production d'exosomes à usage thérapeutique. Les CSM utilisées pour la production des exosomes sont d'abord caractérisées selon les critères de l'ISCT (*Dominici et al., 2006*)

Notre étude a consisté à caractériser les exosomes dérivés des CSM de foie fœtal (FL : Fetal Liver), et à comparer leurs effets immunomodulateurs sur les lymphocytes T et les cellules NK. En effet, une limite à l'utilisation des CSM est leur blocage dans le système vasculaire pulmonaire après une injection intraveineuse (filtration pulmonaire) du fait de leur taille ou de propriétés d'adhésion spécifiques limitant leur adressage au niveau des sites thérapeutiques, ceci nous a conduits à l'utilisation d'exosomes dérivés des MSC. Ainsi, dans un premier temps, la qualité et la pureté des échantillons d'exosomes obtenus ont été vérifiées afin de confirmer l'obtention d'une population homogène d'exosomes pour les futures expérimentations. Ensuite, nous avons caractérisé les marqueurs membranaires et la composition protéique des exosomes sécrétés par les FL-CSM et avons comparé ces résultats au contenu protéique des cellules mères (productrices) FL-CSM. Enfin, une approche fonctionnelle de ces exosomes nous a permis de déterminer leur potentiel immunomodulateur *in vitro* sur l'activité lymphocytaire.

## 1. Isolement des exosomes sécrétés par les CSM

L'isolement des exosomes sécrétés par les CSM à partir des milieux conditionnés, a été réalisé selon la méthode de centrifugations différentielles, la plus décrite dans la littérature (*Théry et al., 2006*).

Après l'isolement, il a été nécessaire de s'assurer de la présence d'exosomes et la qualité de leur préparation.

Dans un premier temps, la taille et la forme des nanovésicules sécrétées par les CSM a été confirmés par microscopie électronique à transmission (ME). L'observation en ME a montré que ces nanovésicules ont une morphologie sphérique de type œuf sur le plat, et présentent une taille homogène comprise entre 60 à 100 nanomètres. Cela correspond à la forme et la taille des exosomes étudiés et décrits dans la littérature (*Simons and Raposo, 2009; Théry et al., 2006*). De plus, l'homogénéité de la taille des nanovésicules a également été confirmée par la technique de Nanosight

Puis, l'utilisation de Western Blot nous a permis d'établir un enrichissement de marqueurs protéiques caractéristiques des exosomes (CD9, CD63 et Tsg101) par rapport au contenu protéique cellulaire. De même, nous avons pu confirmer la qualité des exosomes extraits et en particulier leur origine par l'analyse des marqueurs caractéristiques du réticulum endoplasmique (calnexin), des mitochondries (cytochrome C) et de l'appareil de Golgi (Syntaxin 6) qui n'étaient pas retrouvés dans les préparations. Nous avons également pu confirmer l'origine endosomale des vésicules sécrétées par l'expression du marqueur CD107b. Enfin, la phénotypage des exosomes par cytométrie en flux, a montré que les exosomes sécrétés par les CSM portent certaines caractéristiques membranaires spécifiques des CSMs, tels que l'expression positive de CD29 et l'absence d'expression de HLA-DR et HLA-A/B/C. Cette technique de cytométrie en flux, consiste à fixer par liaison électro-hydrophobique des exosomes sur des microbilles. Cela permet une analyse par cytométrie en flux de ces microvésicules habituellement non détectable de par leurs tailles. Tout comme en Western Blot cette technique a montrée que les vésicules isolées expriment les marqueurs protéiques membranaires des exosomes tel que les tétraspanines (CD9, CD63, CD81).

Les sérums collectés possèdent une grande quantité d'exosomes. C'est le cas des sérums de veaux fœtaux (SVF). Pour limiter la présence d'exosomes du SVF, nous avons dépleté le SVF en exosomes par 2h d'ultracentrifugation à 100000g. Cette déplétion est cependant

incomplète selon l'analyse de Nanosight. Une limite de notre méthode de production des exosomes est la présence d'une contamination des exosomes du SVF, cependant, nous avons pu vérifier que les exosomes de SVF n'avaient aucune fonction régulatrice. Qui plus est, notre système de production d'exosomes ne permet pas de produire de grandes quantités d'exosomes à partir de FL-MSC. Une nouvelle méthode de production par ultrafiltration tangentielle est en cours de mise au point et permettra la production d'une quantité plus importante d'exosomes.

Une autre limite de la méthode d'isolement par ultracentrifugation à haute vitesse est l'altération de la structure des exosomes obtenus. L'observation par ME montre la présence d'agrégats d'exosomes. La présence d'exosomes du SVF et d'agrégats pourrait expliquer la grande quantité d'exosomes utilisée dans notre étude. Des analyses ultérieures sur les exosomes isolés par d'autre méthode, comme l'ultrafiltration tangentielle, sont nécessaires. Celles-ci permettraient de comparer l'effet immunomodulateur des exosomes sur les lymphocytes, par des tests fonctionnels, en fonction du degré de pureté des exosomes.

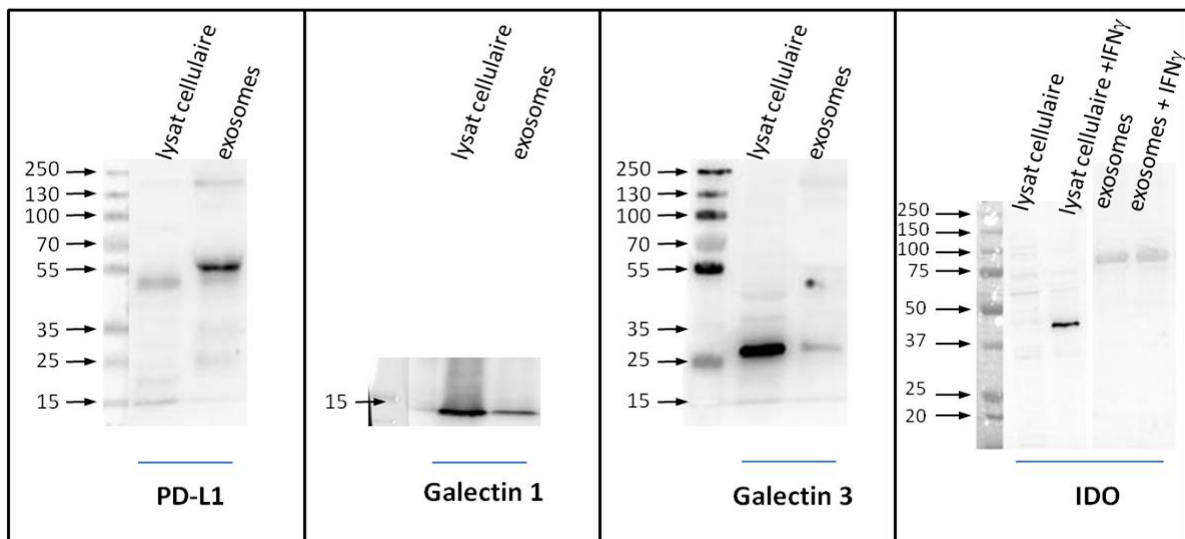
## **2. Les exosomes dérivés des FL-CSM n'inhibent pas la prolifération des lymphocytes T**

Les CSM peuvent inhiber la prolifération des lymphocytes T. Cependant, des études *in vitro* ont montré des effets variables des vésicules extracellulaires sécrétées par les CSM sur l'activation des lymphocytes T. Par exemple, les exosomes dérivés des BM-CSM ne suppriment pas la prolifération des lymphocytes T induite par les anticorps anti-CD3 et anti-CD28, même en utilisant des doses très élevées d'exosomes (*Del Fattore et al., 2015a*). Par contre, les résultats d'une autre équipe ont montrés que les exosomes dérivés de CSM issues de tissu adipeux ont un effet inhibiteur sur les lymphocytes T, ceux-ci étant stimulés par des anticorps antiCD2/antiCD3/antiCD28 (*Blazquez et al., 2014*). Les divergences de ces résultats sont probablement dues aux sources différentes de CSM, ainsi qu'à la méthode expérimentale de production d'exosome utilisée.

Dans notre étude, les exosomes dérivés des FL-CSM n'inhibent pas la prolifération des lymphocytes stimulés par anti-CD3/anti-CD28. L'un des facteurs sécrétés responsable de l'effet suppresseur des CSM sur lymphocytes T en condition inflammatoire est l'IDO. La production d'IDO par les CSM est induite par les cytokines inflammatoires, tel que le INF- $\gamma$  (*Gazdic et al., 2015*). Notre analyse protéomique des exosomes a montré une absence d'IDO

dans l'exosomes dérivés des FL-CSM a l'état basal ou après stimulation par l'INF- $\gamma$ . Par contre nous avons trouvé un enrichissement de PD-L1 dans les exosomes comparé aux CSM, ainsi, que la présence de Galectine 1 et 3 (*Najar et al., 2010b; Sioud et al., 2010*), connues pour réguler la suivie des lymphocytes T. Mais, bien que présentent dans les exosomes les Galectine 1 et 3 ne sont pas enrichies par rapport aux CSM correspondantes (**Figure 16**).

Il a été proposé que l'activité immunomodulatrice des CSM soit médiée par la synergie de plusieurs facteurs sécrétés (*Shi et al. 2012*). Les présences des certains facteurs régulateurs de CSM dans leur exosomes ne suffit pas à inhiber la prolifération des lymphocytes T, suggèrent que les mécanismes impliquées dans l'immunomodulation de la prolifération des lymphocytes T est différents entre les CSM et leur exosomes. De plus certaines auteurs suggèrent que les exosomes dérivés de CSM n'affectent pas la prolifération des cellules CD3<sup>+</sup> totaux mais modifie le ratio Treg/Teff en polarisant des lymphocytes T CD4<sup>+</sup> vers Treg (*Del Fattore et al., 2015b; Kilpinen et al., 2013*). Cependant, les études plus fines sur l'effet régulateur des exosomes sur les Treg sont nécessaires. L'effet immunomodulateur de CSM pouvant être la conséquence de facteurs sécrétés et de contacts cellulaires.



**Figure 16. Expression de molécules ayant une action immunomodulatrice dans les exosomes.** *PD-L1 (B7-H1) est connu comme inhibiteur de la prolifération T, via le récepteur PD-1. Nous avons trouvé un enrichissement de PD-L1 dans les exosomes comparé aux CSM correspondantes. La différence de taille pourrait s'expliquer par une différence de glycosylation.*

*Les Galectines 1 et 3, connues pour réguler la survie des cellules T sont présentes dans les exosomes mais ne sont pas enrichies par rapport aux CSM correspondantes. L'IDO (Indoleamine 2,3-dioxygénase), molécule clé de l'immunomodulation par les CSM, est exprimé sous stimulation par l'IFN $\gamma$  dans les CSM mais est absente dans les exosomes*

### **3. Les exosomes dérivés des FL-CSM exercent une immunosuppression sur l'activation des cellules NK**

Les CSM sont capables d'inhiber la prolifération des cellules NK et leur cytotoxicité par inhibition de leur dégranulation (*Giuliani et al., 2011c; Spaggiari et al., 2008*). Les études récentes ont suggéré que les cellules NK pourraient fonctionner comme le lien entre le système immunitaire inné et adaptatif, et jouer un rôle important dans le rejet allogénique. L'infiltration des cellules NK dans les allogreffes a été décrite dans les modèles de rejet (*Ito et al., 2008; Obara et al., 2005*). Nous nous sommes donc intéressés à l'effet des exosomes dérivés des CSMs sur les fonctions des cellules NK.

Nous avons d'abord étudié la prolifération des cellules NK. Nos résultats ont montré que les exosomes dérivés de FL-CSM ont un effet inhibiteur similaire à celui de leurs cellules d'origine, de façon dose dépendante. Dans un deuxième temps, nous avons cherché à savoir si cet effet inhibiteur atteint aussi l'activation et la cytotoxicité des cellules NK. Notre système expérimental *in vitro* utilise l'IL-2 comme activateur des cellules NK. Suite à l'activation des cellules NK par l'IL-2, on observe une augmentation de la sous-population des cellules NK CD56 bright, de l'expression des récepteurs activateurs des cellules NK, ainsi que de l'activité cytotoxique. L'incubation des cellules NK en présence d'exosomes sécrétés par FL-CSM, montrent que les exosomes peuvent inhiber l'activation et en parallèle, diminuer leur cytotoxicité comme le montre l'inhibition de la dégranulation et de leur capacité de lyse des cellules cibles.

Pour comprendre le mécanisme d'action des exosomes sur les cellules NK, nous nous sommes concentrés sur le récepteur activateur NKG2D, qui joue un rôle majeur dans la cytotoxicité médiée par les cellules NK. Récemment, l'importance du NKG2D a été démontrée en transplantation d'organe allogénique dans des modèles animaux ainsi que chez l'homme. La présence de NKG2D et de ses ligands au sein des allogreffes, est associé au rejet de greffe allogénique (*Ascon et al., 2006; Ito et al., 2008; Ogasawara et al., 2005*). La déplétion des

cellules NK ou le blocage de l'expression de NKG2D sont des voies à explorer pour le développement de nouvelles thérapies de prévention du rejet de greffe. Nos résultats ont démontrés que les exosomes dérivés des FL-CSM sont capables de significativement diminuer l'expression membranaire de NKG2D, par une inhibition au niveau transcriptomique. Le même effet est observé pour les récepteurs NCR : NKp30 et NKp44, suggérant l'existence d'autres mécanismes d'inhibition de l'activation des cellules NK par des exosomes dérivés de FL-CSM. En effet, le TGF $\beta$  n'est pas la seule molécule exprimée par les MSC capable d'inhiber l'expression des NCR. Nous avons observé également que cette diminution de NKG2D et de NKp30 s'accompagnent d'une diminution de la dégranulation et la lyse de cellules cibles. Ces résultats nous conduisent à penser que les exosomes dérivés de FL-CSM sont des immuno-inhibiteurs, plutôt que des activateurs.

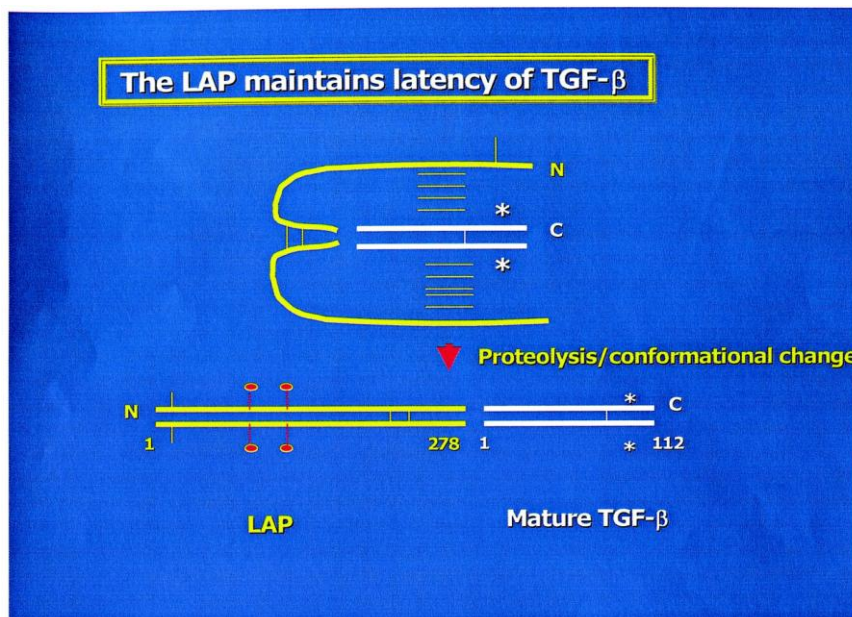
L'inhibition de l'expression de NKG2D est un mécanisme important par lequel les exosomes dérivés de tumeurs peuvent supprimer l'activation des cellules effectrices et favoriser l'échappement des tumeurs à la réponse immunitaire (*Clayton et al., 2008; Lundholm et al., 2014; Mincheva-Nilsson and Baranov, 2014*). Nous suggérons que les exosomes dérivés de FL-CSM exercent probablement des fonctions similaires à ceux dérivés de tumeur vis-à-vis à la cellule NK. D'après la littérature, l'inhibition des cellules NK par la tumeur se fait par deux mécanismes : par la sécrétion des ligands de NKG2D solubles (NKG2D-L) et par l'expression du facteur régulateur TGF $\beta$  (*Mincheva-Nilsson and Baranov, 2014; Yang et al., 2010*). Les tests fonctionnels avec des anticorps bloquants anti-MIC, n'ont eu aucun effet sur l'inhibition des cellules NK traitées par des exosomes dérivés de FL-CSM, suggérant que l'inhibition de l'activation des cellules NK ne se fait pas via des ligands solubles de NKG2D. A l'inverse, l'incubation des exosomes avec des anticorps neutralisant le TGF $\beta$  restaure l'expression de NKG2D et NKp30 à la surface des cellules NK. De plus la restauration de l'expression de ces récepteurs est corrélée à l'augmentation de la sous population CD56bright et de la cytotoxicité de cellules NK. Ces résultats suggèrent que l'inhibition de la cytotoxicité des cellules NK induite par les exosomes est dépendante du TGF $\beta$ .

Le TGF $\beta$  est un facteur régulateur crucial qui peut altérer la prolifération, la cytotoxicité et l'expression de récepteurs activateurs des cellules NK par l'activation de la voie de signalisation de TGF $\beta$ /Smad. Cette molécule est impliquée dans la progression tumorale et l'immunomodulation médiée par les CSM (*Sotiropoulou et al., 2006; Sun et al., 2012; Yang et al., 2010*). Le TGF $\beta$  est synthétisé et sécrété par la plupart des cellules sous forme d'un précurseur inactif, appelé TGF $\beta$  latent. Le complexe latent est formé par un homodimère de



TGFβ mature relié par un pont disulfure et un homodimère de LAP (latency associated peptide) (**Figure 17**). La Thrombospondine-1 (TSP1) est connu pour être un facteur capable d'activer le TGFβ, via l'interaction de TSP1 avec le complexe TGFβ *latent* (Murphy-Ullrich and Poczatek, 2000). Récemment, il a été suggéré que TSP1 est un important régulateur de l'activité des CSMs via le TGFβ (Belotti et al., 2016). De plus, Mkarizadeh et ses collègues ont montré, par cytométrie en flux, que les exosomes dérivés des CSM portent le TGFβ membranaire.

Notre analyse de spectrométrie de masse a montré la présence de TSP1 sur les exosomes dérivé de FL-CSMs. Par cytométrie en flux, nous avons retrouvé une expression de TGFβ et TSP1 sur la membrane des exosomes. Et par le co-immunoprécipitation nous avons montré une co-précipitation de LAP et du TGFβ mais aussi en association avec TSP1. De plus, le traitement des cellules NK par des exosomes induit une activation de la voie de signalisation Smad dans les cellules NK, et le degré d'activation est similaire à celui induit par l'exposition à du TGFβ seul.



