



**UNIVERSITÉ
DE LORRAINE**

**BIBLIOTHÈQUES
UNIVERSITAIRES**

AVERTISSEMENT

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

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

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

Contact bibliothèque : ddoc-theses-contact@univ-lorraine.fr
(Cette adresse ne permet pas de contacter les auteurs)

LIENS

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 122. 4

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

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

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

Ecole Doctorale BioSE (Biologie-Santé-Environnement)

Thèse

Présentée et soutenue publiquement pour l'obtention du titre de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DE LORRAINE

Mention : « Sciences de la Vie et de la Santé »

par **Charlotte VOISIN**

**Etude du potentiel immunomodulateur et/ou migratoire des cellules
souches/stromales mésenchymateuses issues de la gelée de Wharton dans
un contexte d'ingénierie tissulaire et de thérapie cellulaire**

Soutenue le 15 décembre 2021

Membres du jury :

Rapporteurs :	M^{me} Florence Sabatier	Professeure des Universités et Praticienne Hospitalière, Unité de culture et Thérapie cellulaire, Hôpital de la Conception, Marseille
	M Frédéric Pène	Professeur des Universités et Praticien Hospitalier, Médecine intensive-Réanimation, Hôpital Cochin, AP-HP, Paris
Président :	M Philippe Moreau	Directeur de Recherche, CEA Service de Recherches en Hémato-Immunologie, UMR 976, Paris
Examineurs :	M Cédric Boura	Maître de conférences, CRAN UMR 7039 CNRS-UL, Nancy
	M^{me} Céline Huselstein	Professeure des Universités, IMoPA UMR 7365, CNRS-UL, Nancy, <u>directrice de thèse</u>
	M^{me} Danièle Bensoussan	Professeure des Universités et Praticienne Hospitalière, IMoPA UMR 7365 CNRS-UL, CHRU de Nancy, <u>co-directrice de thèse</u>

**UMR 7365 CNRS-Université de Lorraine, Ingénierie Moléculaire et Physiopathologie
Articulaire (IMoPA)**

A ma Tata Foldingue partie bien trop tôt...

A mes parents, Agnès et Jean-Michel, et à mes grand parents, Marie-Thérèse, Francis, Wilhelmina, Jannus, vous êtes des modèles pour moi, merci pour votre soutien et votre amour.

Je vous dédie ce manuscrit.

*« La famille, c'est là où la vie commence et où
l'amour ne se finit jamais »*

Remerciements

Aux **Professeurs Florence Sabatier et Frédéric Pène**, pour m'avoir fait l'honneur d'avoir accepté d'évaluer ce travail en tant que rapporteurs. Soyez assurés de ma profonde reconnaissance et de mon respect.

Aux **Docteurs Philippe Moreau et Cédric Bourra**, d'avoir accepté d'être examinateurs lors de ma soutenance. Soyez assurés de ma sincère reconnaissance et de mon respect.

Au **Docteur Audrey Cras**, pour votre aide et vos conseils lors de nos réunions relatives à mon comité de suivi de thèse. Soyez assurée de ma reconnaissance et de mon respect.

Au **Professeur Céline Huselstein**, pour avoir accepté d'encadrer cette thèse. Veuillez accepter toute ma reconnaissance pour votre soutien et vos encouragements permanents depuis mes années de Licence. Soyez assurée de ma sincère gratitude ainsi que mon profond respect.

Au **Professeur Danièle Bensoussan**, d'avoir accepté de co-encadrer cette thèse. Veuillez accepter ma profonde reconnaissance pour votre bienveillance et votre soutien depuis toutes ces années. Soyez assurée de mon admiration ainsi que mon profond respect.

Aux membres de la **collaboration du projet ANR ATYPiCAL**, pour votre soutien ainsi que le temps consacré pour le bon déroulement du projet.

Aux **Professeurs Jean-Yves Jouzeau et Bruno Charpentier**, pour m'avoir permis de réaliser cette thèse au sein de votre laboratoire. Veuillez recevoir ici le témoignage de ma reconnaissance.

Au **Docteur Natalia De-Isla-Martinez**, pour votre précieuse aide concernant les enseignements ainsi que pour votre bienveillance permanente.

A tout le **personnel du laboratoire IMoPA**, pour votre sympathie, votre soutien ainsi que pour les moments partagés ensemble.

A l'ensemble du **conseil scientifique ainsi que le personnel de l'école doctorale**, pour votre accompagnement durant mon mandat ainsi que pour votre disponibilité envers tous les doctorants.

A l'ensemble du **corps enseignant et du personnel de la Licence Sciences pour la Santé**, pour m'avoir donné l'opportunité d'enseigner, pour votre accompagnement lors de ces derniers ainsi que pour votre dévouement envers les étudiants.

Aux membres du **bureau de l'association AD'UL TEAM**, pour tous les moments de partage et votre esprit d'équipe.

A mes **acolytes et collègues du labo**, Anne-Bé, Laura, Marion, Fatouma, Xing, Cécile, Sara, Valentine, Adrien, Allan, Jordan, Reine, Maroua, Stefania, Dima, Meriem, Julie, Mahdia, Mayssa, Siham, Paul, Caroline, Nasser, et bien-sûr Ghislaine, pour votre gentillesse, votre aide, votre soutien sans faille et pour tous les moments de joie partagés au labo.

A mes **ami(e)s**, Armelle, Maurine, Manon, Tim, Lucien, Perrine, Maxime, Bryan, Xavier, Allan, Andréa, Mathilde, Audrey, Jérémy, Justine, Paul, Cécile, Mélanie, Ophélie, pour votre écoute, votre soutien, ainsi que tous nos moments passés ensemble.

A mes **grands-parents**, pour vos encouragements et votre amour. Je ne pourrai jamais vous remercier assez.

A tous mes **oncles et tantes, mais aussi mes cousins, cousines**, Eddy, Etienne, Nico, Juliette, Elodie, Nono, Hélène et tous les autres, pour votre soutien ainsi que pour être une famille si aimante.

A ma **sœur**, Marie, pour ton écoute, pour être toujours là quand ça ne va pas et pour ton amour, à ta façon. Saches que je te promets d'être toujours là pour toi en retour.

A mes **parents**, pour m'avoir donné la vie, pour votre immense soutien, votre patience et votre amour incommensurable. Je suis si reconnaissante de vous avoir comme parents.

A **Henri**, pour ton amour, ton réconfort, ton soutien inconditionnel et pour tout ce que tu m'apportes chaque jour. Merci d'être à mes côtés et n'oublie jamais à quel point je t'aime.

Table des matières

REMERCIEMENTS.....	4
TABLE DES MATIERES	6
LISTE DES PUBLICATIONS ET COMMUNICATIONS.....	8
LISTE DES ENGAGEMENTS ASSOCIATIF ET UNIVERSITAIRE.....	9
LISTE DES ABREVIATIONS.....	10
LISTE DES FIGURES	12
LISTE DES TABLEAUX	14
ETAT DE L'ART.....	16
I- Introduction et généralités sur les cellules souches	16
1. Classification des cellules souches en fonction de leur degré de potence	16
a. Totipotence	17
b. Pluripotence	17
c. Multipotence.....	18
d. Unipotence.....	18
2. Classification des cellules souches en fonction de leurs origines	19
a. Cellules souches embryonnaires.....	19
b. Cellules souches fœtales.....	19
c. Cellules souches adultes.....	20
3. Définitions et sources des cellules souches/stromales mésenchymateuses.....	21
a. Quelles définitions de l'acronyme « CSM » ?	21
b. Les sources de référence en CSM	23
II- Physiologie des cellules souches/stromales mésenchymateuses endogènes	25
1. Localisation des cellules souches/stromales dans la niche.....	25
2. Propriétés des cellules souches/stromales mésenchymateuses	26
a. Propriétés d'auto-renouvellement	27
b. Propriétés de différenciation cellulaire	27
c. Propriétés de migration.....	28
d. Propriétés immunitaires.....	32
i. Immunomodulation médiée par contact cellulaire.....	34
ii. Immunomodulation médiée par des facteurs solubles.....	35
a. Propriétés anti-fibrotiques, angiogéniques et réparatrices	38
b. Propriétés anti-apoptotiques.....	38
III- Physiologie des cellules souches/stromales mésenchymateuses exogènes	39
1. Caractérisation <i>in vitro</i>	39
a. Propriété clonogénique	40
b. Propriétés de différenciation.....	40

c.	Propriétés de migration après expansion <i>in vitro</i>	41
d.	Propriétés immunomodulatrices	42
2.	Culture et conservation des cellules souches/stromales mésenchymateuses	43
a.	Modes de culture	43
b.	Conservation des cellules	44
3.	Optimisation des propriétés médiées par les cellules souches/stromales mésenchymateuses.....	45
a.	Optimisation des propriétés immunomodulatrices médiées par les cellules souches /stromales mésenchymateuses	49
b.	Optimisation de la migration des cellules souches/stromales mésenchymateuses	50
IV-	Cellules souches/stromales mésenchymateuses en médecine régénérative.....	53
1.	Applications en ingénierie tissulaire	54
a.	Physiopathologie du cartilage.....	57
b.	Ingénierie tissulaire des CSM pour des lésions cartilagineuses.....	59
c.	Le biomatériau	60
d.	La fonctionnalisation	61
2.	Applications en thérapie cellulaire	62
a.	Thérapie à base de cellules souches/stromales mésenchymateuses pour la GvH, le sepsis et la COVID-19.....	62
b.	Thérapies commercialisées à base de CSM	67
OBJECTIFS.....		70
RESULTATS		72
I-	Etude des propriétés immunomodulatrices pendant la différenciation chondrocytaire des cellules souches/ stromales mésenchymateuses issues de la gelée de Wharton	72
II-	Etude de l'effet de la confluence cellulaire sur les récepteurs immunologiques et de migration des cellules souches/stromales mésenchymateuses issues de la gelée de Wharton	95
III-	Etude des différents préconditionnements cellulaires sur l'immunomodulation et la migration des cellules souches/stromales mésenchymateuses de gelée de Wharton.....	106
DISCUSSION GENERALE		130
1.	Différenciation des CSM.....	130
2.	Immunomodulation engendrée par les CSM	132
3.	Migration des CSM.....	133
CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES.....		136
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES		138
RESUME/ ABSTRACT.....		156

Liste des publications et communications

- Publications dans des journaux à comité de lecture :

VOISIN, C.; CAUCHOIS, G.; REPEL, L.; LAROYE, C.; LOUARN, L.; SCHENOWITZ, C.; SONON, P.; PORAS, I.; WANG, V.; E, D. C.; BENKIRANE-JESSEL, N.; MOREAU, P.; ROUAS-FREISS, N.; BENSOUSSAN, D.; AND HUSELSTEIN, C. (2020). Are the Immune Properties of Mesenchymal Stem Cells from Wharton's Jelly Maintained during Chondrogenic Differentiation? *J Clin Med*, 9 : 423 (doi 10.3390/jcm9020423), hal-02968465.

VOISIN, C.; NAHLE, S.; NOTARANTONIO, AB.; CAUCHOIS, G.; BENSOUSSAN, D.; AND HUSELSTEIN C. Impact of cell preconditioning on immunomodulation and migration of Wharton Jelly's Mesenchymal Stem cells (en cours de soumission).

- Acte de congrès publié dans un journal international :

VOISIN, C.; CAUCHOIS, G.; BENSOUSSAN, D.; HUSELSTEIN, C. (2021). Effects of Cell Confluence on the Immunological and Migration Receptors of Wharton Jelly's Mesenchymal Stem Cells. *Stem Cells and Regenerative Medicine*, vol 80 (doi 10.3233/BHR210029), hal-02979813.

- Communication dans un congrès international sans publication d'acte :

VOISIN, C.; WANG, V.; CAUCHOIS, G.; REPEL, L.; LAROYE, C.; ANTONOT, H.; BENKIRANE-JESSEL, N.; MOREAU, P.; ROUAS-FREISS, N.; CAROSELLA, E.; BENSOUSSAN, D.; HUSELSTEIN, C. (2019) Identification of immunomodulatory capacities of mesenchymal stem cells derived from Wharton jelly during cell differentiation. **8th International Conference on HLA-G. 8-10 juillet 2019, Paris.**

- Communication aux journées scientifiques de l'école doctorale :

VOISIN, C.; CAUCHOIS, G.; BENSOUSSAN, D.; HUSELSTEIN, C. Effects of cell confluence on the immunological and migratory properties of Wharton Jelly's Mesenchymal Stem Cells. **Journée de l'Ecole Doctorale BioSE, 21 novembre 2019, Vandœuvre-lès-Nancy.**

Liste des engagements associatif et Universitaire

- Engagements associatif et institutionnel
 - Vice-secrétaire au sein du bureau de l'association des doctorants de l'Université de Lorraine AD'UL TEAM (2018-2019)
 - Représentante des doctorants au sein de l'école doctorale BioSE (2019-2021)
 - Vice-représentante des doctorants BioSE au sein du Collège Lorrain des Ecoles Doctorales (CLED) (2019-2021)
- Charge d'enseignements
 - Contrats d'enseignements : - 48 heures équivalent TD d'enseignements pour l'année Universitaire 2018-2019
 - 64 heures équivalent TD d'enseignements pour l'année Universitaire 2019-2020
 - 64 heures équivalent TD d'enseignements pour l'année Universitaire 2020-2021
 - Domaines d'enseignement : - Cours Magistraux (CM) en Biologie et Santé
 - Enseignements Intégrés (EI) et Travaux Dirigés (TD) en Biostatistiques
 - Travaux Pratiques (TP) et TD en Dépenses Energétiques
 - TP en Biologie cellulaire
- Encadrement d'étudiants au sein du laboratoire
 - Etudiant en première année de Master (M1), Allan Bertrand (Avril-Mai 2019)
 - Etudiante en 3^{ème} année de Licence (L3), Victoria Stoppa (Avril-Mai 2019)
 - Etudiante L3, Fadoua Larouz (Avril-Mai 2020) (stage de bibliographie dû à la pandémie COVID-19)
 - Etudiant en L3, Julien Calvente (Avril-Mai 2021)

Liste des abréviations

3

3 dimensions
3D

A

Acide polyinosinique-polycytidylique
Poly I:C
C
Acide poly-lactique-co-glycolique
PLGA
Acide Ribonucléique
ARN
Agence National de la recherche
ANR
Alginate enrichi en acide hyaluronique
Alg/HA
Aquaporine 1
AQP1
Autorisation de Mise sur le Marché
AMM

B

Bone Morphogenetic Protein
BMP
Bonnes Pratiques de Fabrication
BPF
Brain-Derived Neurotrophic Factor
BDNF

C

Cellules souches
CS
Cellules souches adultes
CSA
Cellules souches embryonnaires
CSE
Cellules souches fœtales
CSF
Cellules souches hématopoïétiques
CSH
Cellules souches pluripotentes induites
iPSC
Cellules souches/stromales mésenchymateuses
CSM
Cluster de différenciation
CD
Collagène de type II
Col II
Collagène de type X
Col X
Colony forming unit-fibroblasts
CFU-F
Complexe majeur d'histocompatibilité de classe II
CMH-II

D

Diméthylsulfoxyde
DMSO
Dulbecco's Modified Eagles Medium
DMEM

E

Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
ELISA

F

Fibroblast Growth Factor
FGF

G

Gelée de Wharton
GW
Maladie du Greffon contre l'hôte
GvH

H

Hepatocyte Growth Factor
HGF
Human leucocyte antigen
HLA

I

Indoleamine 2,3-dioxygénase
IDO
Insulin Growth Factor
IGF
Insulin like growth factor-one
IGF-1
Interféron-γ
IFN-γ
Interleukine
IL
Interleukine-1 β
IL-1β
Intraveineuse
IV

K

Krüppel-like factor 4
Klf4

L

Agence Européenne du Médicament
EMA

Oxide nitrique synthase
 NOS
 Ligature et ponction du cæcum
 CLP
 Lipopolysaccharides
 LPS
 Lymphocyte B
 LB
 Lymphocyte T
 LT
 Lymphocyte T régulateur
 LT reg
 Lysat plaquettaire
 LP

M

Macrophage Colony-Stimulating Factor
 M-CSF
 Matrice extracellulaire
 MEC
 Médicament de Thérapie Innovante
 MTI
 Métalloprotéase matricielle
 MMP
 Moelle osseuse
 MO
Monokine Induced by Interferon-γ
 MIG

N

Natural Killer
 NK, 16,

O

Octamer-binding transcription factor 4
 Oct 4, 16

P

PCR quantitative par transcription inverse
 RT-qPCR
 Phosphate tricalcique
 β-TCP
 Poly-ξ-caprolactone
 PCL
Programmed Death-Ligand 1
 PD-L1
 Prostaglandine E2

PGE2
 Protéine d'activation des fibroblastes
 FAP

R

Réaction en chaîne par polymérase
 PCR
Runt-related transcription factor 2
 Runx2

S

Sepsis-related Organ Failure Assessment
 SOFA
 Sérum de veau fœtal
 SVF
 Société Internationale de Thérapie Cellulaire
 ISCT
 SRY-box 2
 Sox2
Stromal Cell-Derived factor 1
 SDF1
 Syndrome de détresse respiratoire aiguë
 SDRA

T

Tétraéthylammonium
 TEA
Toll like receptor
 TLR
Transforming Growth Factor
 TGF
 TGF-β
Tumor necrosis factor-inducible gene 6
 TSG-6
Tumor Necrosis α
 TNFα

U

Unité de Thérapie cellulaire et banque de tissus
 UTCT

V

Vascular Endothelial Growth Factor
 VEGF ,
 Virus de l'immunodéficience humaine
 VIH

Liste des figures

Figure 1 Degré de potence des cellules souches en fonction du développement embryonnaire	17
Figure 2 Degré de potence des cellules souches	18
Figure 3 Sources multiples de cellules souches/stromales mésenchymateuses.	22
Figure 4 Schéma et coupe histologique de cordon ombilical.....	24
Figure 5 Composition de la niche hématopoïétique au sein de la moelle osseuse	26
Figure 6 Rôles et propriétés des cellules souches/ stromales mésenchymateuses	27
Figure 7 Potentiel multiple de différenciation <i>in vivo</i> des cellules souches/stromales mésenchymateuses.	28
Figure 8 Circuit de migration des cellules souches/stromales mésenchymateuses.....	29
Figure 9 Principes et étapes de migration (activation, adhésion et transmigration) des cellules souches mésenchymateuses.....	32
Figure 10 Polarisation des cellules souches/stromales mésenchymateuses en phénotype anti (CSM 2) et pro-inflammatoire (CSM 1)	33
Figure 11 Effets immunomodulateurs des cellules souches/stromales mésenchymateuses sur les cellules dendritiques, les lymphocytes T (LT), les Natural Killer, les macrophages, les lymphocytes B (LB).....	37
Figure 12 Morphologie des cellules souches/stromales mésenchymateuses issues de la moelle osseuse après expansion en monocouche.....	39
Figure 13 Test de clonogénicité de cellules souches/stromales mésenchymateuses issues de la gelée de Wharton.....	40
Figure 14 Potentiel de différenciation <i>in vitro</i> de cellules souches/stromales mésenchymateuses..	41
Figure 15 Utilisations et effets des préconditionnements de cellules souches/stromales mésenchymateuses sur différentes pathologies.....	49
Figure 16 Utilisation des cellules souches/stromales mésenchymateuses en thérapie cellulaire en condition allogénique	53
Figure 17 Triade de l'ingénierie tissulaire	54
Figure 18 Potentiel de différenciation des cellules souches/stromales mésenchymateuses.....	56

Figure 19 Etapes de la différenciation cellulaire chondrocytaire.....	58
Figure 20 Progression de lésions cartilagineuses et/ou osseuses du genou selon les différents stades (de I à IV) de la classification de Kellgren et Lawrence	59
Figure 21 Mécanismes d'immunosuppression induits par le sepsis.....	64
Figure 22 Physiopathologie du sepsis et rôle des cellules souches/stromales mésenchymateuses dans son traitement.....	65
Figure 23 Représentation schématique des différents objectifs de la thèse.	71
Figure 24 Méthodologie de culture en monocouche et en biomatériaux des cellules souches/stromales mésenchymateuses issues de la gelée de Wharton.....	73
Figure 25 Méthodologie de culture et études des propriétés migratoires et immunomodulatrices des cellules souches/stromales mésenchymateuses en fonction du taux de confluence cellulaire.	96
Figure 26 Méthodologie de préconditionnement des cellules souches/stromales mésenchymateuses.	107

Liste des tableaux

Tableau 1 Classification des cellules souches en fonction de leur potentiel de différenciation	16
Tableau 2 Comparaison de l'extravasation des leucocytes et des CSM..	30
Tableau 3 Traitements à base de différentes sources de cellules souches/stromales mésenchymateuses préconditionnées	46

Etat de l'art

I-Introduction et généralités sur les cellules souches

Les cellules souches (CS) se retrouvent naturellement dans le corps humain. Elles constituent un réservoir permettant le développement, la réparation et l'auto-renouvellement des tissus. Ces CS sont non spécialisées, ce qui signifie qu'elles sont considérées comme indifférenciées. Elles se retrouvent au niveau embryonnaire mais aussi dans des tissus adultes. Elles sont très largement étudiées et ce, depuis de nombreuses années dans le but de les utiliser en médecine régénérative. En effet, les CS sont aujourd'hui utilisées pour restaurer des tissus, des organes ou encore des systèmes. Ce qui en fait un outil thérapeutique très intéressant en ingénierie tissulaire en tant que « bio-substituts », mais aussi en thérapie cellulaire en injection systémique ou localisée (Zakrzewski et al. 2019 ; Labusca, Herea, and Mashayekhi 2018).

Il est possible de classer les CS en fonction de leur potentiel de différenciation mais aussi en fonction de leur origine (tableau 1).

Tableau 1 Classification des cellules souches en fonction de leur potentiel de différenciation (totipotence, pluripotence, multipotence et unipotence) et de leur origine (embryonnaire, fœtales ou adultes) (Adapté de Kolios and Moodley 2013).

Potentiel de différenciation	Origine
Totipotente	
Pluripotente	Cellules souches embryonnaires
Multipotente	Cellules souches fœtales Cellules souches adultes
Unipotente	

1. Classification des cellules souches en fonction de leur degré de potence

Les CS ont une capacité à se différencier qui se nomme la potence, ou encore plasticité cellulaire. Celle-ci va d'un potentiel de différenciation le plus élevé pouvant donner tous types

cellulaires (totipotence) (figure 1) jusqu'à un stade où les cellules ne peuvent donner plus qu'un seul type cellulaire (unipotence).

Dans cette partie, la classification se décline par la totipotence cellulaire, la pluripotence, puis la multipotence, pour finir avec l'unipotence cellulaire (figure 1).



Figure 1 Degré de potence des cellules souches en fonction du développement embryonnaire (embryon d'une cellule) jusqu'au stade adulte en passant par le stade de nouveau-né.

a. Totipotence

Les cellules souches dites totipotentes sont capables de se différencier dans toutes les lignées cellulaires et peuvent donc reformer toutes les cellules de l'organisme. Cette totipotence permet aux cellules souches de former les cellules des trois feuillets embryonnaires : l'ectoderme à l'origine du système nerveux et de l'épiderme, l'endoderme à l'origine de l'appareil digestif et respiratoire et le mésoderme qui sera à l'origine de tous les autres organes ; mais aussi les annexes embryonnaires (vésicule ombilicale, amnios, chorion et allantoïde) et ainsi de créer un individu entier (première ligne de la figure 2 : cellule totipotente). Ce degré de potence se retrouve uniquement après la fécondation au stade zygote unicellulaire et dans les cellules qui découlent des toutes premières divisions. Au cours des divisions cellulaires suivantes, cette plasticité va diminuer pour atteindre la pluripotence.

b. Pluripotence

Au stade blastocyste du 5^{ème} au 7^{ème} jour, les cellules atteignent le degré suivant de potence cellulaire : la pluripotence. Ces cellules pluripotentes sont capables de former toutes les lignées cellulaires issues des trois feuillets embryonnaires soit plus de 200 types cellulaires mais ne peuvent pas former les annexes embryonnaires (figure 2).

c. Multipotence

Les cellules multipotentes sont des cellules qui ont une différenciation beaucoup plus restreinte que les cellules pluripotentes. Déjà engagées dans une certaine direction, elles peuvent généralement former toutes les cellules issues d'un même feuillet embryonnaire. Elles sont retrouvées au stade fœtal mais aussi à l'âge adulte pour régénérer les pools cellulaires. Les cellules souches hématopoïétiques (CSH) (figure 2) en sont un exemple et sont capables de générer 8 effecteurs matures dont les plaquettes, les érythrocytes, les granulocytes, les macrophages, les cellules dendritiques, les lymphocytes T et B ou encore les cellules *Natural Killer* (NK) (Adams and Scadden 2006; Seita and Weissman 2010).

Cette catégorie de cellules peut aussi être représentée par les cellules souches/stromales mésenchymateuses (CSM) (figure 2), que nous détaillerons plus loin dans ce manuscrit.

d. Unipotence

La dernière étape de spécialisation est représentée par les cellules unipotentes, qui sont retrouvées chez l'adulte. Elles ne peuvent se différencier qu'en un seul type cellulaire mais ont la capacité de s'auto-renouveler (dernière ligne de la figure 2). Ici, nous pouvons prendre pour exemple, les cellules de l'épiderme, les kératinocytes, qui se renouvèlent perpétuellement.

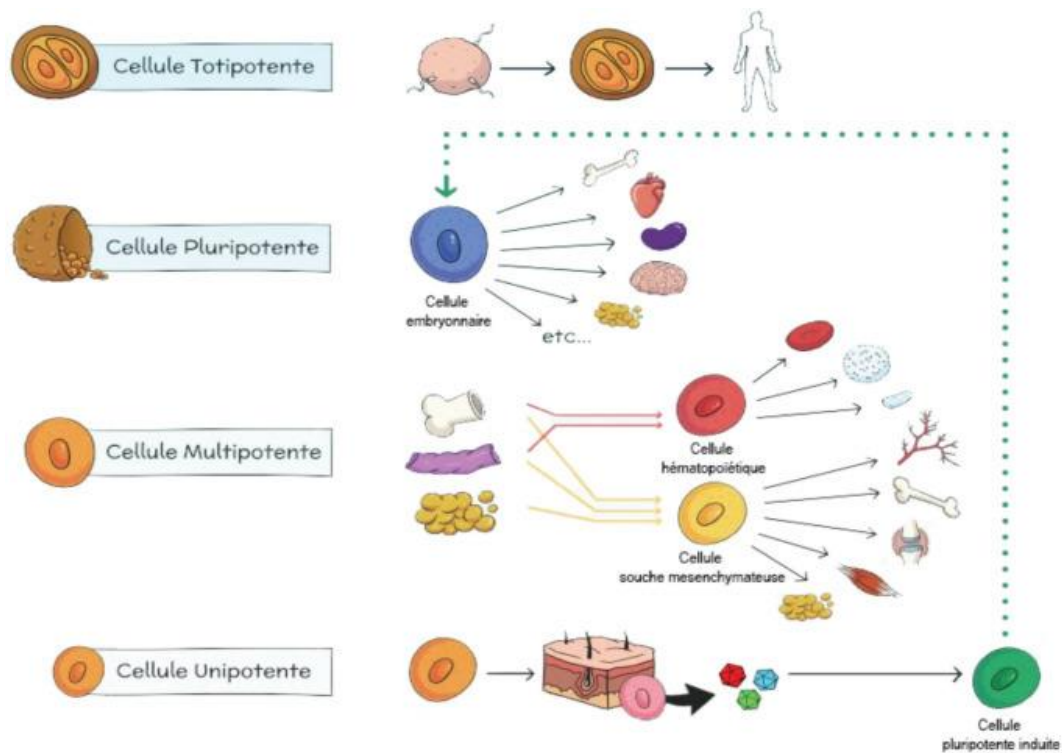


Figure 2 Degré de potence des cellules souches (totipotence, pluripotence, multipotence et unipotence) représenté par leur origine cellulaire (Magalon et al. 2018).

2. Classification des cellules souches en fonction de leurs origines

Après les niveaux de potences et de différenciation cellulaire, une autre classification peut être retrouvée, en fonction de l'origine des cellules souches.

Les différentes cellules souches répertoriées ici sont étudiées à des fins d'utilisations en clinique, il est possible de distinguer, les cellules souches embryonnaires, les cellules souches fœtales ainsi que les cellules souches somatiques adultes.

a. Cellules souches embryonnaires

Les cellules souches embryonnaires (CSE) sont issues de l'embryon précoce, elles sont capables de proliférer *in vitro* indéfiniment tout en gardant leur pluripotence et donc leur état indifférencié. Elles sont donc considérées comme immortelles, tout en conservant un caryotype normal. Cette pluripotence est observée *in vitro* par la présence de marqueurs tels que *Stage-specific embryonic antigen 3* (SSEA-3), SSEA-4, Tra-1-60, Tra-1-8 ainsi que le facteur de transcription *Octamer-binding transcription factor 4* (Oct-4) (Pera, Reubinoff, and Trounson 2000). Ces CSE font de très bonnes candidates pour la médecine régénérative puisqu'elles sont capables de se différencier en tout types cellulaires.

Etant donné que les CSE sont obtenues *via* des embryons fécondés *in vitro*, des tissus d'embryons fécondés *in vitro* ou encore grâce à des tissus de fœtus avortés, ces cellules font l'objet de controverses au niveau éthique (Elstner et al. 2009; Reppel et al. 2012).

Cependant, la dernière loi de bioéthique du 2 août 2021 relate l'allègement de la procédure des demandes d'autorisation de recherche sur les embryons et les cellules souches embryonnaires. La durée limite de culture *in vitro* d'embryons humains est fixée à 14 jours (LOI N° 2021-1017 Du 2 Août 2021 Relative à La Bioéthique (1) 2021).

b. Cellules souches fœtales

Les cellules souches fœtales (CSF) sont considérées comme multipotentes et ont un potentiel de différenciation plus élevé que les cellules souches adultes. Elles sont une source intéressante car elles semblent moins immunogènes, avec une meilleure capacité de prise de greffe et de migration cellulaire (Götherström et al. 2004). Ces dernières peuvent être retrouvées chez le fœtus, dans son sang, sa moelle osseuse ou d'autres de ses organes, le plus souvent elles sont issues du foie, du poumon, des reins, du pancréas ou encore du cerveau. Ces CSF regroupent différents types de cellules souches en fonction de leur localisation : les cellules

souches fœtales hématopoïétiques, mésenchymateuses, endothéliales, épithéliales et enfin les cellules souches fœtales neurales.

A la différence des CSE, les CSF posent moins de problèmes éthiques. En effet, les CSF peuvent être obtenues à partir de fœtus avortés mais aussi de tissus fœtaux incluant le cordon ombilical ou le placenta (O'Donoghue and Fisk 2004; Reppel et al. 2012).

c. Cellules souches adultes

Pour finir, le dernier type de CS identifié sont les cellules souches adultes (CSA). Ces cellules sont identifiées dans les tissus ou organes adultes et sont retrouvées en faible quantité dans le but de régénérer et conserver un *pool* de cellules multipotentes. Ces cellules sont quiescentes au sein de leur niche et ont une division asymétrique. En cas de dommages cellulaires, ces CSA sont cruciales pour renouveler le tissu lésé (Clevers 2015). Certaines CSA ont des capacités de renouvellement rapide comme l'épiderme ou les cellules sanguines tandis que d'autres ont un renouvellement plus lent voire absent comme certaines cellules du foie ou du cerveau (Coulombel 2003).

Plusieurs types de CS adultes peuvent être citées et les CS issues de la moelle osseuse en sont un exemple. Elles ont été largement étudiées et regroupent les cellules souches hématopoïétiques et les cellules souches mésenchymateuses (Poulsom et al. 2002).

Dans cette partie, les cellules souches pluripotentes induites sont retrouvées (iPSC) (figure 2), qui sont, quant à elles, des cellules non naturelles, fabriquées par reprogrammation de cellules adultes unipotentes en cellules pluripotentes induites. Celles-ci sont reprogrammées *via* 4 facteurs de transcription : Oct 4, *SRY-box 2* (Sox2), *Krüppel-like factor 4* (Klf4) et c-Myc incorporés initialement dans un vecteur viral (Takahashi and Yamanaka 2006 ; Germain 2009). Ces cellules ont récemment été ajoutées à la loi de bioéthique de 2021. Elles ont aujourd'hui un encadrement législatif et leur utilisation fait l'objet d'une déclaration préalable à l'agence de biomédecine (LOI N° 2021-1017 Du 2 Août 2021 Relative à La Bioéthique (1) 2021).

3. Définitions et sources des cellules souches/stromales mésenchymateuses

a. Quelles définitions de l'acronyme « CSM » ?

Identifiées pour la première fois en 1976 dans la moelle osseuse (MO) adulte, par Friedenstein et son équipe, et nommées ainsi par Caplan. Ces cellules ont tout d'abord été décrites pour leur capacité à régénérer les tissus mésenchymateux comme l'os, le cartilage, le muscle, le ligament, le tendon, le tissu adipeux ou encore le stroma (Friedenstein, Gorskaja, and Kulagina 1976; Caplan 1991; M. F. Pittenger 1999).

Depuis leur découverte, ces cellules ont ensuite été retrouvées dans de multiples tissus comme le tissu adipeux (Zuk et al. 2002), la peau (Toma et al. 2001), le sang périphérique, le sang de cordon ombilical, le cordon ombilical, la membrane du cordon ombilical, la veine du cordon ombilical, la gelée de Wharton (GW) (H.-S. Wang et al. 2004), le placenta, la caduque basale, le ligament jaune, le liquide amniotique, la membrane amniotique, la pulpe dentaire, les villosités chorioniques du placenta humain, le sang menstruel, le lait maternel ou encore dans l'urine (figure 3) (Van Pham 2016). Bien que portant l'acronyme « CSM », ces cellules diffèrent vis-à-vis de leur plasticité, leur potentiel de différenciation voire de leur phénotype avec une variabilité dans l'expression de leurs marqueurs de surface.

Dès 2017, plusieurs auteurs dont Caplan rapportent la nécessité de clarifier l'acronyme CSM, remettant en question la notion de cellule souche pour les cellules issues de certaines sources. Ainsi Caplan propose de définir l'acronyme « CSM » par « Cellules de Signalisation Médicinales ». Selon lui, les cellules injectées aux patients ne peuvent pas être considérées comme des cellules « souches » car elles ne sont pas multipotentes *in vivo* mais plutôt capables de sécréter des facteurs trophiques et immunomodulateurs qui permettront de régénérer le tissu lésé (Caplan 2017).

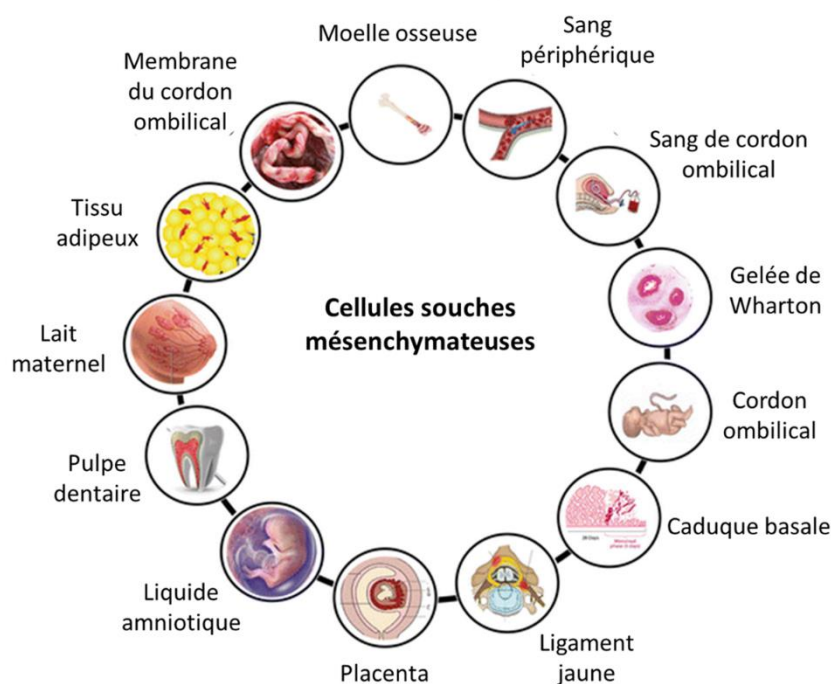


Figure 3 Sources multiples de cellules souches/stromales mésenchymateuses (Adapté de Van Pham 2016).

En 2019, la Société Internationale de Thérapie Cellulaire (ISCT) clarifie l'acronyme CSM et distingue les cellules souches des cellules stromales. En définitif, l'utilisation du mot « stromal » englobe toutes les sous-populations retrouvées dans le tissu dont sont issues les cellules comme les fibroblastes ou myofibroblastes, alors que le terme « souche » définit une population homogène de cellules. Ainsi, l'ISCT préconise l'utilisation du terme « cellules stromales mésenchymateuses » pour une utilisation en clinique car l'hétérogénéité de la fraction cellulaire stromale favoriserait leur utilisation en thérapie cellulaire. En effet ce terme reflèterait leur avantage fonctionnel vis-à-vis de progéniteurs spécifiques de tissus et des cellules immunitaires, contrairement à d'autres indications où le caractère « souches » et leur capacité de différenciation sont primordiales et requièrent une population homogène de CSM (Viswanathan et al. 2019).

Tout au long de ce manuscrit, nous utiliserons le terme « cellules souches/stromales mésenchymateuses » dû au fait que cette dénomination décrit des CSM homogènes mais aussi regroupant différentes sous-populations.

b. Les sources de référence en CSM

Face à ces multiples phénotypes de CSM, il est indispensable d'avoir une source de référence permettant de définir comment se comporte les cellules étudiées vis-à-vis des cellules issues de cette source de référence. En recherche fondamentale et clinique, la source de référence est la moelle osseuse. Ainsi cette source est considérée comme le *gold standard* pour la recherche sur les CSM. Ces CSM-MO sont généralement extraites sous anesthésie générale par prélèvement de moelle osseuse des crêtes iliaques et sont issues de dons. La collecte de la fraction cellulaire contenant les CSM se fait soit après centrifugation en gradient de densité, soit après ensemencement tel quel puis élimination des cellules non adhérentes par changement de milieu. La fraction de CSM recueillie représente alors 0,001% à 0,01% des cellules mononuclées médullaires (M. F. Pittenger 1999). Cette procédure est invasive et douloureuse et la fraction collectée reste faible. De plus, il apparaît que la prolifération et le potentiel de différenciation des CSM-MO diminuent avec l'augmentation de l'âge du donneur (Charif et al. 2017).

Aujourd'hui, les sources néonatales de CSM apparaissent plus favorables pour la médecine régénérative. Les CSM issues de la gelée de Wharton sont de plus en plus étudiées depuis les années 2010 dans ce domaine. Ces cellules sont issues du cordon ombilical, d'une taille moyenne d'environ 60cm et d'une épaisseur d'environ 1,5cm, le cordon ombilical reliant la mère et l'enfant est composé de 2 artères enroulées autour d'une veine ainsi que d'une matrice permettant sa cohésion (figure 4). Sa collecte se fait après l'accouchement, avant la délivrance du placenta et avec le consentement de la mère. Les CSM dérivées de la gelée de Wharton se situent dans la matrice du cordon ombilical, notée GW sur la coupe histologique de cordon ombilical (figure 4).

Pour le prélèvement des CSM-GW, celui-ci s'effectue soit par la méthode des explants en morcelant le cordon ombilical et en disposant les morceaux dans une boîte de culture afin de laisser migrer et adhérer les CSM ou bien par méthode enzymatique, en utilisant la collagénase afin d'isoler les cellules de la matrice extracellulaire. Ainsi, il est possible d'extraire 10^4 à 10^6 cellules par cm de cordon ombilical.



Figure 4 Schéma et coupe histologique de cordon ombilical. Le cordon ombilical est constitué de deux artères enroulées autour d'une veine, le tout composé d'une matrice appelée gelée de Wharton qui permet son maintien.
A : Artère ; V : Veine ; GW : Gelée de Wharton (Adapté de J.LAUGIER , J-C.ROZÉ , U.SIMÉONI , E.SALIBA 2006; Ziaei et al. 2017).

De nombreux chercheurs ont depuis 20 ans, comparé les différentes sources de CSM afin d'optimiser leur utilisation. Sur le plan de l'extraction cellulaire, les CSM-GW sont plus facilement isolées, sans douleur ni complication comparée aux CSM-MO, de plus le nombre recueilli semble bien supérieur. Au niveau de leur expansion *ex vivo*, les CSM-GW montrent une prolifération cellulaire accrue comparées à leurs homologues adultes, les CSM-MO (avec un doublement de population de $2,38 \pm 0,4$ pour les CSM-MO et $4,58 \pm 0,19$) (Laroye, Gauthier, et al. 2019) . Pour finir, les CSM-GW présentent une diminution de la sénescence cellulaire après culture prolongée *in vitro* comparées aux CSM-MO.

Devant ces résultats, le gold standard tend à être permuté en faveur des CSM néonatales et plus spécifiquement des CSM-GW (Hass et al. 2011; Batsali et al. 2013; Laroye, Gauthier, et al. 2019).