**Figure 17. Modèle de la structure du complexe TGFβ latent.** Le peptide associé à la latence (LAP) est schématisé en jaune et le domaine mature représenté en blanc. Les sites de glycosylation par le mannose-6-phosphate sont indiqués en rouge. La liaison disulfure impliquée dans la formation du dimère est indiquée, de même que le groupe thiol N-terminal qui se lie à la protéine de liaison TGFβ latente (non représentée). (\*) Représente le site putatif dans le domaine mature qui se lie au TGFβ RII. (Murphy-Ullrich and Poczatek, 2000)

L'ensemble de nos résultats suggère que le potentiel immunorégulateur des exosomes dérivés de FL-CSM provient de leur transport de facteurs tolérogènes biologiques actifs, et en particulier le TGF- $\beta$ . Notre étude suggère que le TGF $\beta$  est une molécule ancrée sous sa forme inactivée à la membrane des exosomes. Son activation via TSP1 libérait la forme activée et pourrait être liée à certaines protéases ou d'autres facteurs pouvant moduler la PGE2 ou des micro-ARN. Des analyses complémentaires sont nécessaires pour préciser ces mécanismes et les facteurs impliqués.

## PERSPECTIVE

La perspective d'une immunothérapie à base d'exosomes est très prometteuse. Contrairement à l'immunothérapie cellulaire, les exosomes sont des produits cellulaires non viables et cela présente de nombreux avantages. En immunothérapie cellulaire, la nécessité de préserver la viabilité cellulaire augmente la complexité de la production, du stockage, du transport et de l'injection. En revanche, les exosomes sont des produits biologiques qui peuvent maintenir leur fonction après une conservation à -20°C ce qui rend leur stockage aisé. Comme je l'ai décrit dans les chapitres précédents, la sécrétion d'exosomes par des CSM varie selon le microenvironnement. La production des exosomes *in vitro*, en conditions contrôlées, permet de maîtriser les pouvoirs immunomodulateurs ultérieurs de ces vésicules. Il est donc nécessaire d'initier un processus de fabrication strictement réglementé et surveillé. Cela se traduira essentiellement par des produits sur le marché plus qualifiés et plus sûrs qui pourraient être livrés aux patients en temps opportun. L'administration d'EV au lieu de cellules permettrait également d'atténuer de nombreux risques associés à une thérapie cellulaire, tel que l'effet de l'accumulation pulmonaire lors d'injection de CSMs (*François et al. 2006; Toma et al. 2009*) et les risques de tumorigénèse (*Kansy et al., 2014; Karnoub et al., 2007; Kucerova et al., 2010; Prantl et al., 2010*).

Cependant, notre protocole expérimental de production d'exosomes n'est pas optimisé. Il nous faut appliquer d'autres méthodes telles que la filtration tangentielle pour produire des exosomes en grande quantité. Bien que la plupart des études ont confirmé les effets bénéfiques des exosome/microvésicules dérivés des CSM, *in vivo* et *in vitro* comme je l'ai expliqué Chapitre III, il est difficile de comparer l'ensemble de ces études. Les différences méthodologiques, d'analyses fonctionnelles, d'origine des cellules parentales et des doses administrées ne permettent pas de conclure quant aux bénéfices de l'injection d'exosomes issus de CSM. La standardisation des protocoles de production et des tests immunologiques seront nécessaires pour l'évaluation des effets des exosomes dérivés des CSM en immunothérapies.

# *Annexes*

## **Annexe**

**Characterization of effector component from the humoral and cellular immune response stimulated by melanoma cell exhibiting modified IGF-1 expression**

**Authors: Chaobin Zhu, Séverine Trabado, Ye Fan, Jerzy Trojan, Yu-Chun Lone, Julien Giron-Michel, Huynh-Thien Duc**

**Affiliations:**

Inserm U-1014, université Paris XI, groupe hospitalier Paul-Brousse, 94807 Villejuif cedex, France

Inserm U693, université Paris-Sud, 94275 Le Kremlin-Bicêtre, France

Laboratory of Gene Therapy, Faculty of Medicine, Cartagena's University, Cartagena de Indias, Colombia

Faculty of Medicine, La Sabana University, Chia, Autopista Norte de Bogota, Colombia



Available online at  
**ScienceDirect**  
 www.sciencedirect.com

Elsevier Masson France  
**EM|consulte**  
 www.em-consulte.com/en



Original article

# Characterization of effector components from the humoral and cellular immune response stimulated by melanoma cells exhibiting modified IGF-1 expression



Chaobin Zhu <sup>a,1</sup>, Séverine Trabado <sup>b,1</sup>, Ye Fan <sup>a</sup>, Jerzy Trojan <sup>c,d</sup>, Yu-Chun Lone <sup>a</sup>,  
 Julien Giron-Michel <sup>a,\*</sup>, Huynh-Thien Duc <sup>a</sup>

<sup>a</sup> Inserm U-1014, université Paris XI, groupe hospitalier Paul-Brousse, 94807 Villejuif cedex, France

<sup>b</sup> Inserm U693, université Paris-Sud, 94275 Le Kremlin-Bicêtre, France

<sup>c</sup> Laboratory of Gene Therapy, Faculty of Medicine, Cartagena's University, Cartagena de Indias, Colombia

<sup>d</sup> Faculty of Medicine, La Sabana University, Chia, Autopista Norte de Bogota, Colombia

## ARTICLE INFO

### Article history:

Received 11 December 2014

Accepted 4 January 2015

### Keywords:

Modified melanoma cells (B16MOD)

Wild-type melanoma cells (B16WT)

IGF-1 (insulin-like growth factor-1)

Humoral and cellular immune effectors

## ABSTRACT

Modified melanoma B16 cells inhibited in their IGF-1 expression (B16MOD), on the contrary to the IGF-1 fully expressed parental wild-type (B16WT) counterpart, were shown to stimulate humoral as well as cellular immune responses. Among humoral components, the neutralizing and complement-fixing antibodies of IgM and essentially IgG2 (a + b) isotypes exhibited *in vitro* and *in vivo* effects upon tumour growth, while the IgG1 antibody isotype promoted enhanced tumour proliferation. As for the cellular immunity, it was found that the T CD8<sup>+</sup> lymphocyte subpopulation remained the main potent and long lasting immune active effector regulating tumour growth.

© 2015 Elsevier Masson SAS. All rights reserved.

## 1. Introduction

The IGF-1 (insulin-like growth factor-1) is known for its involvement in numerous physiological processes, among which, cell proliferation and anti-apoptosis properties [1]. IGF-1 is found widely expressed in several cancer cell types making it one of the essential targets in antitumor strategies [2–6]. Controlling IGF-1 expression thus constitutes a means for blocking tumour growth and tumour aggressiveness using for example antisense vector targeting IGF-1 mRNA [7]. Another approach has consisted in disrupting IGF-1 receptor (IGF-1R), which resulted in tumour cell growth inhibition and apoptosis [8]. Thus, targeting IGF-1 was shown to affect not only the growth of manipulated tumour cells, but also wild-type parental cells [8–10]. Previous works relative to melanoma have shown that the mouse B16 cells inhibited in their IGF-1 expression, exhibited modification concerning the cell surface tetraspanin family member CD9 but not CD81 [11]. Furthermore, modifications affecting B16 cells' IGF-1 expression (B16MOD cells) in the melanoma model have led *in vivo* to delayed tumour progression. This fact indicated that B16MOD but not B16 wild-type

(B16WT) was immunogenic to the relevant host. Indeed when injected to C57BL/6 mice as vaccines, B16MOD but not B16WT have shown triggering immune response against B16 melanoma cells (B16WT and/or B16MOD) [12]. In the present work, we sought to characterize the immune effector components from the humoral and the cellular immune response stimulated in vaccinating with B16MOD cells and focused on those endowing the capacity regulating the deregulated outgrowth of melanoma B16.

## 2. Material and Methods

### 2.1. Cell lines

The B16 cell line derived from spontaneously arising melanoma of C57BL/6 mouse [13], was from ATCC (Rockville, MD, USA). The IGF-1 modified melanoma clones were obtained from wild-type B16-F0 (B16WT) after transfection with IGF-1 antisense episomal vector, a kind gift from Dr J. Ilan, Case Western Reserve University, Cleveland, OH, USA. Inhibition of IGF-1 expression was also performed by treating the cells with specific antibodies (Abcys, Paris, France) along with complement from Rabbit [11]. Cells were grown in RPMI 1640 (Gibco BRL, Invitrogen, Cergy-Pontoise, France) supplemented with 10% heat inactivated fetal bovine serum, 2 mM

\* Corresponding author. Tel.: +33 01 45 59 53 27.

E-mail address: [juliengiron@hotmail.com](mailto:juliengiron@hotmail.com) (J. Giron-Michel).

<sup>1</sup> These authors participated equally in the present work.

L-glutamine, 100 U/ml penicillin, 100 mg/ml streptomycin (Gibco) at 37 °C, 5% CO<sub>2</sub>.

## 2.2. Mice

C57BL/6 mice of H-2b haplotype were purchased from Janvier (Le Genest-St-Isle, France). In vivo experiments were performed according to the directives of the European Community (86/609/CCE).

## 2.3. Flow cytometry analyses

Indirect stainings were performed using standard protocol. Cells were incubated with primary antibodies for 60 min at 4 °C, washed with phosphate-buffered saline (PBS), followed by a second incubation with goat F(ab')<sub>2</sub> anti-mouse or rat IgG conjugated with FITC (Sigma Aldrich, L'Isle d'Abeau Chesnes, France). For control, the first incubation was performed with the myeloma Ig isotype matched with the tested antibody; in general, only FITC-F(ab')<sub>2</sub> anti-Ig secondary antibody was used as there was practically no difference with the myeloma Ig control. Acquisition and analyses were done with FACS Calibur flow cytometer and Cellquest programs (Becton Dickinson, Le Pont de Claix-France) or EPICS XL-MCL flow cytometer (Beckman Coulter, Villepinte-France).

## 2.4. Immunization

Male C57BL/6 mice from the age of 8–10 weeks were used. They were subcutaneously primed by injection with either 5 × 10<sup>6</sup> B16MOD or B16WT cells that had been blocked by mytomycin treatment (1 hour at 37 °C followed by extensively washing) and boosted 2 weeks after by i.p. injection with the same number of either B16MOD or B16WT cells. Eventually mice were identically immunized with B16MOD or B16WT cells that had been blocked with 2 frozen-thawed cycles. Blood were harvested around 2 weeks after the boost and the sera collected, freezed at -20 °C while isolated spleen cells once isolated were immediately used in different experimental protocols in the presence of B16 cells.

## 2.5. In vitro assays

Sera of vaccinated as well as normal untreated mice were assessed upon B16-F0.WT proliferation in culture in the presence of rabbit complement. After 24 h incubation the wells containing tumour cells were washed, cells harvested after trypsin treatment

and counted in trypan blue. The same protocol was applied in co-culture assays between lymphocytes and B16 melanoma cells in a ratio: 2 × 10<sup>6</sup> lymphocytes to 5 × 10<sup>4</sup> B16 cells.

## 2.6. Sorting antibody isotypes

Antibodies belonging to the main mouse isotypes were isolated by means of protein A coated to Sepharose beads (Invitrogen, Cergy Pontoise-France) with defined pH. A range of buffered acetate solutions with pH 8, 6 and 3 was used, corresponding to IgM, IgG1 and IgG2 (a + b) respectively.

## 2.7. Isolation of lymphocyte subpopulations

Negative selection was used based on antibodies specific to cell surface marker defining lymphocyte subpopulation that have bound to Sepharose beads. Isolated spleen cells were let in contact with specific antibody-protein A Sepharose beads for 30 min in constant rotation. Thereafter, the selected unbound lymphocyte population was harvested from the unsedimented protein A Sepharose beads.

## 2.8. In vivo tumour growth

In vivo tumour growth was evaluated by s.c. injection of 2.5 × 10<sup>4</sup> cells in the right flank of C57BL/6 mice either alone or in the presence of splenocytes or immune sera/antibodies. Tumour growth was followed up by measuring at regular intervals the two perpendicular diameters. The tumour volume was expressed as (width<sup>2</sup>) length/2. Statistical analyses were performed using Student's t-test.

## 3. Results

### 3.1. In vitro and in vivo humoral response induced by vaccination with IGF-1 modified B16 cells (B16MOD)

Isogenic C57BL/6 mice vaccinated with B16MOD but not B16WT cells blocked either by mitomycin or frozen-thawed cycle treatment were shown exhibiting humoral response as assessed by flow cytometry and complement-dependent cytotoxicity. As shown in Fig. 1(A) the immune sera from C57BL/6 mice vaccinated with B16MOD presented a statistically difference in comparison to sera from C57BL/6 identically vaccinated with B16WT or normal serum. Thus it was shown in flow cytometry that the antiB16MOD

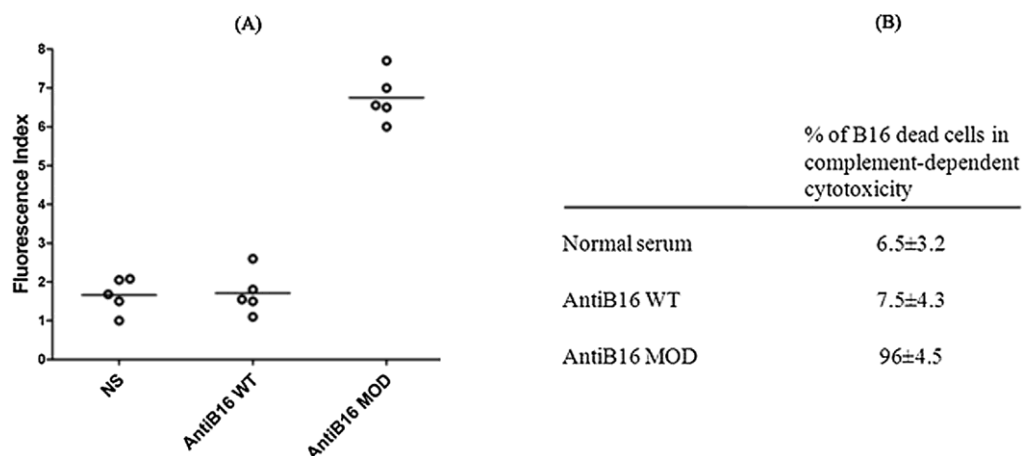


Fig. 1. In vitro activities of antiB16MOD and antiB16WT sera. A. Flow cytometry analyses. B. Complement-dependent cytotoxicity analyses-NS: normal serum.

immune sera gave fluorescence specific indexes of 6–7 times higher than those of sera from mice identically injected with B16WT that were not different to control normal serum. In complement-dependent cytotoxicity, a high percentage of dead cells was observed with B16MOD immune sera in comparison to the marginal base line obtained with sera from mice injected with B16WT or normal serum (Fig. 1B).

The antiB16MOD immune sera was then assessed for their in vivo activities upon tumour growth by mixing with B16 cell suspension and compared to sera from mice injected with B16WT and normal serum. The three types of serum, once mixed to a single B16 cell suspension were subcutaneously injected onto the flank of C57BL/6 mice. No significant difference was observed in tumour size from the groups of recipients receiving B16 cells along with the antiB16MOD serum in comparison to B16 cells mixed with antiB16WT serum or control normal serum (Fig. 2). The discrepancy between in vitro and in vivo effects of antiB16MOD serum raised the question related to different antibody isotypes from the immune serum, their possible interaction and competition.

### 3.2. Activities of antibody isotypes from antiB16MOD immune serum

To further analyzing the activities relevant to different antibody isotypes from antiB16MOD immune serum, this latter was submitted to fractionation using protein A coated Sepharose beads under different pH buffered acetate solutions. Three fractions, FI, FII, and FIII were obtained, among which the FI with IgM isotype was recovered at pH 8. The FII and FIII, eluted at pH 6 and 3 were of IgG1 and IgG2 (a + b) isotypes, respectively. The 3 fractions, once adjusted to pH 7 and dialyzed against 0.1 M phosphate saline solution pH 7 were concentrated to the starting serum volume and assessed for their activities in flow cytometry and complement-dependent cytotoxicity. It was shown that the predominant and essential antibody activities were found in the FIII, while the FII whose Ig isotype belonged to IgG1 was active when assessed in flow cytometry but devoid of complement-dependent cytotoxic activities (Table 1). On the other hand, complement-dependent cytotoxicity was present in the FI and FIII along with their activities in flow cytometry. The three fractions were then examined for their effects upon the in vivo proliferation of B16 cells on syngeneic C57BL/6 hosts using the same experimental protocol as previously described. It was found that, while FI and, in particular FIII led to a significant decrease in the in vivo tumour proliferation, the FII, on the contrary gave rise to enhanced tumour growth (Fig. 3).

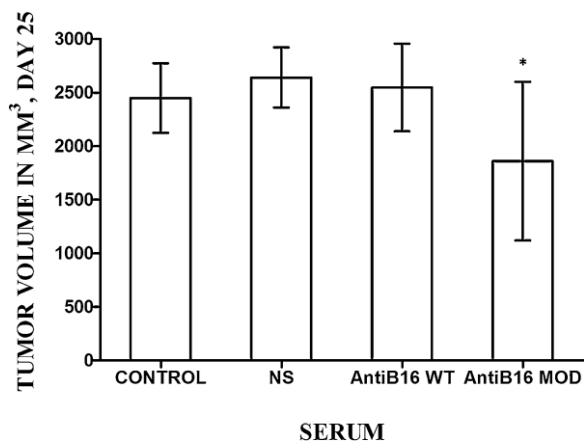


Fig. 2. In vivo activities of antiB16MOD and antiB16WT upon B16 tumor growth in C57BL/6 mice. Control: without serum; NS: normal serum; \*: not significant.

Table 1  
Flow cytometry analyses and complement-dependent cytotoxic activities from antiB16MOD serum and antiB16MOD fractions FI, FII, FIII.

	Fluorescence index in flow cytometry	% of B16 dead cells in complement-dependent cytotoxicity
AntiB16 MOD whole serum	6.8 0.3	95 5.2
AntiB16 MOD whole fraction I	4.3 0.4	56 4.5
AntiB16 MOD whole fraction II	5.6 0.3	4 3.2
AntiB16 MOD whole fraction III	6.5 0.5	86 4.7

### 3.3. Cellular immune response from mice vaccinated with B16MOD

For analyzing the immune response at the cellular level, spleen cells from C57BL/6 mice vaccinated with B16MOD were examined for their in vitro and in vivo effects upon B16 melanoma proliferation. Results obtained have shown that spleen cells harvested from mice vaccinated with B16MOD, but not from mice vaccinated with B16WT or normal control mice endowed cytolytic activities against B16 cells. Indeed, only few of the latter ones were found remained after 24 hours in contact with spleen cells from mice vaccinated with B16MOD, while no effects were observed with spleen cells from mice vaccinated with B16WT or normal control spleen cells. In vivo, the presence of spleen cells from mice vaccinated with B16MOD along with B16 cells led to inhibiting tumour growth when subcutaneously injected to C57BL/6 mice as compared to spleen cells from mice immunized with B16WT cells or normal control spleen cells (Fig. 4).

For characterizing the lymphocyte subpopulation(s) responsible for the regulatory activities upon B16 melanoma growth, negative selection with antibodies specific to cell surface markers such as CD4, CD8, Ig and NK1.1 fixed to protein A Sepharose beads was used in order to remove the relevant immune subpopulation, i.e., TCD4<sup>+</sup>, TCD8<sup>+</sup>, and B lymphocytes as well as NK cells. Results obtained were indicative for an involvement of immune CD8<sup>+</sup>T cells acting against B16 melanoma cells since a high percentage of alive B16 melanoma was observed when CD8<sup>+</sup>T lymphocytes were removed. On the other hand the same treatment concerning CD4<sup>+</sup>T, B lymphocytes or NK cells had produced no such effects (Fig. 5).