II- Physiologie des cellules souches/stromales mésenchymateuses endogènes

1. Localisation des cellules souches/stromales dans la niche

Les CSM endogènes se retrouvent dans tous les organes et tissus, mais elles sont principalement dans la moelle osseuse. Elles se situent dans un environnement qui leur est favorable, ceci afin de leur permettre de conserver leurs caractéristiques « souches ». Cet environnement retrouvé dans la moelle osseuse, est appelé la niche hématopoïétique. Cette niche permet de réguler la survie, la quiescence, l'auto-renouvellement et la différenciation des CSH. Elle est composée d'une niche endostéale juxtaposée à l'os et d'une niche vasculaire (figure 5). La niche endostéale se compose d'ostéoblastes et d'ostéoclastes. Pour ce qui est de la niche vasculaire, celle-ci se compose principalement de cellules stromales comprenant des progéniteurs hématopoïétiques, des CSH, des cellules endothéliales, des CSM ainsi que des cellules réticulaires et adipocytaires. Les CSH de la niche maintiennent un dialogue permanent avec les cellules stromales présentes *via* des contacts directs mais aussi par des facteurs solubles (Lataillade et al. 2010). Les signaux produits par les cellules progénitrices permettent notamment, la survie et l'auto-renouvellement des CSM. Ces signaux régulent les CSM en leur fournissant aussi un support structurel, trophique, topographique et physiologiques. A l'inverse, la présence des CSM dans la niche hématopoïétique est indispensable pour induire la prolifération et le maintien des CSH dans un état indifférencié (Jones and Wagers 2008; Lane, Williams, and Watt 2014).

Les CSH au sein de cette niche se trouvent dans un environnement pauvre en oxygène (concentration d'oxygène comprise entre 2 et 9%), dénommé hypoxie. Cet environnement favorise le maintien de l'état indifférencié des différentes populations de cellules souches et de précurseurs. Il permettrait également de protéger les CSH du stress oxydant et limiter leur taux de prolifération. Comme les CSH, les CSM endogènes localisées dans cette niche pourraient bénéficier de ce faible taux d'oxygène afin d'entretenir leur caractère « souche ». Cet état d'hypoxie a également été retrouvé dans le tissu embryonnaire et dans la moelle osseuse où siègent les CSM (Mohyeldin, Garzón-Muvdi, and Quiñones-Hinojosa 2010).

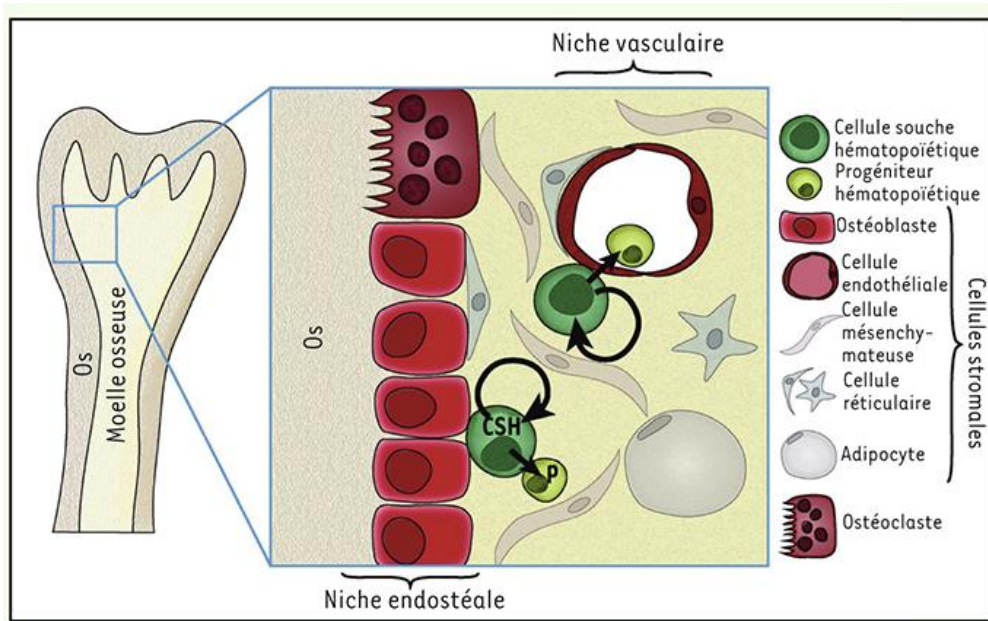


Figure 5 Composition de la niche hématopoïétique au sein de la moelle osseuse. Cette niche est composée d'une niche endostéale ainsi que d'une niche vasculaire. Elle est principalement constituée de progéniteur hématopoïétique, de CSH, de cellules stromales (ostéoblastes, cellules endothéliales, CSM, cellule réticulaire et adipocytaire) ainsi que d'ostéoclastes (Morin-Poulard et al. 2014).

2. Propriétés des cellules souches/stromales mésenchymateuses

Les cellules souches/stromales mésenchymateuses sont pourvues de propriétés d'auto-renouvellement, de différenciation cellulaire, de migration, et possèdent des propriétés anti-apoptotiques. Elles ont la possibilité de relarguer de nombreux facteurs trophiques et possèdent des propriétés anti-inflammatoires, anti-fibrotiques, angiogéniques ainsi que réparatrices (figure 6). Dans cette partie, chacune de ces propriétés seront détaillées.

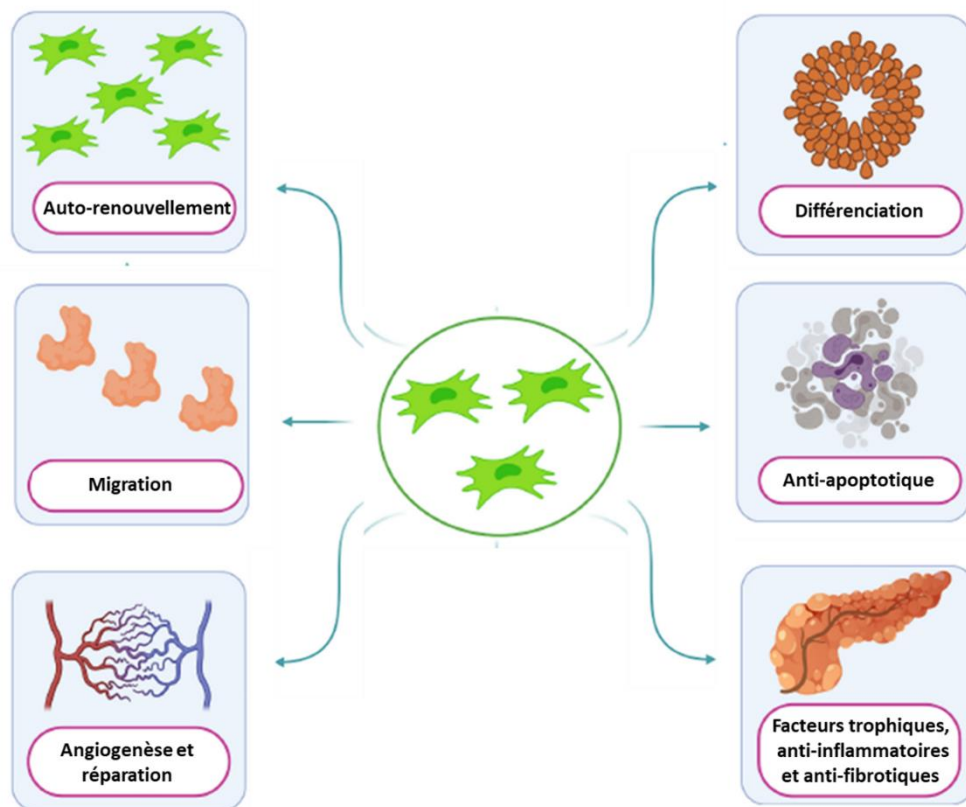


Figure 6 Rôles et propriétés des cellules souches/stromales mésenchymateuses (Auto-renouvellement, différenciation, mécanisme de migration, anti-apoptose, relargage de facteurs trophiques, anti-inflammatoires et anti-fibrotiques, propriété d'angiogenèse et de réparation) (Adapté de Jeyaraman et al. 2021).

a. Propriétés d'auto-renouvellement

Les cellules souches/stromales mésenchymateuses étudiées depuis les années 70 sont considérées comme multipotentes et sont dotées d'une capacité d'auto-renouvellement. Ces cellules ont pour aptitude au sein de la niche, à se diviser en deux cellules filles qui gardent les propriétés « souches » de la cellule mère, c'est ce qu'on appelle la division symétrique. En revanche, en dehors de la niche, la division asymétrique semble prévaloir, en donnant une cellule souche ainsi qu'une cellule progénitrice qui pourra produire des cellules spécialisées.

b. Propriétés de différenciation cellulaire

Les CSM endogènes possèdent des propriétés de différenciation cellulaire, ce processus est principalement mis en place pour régénérer des tissus mésenchymateux (dérivés du mésenchyme : tissu conjonctif embryonnaire qui donne le tissu conjonctif adulte, les cartilages, les os, les muscles) endommagés. Ainsi, ces cellules sont capables de se différencier en cellules

osseuses, cartilagineuses, musculaires, ligamenteuses, tendineuses, adipocytaires ainsi qu'en cellules stromales (figure 7) (M. F. Pittenger 1999).

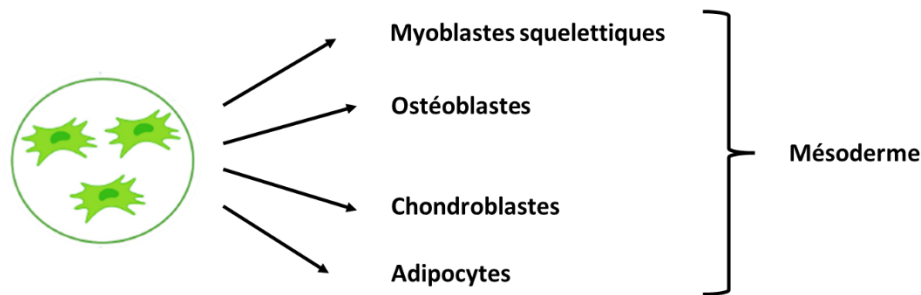


Figure 7 Potentiel multiple de différenciation *in vivo* des cellules souches/stromales mésenchymateuses. Les CSM sont capables de s'engager dans plusieurs voies de différenciation mésodermique afin de former des myoblastes squelettiques, des ostéoblastes, des chondroblastes ainsi que des adipocytes (Adapté de Coulombel 2003).

c. Propriétés de migration

Afin de régénérer un tissu ou organe lésé, les CSM sont susceptibles de migrer sur ce site. Ce processus appelé migration ou alternativement *homing*, n'est toujours pas bien compris aujourd'hui. Lorsqu'un tissu doit être réparé, les CSM sont capables de quitter leur niche dans la moelle osseuse et de rejoindre le site inflammatoire/endommagé. Comme illustre la figure 8, des études anatomo-pathologiques après injection de CSM ont mis en évidence 3 lieux de migration des CSM (flèches rouges dans la figure 8) : la moelle osseuse, des tissus et organes sains ainsi que des sites inflammatoires (Karp and Teo 2009).

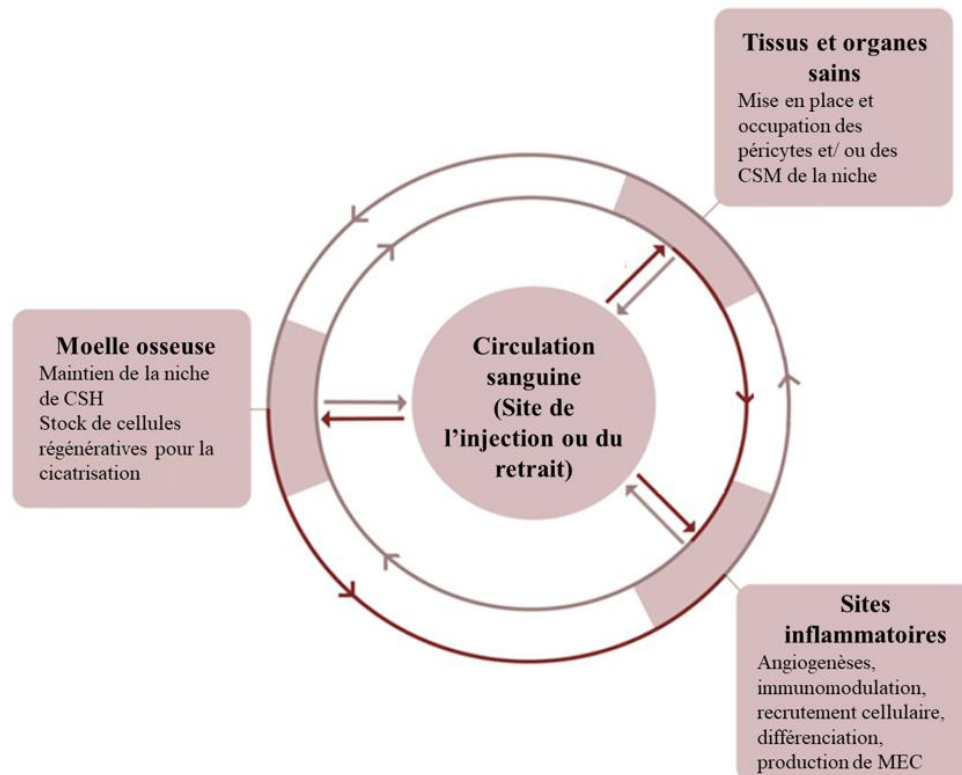


Figure 8 Circuit de migration des cellules souches/stromales mésenchymateuses. Les CSM jouent plusieurs rôles en fonction de leur localisation (moelle osseuse, tissus et organes sains et sites inflammatoires). Les flèches rouges représentent le chemin des CSM avéré par des publications (Adapté de Karp and Teo 2009).

Les CSM sont alors capables de migrer grâce à un gradient de chimiokines et de facteurs de croissance (PDGF-AB, TGF- β 1, TNF- α et le SDF-1 α) sécrétées par les cellules de la lésion tissulaire, de l'inflammation ou par les CSM elles-mêmes (Marquez-Curtis and Janowska-Wieczorek 2013). Ces mêmes chimiokines permettent le recrutement et l'activation du *homing*. Le mécanisme d'extravasation et de migration des CSM est comparé à la diapédèse des leucocytes, avec en premier lieu, un contact avec l'endothélium, la circulation, le roulement, l'adhésion à l'endothélium et pour finir, la diapédèse ou aussi appelée migration transendothéliale (Nitzsche et al. 2017). Ces similitudes et différences sont présentées ci-dessous dans le tableau 2.

Tableau 2 Comparaison de l'extravasation des leucocytes et des CSM. Cellules souches/stromales mésenchymateuses CSM ; Métalloprotéases matricielles MMP ; Phosphoinositide 3-kinase PI3K ; Inhibiteurs tissulaires de la métalloprotéase matricielle TIMP (Adapté de Nitzsche et al. 2017).

Paramètres	Leucocyte	CSM
Intravasation	Active	Active (et passive lors de transplantation)
Extravasation	Active	Active et passive
Durée	Environ 20 minutes	60-120 minutes
Routes	Transcellulaire, paracellulaire	Transcellulaire, paracellulaire (intégration)
Roulement	Obligatoire	Possible mais pas obligatoire
Adhésion ferme	Obligatoire	Obligatoire
<i>Crawling</i>	Formation d'invadosomes, protrusion, filo-et lamellipode ; migration latérale	Formation de pseudo- et filopodes, <i>blebbing</i> de la membrane ; pas de migration latérale
Traverser la barrière endothéliale	Guidée par les cellules endothéliales, signalisation Rho dépendante, PI3K	Coopération MSC-endothélium, formation de coupes transmigratoires
Traverser la membrane basale	Interaction de plusieurs MMP et TIMP	Interaction MMP-2/ TIMP-3, activateur de plasminogène de type urokinase

Les CSM vont pouvoir migrer grâce à un gradient de chimiokines (figure 9). Notamment grâce à la plus connue : le *Stromal Cell-Derived factor 1* (SDF-1) également appelé CXCL12. Elles peuvent suivre cette chimiokine et la lier avec leurs récepteurs extra-cellulaires, le CXCR4 et CXCR7 (ACKR3) à leur surface. Ces récepteurs possèdent sept domaines transmembranaires et représentent une sous-classe de récepteurs couplés aux protéines G (Pawig et al. 2015). Ils sont principalement connus pour se lier avec le SDF-1. Les travaux de Li *et al* ont également montré que la fixation de SDF-1 sur CXCR4 et CXCR7 agissait sur la prolifération, la migration et les activités paracrines des CSM dérivées du tissu adipeux. Quelques années plus tard l'équipe de Park *et al*, a révélé dans un système de micro-fluidique, que le gradient de SDF-1 jouait un rôle dans la migration et que l'utilisation d'AMD3100, un antagoniste du CXCR4 bloquait la migration (Q. Li et al. 2013; Park et al. 2017).

Au cours de ce processus de migration, l'Aquaporine 1 (AQP1), un canal membranaire de transport de l'eau pourrait jouer un rôle. Il semble être exprimé dans les cellules et notamment dans les CSM de moelle osseuse d'ovins et de rats. Ce canal possède une fonction liée à la migration grâce aux mouvements de l'eau (Papadopoulos, Saadoun, and Verkman 2008; Fanbiao Meng et al. 2014; Pelagalli et al. 2018). En 2018, l'équipe de Pelagalli *et al* a observé une corrélation entre l'AQP1 et la migration. En effet, l'utilisation d'inhibiteur de l'AQP1 tel que le tétraéthylammonium (TEA) a empêché la migration des CSM. Ainsi, ce canal pourrait influencer la migration conjointement avec les molécules mentionnées ci-dessus.

Après leur migration, les CSM arrivent au niveau des cellules endothéliales. Elles vont se lier, par l'intermédiaire des intégrines (VLA-4) présentes à leur surface, à des molécules d'adhésion telles que la VCAM-1 sur le vaisseau. Une autre molécule présente à la surface des CSM, le CD44, va s'associer à l'acide hyaluronique présent sur les cellules endothéliales. Après cet arrêt, une étape d'extravasation appelée transmigration endothéliale commence. Les CSM peuvent alors traverser la couche endothéliale afin d'atteindre la lésion ou le site inflammatoire. Ceci est principalement dû aux métalloprotéases matricielles (MMP), les MMP 2 et 9 qui vont favoriser le clivage des composants de la matrice extracellulaire (De Becker et al. 2007; Nitzsche et al. 2017).

Il semblerait qu'un autre récepteur de même conformation que le CXCR4/7 soit impliqué dans la migration des CSM : le récepteur CXCR3.

Une autre étude a montré qu'une nouvelle molécule pourrait être impliquée dans la migration des CSM de moelle osseuse : la protéine d'activation des fibroblastes (FAP), une sérine protéase membranaire de type II. Celle-ci semble générer la migration par le TGF- β et l'IL-1 β . Son potentiel migratoire serait dû à son activité Rho GTPase alors que son activité peptidase ne serait pas essentielle dans les CSM-MO (Chung et al. 2014).

Plus récemment, des micro- Acide Ribonucléiques (ARN) ont été découverts et pourraient avoir un lien dans la régulation de la migration des cellules souches/stromales mésenchymateuses. Ces micro-ARN seraient sécrétés par les CSM ainsi que par leurs exosomes (vésicules extracellulaires détaillées plus loin). Ils auraient un impact sur la migration en ciblant certaines cytokines ainsi que leur récepteur, notamment CXCR4 et SDF1. En ciblant les voies de signalisation de la migration cellulaire : principalement la voie PI3 kinase/Akt, la voie des MAP kinases ainsi que la voie Wnt/ β caténine. De plus, ces micro-ARN agiraient aussi sur la migration des CSM *via* l'adhésion des cellules à la matrice afin de la promouvoir ou de

l'inhiber. Pour finir, ils possèderaient la capacité de remodeler le cytosquelette afin de modifier la migration des CSM (He and Zhang 2019).

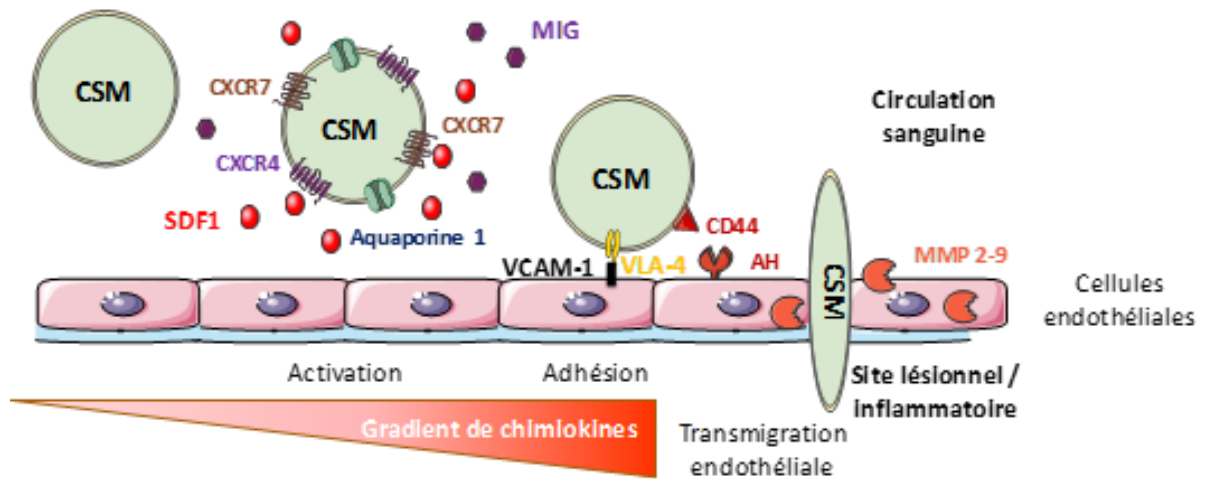


Figure 9 Principes et étapes de migration (activation, adhésion et transmigration) des cellules souches/stromales mésenchymateuses. La migration des CSM est permise grâce à un gradient de chimiokines comme SDF1 et MIG, par l'expression de nombreux récepteurs (CXCR4/7, VLA-4, CD44) ainsi que des métalloprotéases matricielles (MMP2 et 9) (Adapté de De Becker et al. 2007; Meng et al. 2014; Guo et al. 2018; Marquez-Curtis and Janowska-Wieczorek 2013).

d. Propriétés immunitaires

Les propriétés immunitaires des CSM reposent sur trois mécanismes principaux : l'arrêt du cycle cellulaire des cellules immunitaires en phase G1, une interaction directe des CSM avec les cellules immunitaires et un effet paracrine des CSM.

Ces propriétés médiées par les CSM possèdent une influence sur l'immunité innée (cellules *Natural Killer* (NK), granulocytes et phagocytes) mais aussi sur l'immunité adaptative (lymphocytes B et T) (Munir, Ward, and McGettrick 2018).

En fonction du contexte dans lesquelles les CSM se trouvent, celles-ci peuvent adopter deux profils différents : pro-inflammatoire (CSM 1) et anti-inflammatoire (CSM 2) (figure 10). Si l'environnement présente un niveau élevé d'Interféron- γ (IFN- γ) et de *Tumor Necrosis α* (TNF α), les CSM adopteront un profil CSM 2, alors que si le niveau d'IFN- γ et de TNF α est faible, alors les CSM se polariseront en CSM de type 1. De plus, il apparaît que la stimulation des TLR engendre, elle aussi la polarisation des CSM. Une stimulation du TLR3 par un ARN double brin porté par certains virus va induire un phénotype anti-inflammatoire (CSM 2) alors qu'une stimulation du TLR4, engendrée par une bactérie, induit un phénotype pro-

inflammatoire. Par la suite ces deux types de polarisations de CSM vont pouvoir répondre à ces stimulations en sécrétant de nombreuses cytokines, chimiokines et enzymes anti ou pro-inflammatoires. Ces sécrétions vont alors soit engendrer la différenciation de Lymphocytes T (LT) en LT régulateurs (LT reg) (*via* CSM 2) ou bien permettre l'activation de LT (*via* CSM 1)(Waterman et al. 2010; Bernardo and Fibbe 2013).

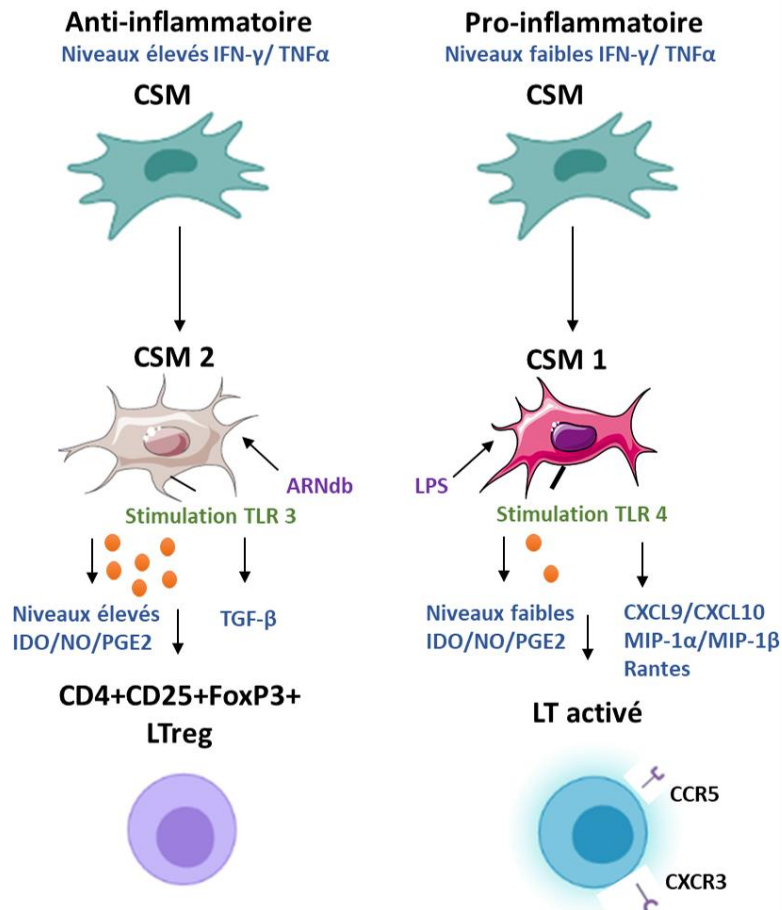


Figure 10 Polarisation des cellules souches/stromales mésenchymateuses en phénotype anti (CSM 2) et pro-inflammatoire (CSM 1) (Adapté de Bernardo and Fibbe 2013).

De plus, les CSM présentes au sein des tissus, sont dotées de facultés antimicrobiennes directes, par la sécrétion du LL-37 mais aussi indirectes *via* la sécrétion de peptides et de protéines antimicrobiennes (AMP), ainsi que par l'expression de molécules telles que IDO et Il-17 permettant d'engendrer l'élimination des bactéries ainsi que par le mécanisme de phagocytose.

L'immunomodulation émanant des CSM semble être engendrée par deux voies distinctes, par contact cellulaire mais aussi par la sécrétion de facteurs solubles.

i. Immunomodulation médiée par contact cellulaire

L'immunomodulation induite par les CSM aurait un impact sur plusieurs types de cellules du système immunitaire (figure 11) (Mark F. Pittenger et al. 2019). Les CSM modulent les différents acteurs du système immunitaire. En effet elles sont capables d'inhiber la prolifération des LT et d'induire des LT régulateurs $CD4^+CD25^+$ *forkhead box P3* (Foxp3⁺) par un mécanisme contact-dépendant (K. H. Han et al. 2011; Zhou et al. 2011). Cette immunomodulation semble également être induite par une protéine présente à la surface des CSM : le ligand de mort programmé 1, *Programmed Death-Ligand 1* (PD-L1) aussi appelé B7-H1 ou encore CD274. Celle-ci aurait la capacité de se lier à PD-1 présent à la surface des LT activés, entraînant leur inhibition et leur mort (Tipnis, Viswanathan, and Majumdar 2010; De la Rosa-Ruiz et al. 2019; Gao et al. 2016).

Les CSM ont été rapportées comme capables de bloquer la maturation des monocytes en cellules dendritiques et donc *in fine* d'empêcher l'initiation de la réponse lymphocytaire. Les mécanismes du blocage de cette maturation résulteraient de la combinaison de production de facteurs solubles associés à un contact cellulaire (X.-X. Jiang et al. 2005; Tipnis, Viswanathan, and Majumdar 2010).

Un impact des CSM sur les NK a aussi été répertorié, en bloquant leur prolifération par l'induction d'Interleukine (IL) 12 et 15 (Spaggiari et al. 2006). Cette inhibition a également été montrée par l'équipe de Sotiropoulou par contact cellulaire mais aussi *via* une membrane entre les 2 types cellulaires afin de comprendre les interactions indépendantes du contact des cellules (technique dite en *Transwell*) (Sotiropoulou et al. 2006). Il semblerait de plus, qu'une des molécules du complexe majeur d'histocompatibilité de classe I membranaire mais aussi soluble, HLA-G5, contribue à l'inhibition de la prolifération des NK (Selmani et al. 2008). Tous ces résultats démontrent que les CSM inhibent l'activité cytotoxique des NK, leur production cytokinique, leur libération de granzyme B ainsi que leurs récepteurs d'activation (Poggi et al. 2005; Spaggiari et al. 2006; Sotiropoulou et al. 2006).

Pour finir, les CSM semblent avoir un impact sur les Lymphocytes B (LB) en affectant leur prolifération et leur maturation. Premièrement en supprimant la migration, la différenciation et la prolifération des LB par l'effet de facteurs solubles (Corcione et al. 2006) mais aussi *via* la Galectine 9 qui diminuerait la prolifération des LB et des LT activés (Ungerer et al. 2014).

ii. Immunomodulation médiée par des facteurs solubles

D'autres études ont montré que l'utilisation de *transwell* dans les cocultures entre les CSM et les LT empêchait la prolifération de ces derniers. Ces résultats ont donc mis en évidence que les propriétés immunomodulatrices des CSM dépendaient également de la production de facteurs solubles (Nasef et al. 2006). C'est pourquoi il apparaît évident que ces propriétés immunomodulatrices sont aussi en grande partie dues à des mécanismes non dépendants du contact cellulaire, et ce particulièrement grâce à de nombreux facteurs solubles sécrétés par les CSM (figure 11). Ces nombreux facteurs semblent être sécrétés de façon dépendante de l'environnement (Gao et al. 2016).

Ainsi dans le contexte d'infection, les CSM-MO seraient capables de contrer l'infection en sécrétant la chimiokine CCL2 et donc permettre le recrutement de monocytes (Shi et al. 2011). D'autres médiateurs de la réponse immunitaire innée sont contrôlés par les CSM et ce, de manière paracrine. En effet, les CSM-MO favoriseraient la survie des neutrophiles (médiateurs de la réponse antimicrobienne) et en produisant de l'Interleukine 6 (IL6), de l'IFN- β et du facteur de stimulation des colonies de granulocytes et de macrophages (GM-CSF) (Cassatella et al. 2011). Par ailleurs, dans le cadre d'allergie ou de pathologies auto-immunes, des études ont démontré que les CSM-MO sécrétaient de la prostaglandine E2 (PGE₂) et inhibaient ainsi l'action des mastocytes (Brown et al. 2011).

Les CSM ont le pouvoir d'orienter les macrophages vers un type pro ou anti-inflammatoire, respectivement macrophage M1 et macrophage M2. Dans le cadre de l'immunomodulation, le profil M2 est mis en place par les CSM *via* l'inhibition de la prolifération des LT en coculture, mais aussi par leurs sécrétions, comme l'IL-10, le facteur de stimulation des colonies de macrophages, *Macrophage Colony-Stimulating Factor* (M-CSF), le *Transforming Growth Factor* (TGF- β), le VEGF et bien d'autres (Abumaree et al. 2013; Miceli et al. 2021).

De plus, les CSM-MO ont la capacité d'inhiber la différenciation des LT naïfs en Th17 en favorisant leur différenciation en lymphocyte T régulateur par un mécanisme d'inhibition de la sécrétion cytokinique des Th17, principalement IL17, IL22 et IFN- γ (Ghannam et al. 2010).

Cette activité paracrine semble être aussi générée par de nombreuses autres cytokines. Un effet immunomodulateur semblerait être produit par l'intermédiaire de l'Interleukine 10 (IL-10) qui permettrait la différenciation des LT en LT régulateurs (De la Rosa-Ruiz et al. 2019). En plus de l'IL-10, l'IL-6 serait sécrétée par les CSM et bloquerait la différenciation des

Lymphocytes B ainsi que la différenciation et maturation des cellules dendritiques (Ménard and Tarte 2011).

Une catégorie de facteur paracrine peut être citée, la famille des facteurs de croissance, avec comme principaux facteurs, le facteur de croissance des hépatocytes, *Hepatocyte Growth Factor* (HGF), le facteur de croissance de l'endothélium vasculaire, *Vascular Endothelial Growth Factor* (VEGF) ainsi que le facteur de croissance des fibroblastes, *Fibroblast Growth Factor* (FGF) qui contribueraient à la mise en place d'un effet anti-apoptotique ainsi qu'anti-fibrotique pour HGF et FGF. Le facteur HGF ainsi que le TGF- β sécrétés par les CSM favoriseraient l'effet antiprolifératif des LT (da Silva Meirelles et al. 2009; Miceli et al. 2021).

La PGE₂ a aussi été retrouvée de nombreuses fois dans le milieu de culture des CSM, par conséquent les CSM sécrèteraient cette molécule afin de créer un environnement immunosuppressif et induisant des LT reg (English et al. 2009; De la Rosa-Ruiz et al. 2019).

En plus de la PGE₂, l'enzyme Indoleamine 2,3-dioxygénase (IDO) a été et est encore très largement étudiée pour ses effets sur les CSM. Cette enzyme aurait la capacité de convertir le tryptophane présent dans l'environnement des LT en kynurénine. La déplétion en tryptophane entraîne une instabilité de la chaîne zêta de TCR des LT, induisant leur mort. La fonctionnalité de cette enzyme serait potentialisée par l'IFN- γ (Meisel et al. 2004; Tipnis, Viswanathan, and Majumdar 2010; Chinnadurai et al. 2014).

Plusieurs études ont montré que la liaison du ligand PD-L1 à la surface des CSM au récepteur PD-1 des LT activés conduisait à la mort de ces derniers. Plus récemment, ce ligand PD-L1 a été observé sous forme soluble et semble être sécrété par les CSM-MO (Davies et al. 2017).

La molécule HLA-G5 appartenant à la famille du complexe majeur d'histocompatibilité de classe I est impliquée dans le processus immunomodulateur des CSM. Cette protéine sécrétée par les CSM, favoriserait la polarisation des LT en LT reg et diminuerait l'activité des NK en entraînant une hausse de production d'IL-10 (Selmani et al. 2008).

D'autres molécules en plus de celles citées précédemment ont aussi été répertoriées comme la protéine *Tumor necrosis factor-inducible gene 6* (TSG-6), l'oxyde nitrique synthase (NOS) ou encore les Galectine-1, 9 et 3 (Sioud et al. 2010; Gieseke et al. 2010; Mark F. Pittenger et al. 2019).

Plus récemment, les vésicules extracellulaires issues des CSM ont été décrites comme possédant un effet immunomodulateur. Elles contiennent plusieurs types de molécules biologiquement actives comme des protéines, des lipides, des ARN messagers, des micro-ARN, des petits ARN interférents, ou encore de l'ADN double ou simple brin. Ces vésicules, aussi

appelées exosomes peuvent être délivrés à une cellule cible. Ils sont relargués par les CSM et ont un impact direct sur les macrophages, les cellules dendritiques ainsi que sur les cellules T et B. Ainsi ils semblent posséder un mécanisme qui pourrait être prometteur pour créer un environnement immunomodulateur (Gomzikova, James, and Rizvanov 2019).

Tous ces facteurs solubles et mécanismes de contact, permettent la modulation du système immunitaire et ce en agissant sur les médiateurs de l'immunité innée et adaptative. De plus, ce caractère immunomodulateur a pu être observé sur différentes sources de CSM, notamment de moelle osseuse, de cordon ombilical, de placenta ou encore de tissu dentaire. Toutefois, les CSM issues de la gelée de Wharton sembleraient être moins immunogènes que les CSM de moelle osseuse (N. Kim and Cho 2013).

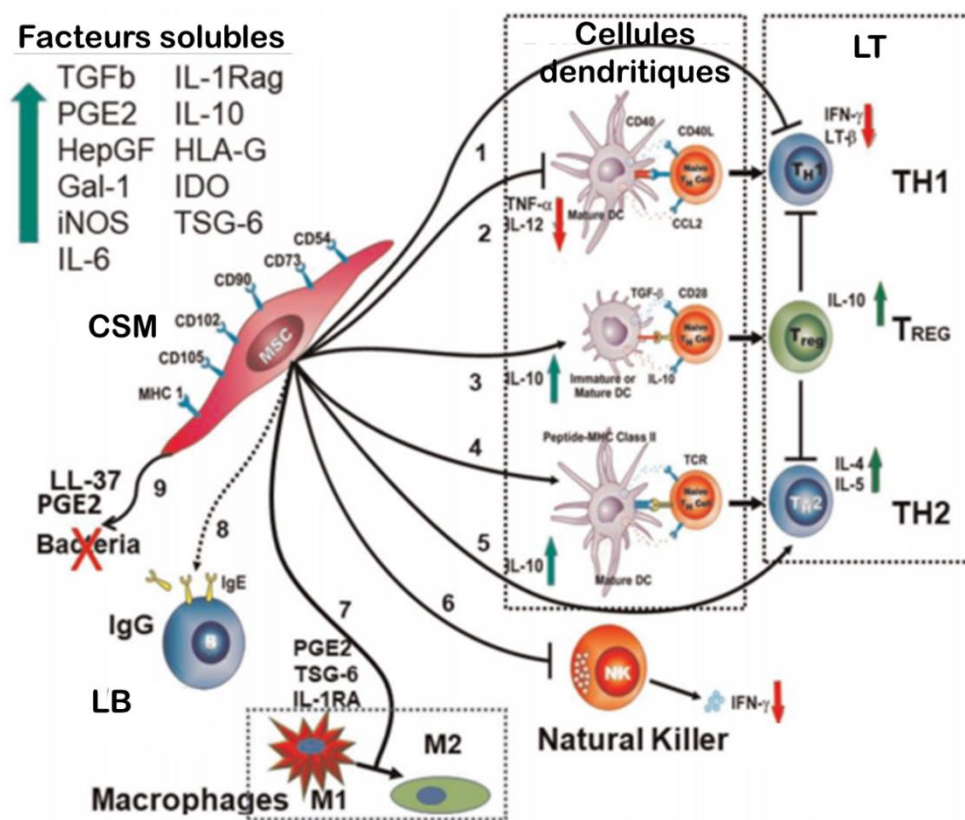


Figure 11 Effets immunomodulateurs des cellules souches/stromales mésenchymateuses sur les cellules dendritiques, les lymphocytes T (LT), les Natural Killer, les macrophages, les lymphocytes B (LB) (Adapté de Mark F. Pittenger et al. 2019).

a. Propriétés anti-fibrotiques, angiogéniques et réparatrices

En plus de leurs propriétés anti-inflammatoires et immunomodulatrices, les CSM endogènes détiennent un caractère anti-fibrotique. En effet, lors d'une lésion entraînant une accumulation excessive de matrice extracellulaire (MEC), les CSM sont capables de limiter ce mécanisme en permettant le remodelage matriciel par l'amélioration de la qualité de la MEC. Ceci dans le but de recréer un environnement favorable consentant à la régénération tissulaire (Usunier et al. 2014).

Afin d'obtenir un tissu fonctionnel, les CSM vont œuvrer à l'angiogenèse *via* la sécrétion de facteurs de croissance pro-angiogéniques (Semedo et al. 2011). Parallèlement, les CSM ont la capacité de réparer des plaies lors de dommages vasculaires. Elles possèdent des propriétés cicatricielles en interagissant notamment avec les cellules progénitrices hématopoïétiques pour engager la myélopoïèse lors de la phase inflammatoire (Lau et al. 2009).

Ainsi lors de blessures ou traumatismes, des CSM circulantes se retrouvent dans le sang afin d'atteindre l'organe distant (Girousse et al. 2021). Ensuite, la différenciation des CSM ainsi que le relargage de facteurs paracrines se mettent en place pour permettre ensemble, la réparation du tissu lésé (Charbord and Casteilla 2011).

b. Propriétés anti-apoptotiques

En plus des propriétés de réparation tissulaire, les cellules souches/stromales mésenchymateuses sont dotées de facultés anti-apoptotiques. Ce mécanisme anti-apoptotique est lié à des facteurs de croissances tels que le facteur neurotrophique du cerveau, *Brain-Derived Neurotrophic Factor* (BDNF), le facteur de croissance ressemblant à l'insuline, *Insulin Growth Factor* (IGF), le facteur de croissance de l'endothélium vasculaire, *Vascular Endothelial Growth Factor* (VEGF) ainsi que le facteur de croissance des hépatocytes, *Hepatocyte Growth Factor* (HGF). Tous ces facteurs permettent aux CSM de se renouveler tout en limitant l'excès de mort cellulaire. Ensemble, ces fonctionnalités conduisent à une homéostasie tissulaire (Semedo et al. 2011).