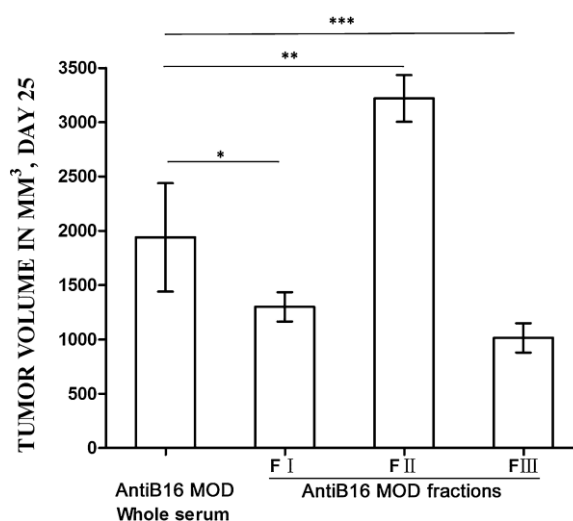


Fig. 3. In vivo activities of antiB16MOD serum and B16MOD serum fractions FI, FII, FIII upon B16 tumor growth. \*P 0.05; \*\*P < 0.02; \*\*\*P < 0.05.



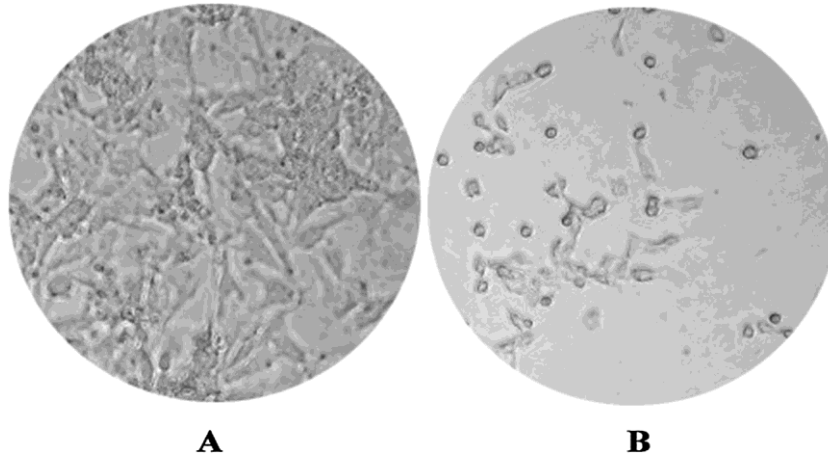


Fig. 4. Effects of spleen cells antiB16WT (A) and antiB16MOD (B) in co-culture with B16 cells.

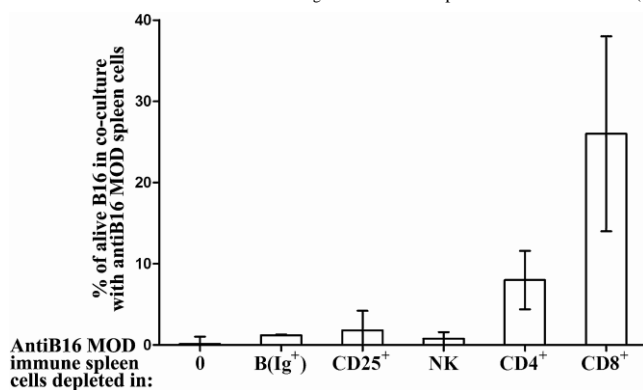


Fig. 5. Analyses of antiB16MOD immune spleen cell subpopulation engaged in effector cytotoxic action against B16 cells.

#### 4. Discussion

The results reported in this work have shown that modulating the IGF-1 expression on the melanoma B16 cells (B16MOD) have rendered them immunogenic to the C57BL/6 hosts in triggering humoral and cellular immune responses. However, although the *in vitro* assays have shown that immune sera from mice vaccinated with B16MOD cells were active against B16 melanoma cells using flow cytometry and complement-dependent cytotoxicity tests, no significant effects have been observed upon the *in vivo* tumour proliferation as resumed in the Fig. 2. This discrepancy between *in vitro* and *in vivo* effects from the antiB16MOD immune sera was apparently due to the presence of different antibody isotypes, i.e., IgM, IgG1, and IgG2 (a + b), hampering for example the cytolytic activities of the first and the last ones. Another possibility is related to the IgFc receptors leading to the antibody-dependent cell cytotoxicity or ADCC [14,15]. Results obtained gave indications for a direct action relevant to different antibody isotype. Indeed, the inhibitory effects upon the B16 outgrowth were shown to be mainly sustained by neutralizing cytotoxic activities of IgG2 (a + b) antibody isotypes and to a lesser extent by the IgM ones. On the contrary, the IgG1 isotype antibody led rather to an enhanced tumour growth. Nevertheless, the inhibitory effects observed with the antibodies were transitory and did not lead to significant *in vivo* lethal tumour percentage decrease. On the other hand, the cellular immune response in our present experimental context was shown to be more potent than the humoral one. Furthermore, the relative short half-life of the Ig molecules might explain the transitory neutralizing effects of passively provided antibody in

comparison to the action of the adoptivity transferred lymphocytes. As for the characterization of cellular immune effectors, the negative selection procedure used in this work has shown that the lymphocyte subpopulation involved in controlling the *in vivo* melanoma B16 proliferation was relevant to CD8<sup>+</sup>T cells. Indeed, by removing these latter ones by negative selection from the antiB16MOD immune spleen cells, the cytotoxic effects upon B16 melanoma cells were decreased as shown by the presence of a high percentage of alive tumoral cells. On the other hand, the same procedure performed upon CD4<sup>+</sup>T, Ig<sup>+</sup>B, NK1.1<sup>+</sup> cells did not significantly modify the activities of the antiB16MOD immune spleen cells.

#### Acknowledgements

We thank Christiane Frayssinet for suggestive ideas and biological materials. Chaobin Zhu was supported by "the association Vaincre le Cancer-NRB, Villejuif, France".

#### References

- [1] Sell C, Baserga R, Rubin R. Insulin-like growth factor I (IGF-I) and the IGF-I receptor prevent etoposide-induced apoptosis. *Cancer Res* 1995;55:303–6.
- [2] Macaulay VM. Insulin-like growth factors and cancer. *Br J Cancer* 1992;65: 311–20.
- [3] LeRoith D, Baserga R, Helman L, Roberts Jr CT. Insulin-like growth factors and cancer. *Ann Intern Med* 1995;122:54–9.
- [4] Chan JM, Stampfer MJ, Giovannucci E, Gann PH, Ma J, Wilkinson P, et al. Plasma insulin-like growth factor-I and prostate cancer risk: a prospective study. *Science* 1998;279:563–6.
- [5] Lee AV, Hilsenbeck SG, Yee D. IGF system components as prognostic markers in breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* 1998;47:295–302.
- [6] Pollak MN, Schernhammer ES, Hankinson SE. Insulin-like growth factors and neoplasia. *Nat Rev Cancer* 2004;4:505–18.
- [7] Trojan J, Blosssey BK, Johnson TR, Rudin SD, Tykocinski M, Ilan J, et al. Loss of tumorigenicity of rat glioblastoma directed by episome-based antisense cDNA transcription of insulin-like growth factor I. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1992;89: 4874–8.
- [8] Resnicoff M, Sell C, Rubini M, Coppola D, Ambrose D, Baserga R, et al. Rat glioblastoma cells expressing an antisense RNA to the insulin-like growth factor-1 (IGF-1) receptor are nontumorigenic and induce regression of wild-type tumors. *Cancer Res* 1994;54:2218–22.
- [9] Trojan J, Duc HT, Upegui-Gonzalez LC, Hor F, Guo Y, Anthony D, et al. Presence of MHC-I and B-7 molecules in rat and human glioma cells expressing antisense IGF-I mRNA. *Neurosci Lett* 1996;212:9–12.
- [10] Lafarge-Frayssinet C, Duc HT, Frayssinet C, Sarasin A, Anthony D, Guo Y, et al. Antisense insulin-like growth factor I transferred into a rat hepatoma cell line inhibits tumorigenesis by modulating major histocompatibility complex I cell surface expression. *Cancer Gene Ther* 1997;4:276–85.
- [11] Trabado S, Nguyen Van Binh P, Martin C, Lafarge-Frayssinet C, Thevenin M, Baudouin F, et al. Modulated expression of cell surface molecules and *in vivo* outgrowth of modified melanoma cells. *Biomed Pharmacother* 2006;60: 693–7.

- [12] Trabado S, Van Binh PN, Martin C, et al. Stimulation of anti-melanoma immune effectors via modified tumour cells exhibiting inhibited IGF-I and low CD9. *Biomed Pharmacother* 2007;61:494–8.
- [13] Fidler IJ. Biological behavior of malignant melanoma cells correlated to their survival in vivo. *Cancer Res* 1975;35:18–24.
- [14] Nimmerjahn F, Ravetch JV. Fc-receptors as regulators of immunity. *Adv Immunol* 2007;96:179–204.
- [15] Chung S, Lin YL, Reed C, et al. Characterization of in vitro antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity of therapeutic antibodies—Impact of effector cells. *J Immunol Methods* 2014;pii:0022–1759(14). 00110-0.

# *Références bibliographiques*

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Aggarwal, S., and Pittenger, M.F. (2005). Human mesenchymal stem cells modulate allogeneic immune cell responses. *Blood* *105*, 1815–1822.

Akyurekli, C., Le, Y., Richardson, R.B., Fergusson, D., Tay, J., and Allan, D.S. (2015). A systematic review of preclinical studies on the therapeutic potential of mesenchymal stromal cell-derived microvesicles. *Stem Cell Rev* *11*, 150–160.

Alsalamah, S., Amin, R., Gemba, T., and Lotz, M. (2004). Identification of mesenchymal progenitor cells in normal and osteoarthritic human articular cartilage. *Arthritis Rheum.* *50*, 1522–1532.

Alter, G., Malenfant, J.M., and Altfeld, M. (2004). CD107a as a functional marker for the identification of natural killer cell activity. *Journal of Immunological Methods* *294*, 15–22.

Anker, P.S. in 't, Scherjon, S.A., Keur, C.K. der, Noort, W.A., Claas, F.H.J., Willemze, R., Fibbe, W.E., and Kanhai, H.H.H. (2003). Amniotic fluid as a novel source of mesenchymal stem cells for therapeutic transplantation. *Blood* *102*, 1548–1549.

in 't Anker, P.S., Scherjon, S.A., Kleijburg-van der Keur, C., de Groot-Swings, G.M.J.S., Claas, F.H.J., Fibbe, W.E., and Kanhai, H.H.H. (2004). Isolation of Mesenchymal Stem Cells of Fetal or Maternal Origin from Human Placenta. *STEM CELLS* *22*, 1338–1345.

Asari, S., Itakura, S., Ferreri, K., Liu, C.-P., Kuroda, Y., Kandeel, F., and Mullen, Y. (2009). Mesenchymal stem cells suppress B-cell terminal differentiation. *Exp. Hematol.* *37*, 604–615.

Ascon, D.B., Lopez-Briones, S., Liu, M., Ascon, M., Savransky, V., Colvin, R.B., Soloski, M.J., and Rabb, H. (2006). Phenotypic and Functional Characterization of Kidney-Infiltrating Lymphocytes in Renal Ischemia Reperfusion Injury. *The Journal of Immunology* *177*, 3380–3387.

Augello, A., Tasso, R., Negrini, S.M., Amateis, A., Indiveri, F., Cancedda, R., and Pennesi, G. (2005). Bone marrow mesenchymal progenitor cells inhibit lymphocyte proliferation by activation of the programmed death 1 pathway. *Eur. J. Immunol.* *35*, 1482–1490.

Baglio, S.R., Rooijers, K., Koppers-Lalic, D., Verweij, F.J., Pérez Lanzón, M., Zini, N., Naaijken, B., Perut, F., Niessen, H.W.M., Baldini, N., et al. (2015). Human bone marrow- and adipose-mesenchymal stem cells secrete exosomes enriched in distinctive miRNA and tRNA species. *Stem Cell Research & Therapy* *6*, 127.

Bai, L., Lennon, D.P., Eaton, V., Maier, K., Caplan, A.I., Miller, S.D., and Miller, R.H. (2009). Human bone marrow-derived mesenchymal stem cells induce Th2-polarized immune response and promote endogenous repair in animal models of multiple sclerosis. *Glia* *57*, 1192–1203.

Bartholomew, A., Sturgeon, C., Siatskas, M., Ferrer, K., McIntosh, K., Patil, S., Hardy, W., Devine, S., Ucker, D., Deans, R., et al. (2002). Mesenchymal stem cells suppress lymphocyte proliferation in vitro and prolong skin graft survival in vivo. *Exp. Hematol.* *30*, 42–48.

Batista, B.S., Eng, W.S., Pilobello, K.T., Hendricks-Muñoz, K.D., and Mahal, L.K. (2011). Identification of a conserved glycan signature for microvesicles. *J. Proteome Res.* *10*, 4624–4633.

- Baume, D.M., Robertson, M.J., Levine, H., Manley, T.J., Schow, P.W., and Ritz, J. (1992). Differential responses to interleukin 2 define functionally distinct subsets of human natural killer cells. *Eur. J. Immunol.* *22*, 1–6.
- Bellingham, S.A., Guo, B.B., Coleman, B.M., and Hill, A.F. (2012). Exosomes: vehicles for the transfer of toxic proteins associated with neurodegenerative diseases? *Front Physiol* *3*, 124.
- Belotti, D., Capelli, C., Resovi, A., Introna, M., and Taraboletti, G. (2016). Thrombospondin-1 promotes mesenchymal stromal cell functions via TGF $\beta$  and in cooperation with PDGF. *Matrix Biology* *55*, 106–116.
- Benz, E.W., and Moses, H.L. (1974). Small, virus-like particles detected in bovine sera by electron microscopy. *J. Natl. Cancer Inst.* *52*, 1931–1934.
- Bernardo, M.E., and Fibbe, W.E. (2013). Mesenchymal Stromal Cells: Sensors and Switchers of Inflammation. *Cell Stem Cell* *13*, 392–402.
- Beyth, S., Borovsky, Z., Mevorach, D., Liebergall, M., Gazit, Z., Aslan, H., Galun, E., and Rachmilewitz, J. (2005). Human mesenchymal stem cells alter antigen-presenting cell maturation and induce T-cell unresponsiveness. *Blood* *105*, 2214–2219.
- Bianchi, M.E. (2007). DAMPs, PAMPs and alarmins: all we need to know about danger. *J. Leukoc. Biol.* *81*, 1–5.
- Blazquez, R., Sanchez-Margallo, F.M., de la Rosa, O., Dalemans, W., Alvarez, V., Tarazona, R., and Casado, J.G. (2014). Immunomodulatory Potential of Human Adipose Mesenchymal Stem Cells Derived Exosomes on in vitro Stimulated T Cells. *Front Immunol* *5*, 556.
- Boomsma, R.A., and Geenen, D.L. (2012). Mesenchymal stem cells secrete multiple cytokines that promote angiogenesis and have contrasting effects on chemotaxis and apoptosis. *PLoS ONE* *7*, e35685.
- Braud, V.M., Allan, D.S., O’Callaghan, C.A., Söderström, K., D’Andrea, A., Ogg, G.S., Lazetic, S., Young, N.T., Bell, J.I., Phillips, J.H., et al. (1998). HLA-E binds to natural killer cell receptors CD94/NKG2A, B and C. *Nature* *391*, 795–799.
- Bright, J.J., Kerr, L.D., and Sriram, S. (1997). TGF-beta inhibits IL-2-induced tyrosine phosphorylation and activation of Jak-1 and Stat 5 in T lymphocytes. *J. Immunol.* *159*, 175–183.
- Brock, T.G., McNish, R.W., and Peters-Golden, M. (1999). Arachidonic acid is preferentially metabolized by cyclooxygenase-2 to prostacyclin and prostaglandin E2. *J. Biol. Chem.* *274*, 11660–11666.
- Bruder, S.P., Jaiswal, N., and Haynesworth, S.E. (1997). Growth kinetics, self-renewal, and the osteogenic potential of purified human mesenchymal stem cells during extensive subcultivation and following cryopreservation. *J. Cell. Biochem.* *64*, 278–294.
- Bruno, S., Grange, C., Deregibus, M.C., Calogero, R.A., Saviozzi, S., Collino, F., Morando, L., Busca, A., Falda, M., Bussolati, B., et al. (2009). Mesenchymal stem cell-derived microvesicles protect against acute tubular injury. *J. Am. Soc. Nephrol.* *20*, 1053–1067.
- Budoni, M., Fierabracci, A., Luciano, R., Petrini, S., Di Ciommo, V., and Muraca, M. (2013). The immunosuppressive effect of mesenchymal stromal cells on B lymphocytes is mediated by membrane vesicles. *Cell Transplant* *22*, 369–379.