III- Physiologie des cellules souches/stromales mésenchymateuses exogènes

1. Caractérisation *in vitro*

En 2006, les CSM ont été caractérisées par l'ISCT afin de standardiser leurs caractéristiques au niveau international. Cette société internationale a formulé 3 critères principaux : l'adhérence au plastique, leur phénotype cellulaire ainsi que leur potentiel de différenciation multipotent (Dominici et al. 2006).

En effet, ces cellules d'apparence fibroblastique (figure 12) ont pour capacité d'adhérer naturellement au plastique et de maintenir ces propriétés tout au long de leur culture.

Pour ce qui est de leur phénotype, il a été convenu qu'au moins 95% de la population cellulaire devait exprimer, par cytométrie en flux, les clusters de différenciation (CD) CD105, CD73 et CD90, sans toutefois exprimer les marqueurs CD45, CD34, ni CD14, CD11b, CD79 α ou CD19, qui sont les principaux marqueurs de la lignée hématopoïétique, ni les molécules du complexe majeur d'histocompatibilité de classe II (CMH-II) principalement nommé HLA-DR (avec moins de 2% d'expression).

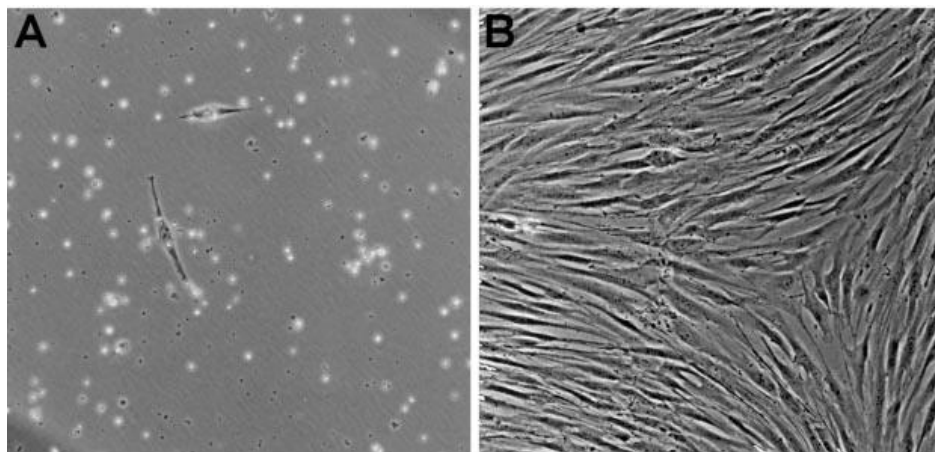


Figure 12 Morphologie des cellules souches/stromales mésenchymateuses issues de la moelle osseuse après expansion en monocouche. A : Morphologie cellulaire après 48h d'ensemencement. B : Morphologie cellulaire après 10 jours d'ensemencement (M. F. Pittenger 1999).

a. Propriété clonogénique

Ces cellules souches/stromales mésenchymateuses possèdent une fonctionnalité qui leur est propre : le potentiel clonogénique. Celui-ci leur donne la capacité de produire des clones et de former une colonie appelée la *colony forming unit-fibroblasts* (CFU-F). Cette potentialité peut être observée *in vitro* après 10 jours de culture et après coloration des cellules avec une solution de Cristal Violet (figure 13) (Bourin, Sensebé, and Charbord 2004 ; Charbord and Casteilla 2011).

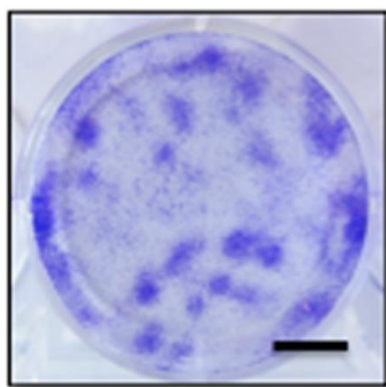


Figure 13 Test de clonogénicité de cellules souches/stromales mésenchymateuses issues de la gelée de Wharton. Les CSM ont été cultivées pendant 10 jours et colorées au Cristal Violet. L'échelle correspond à 1cm (Adapté de Avercenc-Léger et al. 2017).

b. Propriétés de différenciation

Pour terminer, l'ISCT a défini un dernier critère pour définir les CSM *in vitro* : le potentiel de différenciation en 3 lignées spécifiques. Par le fait, les CSM ont la capacité dans un environnement spécifique, de se différencier *in vitro* en ostéocytes, chondrocytes et adipocytes. Cet environnement est créé *in vitro* en utilisant des milieux de culture et des conditions standards de différenciation, notamment par l'ajout de facteurs de croissance. Pour un milieu de différenciation adipocytaire, une supplémentation en l'insuline est requise, pour un milieu ostéocytaire, une supplémentation en β -glycérol phosphate est nécessaire alors que pour induire une différenciation chondrocytaire, les CSM doivent être cultivées en pellet et supplémentées avec du *Transforming growth factor* (TGF- β).

Cette fonctionnalité de différenciation cellulaire doit être démontrée par différentes colorations selon les recommandations de l'ISCT. Une coloration *Oil Red O* permet de visualiser les vésicules lipidiques dans les adipocytes et doit être instaurée pour démontrer une

différenciation adipocytaire. Une coloration au rouge alizarine ou au Von Kossa est nécessaire pour colorer les dépôts calciques et ainsi démontrer une différenciation ostéoblastique et enfin une coloration au bleu Alcian est utilisé pour mettre en évidence les protéoglycanes du cartilage et alors visualiser une différenciation de CSM en chondroblastes (Dominici et al. 2006) (figure 14).



Figure 14 Potentiel de différenciation *in vitro* de cellules souches/stromales mésenchymateuses. Colorations faites avec Oil Red O, rouge Alizarine et bleu Alcian afin de visualiser respectivement le potentiel de différenciation des CSM en adipocytes, ostéocytes et chondrocytes (Adapté de Y. Chen et al. 2019).

c. Propriétés de migration après expansion *in vitro*

Pour des applications en thérapie cellulaire, les CSM exogènes doivent tout d'abord être amplifiées *in vitro* avant d'être injectées dans la circulation systémique. Bien que ces cellules soient dotées de cette faculté, *in vivo*, il apparaît que peu de cellules se retrouvent sur le site inflammatoire ou lésionnel. Rombouts et Ploemacher ont indiqué que les CSM-MO perdaient certainement leur capacité de migration *in vivo* après leur expansion *in vitro* (Rombouts and Ploemacher 2003).

Cette diminution de capacité de migration s'est confirmé par des études chez la souris où des CSM marquées ont été injectées par voie intraveineuse (IV). Une heure après leur injection, les CSM se trouvaient piégées principalement dans les poumons (Eggenhofer et al. 2012; Schrepfer et al. 2007). Seulement 0,1% des cellules ont alors été retrouvées après 24h dans le foie, la rate et les reins (Leibacher et al. 2017). Toutefois, il a été démontré que ces CSM exogènes restaient viables jusqu'à 24h après l'injection et qu'un bénéfice thérapeutique était constaté au niveau de la régénération tissulaire ainsi que par rapport à la réponse immunomodulatrice (Eggenhofer et al. 2012; Nitzsche et al. 2017).

Une autre étude a comparé l'injection intraveineuse à l'injection intra-artérielle de CSM-MO chez des porcs. Ces chercheurs ont montré une accumulation de CSM dans les poumons après injection intraveineuse tandis que la voie intra-artérielle a diminué l'absorption de ces CSM dans les poumons et a augmenté leur proportion dans le foie, la rate et les reins. Ainsi, il

apparaît que l'injection en intra-artérielle pourrait prévenir ce piégeage pulmonaire. Cette accumulation après injection intraveineuse pourrait être due à la différence de taille entre les capillaires pulmonaires et les CSM (Mäkelä et al. 2015).

Une hypothèse expliquant ce faible taux de migration des CSM exogènes pourrait aussi être due à l'altération de l'expression des récepteurs aux chimiokines, notamment CXCR4. En effet, Pelekanos *et al* ont montré une faible expression de CXCR4 à la surface des CSM fœtales et des CSM de moelle osseuse, mais une plus forte expression dans leur cytoplasme.

Devant ces résultats, les chercheurs ont émis l'hypothèse que la régulation de l'expression de ce facteur pourrait se faire *via* endocytose du CXCR4. Ainsi à l'aide de l'utilisation d'inhibiteurs de l'endocytose, l'équipe de Pelekanos *et al* a réussi à augmenter le niveau d'expression membranaire du CXCR4 des CSM (Pelekanos et al. 2014). Cette possible internalisation du récepteur a été confirmée dans d'autres cellules comme les cellules d'hépatocarcinome humain. Il semblerait alors que ce récepteur CXCR4 soit retrouvé dans l'appareil de Golgi et dans le complexe de recyclage des endosomes (Cepeda et al. 2015; Pelekanos et al. 2014).

La seconde hypothèse concerne la migration passive. Ce piégeage passif engendrerait un arrêt des CSM et altérerait ainsi le flux sanguin, ceci pourrait être notamment dû à la taille des CSM qui semble augmenter après leur expansion *in vitro* (Karp and Teo 2009).

Pour conclure, il apparaît que l'expansion *in vitro* altère les propriétés de migration des CSM exogènes compromettant leur migration sur le site inflammatoire/lésé. Ainsi, il est nécessaire que ce processus soit investigué.

d. Propriétés immunomodulatrices

Les propriétés immunomodulatrices des CSM en font des excellentes candidates pour une utilisation allogénique en thérapie cellulaire. En effet, les CSM ont la possibilité d'être utilisées en clinique dans des conditions d'incompatibilité HLA (*human leucocyte antigen*) (Zhao, Ren, and Han 2016). La fonction du complexe antigène/CMH-II permet la présentation antigénique par les cellules présentatrices d'antigène aux lymphocytes T permettant d'initier une réaction immunitaire (Bouillon and Mourad 2003). Dans la mesure où les CSM n'expriment ni le CMH-II, représenté par les antigènes HLA DP, DQ et DR, ni les molécules de costimulation CD80, CD86 et CD40, la synapse immunologique ne peut donc pas se mettre en place. Elles

n'activeront pas les LT CD4⁺ et induiront l'anergie des LT CD8⁺. La réponse immune ne peut donc être déclenchée. C'est pourquoi, les CSM sont considérées comme immunotolérantes (Larghero et al. 2009; Yagi et al. 2010).

Au regard de l'augmentation croissante de publications relatant les propriétés immunes des CSM, l'ISCT a publié, en 2016, de nouvelles recommandations afin d'étudier ces propriétés. Cette société préconise d'étudier le sécrétome des cellules par la technique immuno-enzymatique, de l'anglais *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay* (ELISA) ainsi que des tests fonctionnels à base de cellules répondantes. Cette dernière repose sur l'étude de l'inhibition de la prolifération des Lymphocytes T (LT) en coculture avec les CSM (Galipeau et al. 2016).

2. Culture et conservation des cellules souches/stromales mésenchymateuses

L'utilisation des cellules souches/stromales mésenchymateuses nécessite une amplification et éventuellement une conservation en banque de cellules afin qu'elles soient utilisées dans des indications d'urgence. Pour cela, une amplification *in vitro* et une cryoconservation adéquate sont nécessaires.

a. Modes de culture

Afin d'être amplifiées, les CSM humaines sont le plus souvent cultivées en 2D, en monocouche dans une boîte de culture avec un milieu de culture enrichi en sérum de veau fœtal (SVF) ou en lysat plaquettaire (LP) humain. Pour permettre une culture et une production cellulaire en utilisant les Bonnes Pratiques de Fabrication (BPF) et à grande échelle, des flacons à chambre multiples peuvent être utilisés. Des flacons roulants sont aussi utilisés dans l'industrie biotechnologique. Certaines équipes utilisent une autre technique en utilisant des microporteurs comme support d'adhérence dans des bioréacteurs à cuve agitée. Cette stratégie de culture permet d'intensifier l'expansion cellulaire tout en réduisant le coût de production. Aujourd'hui l'utilisation de bioréacteurs est de plus en plus utilisée pour la culture de CSM issues de différentes sources (X. Chen et al. 2006; Rafiq, Coopman, and Hewitt 2013).

En vue d'une utilisation comme produit de thérapie cellulaire chez l'Homme, les conditions de culture de CSM ont dû être révisées pour répondre aux contraintes de grade

clinique. Ainsi des techniques de BPF ont été mises en place, notamment l'obligation d'utiliser des matières premières de qualité pharmaceutique. Cela remet en cause l'utilisation de milieux de culture et de sérums, nécessaires pour l'amplification des cellules. Des alternatives sont aujourd'hui mises en place, comme certains milieux de culture spécialement conçus pour l'utilisation clinique des CSM. Ainsi le sérum de veau fœtal doit être remplacé par du SVF de grade clinique ou encore du LP humain. Grâce à toutes ces avancées, les CSM sont utilisées en tant que Médicament de Thérapie Innovante (MTI) depuis la directive 2003/63/CE. Ces MTI sont regroupés en plusieurs catégories selon leur nature : cellule, gène ou tissu. Ainsi les CSM sont soit classées en tant que médicaments de thérapie cellulaire somatique, soit comme produits issus de l'ingénierie tissulaire (Mebarki et al. 2021). Ces MTI sont définis comme des médicaments à usage humain basés sur des gènes, tissus ou cellules. Ils regroupent :

- Des médicaments de thérapie génique
- Des médicaments de thérapie cellulaire somatique
- Des médicaments issus de l'ingénierie tissulaire

Ces différentes catégories de MTI sont évaluées et autorisées de manière unique par l'Agence Européenne du Médicament (EMA) (European Medicines Agency 2018).

b. Conservation des cellules

Concernant la conservation des cellules, la cryoconservation semble être le meilleur compromis car elle permet de conserver de grandes quantités de cellules et de répondre rapidement aux besoins des cliniciens. En revanche la congélation peut avoir un impact sur les CSM, elle peut notamment diminuer la viabilité, engendrer un rétrécissement cellulaire, induire de l'apoptose, diminuer la capacité d'adhérence et altérer l'activité métabolique et la fonction paracrine immunomodulatrice (Bahsoun, Coopman, and Akam 2019). Les principales méthodes de congélation se font en azote liquide, par congélation en phase vapeur ou par stockage à -80°C dans un congélateur (Haack-Sørensen and Kastrup 2011; Marquez-Curtis et al. 2015).

Les types de cryoprotecteurs ont des impacts sur les CSM dans leur globalité. Une étude a montré que le sérum humain pouvait affecter et réduire la viabilité des CSM humaines cryoconservées (Moll et al. 2014). D'autres études ont démontré qu'une faible concentration ou une absence de diméthylsulfoxyde (DMSO) réduisait significativement la viabilité dans les CSM de moelle osseuse humaines (Yuan et al. 2016) et dans les CSM de mouton ou de cheval (Renzi et al. 2012). La même réduction a été observée avec une dose élevée de DMSO (20 %)

par rapport au pourcentage standard (10 % de DMSO) dans les CSM-MO porcines (Ock and Rho 2011).

Ainsi, la culture, la cryoconservation et la conservation en banque de cellules, doivent être méticuleusement contrôlées afin de pouvoir standardiser l'utilisation des CSM exogènes en médecine régénérative.

3. Optimisation des propriétés médiées par les cellules souches/stromales mésenchymateuses

En raison de leur plasticité, les CSM sont capables de s'adapter à leur environnement, en fonction des signaux qu'elles perçoivent. Ces signaux chimiques, physiques, mécaniques ou métaboliques peuvent ainsi orienter la différenciation des CSM mais aussi leur phénotype immunomodulateur (exemple : CSM 1 et CSM 2). Cette plasticité observée *in vivo* est devenue une des stratégies pour améliorer leur fonction durant l'expansion *in vitro* et ainsi améliorer l'efficacité de la transplantation de CSM en thérapie cellulaire et en ingénierie tissulaire sans avoir recours à des techniques de génie génétique, qui apporteraient une complexité supplémentaire en matière d'exigences réglementaires. Ce processus est nommé « stimulation », « amorçage » ou encore « préconditionnement ». Différentes molécules comme des cytokines/chimiokines, des facteurs de croissances, des agonistes de récepteurs, des hormones, ou encore *via* l'utilisation d'un environnement hypoxique peuvent ainsi être ajoutées au milieu de culture pendant un temps prédéfini et permettre de moduler l'environnement des cellules pour obtenir certains effets biologiques (tableau 3) (Hu and Li 2018; Lee and Kang 2020; Miceli et al. 2021).

Tableau 3 Traitements à base de différentes sources de cellules souches/stromales mésenchymateuses préconditionnées (Adapté de Miceli et al. 2021). Cellules souches/stromales mésenchymateuses CSM ; CSM dérivées de l'amnios CSM-AM ; CSM dérivées de la moelle osseuse CSM-MO ; CSM dérivées du cordon ombilical CSM-CO ; CSM dérivées du tissu adipeux CSM-TA ; CSM dérivées de la pulpe dentaire CSM-PD ; CSM dérivées de la gelée de Wharton CSM-GW ; CSM dérivées du sang de cordon CSM-SC ; Exosomes EXO ; Milieu conditionné MC ;

Sources de CSM	Types de préconditionnements	Produits de CSM	Facteurs fonctionnels détectés	Effets biologiques	Référence
CSM-AM	IFN- γ	EXO	miR-23a, miR-26b, miR-125b, miR-130b, miR-140, miR-203a, miR-223, miR-224, miR-320a	Régulation de l'activation/anergie des LT et induction de monocytes avec un phénotype M2	Bulati <i>et al.</i> , 2020
CSM-AM	Sphéroïdes, culture 3D	MC et EXO	HGF, PDGF, TGF- β , VEGF, FGF1, GRO α , SDF-1, EGF, IL-6, PGE2, LIF	Augmentation de l'angiogenèse et inhibition de la prolifération de PBMC	Miceli <i>et al.</i> , 2019
CSM-MO	IL-1 α/β ; TNF α ; IFN- γ	MC	G-CSF	Réduction de la sécrétion de médiateurs inflammatoires des cellules microgliales activées par LPS	Redondo-Castro <i>et al.</i> , 2017
CSM-TA	Hypoxie	MC	IL-6, TNF α , HGF, VEGF	Induction de la régénération du foie	Lee <i>et al.</i> , 2016
CSM-MO	Hypoxie	MC	VEGF	Induction de la régénération du foie	Yu <i>et al.</i> , 2013
CSM-MO	Hypoxie	MC	Wnt4	Amélioration des fibres vasculaires et régénération des fibres musculaires squelettiques	Leroux <i>et al.</i> , 2010
CSM-MO	Hypoxie	MC	-	Induction de la prolifération de cardiomyocytes	Hu <i>et al.</i> , 2016
CSM	Hypoxie	EXO	miR-26	Amélioration de la survie des cardiomyocytes	Park <i>et al.</i> , 2018
CSM-MO	Hypoxie	MC	HGF, VEGF	Amélioration de la prolifération des cellules neuronales	Chang <i>et al.</i> , 2013
CSM-MO	Hypoxie	MC	HGF, BDNF, VEGF	Amélioration de la survie des axones	Zhilai <i>et al.</i> , 2016
CSM-TA	TNF- α	MC	BMP2	Amélioration de la régénération osseuse	Lu <i>et al.</i> , 2013

CSM-TA	TNF- α	EXO	Wnt3a	Favorise la prolifération et la différenciation ostéogénique des cellules ostéoblastiques primaires	Lu <i>et al.</i> , 2017
CSM-PD	bFGF ; hypoxie	MC	-	Amélioration de la formation osseuse	Novais <i>et al.</i> , 2019
CSM-MO	AMPC, bFGF, PDGF, Hereguline 1	MC	GDNF, BDNF	Induction de la régénération de des terminaisons nerveuses dopaminergiques striatales	Sadan <i>et al.</i> , 2009
CSM-MO	AMPC, bFGF, PDGF, Hereguline 1	MC	GDNF, BDNF	Réduction du volume striatal et changements associés aux lésions d'acide quinolinique	Sadan <i>et al.</i> , 2009
CSM-MO	Lithium, VPA	MC	-	Amélioration des performances motrices et comportementales, et réduction de la mort neuronale et des agrégats de huntingtine dans le striatum	Linares <i>et al.</i> , 2016
CSM-PD	bFGF ; hypoxie	MC	VEGF	Amélioration de la vascularisation	Gorin <i>et al.</i> , 2016
CSM-PD	Hypoxie	MC	VEGF	Amélioration de la vascularisation	Kuang <i>et al.</i> , 2016
CSM-TA	Hypoxie	EXO	-	Augmentation de la migration et la formation de tube par les HUVEC	Xue <i>et al.</i> , 2018
CSM-TA	Hypoxie	MC	VEGF, HGF, bFGF	Augmentation du potentiel angiogénique des CSM	Lee <i>et al.</i> , 2017
CSM-GW	Hypoxie	MC	Angiogénine, VEGF	Augmentation de la migration et de la formation de tubes d'angiogénèse	Lee <i>et al.</i> , 2018
CSM-TA	Hypoxie	MC	EGF, VEGF, FGF, HGF	Amélioration de la récupération fonctionnelle et néovascularisation du tissu ischémique	Han <i>et al.</i> , 2016
CSM	Hypoxie	MC	VEGF	-	Costa <i>et al.</i> , 2017

CSM-MO	Hypoxie	EXO	miR-125	Amélioration de la fonction cardiaque	Zhu <i>et al.</i> , 2018
CSM-MO	IL-17	MC	IL-6	Suppression de la prolifération des LT ; inhibition de l'activation des LT et des cytokines Th1	Sivanathan <i>et al.</i> , 2015
CSM-TA, CSM-MO, CSM-SC	IFN- γ	MC	IDO	Suppression de la prolifération des LT	Torres <i>et al.</i> , 2020
CSM-MO	IL-17	MC	IL-6	Immunosuppression des LT	Sivanathan <i>et al.</i> , 2017
CSM-MO	IFN- γ et TNF α	MC	PGE ₂ , IDO	Inhibition allogénique en culture mixte lymphocytaire	English <i>et al.</i> , 2007
CSM-MO	IFN- γ , LPS, TNF α	MC	PGE ₂	Induction de la polarisation des monocyte en phénotype anti-inflammatoire M2	Lin <i>et al.</i> , 2017
CSM-MO	IL-1 β et IFN- γ	MC	IL-6	Induction de la polarisation des monocyte en phénotype anti-inflammatoire M2	Philipp <i>et al.</i> , 2018
CSM	IL-1 β	EXO	miR-21	Induction de la polarisation M2 et amélioration du sepsis	Yao <i>et al.</i> , 2020
CSM-CO	IL-1 β	EXO	miR-146a	Amélioration du sepsis murin et polarisation des monocyte en phénotype anti-inflammatoire M2	Song <i>et al.</i> , 2017
CSM-MO	IFN- γ et sphéroïdes	MC	IDO	Suppression de l'activation et de la prolifération des LT <i>in vitro</i>	Zimmerman <i>et al.</i> , 2017
CSM-MO	Hypoxie	MC	PGE ₂ , miR-210	Induction de la polarisation des macrophages M2 et amélioration de la fibrose	Kojima <i>et al.</i> , 2019

L'effet escompté peut être l'optimisation des propriétés immunomodulatrices, l'amélioration des propriétés de régénération, de l'angiogenèse, ou encore anti-apoptotique (figure 15) (Noronha et al. 2019).

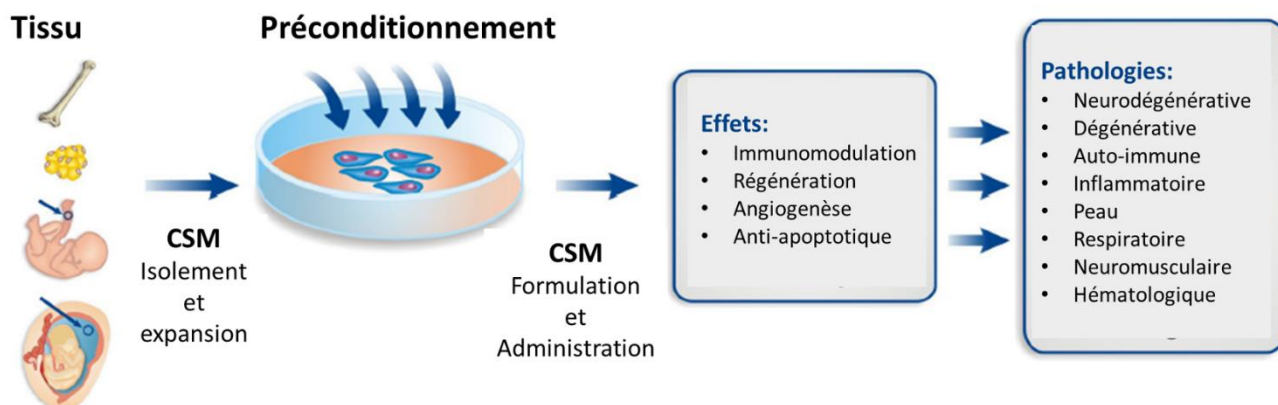


Figure 15 Utilisations et effets (immunomodulateur, régénérateur, angiogénique et anti-apoptotique) des préconditionnements de cellules souches/stromales mésenchymateuses sur différentes pathologies (Neurodégénérative, dégénérative, auto-immune, inflammatoire, de peau, respiratoire, neuromusculaire et hématologique) (Adapté de Noronha et al. 2019).

a. Optimisation des propriétés immunomodulatrices médiées par les cellules souches /stromales mésenchymateuses

L'optimisation des propriétés immunes a d'abord été mise en place *via* l'utilisation de cytokines et chimiokines. En premier lieu, cette optimisation a été démontrée de nombreuses fois par l'ajout d'IFN- γ dans le milieu de culture des CSM. Ce préconditionnement semble permettre aux CSM d'améliorer leurs propriétés immunosuppressives vis-à-vis des LT. La signalisation cellulaire relative à l'Interféron- γ consent à inhiber la prolifération des LT principalement par la voie du ligand PD-L1. Une autre corrélation entre l'IFN- γ et l'enzyme IDO a plusieurs fois été démontrée ce qui permettrait l'inhibition des cellules T (Sheng et al. 2008; D. S. Kim et al. 2018).

Après la publication de toutes ces recherches, de meilleures propriétés immunes ont été garanties en 2016 par l'ISCT avec l'utilisation d'un préconditionnement composé d'IFN- γ ou bien de TNF α (Galipeau et al. 2016).

Ainsi la combinaison de cytokines en tant que préconditionnement cellulaire est aussi une possibilité. Certaines études utilisent maintenant plusieurs cytokines dans le but d'améliorer les propriétés immunomodulatrices des CSM.

D'autres études utilisent des agonistes de certains récepteurs pour promouvoir l'immunomodulation des CSM. Comme cité précédemment, les CSM peuvent modifier le phénotype des macrophages et ce notamment grâce à différents préconditionnements, comme

les *Toll-like receptor* (TLR) 3 et 4. L'équipe de Waterman a observé qu'après un préconditionnement activant la voie du TLR3 avec de l'acide polyinosinique-polycytidylique (Poly I:C), les CSM adoptaient plutôt un profil anti-inflammatoire alors que lorsqu'ils utilisaient un préconditionnement activant la voie du TLR4 avec du lipopolysaccharides (LPS), les cellules devenaient alors pro-inflammatoires (Waterman et al. 2010).

L'environnement exerce aussi une influence sur les propriétés immunomodulatrices des CSM. C'est pourquoi des équipes de recherche utilisent différentes méthodes et environnements de culture pour influencer positivement ces propriétés. Notamment en utilisant un environnement hypoxique sur les CSM pour contrer une inflammation en sécrétant de l'IL-10 (C. M. Jiang et al. 2015). Conjointement à cela, les équipes de Frith et Zimmermann ont d'ailleurs cultivé des CSM dans un environnement tridimensionnel. Ils ont ainsi montré que l'utilisation de sphéroïdes permettait d'augmenter le potentiel immunomodulateur des CSM (Frith, Thomson, and Genever 2010; Zimmermann, Hettiaratchi, and McDevitt 2017).

Enfin, il est possible de recourir à l'utilisation de certains médicaments comme préconditionnement sur les CSM. L'utilisation de l'acide tout-trans rétinolique sur les CSM a permis d'augmenter la sécrétion d'IL-6 et d'induire des lymphocytes T régulateurs (D. Li et al. 2015). De plus, un potentiel médicament pour traiter la sclérose en plaque nommé MIS416 et provenant de la bactérie *Cutibacterium acnes* a aussi été utilisé comme préconditionnement sur les CSM. Ce préconditionnement a permis la sécrétion de cytokines comme l'IL-6, l'IFN- γ et l'IL-2 mais aussi d'augmenter le taux de T régulateurs au détriment des cellules Th1 et Th17 (Lee et al. 2018).

b. Optimisation de la migration des cellules souches/stromales mésenchymateuses

Aujourd'hui, tout comme les propriétés immunomodulatrices, les chercheurs tentent d'améliorer ce processus de migration altéré par l'expansion *in vitro*. Certaines modifications sont explorées, comme les conditions de culture, le préconditionnement ou autrement dit la stimulation des cellules avec l'ajout de différentes molécules (Noronha et al. 2019) ou encore la modification génétique.

Le changement des conditions de culture semble être effectivement plus facile à mettre en œuvre. L'équipe de Rosová a montré qu'avec des conditions hypoxiques (entre 1 et 3% d'O₂)

les CSM-MO humaines avaient une meilleure capacité de migration en test de blessure (Rosová et al. 2008). Les autres paramètres comme la confluence cellulaire, la densité d'ensemencement ou le milieu de culture (sérum et facteurs de croissance) jouent également un rôle important dans la fonctionnalité des CSM (Bhat et al. 2021) et notamment vis-à-vis des propriétés de migration. L'équipe de De Becker a ainsi montré qu'un faible taux de confluence (50% de recouvrement de la surface cellulaire) améliorait la migration des CSM-MO en chambre de Boyden (De Becker et al. 2007).

De nombreuses études rapportent que le préconditionnement des CSM module les propriétés migratrices des CSM. En effet, des études ont pu mettre en évidence l'augmentation de la migration, avec l'aide de la chimiokine SDF1 sur les CSM de rat (Deng, Xu, and Ren 2018) et de souris (Farashah et al. 2019), ou par les ligands des récepteurs Toll sur les CSM humaines (Tomchuck et al. 2008). Des peptides comme la Cathelicidine (LL-37) ont pu être utilisés avec des CSM placentaires (Oliveira-Bravo et al. 2016), mais aussi de médicaments comme la Rapamycine sur les CSM ombilicales humaines (J. Zheng et al. 2018) et l'Azathioprine sur les CSM issues de la membrane du chorion humain (Schneider et al. 2015). D'autres études utilisent des cytokines comme l'interféron (Duijvestein et al. 2011) sur les CSM-MO humaines, l'interleukine 1- β sur les CSM-MO humaines (Carrero et al. 2012) et également sur les CSM de cordon ombilical humain (Guo et al. 2018), l'interleukine 17 appliquée sur les CSM-MO humaines (H. Huang et al. 2009). Toutes ces études attestent de l'effet bénéfique du préconditionnement pour augmenter la migration des CSM.

Enfin, des modifications génétiques ont été réalisées avec l'utilisation de vecteur viraux dans le but d'améliorer la migration. Ces recherches de thérapie génique pour promouvoir la migration des CSM, ont été mises en place avec la surexpression de CXCR4 dans le cas de l'infarctus du myocarde et de la colite, avec des CSM-MO de rat et de souris (Cheng et al. 2008; Z. Chen et al. 2018; D. Zhang et al. 2008) mais aussi avec la surexpression de CXCR7 afin de traiter des lésions pulmonaires aiguës conjointement avec des CSM-MO de rat (Shao et al. 2019). Toutefois ces recherches n'entrent plus dans le cadre de la thérapie cellulaire proprement dite car elles ont recours à des modifications génétiques. L'utilisation de ces modifications génétiques reste plus compliquée pour l'utilisation de CSM en tant que Médicament de Thérapie Innovante.

En résumé, les CSM de différentes sources (plus souvent les CSM-MO humaines) possèdent un potentiel de migration *in vivo* et *in vitro*. Même si ces capacités semblent être très

limitées après leur expansion *in vitro*, il est maintenant possible d'utiliser certaines stratégies dans le but d'améliorer leur migration. Ainsi, cela ouvre de nouvelles perspectives de recherche et la mise en place d'un préconditionnement apparaît être une alternative avantageuse pour de futures applications des CSM en médecine régénérative (Miceli et al. 2021).

IV- Cellules souches/stromales mésenchymateuses en médecine régénérative

Les CSM sont également étudiées dans le but d'être utilisées en médecine régénérative (Caplan 2007). Ce domaine peut se scinder en deux spécialités : l'ingénierie tissulaire et la thérapie cellulaire.

Ces cellules peuvent être administrées en condition autologue, cela signifie que le donneur est également le receveur ; ou en condition allogénique lorsque le donneur de cellules est différent du receveur (figure 16) (Rodríguez-Fuentes et al. 2021).

Depuis 2015, les CSM sont plus utilisées lors d'essais cliniques en condition allogénique qu'autologue (Kabat et al. 2019). En effet leur utilisation en condition allogénique est possible notamment grâce aux effets immunomodulateurs résultant des CSM et de leur non-immunogénicité, qui leur permettent de ne pas être rejetées par le système immunitaire du receveur.

Ces cellules sont donc intéressantes pour traiter des pathologies en lien avec le système immunitaire (Wei et al. 2013) mais aussi pour la régénération des tissus comme le corps vitré, la moelle épinière, la moelle osseuse, le cartilage, le cœur, les poumons et le tissu adipeux (Rodríguez-Fuentes et al. 2021).

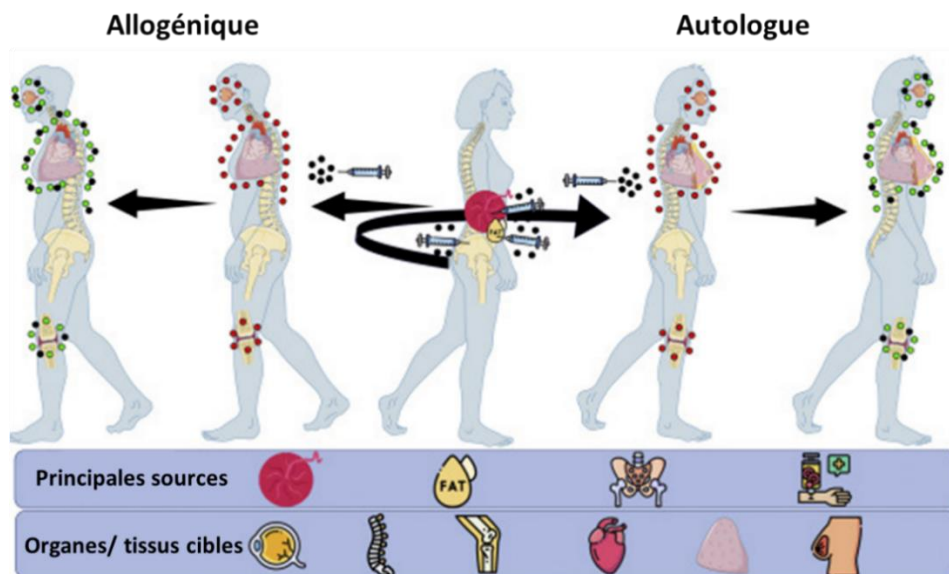


Figure 16 Utilisation des cellules souches/stromales mésenchymateuses en thérapie cellulaire en condition allogénique, lorsque le donneur est différent du receveur (à gauche) et en condition autologue, lorsque le donneur et receveur sont la même personne (à droite). Les principales sources de CSM sont les tissus néonataux, le tissu adipeux, la moelle osseuse et le sang périphérique. Les organes et tissus cibles le plus souvent retrouvés dans les essais cliniques sont le corps vitré, la moelle épinière, la moelle osseuse, le cartilage, le cœur, les poumons et le tissu adipeux (Adapté de Rodríguez-Fuentes et al. 2021).

1. Applications en ingénierie tissulaire

L'ingénierie tissulaire s'est développée depuis 1999 (Vacanti and Langer 1999). L'objectif est de développer des substituts biologiques qui maintiennent, restaurent ou améliorent la fonction des tissus. La construction d'un substitut en ingénierie tissulaire repose sur 3 composantes, plus communément appelée la triade de l'ingénierie tissulaire. Celle-ci regroupe une **composante cellulaire** (autologue ou hétérologue, différenciée ou souche), un **environnement tridimensionnel** favorable, constitué d'un biomatériau (naturel ou synthétique, en hydrogel ou en maillage) ainsi qu'une fonctionnalisation pour permettre la mise en place de **signaux** donnant lieu à la production d'une matrice fonctionnelle par l'utilisation de facteurs de croissance, de petites molécules ou encore *via* des forces mécaniques (figure 17) (Almouemen, Kelly, and O'Leary 2019).

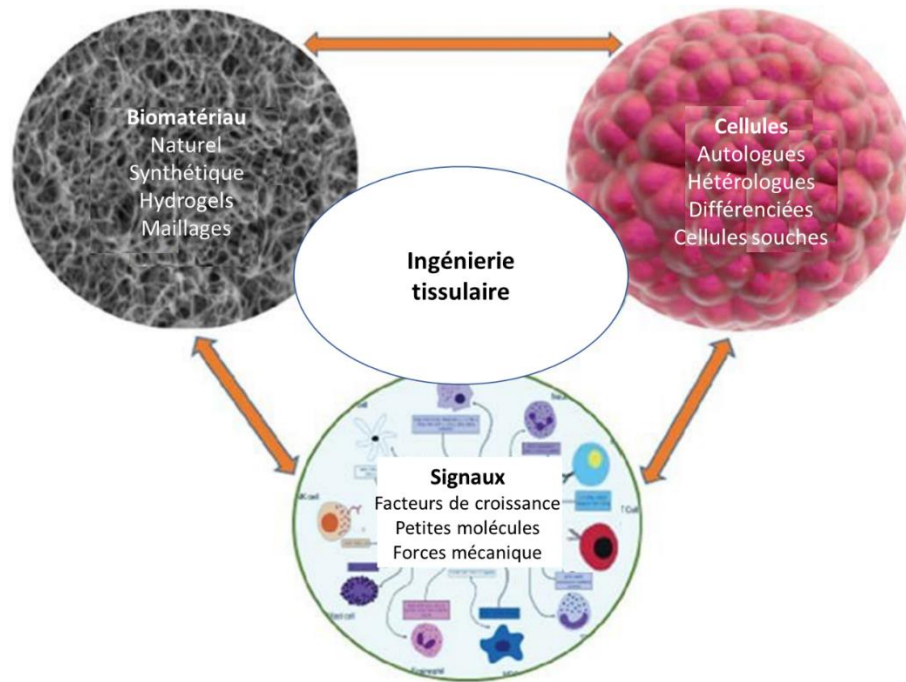


Figure 17 Triade de l'ingénierie tissulaire composée d'un biomatériau (naturel, synthétique, en hydrogel ou en maillage), de cellules (autologues, hétérologues, différenciées ou souches) ainsi que des signaux (facteurs de croissance, petites molécules ou forces mécanique) (Adapté de Almouemen, Kelly, and O'Leary 2019).

Aujourd'hui des CSM humaines issues de multiples sources sont utilisées dans le but d'utiliser leur potentiel de différenciation pour la régénération de nombreux tissus. Les études montrent que celles-ci possèdent la capacité de se différencier en de nombreux types cellulaires : osseux, de tissu adipeux, musculaire, nerveux, myocardique, hépatique, cornéen, de la trachée, de la peau ou encore cartilagineux (figure 18).

Les CSM-MO ont été les premières à être utilisées pour obtenir une différenciation osseuse, ensuite les cellules issues du sang de cordon ombilical et de la pulpe dentaire ont été exploitées. Ces dernières ont montré de très bons résultats en termes de régénération osseuses.

Dans le but d'engager le processus de différenciation osseuse, des facteurs de croissances ou d'autres molécules comme les protéines morphogéniques osseuses, *Bone Morphogenetic Protein* (BMP) sont souvent ajoutés à la culture.

Pour ce qui est de la différenciation cartilagineuse, les CSM ont été très largement utilisées en culture tridimensionnelle en biomatériau afin de créer des échafaudages (*scaffold*) permettant de créer un environnement favorable à cette différenciation. La reconstruction du cartilage a le plus souvent été observées avec des CSM de moelle osseuse, de tissu adipeux, dérivées de la synovie ou encore issues de la gelée de Wharton. Ici, le facteur le plus utilisé en plus de l'environnement 3D, est le TGF- β (Han et al. 2019 ; Hwang et al. 2009 ; Steward and Kelly 2015).

La différenciation en tissu non squelettique est aussi permise *in vitro* grâce aux CSM, notamment en cardiomyocytes, en cellules musculaires et plus récemment en cellules nerveuses. Ceci avec principalement des CSM de moelle osseuse, de tissu adipeux ou de sang de cordon ombilical (Y. Han et al. 2019; Gazit et al. 2013).