- Buschow, S.I., Nolte-'t Hoen, E.N.M., van Niel, G., Pols, M.S., ten Broeke, T., Lauwen, M., Ossendorp, F., Melief, C.J.M., Raposo, G., Wubbolts, R., et al. (2009). MHC II in dendritic cells is targeted to lysosomes or T cell-induced exosomes via distinct multivesicular body pathways. *Traffic* *10*, 1528–1542.
- Byrd, A., Hoffmann, S.C., Jarahian, M., Momburg, F., and Watzl, C. (2007). Expression analysis of the ligands for the Natural Killer cell receptors NKp30 and NKp44. *PLoS ONE* *2*, e1339.
- Calvi, L.M., Adams, G.B., Weibrecht, K.W., Weber, J.M., Olson, D.P., Knight, M.C., Martin, R.P., Schipani, E., Divieti, P., Bringham, F.R., et al. (2003). Osteoblastic cells regulate the haematopoietic stem cell niche. *Nature* *425*, 841–846.
- Campagnoli, C., Roberts, I.A.G., Kumar, S., Bennett, P.R., Bellantuono, I., and Fisk, N.M. (2001). Identification of mesenchymal stem/progenitor cells in human first-trimester fetal blood, liver, and bone marrow. *Blood* *98*, 2396–2402.
- Campard, D., Lysy, P.A., Najimi, M., and Sokal, E.M. (2008). Native umbilical cord matrix stem cells express hepatic markers and differentiate into hepatocyte-like cells. *Gastroenterology* *134*, 833–848.
- Capelli, C., Gotti, E., Morigi, M., Rota, C., Weng, L., Dazzi, F., Spinelli, O., Cazzaniga, G., Trezzi, R., Gianatti, A., et al. (2011). Minimally manipulated whole human umbilical cord is a rich source of clinical-grade human mesenchymal stromal cells expanded in human platelet lysate. *Cytotherapy* *13*, 786–801.
- Caplan, A.I. (1991). Mesenchymal stem cells. *J. Orthop. Res.* *9*, 641–650.
- Casey, M.J., and Meier-Kriesche, H.-U. (2011). Calcineurin inhibitors in kidney transplantation: friend or foe? *Curr. Opin. Nephrol. Hypertens.* *20*, 610–615
- Casiraghi, F., Perico, N., Cortinovis, M., and Remuzzi, G. (2016). Mesenchymal stromal cells in renal transplantation: opportunities and challenges. *Nat Rev Nephrol* *12*, 241–253
- Castriconi, R., Cantoni, C., Della Chiesa, M., Vitale, M., Marcenaro, E., Conte, R., Biassoni, R., Bottino, C., Moretta, L., and Moretta, A. (2003). Transforming growth factor beta 1 inhibits expression of NKp30 and NKG2D receptors: consequences for the NK-mediated killing of dendritic cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *100*, 4120–4125.
- Chabannes, D., Hill, M., Merieau, E., Rossignol, J., Brion, R., Souillou, J.P., Anegon, I., and Cuturi, M.C. (2007). A role for heme oxygenase-1 in the immunosuppressive effect of adult rat and human mesenchymal stem cells. *Blood* *110*, 3691–3694.
- Chan, C.-K., Wu, K.-H., Lee, Y.-S., Hwang, S.-M., Lee, M.-S., Liao, S.-K., Cheng, E.-H., See, L.-C., Tsai, C.-N., Kuo, M.-L., et al. (2012). The comparison of interleukin 6-associated immunosuppressive effects of human ESCs, fetal-type MSCs, and adult-type MSCs. *Transplantation* *94*, 132–138.
- Chan, J.L., Tang, K.C., Patel, A.P., Bonilla, L.M., Pierobon, N., Ponzio, N.M., and Rameshwar, P. (2006). Antigen-presenting property of mesenchymal stem cells occurs during a narrow window at low levels of interferon-gamma. *Blood* *107*, 4817–4824.
- Charbord, P., and Casteilla, L. (2011). [Human mesenchymal stem cell biology]. *Med Sci (Paris)* *27*, 261–267.
- Charbord, P., Livne, E., Gross, G., Häupl, T., Neves, N.M., Marie, P., Bianco, P., and Jorgensen, C. (2011). Human bone marrow mesenchymal stem cells: a systematic reappraisal via the genostem experience. *Stem Cell Rev* *7*, 32–42.

- Chargaff, E., and West, R. (1946). The biological significance of the thromboplastic protein of blood. *J. Biol. Chem.* *166*, 189–197
- Charron, D. (2013). Allogenicity & immunogenicity in regenerative stem cell therapy. *The Indian Journal of Medical Research* *138*, 749.
- Chen, Y.-S. Mesenchymal Stem Cell: Considerations for Manufacturing and Clinical Trials on Cell Therapy Product.
- Chen, K., Wang, D., Du, W.T., Han, Z.-B., Ren, H., Chi, Y., Yang, S.G., Zhu, D., Bayard, F., and Han, Z.C. (2010). Human umbilical cord mesenchymal stem cells hUC-MSCs exert immunosuppressive activities through a PGE2-dependent mechanism. *Clin. Immunol.* *135*, 448–458.
- Chen, W., Huang, Y., Han, J., Yu, L., Li, Y., Lu, Z., Li, H., Liu, Z., Shi, C., Duan, F., et al. (2016). Immunomodulatory effects of mesenchymal stromal cells-derived exosome. *Immunol Res* *64*, 831–840.
- Chen, W.W., Balaj, L., Liau, L.M., Samuels, M.L., Kotsopoulos, S.K., Maguire, C.A., Loguidice, L., Soto, H., Garrett, M., Zhu, L.D., et al. (2013). BEAMing and Droplet Digital PCR Analysis of Mutant IDH1 mRNA in Glioma Patient Serum and Cerebrospinal Fluid Extracellular Vesicles. *Mol Ther Nucleic Acids* *2*, e109.
- Chiesa, S., Morbelli, S., Morando, S., Massollo, M., Marini, C., Bertoni, A., Frassoni, F., Bartolomé, S.T., Sambuceti, G., Traggiai, E., et al. (2011). Mesenchymal stem cells impair in vivo T-cell priming by dendritic cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *108*, 17384–17389.
- Chinnadurai, R., Copland, I.B., Patel, S.R., and Galipeau, J. (2014). IDO-independent suppression of T cell effector function by IFN- $\gamma$ -licensed human mesenchymal stromal cells. *J. Immunol.* *192*, 1491–1501.
- Choi, H., Lee, R.H., Bazhanov, N., Oh, J.Y., and Prockop, D.J. (2011). Anti-inflammatory protein TSG-6 secreted by activated MSCs attenuates zymosan-induced mouse peritonitis by decreasing TLR2/NF- $\kappa$ B signaling in resident macrophages. *Blood* *118*, 330–338.
- Chong, P.-P., Selvaratnam, L., Abbas, A.A., and Kamarul, T. (2012). Human peripheral blood derived mesenchymal stem cells demonstrate similar characteristics and chondrogenic differentiation potential to bone marrow derived mesenchymal stem cells. *J. Orthop. Res.* *30*, 634–642.
- Christianson, H.C., Svensson, K.J., van Kuppevelt, T.H., Li, J.-P., and Belting, M. (2013). Cancer cell exosomes depend on cell-surface heparan sulfate proteoglycans for their internalization and functional activity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *110*, 17380–17385.
- Clayton, A., Mitchell, J.P., Court, J., Linnane, S., Mason, M.D., and Tabi, Z. (2008). Human Tumor-Derived Exosomes Down-Modulate NKG2D Expression. *The Journal of Immunology* *180*, 7249–7258.
- Comoli, P., Ginevri, F., Maccario, R., Avanzini, M.A., Marconi, M., Groff, A., Cometa, A., Cioni, M., Porretti, L., Barberi, W., et al. (2008). Human mesenchymal stem cells inhibit antibody production induced in vitro by allostimulation. *Nephrol. Dial. Transplant.* *23*, 1196–1202.
- Cooper, M.A., Fehniger, T.A., and Caligiuri, M.A. (2001). The biology of human natural killer-cell subsets. *Trends in Immunology* *22*, 633–640.

- Corcione, A., Benvenuto, F., Ferretti, E., Giunti, D., Cappiello, V., Cazzanti, F., Risso, M., Gualandi, F., Mancardi, G.L., Pistoia, V., et al. (2006). Human mesenchymal stem cells modulate B-cell functions. *Blood* *107*, 367–372.
- Cosman, D., Fanger, N., Borges, L., Kubin, M., Chin, W., Peterson, L., and Hsu, M.L. (1997). A novel immunoglobulin superfamily receptor for cellular and viral MHC class I molecules. *Immunity* *7*, 273–282.
- Cravens, P.D., and Lipsky, P.E. (2002). Dendritic cells, chemokine receptors and autoimmune inflammatory diseases. *Immunol. Cell Biol.* *80*, 497–505.
- Crisan, M., Corselli, M., Chen, C.-W., and Péault, B. (2011). Multilineage stem cells in the adult: a perivascular legacy? *Organogenesis* *7*, 101–104.
- Crofford, L.J. (1997). COX-1 and COX-2 tissue expression: implications and predictions. *J Rheumatol Suppl* *49*, 15–19.
- Crop, M.J., Korevaar, S.S., de Kuiper, R., IJzermans, J.N.M., van Besouw, N.M., Baan, C.C., Weimar, W., and Hoogduijn, M.J. (2011). Human mesenchymal stem cells are susceptible to lysis by CD8(+) T cells and NK cells. *Cell Transplant* *20*, 1547–1559.
- Cutler, A.J., Limbani, V., Girdlestone, J., and Navarrete, C.V. (2010). Umbilical cord-derived mesenchymal stromal cells modulate monocyte function to suppress T cell proliferation. *J. Immunol.* *185*, 6617–6623.
- Dalton, A.J. (1975). Microvesicles and vesicles of multivesicular bodies versus “virus-like” particles. *J. Natl. Cancer Inst.* *54*, 1137–1148.
- De Broe, M., Wieme, R., and Roels, F. (1975). Letter: Membrane fragments with koinozymic properties released from villous adenoma of the rectum. *Lancet* *2*, 1214–1215
- Del Fattore, A., Luciano, R., Saracino, R., Battafarano, G., Rizzo, C., Pascucci, L., Alessandri, G., Pessina, A., Perrotta, A., Fierabracci, A., et al. (2015a). Differential effects of extracellular vesicles secreted by mesenchymal stem cells from different sources on glioblastoma cells. *Expert Opin Biol Ther* *15*, 495–504.
- Del Fattore, A., Luciano, R., Pascucci, L., Goffredo, B.M., Giorda, E., Scapaticci, M., Fierabracci, A., and Muraca, M. (2015b). Immunoregulatory Effects of Mesenchymal Stem Cell-Derived Extracellular Vesicles on T Lymphocytes. *Cell Transplant* *24*, 2615–2627.
- DelaRosa, O., and Lombardo, E. (2010). Modulation of Adult Mesenchymal Stem Cells Activity by Toll-Like Receptors: Implications on Therapeutic Potential. *Mediators of Inflammation* *2010*, e865601.
- Delorme, B., Ringe, J., Gallay, N., Vern, Y.L., Kerboeuf, D., Jorgensen, C., Rosset, P., Sensebé, L., Layrolle, P., Häupl, T., et al. (2008). Specific plasma membrane protein phenotype of culture-amplified and native human bone marrow mesenchymal stem cells. *Blood* *111*, 2631–2635.
- Deniz, G., Erten, G., Küçüksezer, U.C., Kocacik, D., Karagiannidis, C., Aktas, E., Akdis, C.A., and Akdis, M. (2008). Regulatory NK cells suppress antigen-specific T cell responses. *J. Immunol.* *180*, 850–857.
- Devine, S.M., Cobbs, C., Jennings, M., Bartholomew, A., and Hoffman, R. (2003). Mesenchymal stem cells distribute to a wide range of tissues following systemic infusion into nonhuman primates. *Blood* *101*, 2999–3001.



- Dexter, T.M., Allen, T.D., and Lajtha, L.G. (1977). Conditions controlling the proliferation of haemopoietic stem cells in vitro. *J. Cell. Physiol.* *91*, 335–344.
- Dhama, K., Saminathan, M., Jacob, S.S., Singh, M., Karthik, K., . A., Tiwari, R., Sunkara, L.T., Malik, Y.S., and Singh, R.K. (2015). Effect of Immunomodulation and Immunomodulatory Agents on Health with some Bioactive Principles, Modes of Action and Potent Biomedical Applications. *International Journal of Pharmacology* *11*, 253–290.
- Di Trapani, M., Bassi, G., Midolo, M., Gatti, A., Kamga, P.T., Cassaro, A., Carusone, R., Adamo, A., and Krampera, M. (2016). Differential and transferable modulatory effects of mesenchymal stromal cell-derived extracellular vesicles on T, B and NK cell functions. *Sci Rep* *6*.
- Ding, L., Saunders, T.L., Enikolopov, G., and Morrison, S.J. (2012). Endothelial and perivascular cells maintain haematopoietic stem cells. *Nature* *481*, 457–462.
- Djouad, F., Charbonnier, L.-M., Bouffi, C., Louis-Plence, P., Bony, C., Apparailly, F., Cantos, C., Jorgensen, C., and Noël, D. (2007). Mesenchymal stem cells inhibit the differentiation of dendritic cells through an interleukin-6-dependent mechanism. *Stem Cells* *25*, 2025–2032.
- Dominici, M., Le Blanc, K., Mueller, I., Slaper-Cortenbach, I., Marini, F.C., Krause, D.S., Deans, R.J., Keating, A., Prockop, D.J., and Horwitz, E.M. (2006). Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy* *8*, 315–317.
- Duffy, M.M., Ritter, T., Ceredig, R., and Griffin, M.D. (2011). Mesenchymal stem cell effects on T-cell effector pathways. *Stem Cell Res Ther* *2*, 34.
- Dupuy, S., Lambert, M., Zucman, D., Choukem, S.-P., Tognarelli, S., Pages, C., Lebbé, C., and Caillat-Zucman, S. (2012). Human Herpesvirus 8 (HHV8) Sequentially Shapes the NK Cell Repertoire during the Course of Asymptomatic Infection and Kaposi Sarcoma. *PLoS Pathog* *8*.
- Dvorak, H.F., Quay, S.C., Orenstein, N.S., Dvorak, A.M., Hahn, P., Bitzer, A.M., and Carvalho, A.C. (1981). Tumor shedding and coagulation. *Science* *212*, 923–924.
- Eggenhofer, E., Luk, F., Dahlke, M.H., and Hoogduijn, M.J. (2014). The life and fate of mesenchymal stem cells. *Front Immunol* *5*, 148.
- Eirin, A., Riester, S.M., Zhu, X.-Y., Tang, H., Evans, J.M., O'Brien, D., van Wijnen, A.J., and Lerman, L.O. (2014). MicroRNA and mRNA cargo of extracellular vesicles from porcine adipose tissue-derived mesenchymal stem cells. *Gene* *551*, 55–64.
- EL Andaloussi, S., Mäger, I., Breakefield, X.O., and Wood, M.J.A. (2013). Extracellular vesicles: biology and emerging therapeutic opportunities. *Nat Rev Drug Discov* *12*, 347–357.
- El Haddad, N., Moore, R., Heathcote, D., Mounayar, M., Azzi, J., Mfarrej, B., Batal, I., Ting, C., Atkinson, M., Sayegh, M.H., et al. (2011). The novel role of SERPINB9 in cytotoxic protection of human mesenchymal stem cells. *J. Immunol.* *187*, 2252–2260.
- English, K., Barry, F.P., and Mahon, B.P. (2008). Murine mesenchymal stem cells suppress dendritic cell migration, maturation and antigen presentation. *Immunol. Lett.* *115*, 50–58.
- English, K., Ryan, J.M., Tobin, L., Murphy, M.J., Barry, F.P., and Mahon, B.P. (2009a). 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* *156*, 149–160.

- English, K., Ryan, J.M., Tobin, L., Murphy, M.J., Barry, F.P., and Mahon, B.P. (2009b). Cell contact, prostaglandin E(2) and transforming growth factor beta 1 play non-redundant roles in human mesenchymal stem cell induction of CD4+CD25(High) forkhead box P3+ regulatory T cells. *Clin. Exp. Immunol.* *156*, 149–160.
- English, K., French, A., and Wood, K.J. (2010). Mesenchymal stromal cells: facilitators of successful transplantation? *Cell Stem Cell* *7*, 431–442.
- Erices, A., Conget, P., and Minguell, J.J. (2000). Mesenchymal progenitor cells in human umbilical cord blood. *British Journal of Haematology* *109*.
- Erkers, T., Nava, S., Yosef, J., Ringdén, O., and Kaipe, H. (2013). Decidual stromal cells promote regulatory T cells and suppress alloreactivity in a cell contact-dependent manner. *Stem Cells Dev.* *22*, 2596–2605.
- Esin, S., Batoni, G., Counoupas, C., Stringaro, A., Brancatisano, F.L., Colone, M., Maisetta, G., Florio, W., Arancia, G., and Campa, M. (2008). Direct Binding of Human NK Cell Natural Cytotoxicity Receptor NKp44 to the Surfaces of Mycobacteria and Other Bacteria. *Infect. Immun.* *76*, 1719–1727.
- Fanger, N.A., Cosman, D., Peterson, L., Braddy, S.C., Maliszewski, C.R., and Borges, L. (1998). The MHC class I binding proteins LIR-1 and LIR-2 inhibit Fc receptor-mediated signaling in monocytes. *Eur. J. Immunol.* *28*, 3423–3434.
- Fattore, A.D., Luciano, R., Fierabracci, A., and Muraca, M. (2014). Mesenchymal stem/stromal cell-derived microparticles show anti-inflammatory activity in an animal model of ulcerative colitis. *Cytotherapy* *16*, S25.
- Fauré, J., Lachenal, G., Court, M., Hirrlinger, J., Chatellard-Causse, C., Blot, B., Grange, J., Schoehn, G., Goldberg, Y., Boyer, V., et al. (2006). Exosomes are released by cultured cortical neurones. *Mol. Cell. Neurosci.* *31*, 642–648.
- Fauriat, C., Long, E.O., Ljunggren, H.-G., and Bryceson, Y.T. (2010). Regulation of human NK-cell cytokine and chemokine production by target cell recognition. *Blood* *115*, 2167–2176
- Fayyad-Kazan, M., Fayyad-Kazan, H., Lagneaux, L., and Najjar, M. (2016). The potential of mesenchymal stromal cells in immunotherapy. *Immunotherapy* *8*, 839–842.
- Ferlazzo, G., and Morandi, B. (2014). Cross-Talks between Natural Killer Cells and Distinct Subsets of Dendritic Cells. *Front Immunol* *5*.
- Ferlazzo, G., Tsang, M.L., Moretta, L., Melioli, G., Steinman, R.M., and Münz, C. (2002). Human dendritic cells activate resting natural killer (NK) cells and are recognized via the NKp30 receptor by activated NK cells. *J. Exp. Med.* *195*, 343–351.
- Ferlazzo, G., Thomas, D., Lin, S.-L., Goodman, K., Morandi, B., Muller, W.A., Moretta, A., and Münz, C. (2004). The abundant NK cells in human secondary lymphoid tissues require activation to express killer cell Ig-like receptors and become cytolytic. *J. Immunol.* *172*, 1455–1462.
- Figueroa, F.E., Carrión, F., Villanueva, S., and Khoury, M. (2012). Mesenchymal Stem Cell treatment for autoimmune diseases: a critical review. *Biological Research* *45*, 269–277.
- Fischer, U.M., Harting, M.T., Jimenez, F., Monzon-Posadas, W.O., Xue, H., Savitz, S.I., Laine, G.A., and Cox, C.S. (2009). Pulmonary Passage is a Major Obstacle for Intravenous Stem Cell Delivery: The Pulmonary First-Pass Effect. *Stem Cells Dev* *18*, 683–691.

- Fitzner, D., Schnaars, M., van Rossum, D., Krishnamoorthy, G., Dibaj, P., Bakhti, M., Regen, T., Hanisch, U.-K., and Simons, M. (2011). Selective transfer of exosomes from oligodendrocytes to microglia by macropinocytosis. *J. Cell. Sci.* *124*, 447–458.
- Forman, M.B., Stone, G.W., and Jackson, E.K. (2006). Role of adenosine as adjunctive therapy in acute myocardial infarction. *Cardiovasc Drug Rev* *24*, 116–147.
- François, M., Romieu-Mourez, R., Stock-Martineau, S., Boivin, M.-N., Bramson, J.L., and Galipeau, J. (2009). Mesenchymal stromal cells cross-present soluble exogenous antigens as part of their antigen-presenting cell properties. *Blood* *114*, 2632–2638.
- François, M., Romieu-Mourez, R., Li, M., and Galipeau, J. (2012). Human MSC suppression correlates with cytokine induction of indoleamine 2,3-dioxygenase and bystander M2 macrophage differentiation. *Mol. Ther.* *20*, 187–195.
- François, S., Bensidhoum, M., Mouiseddine, M., Mazurier, C., Allenet, B., Semont, A., Frick, J., Saché, A., Bouchet, S., Thierry, D., et al. (2006). Local Irradiation Not Only Induces Homing of Human Mesenchymal Stem Cells at Exposed Sites but Promotes Their Widespread Engraftment to Multiple Organs: A Study of Their Quantitative Distribution After Irradiation Damage. *STEM CELLS* *24*, 1020–1029.
- Franquesa, M., Hoogduijn, M.J., Bestard, O., and Grinyó, J.M. (2012). Immunomodulatory Effect of Mesenchymal Stem Cells on B Cells. *Front Immunol* *3*.
- Franquesa, M., Mensah, F.K., Huizinga, R., Strini, T., Boon, L., Lombardo, E., DelaRosa, O., Laman, J.D., Grinyó, J.M., Weimar, W., et al. (2015). Human adipose tissue-derived mesenchymal stem cells abrogate plasmablast formation and induce regulatory B cells independently of T helper cells. *Stem Cells* *33*, 880–891.
- Friedenstein, A.J., Chailakhjan, R.K., and Lalykina, K.S. (1970). The development of fibroblast colonies in monolayer cultures of guinea pig bone marrow and spleen cells. *Cell Proliferation* *3*.
- Friederichs, K., Schmitz, J., Weissenbach, M., Heinrich, P.C., and Schaper, F. (2001). Interleukin-6-induced proliferation of pre-B cells mediated by receptor complexes lacking the SHP2/SOCS3 recruitment sites revisited. *Eur. J. Biochem.* *268*, 6401–6407.
- Garrett, R.W., and Emerson, S.G. (2009). Bone and blood vessels: the hard and the soft of hematopoietic stem cell niches. *Cell Stem Cell* *4*, 503–506.
- Gasteiger, G., Hemmers, S., Firth, M.A., Le Floc’h, A., Huse, M., Sun, J.C., and Rudensky, A.Y. (2013). IL-2-dependent tuning of NK cell sensitivity for target cells is controlled by regulatory T cells. *J. Exp. Med.* *210*, 1167–1178.
- Gatti, S., Bruno, S., Deregibus, M.C., Sordi, A., Cantaluppi, V., Tetta, C., and Camussi, G. (2011). Microvesicles derived from human adult mesenchymal stem cells protect against ischaemia-reperfusion-induced acute and chronic kidney injury. *Nephrol. Dial. Transplant.* *26*, 1474–1483.
- Gazdic, M., Volarevic, V., Arsenijevic, N., and Stojkovic, M. (2015). Mesenchymal stem cells: a friend or foe in immune-mediated diseases. *Stem Cell Rev* *11*, 280–287.
- Ghannam, S., Bouffi, C., Djouad, F., Jorgensen, C., and Noël, D. (2010). Immunosuppression by mesenchymal stem cells: mechanisms and clinical applications. *Stem Cell Res Ther* *1*, 2.

- Giuliani, M., Oudrhiri, N., Noman, Z.M., Vernochet, A., Chouaib, S., Azzarone, B., Durrbach, A., and Bennaceur-Griscelli, A. (2011a). Human mesenchymal stem cells derived from induced pluripotent stem cells down-regulate NK-cell cytolytic machinery. *Blood* *118*, 3254–3262.
- Giuliani, M., Fleury, M., Vernochet, A., Ketrroussi, F., Clay, D., Azzarone, B., Lataillade, J.J., and Durrbach, A. (2011b). Long-Lasting Inhibitory Effects of Fetal Liver Mesenchymal Stem Cells on T-Lymphocyte Proliferation. *PLOS ONE* *6*, e19988
- Giuliani, M., Bennaceur-Griscelli, A., Nanbakhsh, A., Oudrhiri, N., Chouaib, S., Azzarone, B., Durrbach, A., and Lataillade, J.-J. (2014). TLR ligands stimulation protects MSC from NK killing. *Stem Cells* *32*, 290–300.
- Glennie, S., Soeiro, I., Dyson, P.J., Lam, E.W.-F., and Dazzi, F. (2005). Bone marrow mesenchymal stem cells induce division arrest anergy of activated T cells. *Blood* *105*, 2821–2827
- González, M.A., Gonzalez-Rey, E., Rico, L., Büscher, D., and Delgado, M. (2009). Adipose-derived mesenchymal stem cells alleviate experimental colitis by inhibiting inflammatory and autoimmune responses. *Gastroenterology* *136*, 978–989.
- Götherström, C., Ringdén, O., Westgren, M., Tammik, C., and Le Blanc, K. (2003). Immunomodulatory effects of human foetal liver-derived mesenchymal stem cells. *Bone Marrow Transplant* *32*, 265–272.
- Götherström, C., West, A., Liden, J., Uzunel, M., Lahesmaa, R., and Le Blanc, K. (2005). Difference in gene expression between human fetal liver and adult bone marrow mesenchymal stem cells. *Haematologica* *90*, 1017–1026.
- Götherström, C., Lundqvist, A., Duprez, I.R., Childs, R., Berg, L., and le Blanc, K. (2011). Fetal and adult multipotent mesenchymal stromal cells are killed by different pathways. *Cytotherapy* *13*, 269–278.
- Gould, S.J., and Raposo, G. (2013). As we wait: coping with an imperfect nomenclature for extracellular vesicles. *Journal of Extracellular Vesicles* *2*.
- Greening, D.W., Xu, R., Ji, H., Tauro, B.J., and Simpson, R.J. (2015). A protocol for exosome isolation and characterization: evaluation of ultracentrifugation, density-gradient separation, and immunoaffinity capture methods. *Methods Mol. Biol.* *1295*, 179–209.
- Gronthos, S. (2011). The therapeutic potential of dental pulp cells: more than pulp fiction? *Cytotherapy* *13*, 1162–1163.
- Guescini, M., Genedani, S., Stocchi, V., and Agnati, L.F. (2010). Astrocytes and Glioblastoma cells release exosomes carrying mtDNA. *J Neural Transm (Vienna)* *117*, 1–4
- Haddad, R., Saldanha-Araujo, F., Haddad, R., and Saldanha-Araujo, F. (2014). Mechanisms of T-Cell Immunosuppression by Mesenchymal Stromal Cells: What Do We Know So Far?., *BioMed Research International*, *BioMed Research International* *2014*, *2014*, e216806.
- Harding, C., Heuser, J., and Stahl, P. (1984). Endocytosis and intracellular processing of transferrin and colloidal gold-transferrin in rat reticulocytes: demonstration of a pathway for receptor shedding. *Eur. J. Cell Biol.* *35*, 256–263.
- Harichandan, A., Sivasubramanian, K., and Bühring, H.-J. (2013). Prospective isolation and characterization of human bone marrow-derived MSCs. *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.* *129*, 1–17.

- He, J., Wang, Y., Sun, S., Yu, M., Wang, C., Pei, X., Zhu, B., Wu, J., and Zhao, W. (2012). Bone marrow stem cells-derived microvesicles protect against renal injury in the mouse remnant kidney model. *Nephrology (Carlton)* 17, 493–500.
- Heijnen, H.F., Schiel, A.E., Fijnheer, R., Geuze, H.J., and Sixma, J.J. (1999). Activated platelets release two types of membrane vesicles: microvesicles by surface shedding and exosomes derived from exocytosis of multivesicular bodies and alpha-granules. *Blood* 94, 3791–3799.
- Hemler, M.E. (2003). Tetraspanin proteins mediate cellular penetration, invasion, and fusion events and define a novel type of membrane microdomain. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 19, 397–422.
- Heo, Y.-J., Joo, Y.-B., Oh, H.-J., Park, M.-K., Heo, Y.-M., Cho, M.-L., Kwok, S.-K., Ju, J.-H., Park, K.-S., Cho, S.G., et al. (2010). IL-10 suppresses Th17 cells and promotes regulatory T cells in the CD4+ T cell population of rheumatoid arthritis patients. *Immunol. Lett.* 127, 150–156.
- Herberman, R.B., Nunn, M.E., Holden, H.T., and Lavrin, D.H. (1975). Natural cytotoxic reactivity of mouse lymphoid cells against syngeneic and allogeneic tumors. II. Characterization of effector cells. *Int. J. Cancer* 16, 230–239.
- Hershkovitz, O., Jivov, S., Bloushtain, N., Zilka, A., Landau, G., Bar-Ilan, A., Lichtenstein, R.G., Campbell, K.S., van Kuppevelt, T.H., and Porgador, A. (2007). Characterization of the recognition of tumor cells by the natural cytotoxicity receptor, NKp44. *Biochemistry* 46, 7426–7436.
- Hoogduijn, M.J. (2015). Are mesenchymal stromal cells immune cells? *Arthritis Res Ther* 17.
- Hoogduijn, M.J., Crop, M.J., Korevaar, S.S., Peeters, A.M.A., Eijken, M., Maat, L.P.W.M., Balk, A.H.M.M., Weimar, W., and Baan, C.C. (2008). Susceptibility of human mesenchymal stem cells to tacrolimus, mycophenolic acid, and rapamycin. *Transplantation* 86, 1283–1291.
- Hsu, W.-T., Lin, C.-H., Chiang, B.-L., Jui, H.-Y., Wu, K.K.-Y., and Lee, C.-M. (2013). Prostaglandin E2 potentiates mesenchymal stem cell-induced IL-10+IFN- $\gamma$ +CD4+ regulatory T cells to control transplant arteriosclerosis. *J. Immunol.* 190, 2372–2380.
- Hu, G., Drescher, K.M., and Chen, X.-M. (2012). Exosomal miRNAs: Biological Properties and Therapeutic Potential. *Front Genet* 3.
- Iguchi, H., Kosaka, N., and Ochiya, T. (2010). Secretory microRNAs as a versatile communication tool. *Commun Integr Biol* 3, 478–481.
- Ildstad, S.T., and Sachs, D.H. (1984). Reconstitution with syngeneic plus allogeneic or xenogeneic bone marrow leads to specific acceptance of allografts or xenografts. *Nature* 307, 168–170.
- Isern, J., García-García, A., Martín, A.M., Arranz, L., Martín-Pérez, D., Torroja, C., Sánchez-Cabo, F., and Méndez-Ferrer, S. (2014). The neural crest is a source of mesenchymal stem cells with specialized hematopoietic stem cell niche function. *Elife* 3, e03696.
- Ito, A., Shimura, H., Nitahara, A., Tomiyama, K., Ito, M., Kanekura, T., Okumura, K., Yagita, H., and Kawai, K. (2008). NK cells contribute to the skin graft rejection promoted by CD4+ T cells activated through the indirect allorecognition pathway. *Int Immunol* 20, 1343–1349.
- Ivanova-Todorova, E., Bochev, I., Mourdjeva, M., Dimitrov, R., Bukarev, D., Kyurkchiev, S., Tivchev, P., Altunkova, I., and Kyurkchiev, D.S. (2009). Adipose tissue-derived mesenchymal stem cells are more potent suppressors of dendritic cells differentiation compared to bone marrow-derived mesenchymal stem cells. *Immunol. Lett.* 126, 37–42.

- Ivanova-Todorova, E., Bochev, I., Dimitrov, R., Belezova, K., Mourdjeva, M., Kyurkchiev, S., Kinov, P., Altankova, I., and Kyurkchiev, D. (2012). Conditioned medium from adipose tissue-derived mesenchymal stem cells induces CD4+FOXP3+ cells and increases IL-10 secretion. *J. Biomed. Biotechnol.* *2012*, 295167.
- Jensen, P.E. (2007). Recent advances in antigen processing and presentation. *Nat. Immunol.* *8*, 1041–1048.
- 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., et al. (2012). Mesenchymal stem cells support proliferation and terminal differentiation of B cells. *Cell. Physiol. Biochem.* *30*, 1526–1537.
- Jiang, X.-X., Zhang, Y., Liu, B., Zhang, S.-X., Wu, Y., Yu, X.-D., and Mao, N. (2005). Human mesenchymal stem cells inhibit differentiation and function of monocyte-derived dendritic cells. *Blood* *105*, 4120–4126.
- Johnstone, R.M. (1992). The Jeanne Manery-Fisher Memorial Lecture 1991. Maturation of reticulocytes: formation of exosomes as a mechanism for shedding membrane proteins. *Biochem. Cell Biol.* *70*, 179–190.
- Johnstone, R.M. (2005). Revisiting the road to the discovery of exosomes. *Blood Cells, Molecules, and Diseases* *34*, 214–219.
- Johnstone, R.M., Adam, M., Hammond, J.R., Orr, L., and Turbide, C. (1987). Vesicle formation during reticulocyte maturation. Association of plasma membrane activities with released vesicles (exosomes). *J. Biol. Chem.* *262*, 9412–9420.
- Jones, D.L., and Wagers, A.J. (2008). No place like home: anatomy and function of the stem cell niche. *Nat Rev Mol Cell Biol* *9*, 11–21.
- Kaech, S.M., Wherry, E.J., and Ahmed, R. (2002). Effector and memory T-cell differentiation: implications for vaccine development. *Nat. Rev. Immunol.* *2*, 251–262.
- Kalinski, P. (2012). Regulation of Immune Responses by Prostaglandin E2. *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)* *188*, 21.
- Kalra, H., Adda, C.G., Liem, M., Ang, C.-S., Mechler, A., Simpson, R.J., Hulett, M.D., and Mathivanan, S. (2013). Comparative proteomics evaluation of plasma exosome isolation techniques and assessment of the stability of exosomes in normal human blood plasma. *Proteomics* *13*, 3354–3364.
- Kang, S.-G., Shinojima, N., Hossain, A., Gumin, J., Yong, R.L., Colman, H., Marini, F., Andreeff, M., and Lang, F.F. (2010). Isolation and Perivascular Localization of Mesenchymal Stem Cells From Mouse Brain. *Neurosurgery* *67*, 711–720.
- Kansy, B.A., Dißmann, P.A., Hemeda, H., Bruderek, K., Westerkamp, A.M., Jagalski, V., Schuler, P., Kansy, K., Lang, S., Dumitru, C.A., et al. (2014). The bidirectional tumor--mesenchymal stromal cell interaction promotes the progression of head and neck cancer. *Stem Cell Res Ther* *5*, 95.
- Karlsson, H., Samarasinghe, S., Ball, L.M., Sundberg, B., Lankester, A.C., Dazzi, F., Uzunel, M., Rao, K., Veys, P., Le Blanc, K., et al. (2008). Mesenchymal stem cells exert differential effects on alloantigen and virus-specific T-cell responses. *Blood* *112*, 532–541.

- 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. (2007). Mesenchymal stem cells within tumour stroma promote breast cancer metastasis. *Nature* *449*, 557–563.
- Katayama, Y., Battista, M., Kao, W.-M., Hidalgo, A., Peired, A.J., Thomas, S.A., and Frenette, P.S. (2006). Signals from the sympathetic nervous system regulate hematopoietic stem cell egress from bone marrow. *Cell* *124*, 407–421.
- Katsha, A.M., Ohkouchi, S., Xin, H., Kanehira, M., Sun, R., Nukiwa, T., and Saijo, Y. (2011). Paracrine factors of multipotent stromal cells ameliorate lung injury in an elastase-induced emphysema model. *Mol. Ther.* *19*, 196–203.
- Katsuda, T., Tsuchiya, R., Kosaka, N., Yoshioka, Y., Takagaki, K., Oki, K., Takeshita, F., Sakai, Y., Kuroda, M., and Ochiya, T. (2013). Human adipose tissue-derived mesenchymal stem cells secrete functional neprilysin-bound exosomes. *Sci Rep* *3*, 1197.
- Khoo, M.L.M., Shen, B., Tao, H., and Ma, D.D.F. (2008). Long-term serial passage and neuronal differentiation capability of human bone marrow mesenchymal stem cells. *Stem Cells Dev.* *17*, 883–896.
- Kiessling, R., Klein, E., and Wigzell, H. (1975). “Natural” killer cells in the mouse. I. Cytotoxic cells with specificity for mouse Moloney leukemia cells. Specificity and distribution according to genotype. *Eur. J. Immunol.* *5*, 112–117.
- Kilpinen, L., Impola, U., Sankkila, L., Ritamo, I., Aatonen, M., Kilpinen, S., Tuimala, J., Valmu, L., Levijoki, J., Finckenberg, P., et al. (2013). Extracellular membrane vesicles from umbilical cord blood-derived MSC protect against ischemic acute kidney injury, a feature that is lost after inflammatory conditioning. *J Extracell Vesicles* *2*.
- Kim, N., and Cho, S.-G. (2013). Clinical applications of mesenchymal stem cells. *Korean J. Intern. Med.* *28*, 387–402.
- Kim, N., and Cho, S.-G. (2016). Overcoming immunoregulatory plasticity of mesenchymal stem cells for accelerated clinical applications. *Int J Hematol* *103*, 129–137.
- Kim, H.-S., Choi, D.-Y., Yun, S.J., Choi, S.-M., Kang, J.W., Jung, J.W., Hwang, D., Kim, K.P., and Kim, D.-W. (2012). Proteomic analysis of microvesicles derived from human mesenchymal stem cells. *J. Proteome Res.* *11*, 839–849.
- Kimura, A., and Kishimoto, T. (2010). IL-6: regulator of Treg/Th17 balance. *Eur. J. Immunol.* *40*, 1830–1835.
- Kishimoto, T. (2010). IL-6: from its discovery to clinical applications. *Int. Immunol.* *22*, 347–352.
- Klyushnenkova, E., Mosca, J.D., Zernetkina, V., Majumdar, M.K., Beggs, K.J., Simonetti, D.W., Deans, R.J., and McIntosh, K.R. (2005). T cell responses to allogeneic human mesenchymal stem cells: immunogenicity, tolerance, and suppression. *J. Biomed. Sci.* *12*, 47–57.
- Koppers-Lalic, D., Hackenberg, M., Bijnsdorp, I.V., van Eijndhoven, M.A.J., Sadek, P., Sie, D., Zini, N., Middeldorp, J.M., Ylstra, B., de Menezes, R.X., et al. (2014). Nontemplated nucleotide additions distinguish the small RNA composition in cells from exosomes. *Cell Rep* *8*, 1649–1658.
- Kordelas, L., Rebmann, V., Ludwig, A.-K., Radtke, S., Ruesing, J., Doepfner, T.R., Epple, M., Horn, P.A., Beelen, D.W., and Giebel, B. (2014). MSC-derived exosomes: a novel tool to treat therapy-refractory graft-versus-host disease. *Leukemia* *28*, 970–973.