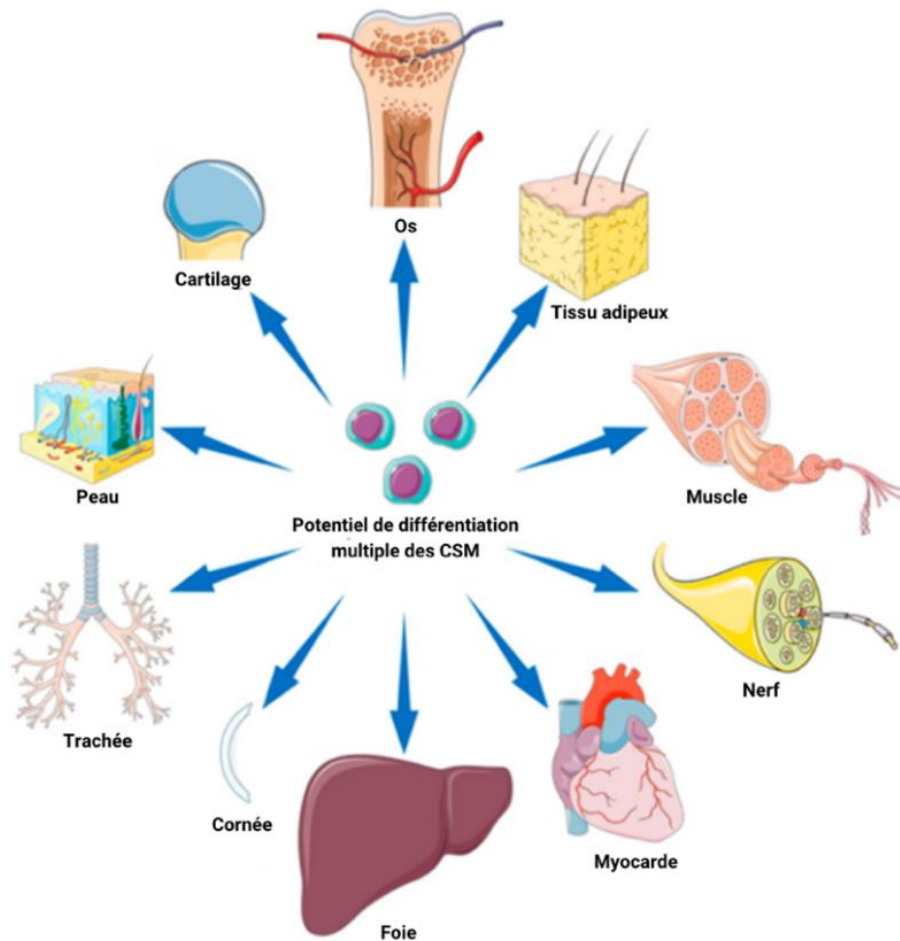


Figure 18 Potentiel de différenciation des cellules souches mésenchymateuse (Adapté de Y. Han et al. 2019).

Au niveau réglementaire, le biomatériau, composé de cellules ayant subi une modification et agrémenté d'une matrice 3D est considéré comme un MTI issu de l'ingénierie tissulaire. Les cellules issues du biomatériau doivent bien entendu être produites selon les BPF. Afin que le biomatériau soit validé et commercialisé, sa matrice 3D doit au préalable avoir obtenu une Autorisation de Mise sur le Marché (AMM) (European Medicines Agency 2018).

Une étude publiée en 2019 a retracé les essais cliniques utilisant des CSM sur une plage de 14 années allant de 2004 à 2018 (Kabat et al. 2019). Cette investigation a pu révéler que les pathologies les plus répandues pour les essais consacrés aux CSM étaient dans les domaines :

- Neurologique
- Osseuse et cartilagineuse
- Cardiovasculaire

Plus récemment, après analyse des essais cliniques répertoriés sur Clinical Trials utilisant des CSM à des fins d'ingénierie tissulaire, nous pouvons témoigner du faible nombre d'études comparées à celles entreprises en thérapie cellulaire (58 *versus* 1208 en octobre 2021). Ces essais cliniques sont mis en place pour envisager des applications articulaires, de reconstruction mandibulaire, labiale et palatine, de régénération tendineuse et osseuse ou encore de rétablissement de tissu myocardique. Ceci montre bien que les CSM sont encore aujourd'hui utilisées pour un vaste champ d'applications cliniques en ingénierie tissulaire.

Ainsi pour la suite de cette partie concernant l'ingénierie tissulaire, nous nous focaliserons sur un seul de ces domaines : l'utilisation de CSM pour la régénération cartilagineuse/ osseuse.

a. Physiopathologie du cartilage

Le cartilage articulaire permet d'assurer la mobilité des articulations et se situe entre deux pièces osseuses. Ce tissu est composé d'un seul type cellulaire : le chondrocyte. Ce cartilage hyalin est avasculaire et est principalement composé d'une matrice de collagène de type II et de protéoglycanes : les agrécanes. Le glissement exercé avec l'os, la rigidité ainsi que la résistance du cartilage sont principalement dus à l'eau et au collagène (Ulrich-Vinther et al. 2003).

La différenciation cellulaire du chondrocyte peut conduire à un tissu osseux. Celle-ci commence par la différenciation de CSM en chondrocyte *via* le facteur de transcription (*SRY*)-*box 9* (Sox 9). Ces mêmes chondrocytes peuvent ensuite se différencier en chondrocytes pré-hypertrophiques par l'activation du facteur de transcription *Runt-related transcription factor 2* (Runx2) et la présence du collagène de type X puis finir en chondrocytes hypertrophiques. Si cette différenciation se met en place jusqu'à la dernière étape, un phénotype ostéoblastique et une transformation du cartilage en os vont apparaître et ainsi une perte de la mobilité du cartilage va émerger (figure 19) (Hata et al. 2017).

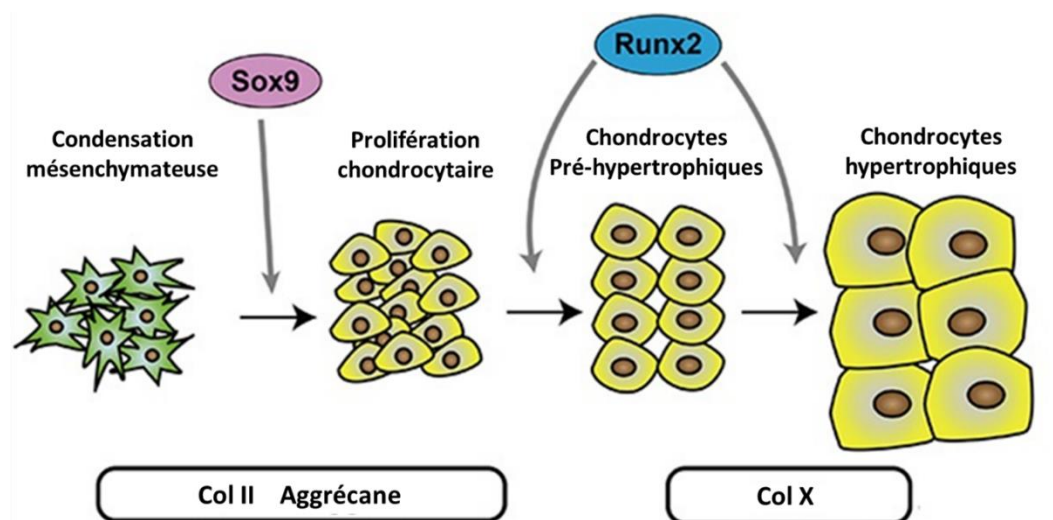


Figure 19 Etapes de la différenciation cellulaire chondrocytaire. La différenciation chondrocytaire débute par une condensation mésenchymateuse puis grâce au facteur de transcription Sox9 les cellules prolifèrent et se différencient en chondrocytes exprimant du collagène de type II (Col II) ainsi que des aggrécanes. La seconde étape est initiée par le facteur de transcription Runx2 et permet une différenciation en chondrocyte pré-hypertrophique exprimant du collagène de type X (Col X). Si cette différenciation continue, des chondrocytes hypertrophiques émergent (Adapté de Hata et al. 2017).

Le problème qui se pose est le faible potentiel de régénération de ce tissu. Si une perte de l'homéostasie de celui-ci est observée, des lésions apparaissent sans retour à l'originel. Différentes lésions cartilagineuses peuvent en résulter, elles sont potentiellement dues à des pathologies inflammatoires comme la polyarthrite rhumatoïde, des pathologies métaboliques ou dégénératives ou encore dues à des traumatismes (Demoor et al. 2014). Ces lésions peuvent être classées selon leur grade (figure 20). Le premier type montre une suspicion d'arthrose avec de faibles lésions du cartilage, le second laisse apparaître un début de dislocation du cartilage qu'on appellera lésions chondrales, le troisième type est associé à une arthrose modérée avec lésion du cartilage et une atteinte de l'os, que l'on appellera lésions ostéochondrales. Pour finir le quatrième type est classé comme une arthrose grave au vu d'une perte de cartilage de 60% ainsi qu'une forte atteinte de l'os (Kellgren and Lawrence 1957).

Les traitements utilisés aujourd'hui pour des lésions cartilagineuses sont assez restreints. En première intention, des antalgiques, des anti-inflammatoires, des analgésiques ou des injections intra-articulaires d'acide hyaluronique sont mises en place. Actuellement, aucune des thérapies développées ne permet de régénérer un cartilage suffisamment fonctionnel et dans les stades avancés de la pathologie, la chirurgie par pose de prothèse reste la seule alternative.

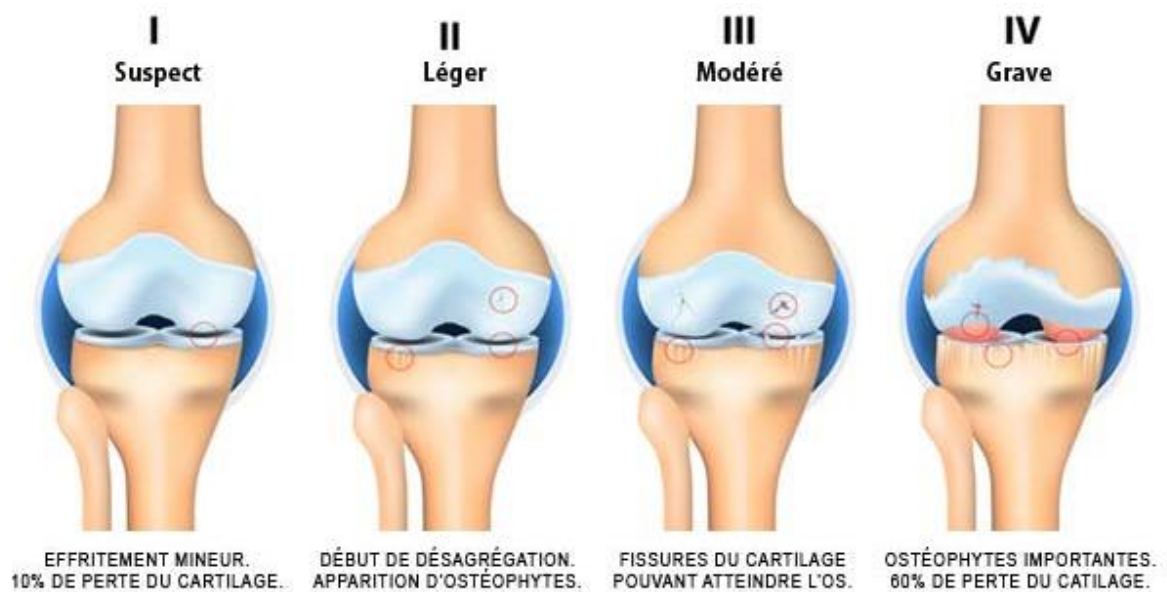


Figure 20 Progression de lésions cartilagineuses et/ou osseuses du genou selon les différents stades (de I à IV) de la classification de Kellgren et Lawrence (Kellgren and Lawrence 1957).

b. Ingénierie tissulaire des CSM pour des lésions cartilagineuses

Du fait de leurs propriétés de différenciation, les CSM se voient comme d'excellentes candidates pour produire *in vitro* un néo-tissu cartilagineux pouvant par la suite être implanté chez le patient.

Depuis plusieurs années, des équipes de recherches internationales étudient le potentiel de reconstruction du cartilage à l'aide de CSM de différentes sources. Des CSM endogènes peuvent être mises à profit pour la régénération du cartilage grâce à la chirurgie de micro-fractures. Le principe est de percer quelques trous dans l'os sous-chondral pour permettre la sortie des CSM de la moelle osseuse, ainsi qu'un cocktail de molécules supportant cette régénération. Les résultats montrent que cette technique permettrait de soulager la douleur post-opératoire. Toutefois des limites apparaissent, les résultats ont montré une formation d'un tissu fibreux instable, de plus elle n'est privilégiée que pour des lésions cartilagineuses de petite taille.

Il est aussi possible d'utiliser de la thérapie cellulaire à partir de CSM exogènes issues de moelle osseuse, de tissu adipeux ou d'autres sources. Ainsi, les CSM peuvent être injectées directement dans la lésion, en intra-articulaire. Les résultats laissent apparaître la formation d'un tissu semblable à du cartilage hyalin. Toutefois, ce procédé semble permettre la migration

des cellules vers plusieurs autres tissus de l'organisme (Tuan, Boland, and Tuli 2002; Le et al. 2020).

De ce fait, ces techniques engendrent une cicatrisation partielle avec une matrice de mauvaise qualité. C'est pourquoi l'implantation des CSM dans un biomatériau semble être une meilleure alternative pour combler des lésions chondrales et ostéochondrales. Les CSM ensemencées dans un biomatériau avec une fonctionnalisation vont permettre, ensemble, une différenciation cellulaire permettant d'aboutir à un phénotype chondrocytaire et à la synthèse d'une matrice extracellulaire fonctionnelle sur le plan mécanique (Chao, Grayson, and Vunjak-Novakovic 2007; Jacob, Shimomura, and Nakamura 2020).

c. Le biomatériau

En ingénierie tissulaire, l'environnement tridimensionnel ou biomatériau est fondamental pour soutenir les cellules et ainsi leur créer un environnement favorable à la différenciation ou le maintien du phénotype et par conséquent à synthèse d'une matrice extracellulaire mimant celle du tissu natif. Il est nécessaire que ce biomatériau soit biodégradable, biorésorbable, non immunogène et non toxique afin de permettre la mise en place d'une matrice fonctionnelle qui résiste aux contraintes mécaniques (Kuo and Tuan 2003).

Il apparaît que le biomatériau et son environnement soient plus physiologiques pour les cellules et amélioreraient leur survie après transplantation. Cette technique de culture est de plus en plus utilisée dans le domaine de l'ingénierie tissulaire, notamment car la structure 3D du biomatériau permet aux CSM de se différencier en cellule spécialisée (Cesarz and Tamama 2015). Grâce aux progrès technologiques, ces biomatériaux peuvent être conçus par impression 3D, couche par couche. (Wu et al. 2019; Messaoudi et al. 2020).

La composition du biomatériau peut varier, il est possible de trouver des biomatériaux naturels ou synthétiques. Plusieurs études utilisent un biomatériau avec, pour composante cellulaire, des cellules souches/stromales mésenchymateuses. En septembre 2021, 19 essais cliniques répertoriés sur Clinical Trials utilisent un biomatériau naturel de collagène composé de CSM. Toutefois, d'autres biomatériaux naturels sont confectionnés dans le domaine de l'ingénierie tissulaire des CSM, ils peuvent être constitués d'acide hyaluronique, d'alginate ou bien de chondroïtine sulfate. Des biomatériaux synthétiques sont aussi élaborés avec l'ajout de CSM, notamment avec des polymères comme le Poly- ξ -caprolactone (PCL), l'acide polylactique-co-glycolique (PLGA) ou le phosphate tricalcique (β -TCP) composé de sels de calcium (Leo and Grande 2006; Won et al. 2016; Xu et al. 2019). Un seul essai clinique a été rapporté

comme utilisant un biomatériau synthétique de PLGA combiné à des CSM-MO autologues dans le but de traiter des kystes osseux anévrisimal (donnée issue du site Clinical Trial et répertoriée en septembre 2021).

Différentes techniques de fabrication peuvent être mises en œuvre afin de réaliser ces biomatériaux. Les procédés de fabrication les plus courants sont en hydrogel, en éponge ou en maillage (G. Chen, Ushida, and Tateishi 2000; 2001; Almouemen, Kelly, and O’Leary 2019).

d. La fonctionnalisation

Afin de rendre fonctionnel le néo-tissu, la fonctionnalisation du complexe cellules-biomatériau est indispensable. Elle permet ainsi de reproduire les conditions physiologiques dans lesquelles se trouve le tissu cartilagineux.

Cette fonctionnalisation peut se faire de différentes façons, par l’ajout de facteurs de croissance comme le TGF- β , la BMP de type II, le FGF ou l’*insulin like growth factor-one* (IGF-1). Ces facteurs de croissance sont les plus utilisés pour l’ingénierie tissulaire du cartilage puisqu’ils font partie de la classe des morphogènes et possèderaient alors un potentiel chondrogénique (Correa and Lietman 2017).

La fonctionnalisation peut aussi être effectuée par la mise en place de contraintes mécaniques comme des contraintes de compression, d’étirement, de cisaillement ou de déformation. Ces différentes contraintes ont des effets sur la fonctionnalité de la matrice des cellules et donc sur le développement tissulaire (Dado and Levenberg 2009).

De nombreuses recherches ont déjà été publiées sur le sujet et les résultats semblent encourageants. Cette régénération du cartilage a pu être étudiée *in vitro* avec des CSM issues de nombreuses sources, intégrées dans différents types de biomatériaux. Comme l’a montré l’équipe de Ponticiello *et al*, avec des CSM issues de moelle osseuse cultivées dans un biomatériau en éponge de gélatine (Ponticiello et al. 2000). Tandis que d’autres laboratoires utilisent des hydrogels constitués d’alginate et d’acide hyaluronique avec des CSM originaires de la moelle osseuse (Schiavi et al. 2012) ou de la gelée de Wharton (Aleksander-Konert et al. 2016). Bien d’autres exemples peuvent être cités, comme l’utilisation de CSM de tissus adipeux cultivées en sphéroïdes constitués de chitosan et hyaluronane (G.-S. Huang et al. 2014). Les résultats issus de ces multiples études affirment que les CSM cultivées dans ces différents biomatériaux génèrent un environnement favorable à leur différenciation chondrocytaire.

D'autres expérimentations ont aussi été pratiquées, *in vivo*, sur différents modèles animaux comme chez le rat avec des CSM du liquide synovial incorporées dans des éponges de collagène (Neybecker et al. 2018), ou encore avec des CSM du liquide arthrosique dans un biomatériau composé d'un hydrogel constitué de poly(éthylène glycol) diacrylate et d'acide hyaluronique (J. Li et al. 2018). Des investigations ont aussi été faites dans des modèles animaux de plus grande taille comme chez le lapin (Khalilifar et al. 2019), le chien (Sasaki et al. 2019) ou encore le mouton avec des CSM humaines issues de la moelle osseuse et cultivées dans un biomatériau d'alginate enrichi en acide hyaluronique (Keller et al. 2019; Music, Futrega, and Doran 2018). Tous ces résultats tendent à montrer que les CSM sont capables de promouvoir la réparation du cartilage *in vivo*.

Pour conclure, l'ingénierie tissulaire des CSM apparaît prometteuse pour la régénération du cartilage et même de l'os sous-chondral. La greffe allogénique semble être une alternative à la seule condition que les propriétés immunomodulatrices des cellules soient maintenues au cours de la différenciation.

2. Applications en thérapie cellulaire

Les CSM ont été utilisées de nombreuses fois en ingénierie tissulaire grâce à leur potentiel de régénération mais elles peuvent aussi être exploitées en thérapie cellulaire. Ce qui signifie d'utiliser des cellules humaines seules à des fins thérapeutiques en l'occurrence ici les cellules souches/stromales mésenchymateuses.

a. Thérapie à base de cellules souches/stromales mésenchymateuses pour la GvH, le sepsis et la COVID-19

Les CSM pourraient être utilisées dans de nombreuses pathologies en clinique. Depuis plusieurs années, les chercheurs s'intéressent à l'utilisation de CSM en conditions autologues mais aussi allogéniques dans différents types de pathologies. Dans cette partie nous décrirons 3 pathologies distinctes dans lesquelles l'utilisation des CSM apparaît bénéfique : la maladie du greffon contre l'hôte (GvH), le sepsis et la COVID-19.