- Krampera, M., Glennie, S., Dyson, J., Scott, D., Laylor, R., Simpson, E., and Dazzi, F. (2003). Bone marrow mesenchymal stem cells inhibit the response of naive and memory antigen-specific T cells to their cognate peptide. *Blood* *101*, 3722–3729.
- Krampera, M., Cosmi, L., Angeli, R., Pasini, A., Liotta, F., Andreini, A., Santarlasci, V., Mazzinghi, B., Pizzolo, G., Vinante, F., et al. (2006a). Role for Interferon- $\gamma$  in the Immunomodulatory Activity of Human Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells. *STEM CELLS* *24*, 386–398.
- Krampera, M., Cosmi, L., Angeli, R., Pasini, A., Liotta, F., Andreini, A., Santarlasci, V., Mazzinghi, B., Pizzolo, G., Vinante, F., et al. (2006b). Role for interferon-gamma in the immunomodulatory activity of human bone marrow mesenchymal stem cells. *Stem Cells* *24*, 386–398.
- Krutzik, P.O., and Nolan, G.P. (2003). Intracellular phospho-protein staining techniques for flow cytometry: monitoring single cell signaling events. *Cytometry A* *55*, 61–70.
- Kucerova, L., Matuskova, M., Hlubinova, K., Altanerova, V., and Altaner, C. (2010). Tumor cell behaviour modulation by mesenchymal stromal cells. *Mol. Cancer* *9*, 129.
- Kyurkchiev, D., Ivanova-Todorova, E., Bochev, I., Mourdjeva, M., and Kyurkchiev, S. (2013). Differences Between Adipose Tissue-Derived Mesenchymal Stem Cells and Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stem Cells as Regulators of the Immune Response. In *Stem Cells and Cancer Stem Cells*, Volume 10, M.A. Hayat, ed. (Springer Netherlands), pp. 71–84.
- Kyurkchiev, D., Bochev, I., Ivanova-Todorova, E., Mourdjeva, M., Oreshkova, T., Belemezova, K., and Kyurkchiev, S. (2014). Secretion of immunoregulatory cytokines by mesenchymal stem cells. *World J Stem Cells* *6*, 552–570.
- Lai, F.W., Lichty, B.D., and Bowdish, D.M.E. (2015a). Microvesicles: ubiquitous contributors to infection and immunity. *J. Leukoc. Biol.* *97*, 237–245.
- Lai, R.C., Arslan, F., Tan, S.S., Tan, B., Choo, A., Lee, M.M., Chen, T.S., Teh, B.J., Eng, J.K.L., Sidik, H., et al. (2010a). Derivation and characterization of human fetal MSCs: an alternative cell source for large-scale production of cardioprotective microparticles. *J. Mol. Cell. Cardiol.* *48*, 1215–1224.
- Lai, R.C., Arslan, F., Lee, M.M., Sze, N.S.K., Choo, A., Chen, T.S., Salto-Tellez, M., Timmers, L., Lee, C.N., El Oakley, R.M., et al. (2010b). Exosome secreted by MSC reduces myocardial ischemia/reperfusion injury. *Stem Cell Res* *4*, 214–222.
- Lai, R.C., Tan, S.S., Teh, B.J., Sze, S.K., Arslan, F., de Kleijn, D.P., Choo, A., and Lim, S.K. (2012). Proteolytic Potential of the MSC Exosome Proteome: Implications for an Exosome-Mediated Delivery of Therapeutic Proteasome. *Int J Proteomics* *2012*, 971907.
- Lai, R.C., Yeo, R.W.Y., Tan, S.S., Zhang, B., Yin, Y., Sze, N.S.K., Choo, A., and Lim, S.K. (2013). Mesenchymal Stem Cell Exosomes: The Future MSC-Based Therapy? In *Mesenchymal Stem Cell Therapy*, L.G. Chase, and M.C. Vemuri, eds. (Humana Press), pp. 39–61.
- Lai, R.C., Yeo, R.W.Y., and Lim, S.K. (2015b). Mesenchymal stem cell exosomes. *Seminars in Cell & Developmental Biology* *40*, 82–88.
- Lama, V.N., Smith, L., Badri, L., Flint, A., Andrei, A.-C., Murray, S., Wang, Z., Liao, H., Toews, G.B., Krebsbach, P.H., et al. (2007). Evidence for tissue-resident mesenchymal stem cells in human adult lung from studies of transplanted allografts. *J Clin Invest* *117*, 989–996.



- Lanier, L.L. (2008). Up on the tightrope: natural killer cell activation and inhibition. *Nat. Immunol.* *9*, 495–502.
- Lanier, L.L., Corliss, B.C., Wu, J., Leong, C., and Phillips, J.H. (1998). Immunoreceptor DAP12 bearing a tyrosine-based activation motif is involved in activating NK cells. *Nature* *391*, 703–707.
- Lavoie, J.R., and Rosu-Myles, M. (2013). Uncovering the secrets of mesenchymal stem cells. *Biochimie* *95*, 2212–2221.
- Lázaro-Ibáñez, E., Sanz-García, A., Visakorpi, T., Escobedo-Lucea, C., Siljander, P., Ayuso-Sacido, A., and Yliperttula, M. (2014). Different gDNA content in the subpopulations of prostate cancer extracellular vesicles: apoptotic bodies, microvesicles, and exosomes. *Prostate* *74*, 1379–1390.
- Le Blanc, K., Tammik, L., Sundberg, B., Haynesworth, S.E., and Ringdén, O. (2003). Mesenchymal Stem Cells Inhibit and Stimulate Mixed Lymphocyte Cultures and Mitogenic Responses Independently of the Major Histocompatibility Complex. *Scandinavian Journal of Immunology* *57*, 11–20.
- Lee, C., Mitsialis, S.A., Aslam, M., Vitali, S.H., Vergadi, E., Konstantinou, G., Sdrimas, K., Fernandez-Gonzalez, A., and Kourembanas, S. (2012). Exosomes mediate the cytoprotective action of mesenchymal stromal cells on hypoxia-induced pulmonary hypertension. *Circulation* *126*, 2601–2611.
- Lee, D.-S., Yi, T.G., Lee, H.-J., Kim, S.-N., Park, S., Jeon, M.-S., and Song, S.U. (2014). Mesenchymal stem cells infected with *Mycoplasma arginini* secrete complement C3 to regulate immunoglobulin production in B lymphocytes. *Cell Death Dis* *5*, e1192.
- Lee, J.-C., Lee, K.-M., Kim, D.-W., and Heo, D.S. (2004). Elevated TGF- $\beta$ 1 secretion and down-modulation of NKG2D underlies impaired NK cytotoxicity in cancer patients. *J. Immunol.* *172*, 7335–7340.
- Lei, J., Wang, Z., Hui, D., Yu, W., Zhou, D., Xia, W., Chen, C., Zhang, Q., Wang, Z., Zhang, Q., et al. (2011). Ligation of TLR2 and TLR4 on murine bone marrow-derived mesenchymal stem cells triggers differential effects on their immunosuppressive activity. *Cell. Immunol.* *271*, 147–156.
- Lepelletier, Y., Lecourt, S., Renand, A., Arnulf, B., Vanneaux, V., Femand, J.-P., Menasché, P., Domet, T., Marolleau, J.-P., Hermine, O., et al. (2010). Galectin-1 and semaphorin-3A are two soluble factors conferring T-cell immunosuppression to bone marrow mesenchymal stem cell. *Stem Cells Dev.* *19*, 1075–1079.
- Li, S.S., Kyei, S.K., Timm-McCann, M., Ogbomo, H., Jones, G.J., Shi, M., Xiang, R.F., Oykhman, P., Huston, S.M., Islam, A., et al. (2013). The NK receptor NKp30 mediates direct fungal recognition and killing and is diminished in NK cells from HIV-infected patients. *Cell Host Microbe* *14*, 387–397.
- Li, W., Ren, G., Huang, Y., Su, J., Han, Y., Li, J., Chen, X., Cao, K., Chen, Q., Shou, P., et al. (2012a). Mesenchymal stem cells: a double-edged sword in regulating immune responses. *Cell Death Differ.* *19*, 1505–1513.
- Li, X., Arslan, F., Ren, Y., Adav, S.S., Poh, K.K., Sorokin, V., Lee, C.N., de Kleijn, D., Lim, S.K., and Sze, S.K. (2012b). Metabolic adaptation to a disruption in oxygen supply during myocardial ischemia and reperfusion is underpinned by temporal and quantitative changes in the cardiac proteome. *J. Proteome Res.* *11*, 2331–2346.
- Liang, C., Chen, S., Wang, M., Zhai, W., Zhou, Z., Pang, A., Feng, S., and Han, M. (2013). [Synergistic immunomodulatory effects of interferon-gamma and bone marrow mesenchymal stem cells]. *Zhonghua Xue Ye Xue Za Zhi* *34*, 213–216.

- Liu, W., Liu, J., Wu, J., Zhang, L., Liu, F., Yin, L., Zhang, M., and Yu, B. (2013). Novel mechanism of inhibition of dendritic cells maturation by mesenchymal stem cells via interleukin-10 and the JAK1/STAT3 signaling pathway. *PLoS ONE* 8, e55487.
- Ljunggren, H.G., and Kärre, K. (1990). In search of the “missing self”: MHC molecules and NK cell recognition. *Immunol. Today* 11, 237–244.
- Ljunggren, H.-G., and Malmberg, K.-J. (2007). Prospects for the use of NK cells in immunotherapy of human cancer. *Nat. Rev. Immunol.* 7, 329–339.
- Llano, M., Lee, N., Navarro, F., García, P., Albar, J.P., Geraghty, D.E., and López-Botet, M. (1998). HLA-E-bound peptides influence recognition by inhibitory and triggering CD94/NKG2 receptors: preferential response to an HLA-G-derived nonamer. *Eur. J. Immunol.* 28, 2854–2863.
- Long, E.O., Barber, D.F., Burshtyn, D.N., Faure, M., Peterson, M., Rajagopalan, S., Renard, V., Sandusky, M., Stebbins, C.C., Wagtmann, N., et al. (2001). Inhibition of natural killer cell activation signals by killer cell immunoglobulin-like receptors (CD158). *Immunol. Rev.* 181, 223–233.
- Lopez-Verrilli, M.A., Caviedes, A., Cabrera, A., Sandoval, S., Wyneken, U., and Khoury, M. (2016). Mesenchymal stem cell-derived exosomes from different sources selectively promote neuritic outgrowth. *Neuroscience* 320, 129–139.
- Lundholm, M., Schröder, M., Nagaeva, O., Baranov, V., Widmark, A., Mincheva-Nilsson, L., and Wikström, P. (2014). Prostate tumor-derived exosomes down-regulate NKG2D expression on natural killer cells and CD8+ T cells: mechanism of immune evasion. *PLoS ONE* 9, e108925.
- Lüthje, J. (1989). Origin, metabolism and function of extracellular adenine nucleotides in the blood. *Klin. Wochenschr.* 67, 317–327.
- Luz-Crawford, P., Kurte, M., Bravo-Alegría, J., Contreras, R., Nova-Lamperti, E., Tejedor, G., Noël, D., Jorgensen, C., Figueroa, F., Djouad, F., et al. (2013). 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* 4, 65.
- Lv, F.-J., Tuan, R.S., Cheung, K.M.C., and Leung, V.Y.L. (2014). Concise Review: The Surface Markers and Identity of Human Mesenchymal Stem Cells. *Stem Cells* 32, 1408–1419.
- Mace, E.M., Dongre, P., Hsu, H.-T., Sinha, P., James, A.M., Mann, S.S., Forbes, L.R., Watkin, L.B., and Orange, J.S. (2014). Cell biological steps and checkpoints in accessing NK cell cytotoxicity. *Immunol. Cell Biol.* 92, 245–255.
- Majumdar, M.K., Keane-Moore, M., Buyaner, D., Hardy, W.B., Moorman, M.A., McIntosh, K.R., and Mosca, J.D. (2003). Characterization and functionality of cell surface molecules on human mesenchymal stem cells. *J. Biomed. Sci.* 10, 228–241.
- Marigo, I., and Dazzi, F. (2011). The immunomodulatory properties of mesenchymal stem cells. *Semin Immunopathol* 33, 593.
- Mathivanan, S., Ji, H., and Simpson, R.J. (2010). Exosomes: Extracellular organelles important in intercellular communication. *Journal of Proteomics* 73, 1907–1920.
- Mauri, C., and Bosma, A. (2012). Immune regulatory function of B cells. *Annu. Rev. Immunol.* 30, 221–241.

- Meirelles, L. da S., Fontes, A.M., Covas, D.T., and Caplan, A.I. (2009). Mechanisms involved in the therapeutic properties of mesenchymal stem cells. *Cytokine Growth Factor Rev.* 20, 419–427.
- Meisel, R., Zibert, A., Laryea, M., Göbel, U., Däubener, W., and Dilloo, D. (2004). Human bone marrow stromal cells inhibit allogeneic T-cell responses by indoleamine 2,3-dioxygenase-mediated tryptophan degradation. *Blood* 103, 4619–4621.
- Melief, S.M., Schrama, E., Brugman, M.H., Tiemessen, M.M., Hoogduijn, M.J., Fibbe, W.E., and Roelofs, H. (2013a). Multipotent stromal cells induce human regulatory T cells through a novel pathway involving skewing of monocytes toward anti-inflammatory macrophages. *Stem Cells* 31, 1980–1991.
- Melief, S.M., Geutskens, S.B., Fibbe, W.E., and Roelofs, H. (2013b). Multipotent stromal cells skew monocytes towards an anti-inflammatory interleukin-10-producing phenotype by production of interleukin-6. *Haematologica* 98, 888–895.
- Méndez-Ferrer, S., Michurina, T.V., Ferraro, F., Mazloom, A.R., Macarthur, B.D., Lira, S.A., Scadden, D.T., Ma'ayan, A., Enikolopov, G.N., and Frenette, P.S. (2010). Mesenchymal and haematopoietic stem cells form a unique bone marrow niche. *Nature* 466, 829–834.
- de Menthon, M., Lambert, M., Guiard, E., Tognarelli, S., Bienvenu, B., Karras, A., Guillevin, L., and Caillat-Zucman, S. (2011). Excessive interleukin-15 transpresentation endows NKG2D+CD4+ T cells with innate-like capacity to lyse vascular endothelium in granulomatosis with polyangiitis (Wegener's). *Arthritis Rheum.* 63, 2116–2126.
- Mincheva-Nilsson, L., and Baranov, V. (2014). Cancer exosomes and NKG2D receptor-ligand interactions: impairing NKG2D-mediated cytotoxicity and anti-tumour immune surveillance. *Semin. Cancer Biol.* 28, 24–30.
- Miranda, K.C., Bond, D.T., Levin, J.Z., Adiconis, X., Sivachenko, A., Russ, C., Brown, D., Nusbaum, C., and Russo, L.M. (2014). Massively Parallel Sequencing of Human Urinary Exosome/Microvesicle RNA Reveals a Predominance of Non-Coding RNA. *PLOS ONE* 9, e96094.
- Mocellin, S., Marincola, F.M., and Young, H.A. (2005). Interleukin-10 and the immune response against cancer: a counterpoint. *J. Leukoc. Biol.* 78, 1043–1051.
- Moffett, A., and Colucci, F. (2014). Uterine NK cells: active regulators at the maternal-fetal interface. *J. Clin. Invest.* 124, 1872–1879.
- Mokarizadeh, A., Delirez, N., Morshedi, A., Mosayebi, G., Farshid, A.-A., and Mardani, K. (2012a). Microvesicles derived from mesenchymal stem cells: Potent organelles for induction of tolerogenic signaling. *Immunology Letters* 147, 47–54.
- Mokarizadeh, A., Delirez, N., Morshedi, A., Mosayebi, G., Farshid, A.-A., and Mardani, K. (2012b). Microvesicles derived from mesenchymal stem cells: potent organelles for induction of tolerogenic signaling. *Immunol. Lett.* 147, 47–54.
- Morel, O., Morel, N., Jesel, L., Freyssinet, J.-M., and Toti, F. (2011). Microparticles: a critical component in the nexus between inflammation, immunity, and thrombosis. *Semin Immunopathol* 33, 469–486.
- Morelli, A.E., Larregina, A.T., Shufesky, W.J., Sullivan, M.L.G., Stolz, D.B., Papworth, G.D., Zahorchak, A.F., Logar, A.J., Wang, Z., Watkins, S.C., et al. (2004). Endocytosis, intracellular sorting, and processing of exosomes by dendritic cells. *Blood* 104, 3257–3266.

- Moretta, A., Bottino, C., Vitale, M., Pende, D., Cantoni, C., Mingari, M.C., Biassoni, R., and Moretta, L. (2001). Activating receptors and coreceptors involved in human natural killer cell-mediated cytotoxicity. *Annu. Rev. Immunol.* *19*, 197–223.
- Morrison, S.J., and Scadden, D.T. (2014). The bone marrow niche for haematopoietic stem cells. *Nature* *505*, 327–334.
- Murphy-Ullrich, J.E., and Poczatek, M. (2000a). Activation of latent TGF $\beta$  by thrombospondin-1: mechanisms and physiology. *Cytokine & Growth Factor Reviews* *11*, 59–69.
- Murphy-Ullrich, J.E., and Poczatek, M. (2000b). Activation of latent TGF $\beta$  by thrombospondin-1: mechanisms and physiology. *Cytokine & Growth Factor Reviews* *11*, 59–69.
- Nagler, A., Lanier, L.L., Cwirla, S., and Phillips, J.H. (1989). Comparative studies of human FcR3-positive and negative natural killer cells. *J. Immunol.* *143*, 3183–3191.
- Najar, M., Raicevic, G., Id Boufker, H., Stamatopoulos, B., De Bruyn, C., Meuleman, N., Bron, D., Toungouz, M., and Lagneaux, L. (2010). Modulated expression of adhesion molecules and galectin-1: role during mesenchymal stromal cell immunoregulatory functions. *Exp. Hematol.* *38*, 922–932.
- Najar, M., Raicevic, G., Fayyad-Kazan, H., Kazan, H.F., De Bruyn, C., Bron, D., Toungouz, M., and Lagneaux, L. (2012). Immune-related antigens, surface molecules and regulatory factors in human-derived mesenchymal stromal cells: the expression and impact of inflammatory priming. *Stem Cell Rev* *8*, 1188–1198.
- Najimi, M., Khuu, D.N., Lysy, P.A., Jazouli, N., Abarca, J., Sempoux, C., and Sokal, E.M. (2007). Adult-derived human liver mesenchymal-like cells as a potential progenitor reservoir of hepatocytes? *Cell Transplant* *16*, 717–728.
- Nasef, A., Chapel, A., Mazurier, C., Bouchet, S., Lopez, M., Mathieu, N., Sensebé, L., Zhang, Y., Gorin, N.-C., Thierry, D., et al. (2007). Identification of IL-10 and TGF- $\beta$  transcripts involved in the inhibition of T-lymphocyte proliferation during cell contact with human mesenchymal stem cells. *Gene Expr.* *13*, 217–226.
- Nasef, A., Mazurier, C., Bouchet, S., François, S., Chapel, A., Thierry, D., Gorin, N.-C., and Fouillard, L. (2008). Leukemia inhibitory factor: Role in human mesenchymal stem cells mediated immunosuppression. *Cell. Immunol.* *253*, 16–22.
- Nauta, A.J., Kruisselbrink, A.B., Lurvink, E., Willemze, R., and Fibbe, W.E. (2006). Mesenchymal stem cells inhibit generation and function of both CD34 $^{+}$ -derived and monocyte-derived dendritic cells. *J. Immunol.* *177*, 2080–2087.
- Nedvetzki, S., Sowinski, S., Eagle, R.A., Harris, J., Vély, F., Pende, D., Trowsdale, J., Vivier, E., Gordon, S., and Davis, D.M. (2007). Reciprocal regulation of human natural killer cells and macrophages associated with distinct immune synapses. *Blood* *109*, 3776–3785.
- Németh, K., Leelahavanichkul, A., Yuen, P.S.T., Mayer, B., Parmelee, A., Doi, K., Robey, P.G., Leelahavanichkul, K., Koller, B.H., Brown, J.M., et al. (2009). Bone marrow stromal cells attenuate sepsis via prostaglandin E(2)-dependent reprogramming of host macrophages to increase their interleukin-10 production. *Nat. Med.* *15*, 42–49.
- Ng, T.H.S., Britton, G.J., Hill, E.V., Verhagen, J., Burton, B.R., and Wraith, D.C. (2013). Regulation of adaptive immunity; the role of interleukin-10. *Front Immunol* *4*, 129.

- Nicola, M.D., Carlo-Stella, C., Magni, M., Milanesi, M., Longoni, P.D., Matteucci, P., Grisanti, S., and Gianni, A.M. (2002). Human bone marrow stromal cells suppress T-lymphocyte proliferation induced by cellular or nonspecific mitogenic stimuli. *Blood* 99, 3838–3843.
- van Niel, G., Raposo, G., Candalh, C., Boussac, M., Hershberg, R., Cerf-Bensussan, N., and Heyman, M. (2001). Intestinal epithelial cells secrete exosome-like vesicles. *Gastroenterology* 121, 337–349.
- van Niel, G., Porto-Carreiro, I., Simoes, S., and Raposo, G. (2006). Exosomes: a common pathway for a specialized function. *J. Biochem.* 140, 13–21.
- Nolte-'t Hoen, E.N.M., Buermans, H.P.J., Waasdorp, M., Stoorvogel, W., Wauben, M.H.M., and 't Hoen, P.A.C. (2012). Deep sequencing of RNA from immune cell-derived vesicles uncovers the selective incorporation of small non-coding RNA biotypes with potential regulatory functions. *Nucleic Acids Res.* 40, 9272–9285
- Obara, H., Nagasaki, K., Hsieh, C.L., Ogura, Y., Esquivel, C.O., Martinez, O.M., and Krams, S.M. (2005). IFN- $\gamma$ , produced by NK cells that infiltrate liver allografts early after transplantation, links the innate and adaptive immune responses. *American Journal of Transplantation: Official Journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons* 5, 2094.
- O'Donoghue, K., and Fisk, N.M. (2004). Fetal stem cells. *Best Practice & Research Clinical Obstetrics & Gynaecology* 18, 853–875.
- Ogasawara, K., Benjamin, J., Takaki, R., Phillips, J.H., and Lanier, L.L. (2005). A role for NKG2D in NK cell-mediated rejection of mouse bone marrow grafts. *Nat Immunol* 6, 938–945.
- Olivier, E.N., Rybicki, A.C., and Bouhassira, E.E. (2006). Differentiation of human embryonic stem cells into bipotent mesenchymal stem cells. *Stem Cells* 24, 1914–1922.
- Owen, M., and Friedenstein, A.J. (1988). Stromal stem cells: marrow-derived osteogenic precursors. *Ciba Found. Symp.* 136, 42–60.
- Padua, D., and Massagué, J. (2009). Roles of TGF $\beta$  in metastasis. *Cell Res* 19, 89–102.
- Pan, B.T., Teng, K., Wu, C., Adam, M., and Johnstone, R.M. (1985). Electron microscopic evidence for externalization of the transferrin receptor in vesicular form in sheep reticulocytes. *J. Cell Biol.* 101, 942–948.
- Pant, S., Hilton, H., and Burczynski, M.E. (2012). The multifaceted exosome: biogenesis, role in normal and aberrant cellular function, and frontiers for pharmacological and biomarker opportunities. *Biochem. Pharmacol.* 83, 1484–1494.
- Park, C.W., Kim, K.-S., Bae, S., Son, H.K., Myung, P.-K., Hong, H.J., and Kim, H. (2009). Cytokine secretion profiling of human mesenchymal stem cells by antibody array. *Int J Stem Cells* 2, 59–68.
- Park, K.-H., Park, H., Kim, M., Kim, Y., Han, K., and Oh, E.-J. (2013). Evaluation of NK cell function by flowcytometric measurement and impedance based assay using real-time cell electronic sensing system. *Biomed Res Int* 2013, 210726.
- Park, M.-J., Kwok, S.-K., Lee, S.-H., Kim, E.-K., Park, S.-H., and Cho, M.-L. (2015). Adipose tissue-derived mesenchymal stem cells induce expansion of interleukin-10-producing regulatory B cells and ameliorate autoimmunity in a murine model of systemic lupus erythematosus. *Cell Transplant* 24, 2367–2377.

- Pegtel, D.M., Cosmopoulos, K., Thorley-Lawson, D.A., van Eijndhoven, M.A.J., Hopmans, E.S., Lindenberg, J.L., de Gruijl, T.D., Würdinger, T., and Middeldorp, J.M. (2010). Functional delivery of viral miRNAs via exosomes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *107*, 6328–6333.
- Pierson, B.A., Gupta, K., Hu, W.S., and Miller, J.S. (1996). Human natural killer cell expansion is regulated by thrombospondin-mediated activation of transforming growth factor-beta 1 and independent accessory cell-derived contact and soluble factors. *Blood* *87*, 180–189.
- Pittenger, M.F., Mackay, A.M., Beck, S.C., Jaiswal, R.K., Douglas, R., Mosca, J.D., Moorman, M.A., Simonetti, D.W., Craig, S., and Marshak, D.R. (1999). Multilineage Potential of Adult Human Mesenchymal Stem Cells. *Science* *284*, 143–147.
- Prantl, L., Muehlberg, F., Navone, N.M., Song, Y.-H., Vykoukal, J., Logothetis, C.J., and Alt, E.U. (2010). Adipose tissue-derived stem cells promote prostate tumor growth. *Prostate* *70*, 1709–1715.
- Prockop, D.J. (2013). Concise review: two negative feedback loops place mesenchymal stem/stromal cells at the center of early regulators of inflammation. *Stem Cells* *31*, 2042–2046.
- Prod'homme, V., Griffin, C., Aicheler, R.J., Wang, E.C.Y., McSharry, B.P., Rickards, C.R., Stanton, R.J., Borysiewicz, L.K., López-Botet, M., Wilkinson, G.W.G., et al. (2007). The human cytomegalovirus MHC class I homolog UL18 inhibits LIR-1+ but activates LIR-1- NK cells. *J. Immunol.* *178*, 4473–4481.
- Qazi, K.R., Gehrman, U., Domange Jordö, E., Karlsson, M.C.I., and Gabrielsson, S. (2009). Antigen-loaded exosomes alone induce Th1-type memory through a B-cell-dependent mechanism. *Blood* *113*, 2673–2683.
- Qian, H., Yang, H., Xu, W., Yan, Y., Chen, Q., Zhu, W., Cao, H., Yin, Q., Zhou, H., Mao, F., et al. (2008). Bone marrow mesenchymal stem cells ameliorate rat acute renal failure by differentiation into renal tubular epithelial-like cells. *Int. J. Mol. Med.* *22*, 325–332.
- Quaedackers, M.E., Baan, C.C., Weimar, W., and Hoogduijn, M.J. (2009). Cell contact interaction between adipose-derived stromal cells and allo-activated T lymphocytes. *Eur. J. Immunol.* *39*, 3436–3446.
- Quah, B., and O'Neill, H.C. (2000). Review: the application of dendritic cell-derived exosomes in tumour immunotherapy. *Cancer Biother. Radiopharm.* *15*, 185–194.
- Ramasamy, R., Fazekasova, H., Lam, E.W.-F., Soeiro, I., Lombardi, G., and Dazzi, F. (2007). Mesenchymal stem cells inhibit dendritic cell differentiation and function by preventing entry into the cell cycle. *Transplantation* *83*, 71–76.
- Rana, S., Yue, S., Stadel, D., and Zöller, M. (2012). Toward tailored exosomes: the exosomal tetraspanin web contributes to target cell selection. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* *44*, 1574–1584.
- Raposo, G., and Stoorvogel, W. (2013a). Extracellular vesicles: Exosomes, microvesicles, and friends. *J Cell Biol* *200*, 373–383.
- Raposo, G., and Stoorvogel, W. (2013b). Extracellular vesicles: exosomes, microvesicles, and friends. *J. Cell Biol.* *200*, 373–383.
- Raposo, G., Nijman, H.W., Stoorvogel, W., Liejendekker, R., Harding, C.V., Melief, C.J., and Geuze, H.J. (1996). B lymphocytes secrete antigen-presenting vesicles. *J. Exp. Med.* *183*, 1161–1172.

- Rasmusson, I., Ringdén, O., Sundberg, B., and Le Blanc, K. (2005). Mesenchymal stem cells inhibit lymphocyte proliferation by mitogens and alloantigens by different mechanisms. *Experimental Cell Research* 305, 33–41.
- Rasmusson, I., Le Blanc, K., Sundberg, B., and Ringdén, O. (2007). Mesenchymal stem cells stimulate antibody secretion in human B cells. *Scand. J. Immunol.* 65, 336–343.
- Ratajczak, J., Miekus, K., Kucia, M., Zhang, J., Reca, R., Dvorak, P., and Ratajczak, M.Z. (2006). Embryonic stem cell-derived microvesicles reprogram hematopoietic progenitors: evidence for horizontal transfer of mRNA and protein delivery. *Leukemia* 20, 847–856.
- Redfield, R.R., Rodriguez, E., Parsons, R., Vivek, K., Mustafa, M.M., Noorchashm, H., and Najji, A. (2011). Essential role for B cells in transplantation tolerance. *Curr. Opin. Immunol.* 23, 685–691.
- Reinders, M.E., and Hoogduijn, M.J. (2014a). NK Cells and MSCs: Possible Implications for MSC Therapy in Renal Transplantation. *J Stem Cell Res Ther* 4.
- Reinders, M.E., and Hoogduijn, M.J. (2014b). NK Cells and MSCs: Possible Implications for MSC Therapy in Renal Transplantation. *J Stem Cell Res Ther* 4.
- Reis e Sousa, C. (2006). Dendritic cells in a mature age. *Nat. Rev. Immunol.* 6, 476–483.
- Ren, G., Su, J., Zhang, L., Zhao, X., Ling, W., L’huillie, A., Zhang, J., Lu, Y., Roberts, A.I., Ji, W., et al. (2009). Species variation in the mechanisms of mesenchymal stem cell-mediated immunosuppression. *Stem Cells* 27, 1954–1962.
- Ren, G., Zhao, X., Zhang, L., Zhang, J., L’Huillier, A., Ling, W., Roberts, A.I., Le, A.D., Shi, S., Shao, C., et al. (2010). Inflammatory cytokine-induced intercellular adhesion molecule-1 and vascular cell adhesion molecule-1 in mesenchymal stem cells are critical for immunosuppression. *J. Immunol.* 184, 2321–2328.
- Renner, P., Eggenhofer, E., Rosenauer, A., Popp, F.C., Steinmann, J.F., Slowik, P., Geissler, E.K., Piso, P., Schlitt, H.J., and Dahlke, M.H. (2009). Mesenchymal stem cells require a sufficient, ongoing immune response to exert their immunosuppressive function. *Transplant. Proc.* 41, 2607–2611.
- Roberts, I. (2004). Mesenchymal stem cells. *Vox Sanguinis* 87, 38–41.
- Robertson, M.J., and Ritz, J. (1990). Biology and clinical relevance of human natural killer cells. *Blood* 76, 2421–2438.
- Robertson, M.J., Manley, T.J., Donahue, C., Levine, H., and Ritz, J. (1993). Costimulatory signals are required for optimal proliferation of human natural killer cells. *J. Immunol.* 150, 1705–1714.
- Roche, P.A., and Furuta, K. (2015). The ins and outs of MHC class II-mediated antigen processing and presentation. *Nat. Rev. Immunol.* 15, 203–216.
- Ronquist, G., Brody, I., Gottfries, A., and Stegmayr, B. (1978). An Mg<sup>2+</sup> and Ca<sup>2+</sup>-stimulated adenosine triphosphatase in human prostatic fluid: part I. *Andrologia* 10, 261–272.
- Rosado, M.M., Bernardo, M.E., Scarsella, M., Conforti, A., Giorda, E., Biagini, S., Cascioli, S., Rossi, F., Guzzo, I., Vivarelli, M., et al. (2015). Inhibition of B-cell proliferation and antibody production by mesenchymal stromal cells is mediated by T cells. *Stem Cells Dev.* 24, 93–103.
- Rosano, G.M.C., Fini, M., Caminiti, G., and Barbaro, G. (2008). Cardiac metabolism in myocardial ischemia. *Curr. Pharm. Des.* 14, 2551–2562.

- Rouce, R.H., Shaim, H., Sekine, T., Weber, G., Ballard, B., Ku, S., Barese, C., Murali, V., Wu, M.-F., Liu, H., et al. (2016). The TGF- $\beta$ /SMAD pathway is an important mechanism for NK cell immune evasion in childhood B acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia* 30, 800–811.
- Sabapathy, V., Ravi, S., Srivastava, V., Srivastava, A., and Kumar, S. (2012). Long-Term Cultured Human Term Placenta-Derived Mesenchymal Stem Cells of Maternal Origin Displays Plasticity. *Stem Cells Int* 2012.
- Sacchetti, B., Funari, A., Michienzi, S., Di Cesare, S., Piersanti, S., Saggio, I., Tagliafico, E., Ferrari, S., Robey, P.G., Riminucci, M., et al. (2007). Self-renewing osteoprogenitors in bone marrow sinusoids can organize a hematopoietic microenvironment. *Cell* 131, 324–336.
- Sakaguchi, S., Yamaguchi, T., Nomura, T., and Ono, M. (2008). Regulatory T Cells and Immune Tolerance. *Cell* 133, 775–787.
- Sánchez-Berná, I., Santiago-Díaz, C., and Jiménez-Alonso, J. (2015). Immunomodulatory properties of stem mesenchymal cells in autoimmune diseases. *Medicina Clínica (English Edition)* 144, 88–91.
- Sato, K., Ozaki, K., Oh, I., Meguro, A., Hatanaka, K., Nagai, T., Muroi, K., and Ozawa, K. (2007). Nitric oxide plays a critical role in suppression of T-cell proliferation by mesenchymal stem cells. *Blood* 109, 228–234.
- Scheller, J., Chalaris, A., Schmidt-Arras, D., and Rose-John, S. (2011). The pro- and anti-inflammatory properties of the cytokine interleukin-6. *Biochim. Biophys. Acta* 1813, 878–888.
- Schena, F., Gambini, C., Gregorio, A., Mosconi, M., Reverberi, D., Gattorno, M., Casazza, S., Uccelli, A., Moretta, L., Martini, A., et al. (2010). Interferon- $\gamma$ -dependent inhibition of B cell activation by bone marrow-derived mesenchymal stem cells in a murine model of systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum.* 62, 2776–2786.
- Schürch, C.M., Riether, C., and Ochsnein, A.F. (2014). Cytotoxic CD8+ T cells stimulate hematopoietic progenitors by promoting cytokine release from bone marrow mesenchymal stromal cells. *Cell Stem Cell* 14, 460–472.
- Shi, C., and Pamer, E.G. (2011). Monocyte recruitment during infection and inflammation. *Nat. Rev. Immunol.* 11, 762–774.
- Shi, Y., Hu, G., Su, J., Li, W., Chen, Q., Shou, P., Xu, C., Chen, X., Huang, Y., Zhu, Z., et al. (2010). Mesenchymal stem cells: a new strategy for immunosuppression and tissue repair. *Cell Res.* 20, 510–518.
- Shi, Y., Su, J., Roberts, A.I., Shou, P., Rabson, A.B., and Ren, G. (2012a). How mesenchymal stem cells interact with tissue immune responses. *Trends Immunol* 33, 136–143.
- Shi, Y., Su, J., Roberts, A.I., Shou, P., Rabson, A.B., and Ren, G. (2012b). How mesenchymal stem cells interact with tissue immune responses. *Trends Immunol* 33, 136–143.
- Simhadri, V.R., Reiners, K.S., Hansen, H.P., Topolar, D., Simhadri, V.L., Nohroudi, K., Kufer, T.A., Engert, A., and Pogge von Strandmann, E. (2008). Dendritic cells release HLA-B-associated transcript-3 positive exosomes to regulate natural killer function. *PLoS ONE* 3, e3377.
- Simons, M., and Raposo, G. (2009). Exosomes – vesicular carriers for intercellular communication. *Current Opinion in Cell Biology* 21, 575–581.



- Sioud, M., Mobergslien, A., Boudabous, A., and Fløisand, Y. (2010). Evidence for the involvement of galectin-3 in mesenchymal stem cell suppression of allogeneic T-cell proliferation. *Scand. J. Immunol.* *71*, 267–274.
- Sivori, S., Carlomagno, S., Pesce, S., Moretta, A., Vitale, M., and Marcenaro, E. (2014). TLR/NCR/KIR: Which One to Use and When? *Front Immunol* *5*.
- Skokos, D., Goubran-Botros, H., Roa, M., and Mécheri, S. (2002). Immunoregulatory properties of mast cell-derived exosomes. *Mol. Immunol.* *38*, 1359–1362.
- Sluijter, J.P.G., Verhage, V., Deddens, J.C., van den Akker, F., and Doevendans, P.A. (2014). Microvesicles and exosomes for intracardiac communication. *Cardiovasc. Res.* *102*, 302–311.
- Sotiropoulou, P.A., Perez, S.A., Gritzapis, A.D., Baxevanis, C.N., and Papamichail, M. (2006). Interactions Between Human Mesenchymal Stem Cells and Natural Killer Cells. *STEM CELLS* *24*, 74–85.
- Spaggiari, G.M., Capobianco, A., Becchetti, S., Mingari, M.C., and Moretta, L. (2006). Mesenchymal stem cell-natural killer cell interactions: evidence that activated NK cells are capable of killing MSCs, whereas MSCs can inhibit IL-2-induced NK-cell proliferation. *Blood* *107*, 1484–1490.
- Spaggiari, G.M., Capobianco, A., Abdelrazik, H., Becchetti, F., Mingari, M.C., and Moretta, L. (2008). Mesenchymal stem cells inhibit natural killer-cell proliferation, cytotoxicity, and cytokine production: role of indoleamine 2,3-dioxygenase and prostaglandin E2. *Blood* *111*, 1327–1333.
- Spaggiari, G.M., Abdelrazik, H., Becchetti, F., and Moretta, L. (2009a). 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*, 6576–6583.
- Spaggiari, G.M., Abdelrazik, H., Becchetti, F., and Moretta, L. (2009b). 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*, 6576–6583.
- Steensberg, A., Fischer, C.P., Keller, C., Møller, K., and Pedersen, B.K. (2003). IL-6 enhances plasma IL-1ra, IL-10, and cortisol in humans. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* *285*, E433–437.
- Stegmayr, B., and Ronquist, G. (1982). Promotive effect on human sperm progressive motility by prostasomes. *Urol. Res.* *10*, 253–257.
- Stoumpos, S., Jardine, A.G., and Mark, P.B. (2015). Cardiovascular morbidity and mortality after kidney transplantation. *Transpl. Int.* *28*, 10–21.
- Suárez-Álvarez, B., López-Vázquez, A., Baltar, J.M., Ortega, F., and López-Larrea, C. (2009). Potential Role of NKG2D and Its Ligands in Organ Transplantation: New Target for Immunointervention. *American Journal of Transplantation* *9*, 251–257.
- Sugiyama, T., Kohara, H., Noda, M., and Nagasawa, T. (2006). Maintenance of the hematopoietic stem cell pool by CXCL12-CXCR4 chemokine signaling in bone marrow stromal cell niches. *Immunity* *25*, 977–988.
- Sun, C., Fu, B., Gao, Y., Liao, X., Sun, R., Tian, Z., and Wei, H. (2012). TGF- $\beta$ 1 Down-Regulation of NKG2D/DAP10 and 2B4/SAP Expression on Human NK Cells Contributes to HBV Persistence. *PLoS Pathog* *8*.

- Sze, S.K., Kleijn, D.P.V. de, Lai, R.C., Tan, E.K.W., Zhao, H., Yeo, K.S., Low, T.Y., Lian, Q., Lee, C.N., Mitchell, W., et al. (2007). Elucidating the Secretion Proteome of Human Embryonic Stem Cell-derived Mesenchymal Stem Cells. *Mol Cell Proteomics* 6, 1680–1689.
- Tabera, S., Pérez-Simón, J.A., Díez-Campelo, M., Sánchez-Abarca, L.I., Blanco, B., López, A., Benito, A., Ocio, E., Sánchez-Guijo, F.M., Cañizo, C., et al. (2008). The effect of mesenchymal stem cells on the viability, proliferation and differentiation of B-lymphocytes. *Haematologica* 93, 1301–1309.
- Taichman, R., Reilly, M., Verma, R., Ehrenman, K., and Emerson, S. (2001). Hepatocyte growth factor is secreted by osteoblasts and cooperatively permits the survival of haematopoietic progenitors. *Br. J. Haematol.* 112, 438–448.
- Taichman, R.S., Reilly, M.J., Verma, R.S., and Emerson, S.G. (1997). Augmented production of interleukin-6 by normal human osteoblasts in response to CD34+ hematopoietic bone marrow cells in vitro. *Blood* 89, 1165–1172.
- Takahashi, K., and Yamanaka, S. (2006). Induction of Pluripotent Stem Cells from Mouse Embryonic and Adult Fibroblast Cultures by Defined Factors. *Cell* 126, 663–676.
- Tangye, S.G., Phillips, J.H., and Lanier, L.L. (2000). The CD2-subset of the Ig superfamily of cell surface molecules: receptor-ligand pairs expressed by NK cells and other immune cells. *Semin. Immunol.* 12, 149–157.
- Tauro, B.J., Greening, D.W., Mathias, R.A., Ji, H., Mathivanan, S., Scott, A.M., and Simpson, R.J. (2012). Comparison of ultracentrifugation, density gradient separation, and immunoaffinity capture methods for isolating human colon cancer cell line LIM1863-derived exosomes. *Methods* 56, 293–304.
- Taylor, D.D., Homesley, H.D., and Doellgast, G.J. (1980). Binding of specific peroxidase-labeled antibody to placental-type phosphatase on tumor-derived membrane fragments. *Cancer Res.* 40, 4064–4069.
- Thakur, B.K., Zhang, H., Becker, A., Matei, I., Huang, Y., Costa-Silva, B., Zheng, Y., Hoshino, A., Brazier, H., Xiang, J., et al. (2014). Double-stranded DNA in exosomes: a novel biomarker in cancer detection. *Cell Res.* 24, 766–769.
- Théry, C., Amigorena, S., Raposo, G., and Clayton, A. (2001a). Isolation and Characterization of Exosomes from Cell Culture Supernatants and Biological Fluids. In *Current Protocols in Cell Biology*, (John Wiley & Sons, Inc.), p.
- Théry, C., Boussac, M., Véron, P., Ricciardi-Castagnoli, P., Raposo, G., Garin, J., and Amigorena, S. (2001b). Proteomic analysis of dendritic cell-derived exosomes: a secreted subcellular compartment distinct from apoptotic vesicles. *J. Immunol.* 166, 7309–7318.
- Théry, C., Zitvogel, L., and Amigorena, S. (2002). Exosomes: composition, biogenesis and function. *Nat Rev Immunol* 2, 569–579.
- Théry, C., Amigorena, S., Raposo, G., and Clayton, A. (2006). Isolation and characterization of exosomes from cell culture supernatants and biological fluids. *Curr Protoc Cell Biol* Chapter 3, Unit 3.22.
- Théry, C., Ostrowski, M., and Segura, E. (2009). Membrane vesicles as conveyors of immune responses. *Nat. Rev. Immunol.* 9, 581–593.

- Tilg, H., Trehu, E., Atkins, M.B., Dinarello, C.A., and Mier, J.W. (1994). Interleukin-6 (IL-6) as an anti-inflammatory cytokine: induction of circulating IL-1 receptor antagonist and soluble tumor necrosis factor receptor p55. *Blood* 83, 113–118.
- Toma, C., Wagner, W.R., Bowry, S., Schwartz, A., and Villanueva, F. (2009). Fate Of Culture-Expanded Mesenchymal Stem Cells in The Microvasculature. *Circulation Research* 104, 398–402.
- Topham, N.J., and Hewitt, E.W. (2009). Natural killer cell cytotoxicity: how do they pull the trigger? *Immunology* 128, 7–15.
- Traggiati, E., Volpi, S., Schena, F., Gattorno, M., Ferlito, F., Moretta, L., and Martini, A. (2008). 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, 562–569.
- Trivedi, P., and Hematti, P. (2008). Derivation and Immunological Characterization of Mesenchymal Stromal Cells from Human Embryonic Stem Cells. *Experimental Hematology* 36, 350.
- Tse, W.T., Pendleton, J.D., Beyer, W.M., Egalka, M.C., and Guinan, E.C. (2003). Suppression of allogeneic T-cell proliferation by human marrow stromal cells: implications in transplantation. *Transplantation* 75, 389–397.
- Tsirigotis, P.D., Resnick, I.B., and Shapira, M.Y. (2012). the role of NK cell interaction. *Ann. Med.* 44, 130–145.
- Tufton, N., Ahmad, S., Rolfe, C., Rajkariar, R., Byrne, C., and Chowdhury, T.A. (2014). New-onset diabetes after renal transplantation. *Diabet. Med.* 31, 1284–1292.
- Ungerer, C., Quade-Lyssy, P., Radeke, H.H., Henschler, R., Königs, C., Köhl, U., Seifried, E., and Schüttrumpf, J. (2014). Galectin-9 is a suppressor of T and B cells and predicts the immune modulatory potential of mesenchymal stromal cell preparations. *Stem Cells Dev.* 23, 755–766.
- Valadi, H., Ekström, K., Bossios, A., Sjöstrand, M., Lee, J.J., and Lötvall, J.O. (2007). Exosome-mediated transfer of mRNAs and microRNAs is a novel mechanism of genetic exchange between cells. *Nat. Cell Biol.* 9, 654–659.
- Vallabhaneni, K.C., Penfornis, P., Dhule, S., Guillonueva, F., Adams, K.V., Mo, Y.Y., Xu, R., Liu, Y., Watabe, K., Vemuri, M.C., et al. (2015). Extracellular vesicles from bone marrow mesenchymal stem/stromal cells transport tumor regulatory microRNA, proteins, and metabolites. *Oncotarget* 6, 4953–4967.
- Van Elssen, C.H.M.J., Vanderlocht, J., Oth, T., Senden-Gijsbers, B.L.M.G., Germeraad, W.T.V., and Bos, G.M.J. (2011). Inflammation-restraining effects of prostaglandin E2 on natural killer-dendritic cell (NK-DC) interaction are imprinted during DC maturation. *Blood* 118, 2473–2482.
- Vater, C., Kasten, P., and Stiehler, M. (2011). Culture media for the differentiation of mesenchymal stromal cells. *Acta Biomater* 7, 463–477.
- Villard, J. (2011). The role of natural killer cells in human solid organ and tissue transplantation. *J Innate Immun* 3, 395–402.
- Vivier, E., Morin, P., O'Brien, C., Druker, B., Schlossman, S.F., and Anderson, P. (1991). Tyrosine phosphorylation of the Fc gamma RIII(CD16): zeta complex in human natural killer cells. Induction by antibody-dependent cytotoxicity but not by natural killing. *J. Immunol.* 146, 206–210.

- Vivier, E., Tomasello, E., Baratin, M., Walzer, T., and Ugolini, S. (2008). Functions of natural killer cells. *Nat. Immunol.* 9, 503–510.
- Vlassov, A.V., Magdaleno, S., Setterquist, R., and Conrad, R. (2012). Exosomes: current knowledge of their composition, biological functions, and diagnostic and therapeutic potentials. *Biochim. Biophys. Acta* 1820, 940–948.
- Waldhauer, I., and Steinle, A. (2008). NK cells and cancer immunosurveillance. *Oncogene* 27, 5932–5943.
- Wan, Y.Y., and Flavell, R.A. (2009). How diverse--CD4 effector T cells and their functions. *J Mol Cell Biol* 1, 20–36.
- Wang, H.-S., Hung, S.-C., Peng, S.-T., Huang, C.-C., Wei, H.-M., Guo, Y.-J., Fu, Y.-S., Lai, M.-C., and Chen, C.-C. (2004). Mesenchymal stem cells in the Wharton's jelly of the human umbilical cord. *Stem Cells* 22, 1330–1337.
- Wang, J., Liao, L., and Tan, J. (2011). Mesenchymal-stem-cell-based experimental and clinical trials: current status and open questions. *Expert Opin Biol Ther* 11, 893–909.
- Wang, Q., Sun, B., Wang, D., Ji, Y., Kong, Q., Wang, G., Wang, J., Zhao, W., Jin, L., and Li, H. (2008). Murine bone marrow mesenchymal stem cells cause mature dendritic cells to promote T-cell tolerance. *Scand. J. Immunol.* 68, 607–615.
- Waters, C.M., and Bassler, B.L. (2005). Quorum sensing: cell-to-cell communication in bacteria. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 21, 319–346.
- Wolf, P. (1967). The Nature and Significance of Platelet Products in Human Plasma. *British Journal of Haematology* 13, 269–288.
- Wood, K.J., Bushell, A., and Hester, J. (2012). Regulatory immune cells in transplantation. *Nat. Rev. Immunol.* 12, 417–430.
- Wu, J., Song, Y., Bakker, A.B., Bauer, S., Spies, T., Lanier, L.L., and Phillips, J.H. (1999). An activating immunoreceptor complex formed by NKG2D and DAP10. *Science* 285, 730–732.
- Xing, Z., Gauldie, J., Cox, G., Baumann, H., Jordana, M., Lei, X.F., and Achong, M.K. (1998). IL-6 is an antiinflammatory cytokine required for controlling local or systemic acute inflammatory responses. *J. Clin. Invest.* 101, 311–320.
- Yáñez-Mó, M., Siljander, P.R.-M., Andreu, Z., Zavec, A.B., Borràs, F.E., Buzas, E.I., Buzas, K., Casal, E., Cappello, F., Carvalho, J., et al. (2015). Biological properties of extracellular vesicles and their physiological functions. *J Extracell Vesicles* 4, 27066.
- Yang, L., Pang, Y., and Moses, H.L. (2010). TGF $\beta$  and immune cells: an important regulatory axis in the tumor microenvironment and progression. *Trends Immunol* 31, 220–227.
- Yang, S., Li, W., Liu, W., Gao, C., Zhou, B., Li, S., Li, Y., and Kong, Y. (2006). IL-10 gene modified dendritic cells induced antigen-specific tolerance in experimental autoimmune myocarditis. *Clin. Immunol.* 121, 63–73.
- Yeh Yeo, R.W., Chai, R., Hian, K., and Kiang, S. (2013). Exosome: A Novel and Safer Therapeutic Refinement of Mesenchymal Stem Cell. *Exosomes and Microvesicles* 1.

- Yeo, R.W.Y., Lai, R.C., Zhang, B., Tan, S.S., Yin, Y., Teh, B.J., and Lim, S.K. (2013). Mesenchymal stem cell: an efficient mass producer of exosomes for drug delivery. *Adv. Drug Deliv. Rev.* *65*, 336–341.
- Yoshimura, A., and Muto, G. (2011). TGF $\beta$  function in immune suppression. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* *350*, 127–147.
- Yu, B., Zhang, X., and Li, X. (2014). Exosomes Derived from Mesenchymal Stem Cells. *Int J Mol Sci* *15*, 4142–4157.
- Yu, J., Freud, A.G., and Caligiuri, M.A. (2013). Location and cellular stages of natural killer cell development. *Trends Immunol.* *34*, 573–582.
- Yun, U.J., Park, S.E., Jo, Y.S., Kim, J., and Shin, D.Y. (2012). DNA damage induces the IL-6/STAT3 signaling pathway, which has anti-senescence and growth-promoting functions in human tumors. *Cancer Lett.* *323*, 155–160.
- Zaborowski, M.P., Balaj, L., Breakefield, X.O., and Lai, C.P. (2015). Extracellular Vesicles: Composition, Biological Relevance, and Methods of Study. *BioScience* biv084.
- Zamai, L., Ahmad, M., Bennett, I.M., Azzoni, L., Alnemri, E.S., and Perussia, B. (1998). Natural killer (NK) cell-mediated cytotoxicity: differential use of TRAIL and Fas ligand by immature and mature primary human NK cells. *J. Exp. Med.* *188*, 2375–2380.
- Zappia, E., Casazza, S., Pedemonte, E., Benvenuto, F., Bonanni, I., Gerdoni, E., Giunti, D., Ceravolo, A., Cazzanti, F., Frassoni, F., et al. (2005). Mesenchymal stem cells ameliorate experimental autoimmune encephalomyelitis inducing T-cell anergy. *Blood* *106*, 1755–1761.
- Zhang, B., Yin, Y., Lai, R.C., Tan, S.S., Choo, A.B.H., and Lim, S.K. (2014a). Mesenchymal stem cells secrete immunologically active exosomes. *Stem Cells Dev.* *23*, 1233–1244.
- Zhang, B., Yin, Y., Lai, R.C., and Lim, S.K. (2014b). Immunotherapeutic potential of extracellular vesicles. *Front Immunol* *5*, 518.
- Zhang, J., Niu, C., Ye, L., Huang, H., He, X., Tong, W.-G., Ross, J., Haug, J., Johnson, T., Feng, J.Q., et al. (2003). Identification of the haematopoietic stem cell niche and control of the niche size. *Nature* *425*, 836–841.
- Zhang, W., Ge, W., Li, C., You, S., Liao, L., Han, Q., Deng, W., and Zhao, R.C.H. (2004). Effects of mesenchymal stem cells on differentiation, maturation, and function of human monocyte-derived dendritic cells. *Stem Cells Dev.* *13*, 263–271.
- Zhao, Q., Ren, H., and Han, Z. (2016). Mesenchymal stem cells: Immunomodulatory capability and clinical potential in immune diseases. *Journal of Cellular Immunotherapy* *2*, 3–20.
- Zhao, Z.-G., Xu, W., Sun, L., You, Y., Li, F., Li, Q.-B., and Zou, P. (2012). Immunomodulatory function of regulatory dendritic cells induced by mesenchymal stem cells. *Immunol. Invest.* *41*, 183–198.
- Zhu, Y.-G., Feng, X.-M., Abbott, J., Fang, X.-H., Hao, Q., Monsel, A., Qu, J.-M., Matthay, M.A., and Lee, J.W. (2014). Human mesenchymal stem cell microvesicles for treatment of Escherichia coli endotoxin-induced acute lung injury in mice. *Stem Cells* *32*, 116–125.

Zischek, C., Niess, H., Ischenko, I., Conrad, C., Huss, R., Jauch, K.-W., Nelson, P.J., and Bruns, C. (2009). Targeting tumor stroma using engineered mesenchymal stem cells reduces the growth of pancreatic carcinoma. *Ann. Surg.* 250, 747–753.

Zuk, P.A., Zhu, M., Mizuno, H., Huang, J., Futrell, J.W., Katz, A.J., Benhaim, P., Lorenz, H.P., and Hedrick, M.H. (2001). Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell-based therapies. *Tissue Eng.* 7, 211–228.

**Title: Régulation de l'activité de lymphocytes par les cellules souche mésenchymateuse et leur exosomes**

**Mots clés :** Cellules souches mésenchymateuse, exosomes, immunomodulation, cellule NK

**Résumé:** Les cellules souche mésenchymateuse (CSM) présentent une puissante activité immunomodulatrice sur les lymphocytes T et les Natural Killer (NK), impliquées dans les réactions allogéniques. Les propriétés immunomodulatrices des CSM dépendent de contacts cellulaires et des facteurs sécrétés. Ainsi les exosomes produits par ces cellules pourraient constituer des nouveaux produits thérapeutiques. L'objectif de ce travail est d'étudier, *in vitro*, l'effet d'exosomes dérivés de CSM sur les lymphocytes T et les NK.

Les CSMs utilisées sont issues de foies fœtaux humains. Les exosomes ont été isolés à partir du milieu de culture des CSMs par une série d'ultracentrifugation à 100000g. Contrairement aux CSMs qui inhibent la prolifération des lymphocytes T leurs exosomes n'ont pas d'effet sur leur prolifération. Cependant ils inhibent la prolifération, l'activation et la cytotoxicité (expression CD107a) des NK. Nous avons mis en évidence, par FACS, la présence de TGFβ à la surface des exosomes. De plus leur fonction inhibitrice est abrogé en présence d'un anticorps bloquants anti-TGFβ. Réciproquement l'exposition de cellules NK à du TGFβ inhibe la cytotoxicité et la prolifération de cellules. Enfin, en présence d'exosomes nous avons montré, par IF, une translocation de Smad 2/3 (messager du signal TGFβ) dans les noyaux des cellules NK, inhibé par l'ajout d'anticorps anti-TGFβ.

Conclusion: Ces résultats suggère que les propriétés immunomodulatrices de CSMs sur NK pourraient dépendre de TGFβ présenté ou associé aux exosomes.

**Regulation of lymphocytes activity by Mesenchymal Stem Cells and their Exosomes**

**Keywords :** Mesenchymal stem cell, exosomes , immunomodulation, cellules NK

**Abstract:** Mesenchymal stem cells (MSC) are powerful immunomodulators regulating the function of T lymphocytes and natural killers cells (NK) involved in allogeneic reactions. Their immunomodulatory properties depend on cell contact and secretion factors produced by MSC. Thus exosomes produced by these cells could provide new therapeutic tools. The objective of this work is to study the effect of MSC derived exosomes *in vitro* on T lymphocytes and NK cells. MSCs used for this study are isolated from human fetal liver. Exosomes were isolated from MSC culture medium by a series of ultracentrifugation at 100000g.

MSCs inhibit the proliferation of T lymphocytes. Unlike MSCs, their exosomes do not abrogate the proliferation of T cells. However they inhibit the proliferation, activation and cytotoxicity (CD107a expression) of NK cells. By FACS analysis we showed a surface expression of TGFβ by exosomes. Inhibition of NK cells activation by exosomes is altered by a neutralizing anti-TGFβ antibody. Contrary when NK cells are cultured with TGFβ the same effect as exosomes is demonstrated. By IF, we found a nuclear translocation of Smad 2/3 (TGFβ signal transducer) in NK cells cultured with exosomes, which is inhibited by the addition of anti-TGFβ antibody.

Conclusion: These results suggest that the immunomodulatory properties of MSCs on NK could depend on exosome presentation or association with TGFβ.