Les CSM sont très étudiées afin d'être employées dans la GvH. Cette pathologie est la première complication survenant après allogreffe de cellules souches hématopoïétiques, et survient dans 30 à 50% des cas une réaction de GvH aiguë. L'incidence de la maladie du greffon contre l'hôte chronique est de 14% et n'apparaît que plus tardivement. La GvH aiguë

correspond à l'attaque des tissus sains du receveur (foie, peau, tube digestif, intestin lésés par le conditionnement) par les LT du donneur. La première ligne de traitement est la corticothérapie systémique. Cependant certaines GvH aiguës sont cortico-résistantes et nécessitent l'ajout d'autres lignes de traitements comme les immunosuppresseurs. Par leurs propriétés immunomodulatrices, les CSM apparaissent être une bonne alternative. Dans le cas de cette pathologie, les CSM sont utilisées en situation allogénique. Elles sont préalablement congelées, ce qui permet une utilisation rapide. De nombreuses études peuvent être citées concernant l'utilisation de CSM dans le cas de la maladie du GvH. La plupart de ces études répertoriées utilisent des CSM issues de la moelle osseuse (Godoy et al. 2019; Elgaz et al. 2019). En 2008, l'équipe de Le Blanc *et al* a traité des patients résistants aux stéroïdes par injection de CSM-MO allogéniques avec en moyenne $1,4 \times 10^6$ cellules/kg de patients. Parmi les 55 patients, 30 ont résolu complètement leur GvH et 9 patients ont amélioré leur GVH sans la résoudre totalement (réponse partielle) (Le Blanc et al. 2008). Une autre étude, plus récente, a montré les bénéfices de l'utilisation de CSM-MO enrichies à partir de ponction de moelle osseuse dans des cas de GvH réfractaires aux stéroïdes. Ces chercheurs ont pu prouver la sécurité ainsi que l'absence de toxicité de l'injection d'un *pool* de CSM-MO sur une cohorte de 69 patients. Les résultats de cette études étaient encourageants puisque 83% des patients étaient en rémission complète ou partielle 28 jours après leur injection (Bader et al. 2018).

Pour finir, une étude exclusivement pédiatrique a pu montrer l'effet bénéfique de l'injection de CSM avec une amélioration des atteintes cutanées, des symptômes gastro-intestinaux ainsi que de la fonction hépatique (Ball et al. 2013).

Toutes ces investigations démontrent que les CSM ont un réel effet thérapeutique dans le cas de la maladie du greffon contre l'hôte et qu'il est nécessaire de continuer les recherches cliniques à base de CSM dans le cas de cette pathologie.

Les CSM sont aussi étudiées dans le but d'être utilisée chez des patients en sepsis. A ce jour, aucun traitement ne semble efficace pour lutter contre cette pathologie. Par définition, le sepsis est caractérisé par une ou plusieurs dysfonctions d'organes engendrées par une réponse dérégulée de l'hôte due à une infection prouvée ou suspectée et menaçant le pronostic vital. Ces dysfonctions sont évaluées par des critères cliniques et biologiques grâce au score *Sepsis-related Organ Failure Assessment* (SOFA) ≥ 2 .

La physiopathologie du sepsis est un processus très complexe qui altère l'homéostasie du système immunitaire conduisant à la fois à une suractivation et à une suppression de la réponse immunitaire (figure 21). D'autres dérégulations sont associées comme une coagulation

augmentée, un dysfonctionnement cellulaire avec une incapacité à éliminer les agents pathogènes et la présence de lésions organiques (Remick 2007).

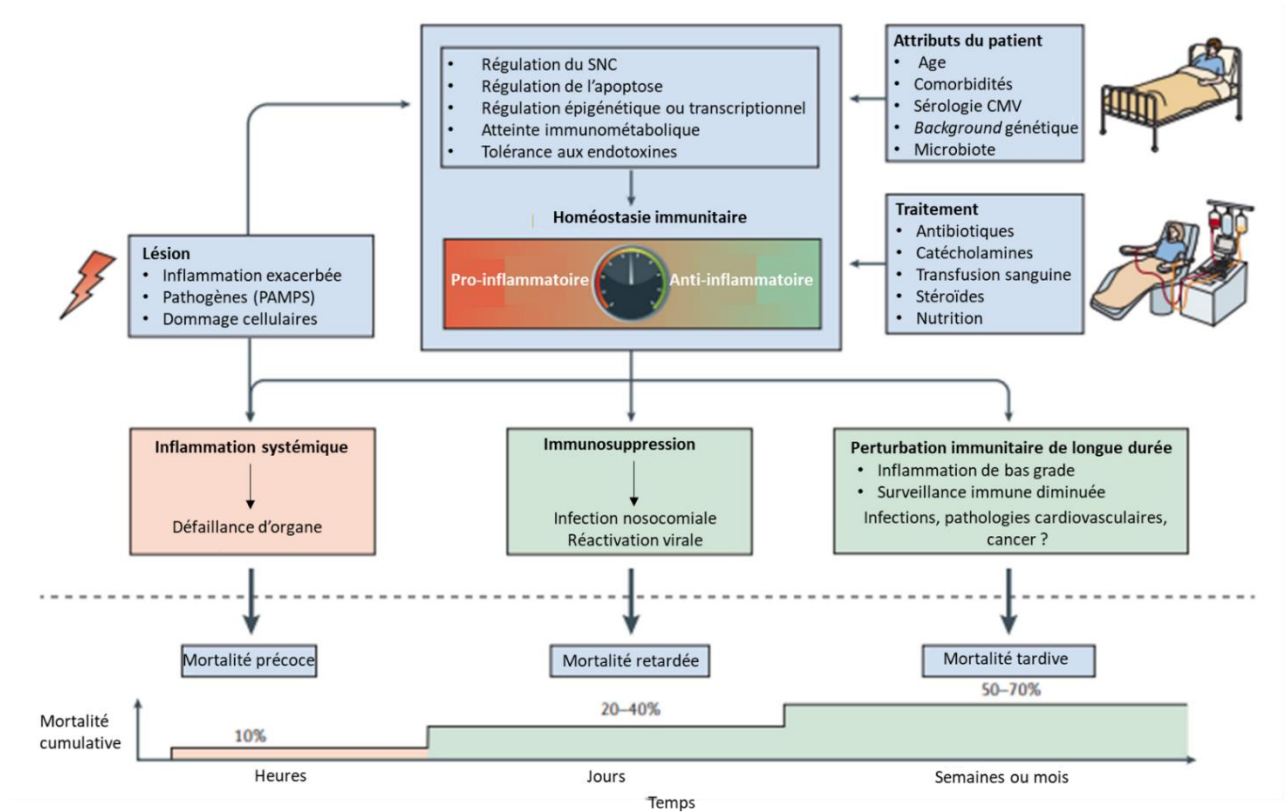


Figure 21 Mécanismes d'immunosuppression induits par le sepsis. Cette réponse immunitaire est complexe et varie dans le temps. Cytomégalovirus CMV ; *Pathogen Associated Molecular Patterns* PAMP (Adapté de Venet and Monneret 2018)

Le choc septique quant à lui est défini par des perturbations circulatoires, cellulaires et métaboliques profondes. Le pronostic vital du patient est engagé dans cette phase ultime que constitue le choc septique. Les critères cliniques nécessitent de recourir à un traitement par vasopresseur en dépit d'un remplissage vasculaire adéquat (Lemarié and Gibot 2020).

Grâce à leurs propriétés immunomodulatrices, la thérapie cellulaire utilisant les CSM apparaît aujourd'hui comme une alternative très intéressante pour traiter le sepsis mais aussi la COVID-19. Ces cellules pourraient moduler l'inflammation sans accentuer l'immunoparalysie. Ainsi, dans un contexte d'anergie cellulaire, elles pourraient présenter un phénotype pro-inflammatoire (CSM 1), permettant de réduire l'apoptose et de favoriser la survie des lymphocytes T. En revanche, en cas d'inflammation, ils pourraient adopter un phénotype immunosuppresseur et anti-inflammatoire (CSM 2). Ce changement de phénotype dépend principalement du niveau de l'environnement inflammatoire dans lequel se trouve le patient (figure 22).

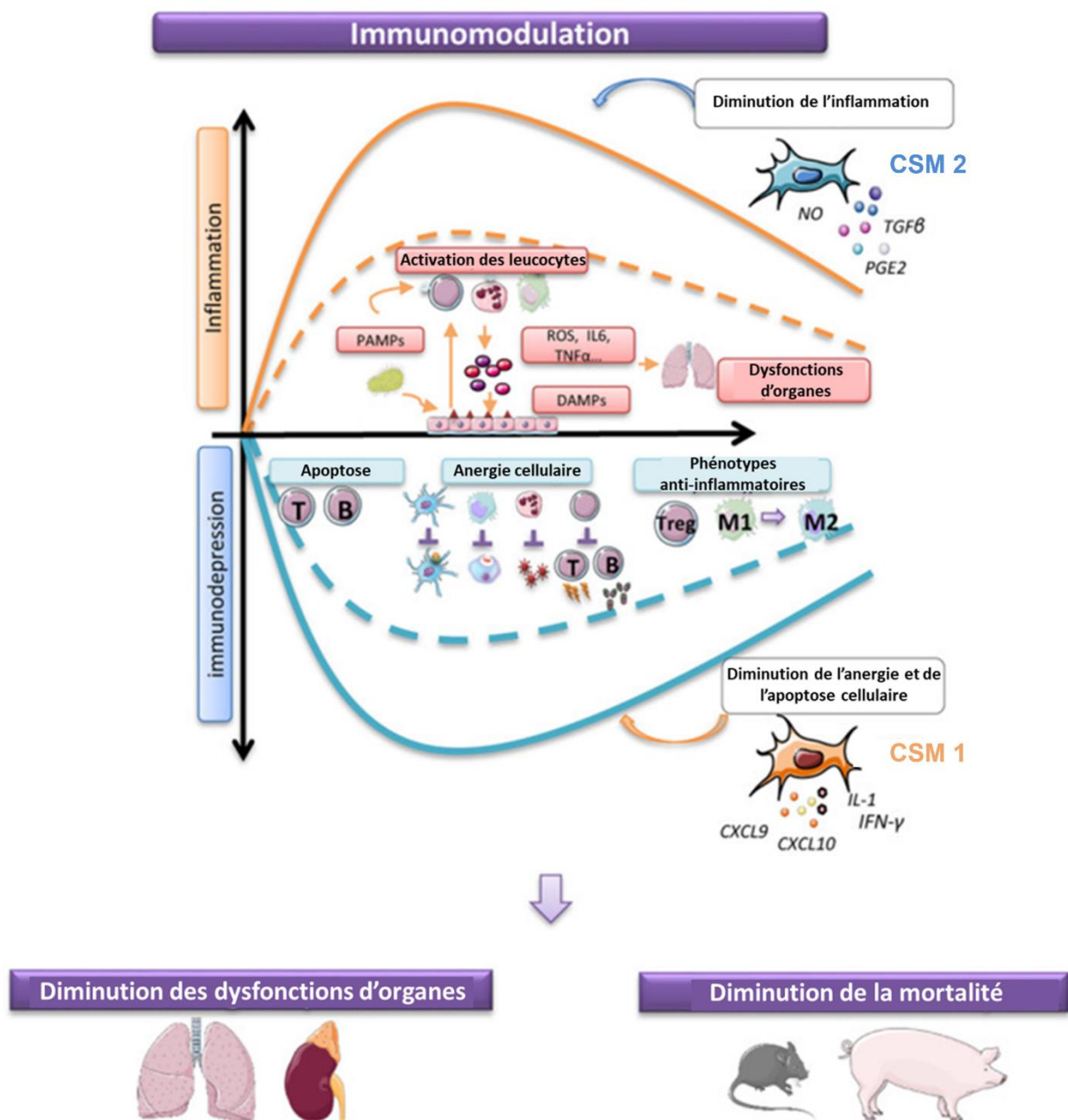


Figure 22 Physiopathologie du sepsis et rôle des cellules souches/stromales mésenchymateuses dans son traitement. Dans le sepsis, la prise en charge thérapeutique doit pouvoir s'adapter au contexte inflammatoire dans lequel se trouve le patient et, dans le même temps, améliorer les défaillances d'organes. La capacité des CSM moduler son phénotype peut s'avérer intéressante dans cette pathologie. En effet, en fonction du contexte inflammatoire, les CSM peuvent adopter soit un phénotype CSM 1 (pro-inflammatoire) soit CSM 2 (anti-inflammatoire) (Adapté de Laroye et al. 2020)

De plus, les CSM possèdent une action antibactérienne. Elles ont également la capacité de migrer vers les organes lésés et d'y exercer un effet pro-angiogénique et anti-apoptotique afin de stabiliser les dysfonctions d'organe. Associées aux propriétés immunitaires, cela semble

permettre de contrer la défaillance d'organe ainsi que la mortalité dues à un choc septique (Laroye et al. 2017).

Pour appuyer ces théories, des études ont été menées au sein de notre équipe avec injection de CSM-MO ou de cordon ombilical dans un modèle murin de choc septique induit par la méthode de ligature et ponction du cæcum (CLP). Les résultats ont montré que seules les CSM-GW décongelées permettaient d'améliorer significativement la survie des animaux ainsi que la clairance bactérienne (Laroye, Boufenzler, et al. 2019). Une étude réalisée dans un modèle porcin de péritonite sévère a permis de montrer l'effet des CSM-GW décongelées sur l'amélioration significative des paramètres hémodynamiques, le retard à l'injection des catécholamines pour le maintien de la pression artérielle et l'amélioration des fonctions d'organes (pulmonaires, rénales, etc., l'ensemble ayant un impact sur l'amélioration de la survie (Laroye et al. 2018).

Une étude élaborée chez l'Homme, a montré que l'injection de CSM chez des patients en choc septique était bien tolérée, et qu'aucune augmentation de médiateurs pro-inflammatoires et des marqueurs du dysfonctionnement organique n'a été détecté. De plus, il semblerait que l'inoculation de CSM ait permis d'atténuer certaines cytokines pro-inflammatoires (Schlosser et al. 2019).

Ces résultats seraient donc encourageants pour améliorer la prise en charge des patients en sepsis ou choc septique, même si d'autres recherches doivent être consacrées pour comprendre la biologie des CSM dans cette pathologie.

Plus récemment, les CSM ont été mises à l'essai dans le Syndrome de Détresse respiratoire aigüe de la COVID-19 engendré par le virus SARS-CoV-2.

Les cas graves de COVID-19 rapportent des mécanismes lésionnels similaires au choc septique, ils se caractérisent par une augmentation de cytokines et chimiokines pro-inflammatoires, une réponse cellulaire immunitaire aberrante, des indices de coagulation anormaux, des lésions d'organes ainsi qu'une insuffisance respiratoire et cardiovasculaire, tout cela pouvant conduire au décès du patient (Fanping Meng et al. 2020). A ce jour, aucun traitement antiviral n'est efficace pour traiter cette pathologie, les corticoïdes et certains anticorps monoclonaux anti-cytokines ayant permis une amélioration clinique. C'est pourquoi de nombreux chercheurs se penchent sur l'utilisation des CSM pour en diminuer les conséquences. Ceci semble possible car les CSM ont la capacité de moduler le système immunitaire innée mis en jeu par les LT CD4 et CD8, les cellules dendritiques, les macrophages et les cellules NK mais aussi par la sécrétion de facteurs solubles. Parallèlement au choc septique, l'inflammation due à la COVID-

19 engendre un relargage cytokinique, ainsi les CSM semblent alors capables de diminuer ce relargage et pourrait être un traitement favorable pour cette pathologie émergente. Au vu de ce qu'il a été observé et décrit précédemment quant au piégeage pulmonaire induit après migration des CSM administrées par voie intraveineuse, celles-ci semblent bénéfiques en ce qui concerne des pathologies pulmonaires comme la COVID-19 (Yadav et al. 2020; Golchin, Seyedjafari, and Ardeshtyrlajimi 2020; Jeyaraman et al. 2021).

En septembre 2021, 84 essais cliniques sont répertoriés sur le site Clinical Trials sous le nom « *COVID-19 and mesenchymal stem cell* ». De nombreux essais ont été également réalisés en Chine et répertoriés sur le registre chinois des essais cliniques. Ceci montre bien l'intérêt porté à l'application de ces cellules dans cette pathologie.

Des premiers résultats ont montrés, après injection de CSM dérivées de la gelée de Wharton chez des patients atteints de la COVID-19, des réductions de l'inflammation sans aucune complication grave (Saleh et al. 2021; Lanzoni et al. 2021).

Toutes ces études attestent bien des effets thérapeutiques des cellules souches/stromales mésenchymateuses issues de sources différentes et ce dans des pathologies telles que la GvH, la sepsis, la COVID-19 et bien d'autres.

b. Thérapies commercialisées à base de CSM

Aux vues des recherches menées sur les CSM, celles-ci apparaissent bénéfiques lors de leur utilisation en clinique. Cela est particulièrement vrai pour ces quelques pathologies pour lesquelles les CSM ont été approuvées et commercialisées dans certains pays (Gao et al. 2016; Mebarki et al. 2021).

Un traitement pour l'arthrose dégénérative est commercialisé en Corée (*Cartistem*). Ce traitement utilise des CSM allogéniques dérivées du sang de cordon ombilical et est administré dans la lésion à la posologie de $2,5 \times 10^6$ cellules/500 μ l/cm² de défaut cartilagineux. Un autre traitement est commercialisé en Corée, pour traiter les fistules engendrées par la maladie de Crohn (*Cupistem*). Il utilise des CSM autologues dérivées du tissu adipeux.

D'autres traitements sont commercialisés pour la maladie du Greffon contre l'hôte (*Prochymal Remestemcel-L/ Ryoncil*) au Canada et en Nouvelle-Zélande, qui est composé de CSM-MO allogéniques issues d'un donneur non apparenté. Il est injecté en IV à raison de 2×10^6 cellules/kg de patient. Au Japon *Temcell* est vendu pour traiter la GvH, ce traitement est

constitué d'un *pool* de CSM-MO issues de différents donneurs. Il est administré de la même manière et à la même dose que *Ryoncil*.

En Europe, une autorisation de mise sur le marché a été accordée pour un traitement à base de cellules souches adipeuses pour les fistules anales complexes chez les adultes atteints de la maladie de Crohn (*Alofisel*). Il est composé de 30 millions de cellules par flacon à raison de 4 flacons par boîte.

De plus, une désignation orpheline a été accordée par la Commission européenne à *Medac Gesellschaft für klinische Spezialpräparate mbH*, (Allemagne) pour le traitement de la GvH, via l'utilisation de CSM dérivées de moelle osseuse.

Encore aujourd'hui, en octobre 2021, 1332 essais cliniques sont répertoriés sous le nom « cellules souches mésenchymateuses ». Comme nous avons pu le voir tout au long de cette partie, les CSM sont profitables dans les domaines de l'ingénierie tissulaire et de thérapie cellulaire.

Objectifs

A travers l'état de l'art, il apparaît que les conditions d'expansion impactent les propriétés des CSM et que les signaux que ces cellules perçoivent au cours de cette étape d'amplification peuvent modifier leur différenciation, leurs propriétés immunomodulatrices et migratoires. Dans ce travail de thèse, nous souhaitons mesurer le bénéfice d'un préconditionnement de CSM-GW pour une application en médecine régénérative, que ce soit pour l'ingénierie tissulaire ou la thérapie cellulaire.

Pour cela, nous avons étudié, dans un premier temps, un contexte d'ingénierie tissulaire appliqué au cartilage (figure 23). Cette première étape a été réalisée dans le cadre d'un projet ANR et consistait à **évaluer le maintien des propriétés immunomodulatrices des CSM-GW lorsque ces dernières sont amenées à se différencier** dans un modèle de culture 3D. Ce biomatériau issu de BPF était composé d'un hydrogel d'alginate enrichi en acide hyaluronique. Dans la mesure où ces biomatériaux contenant les CSM seront utilisés en conditions allogéniques avec potentiellement une dominante inflammatoire, nous avons mimé *in vitro* un contexte inflammatoire avec de l'Interféron-gamma et du Tumor Necrosis alpha ajoutés à la culture pendant 48h à différents temps de la différenciation. Cela nous a permis **d'évaluer la réponse des CSM à ce préconditionnement et de savoir si dernier perturbait le potentiel de différenciation des cellules.**

La suite de notre travail s'est ensuite orientée vers la thérapie cellulaire et plus spécifiquement vers l'impact d'un préconditionnement sur les propriétés immunomodulatrices et migratoires des CSM-GW utilisables pour des applications de thérapie cellulaire comme le sepsis/choc septique. Au cours de la culture cellulaire, de nombreux paramètres sont à prendre en compte (densité d'ensemencement, teneur en oxygène, niveau de confluence...) pour optimiser le rendement de la production sans altérer ni le phénotype cellulaire ni leurs fonctions. S'il est maintenant reconnu que certains facteurs physiques, comme la teneur en oxygène, modifient la plasticité des cellules, peu d'informations sont publiées sur l'impact de la confluence sur le phénotype immunomodulateur et migratoire des CSM-GW. La deuxième étape de ce travail a donc été d'analyser les **effets de la confluence cellulaire sur le phénotype immunomodulateur et migratoire des cellules.**

Enfin, dans la troisième et dernière étape de notre projet, nous sommes partis du constat que les équipes qui fonctionnalisait des CSM par préconditionnement pour une application donnée centraient toujours leur recherche sur les fonctions attendues chez les CSM pour cette application. En revanche, l'impact du préconditionnement sur la capacité des CSM à migrer vers le site d'intérêt n'est jamais pris en compte y compris lorsque les CSM doivent être injectées en IV. Nous avons donc tenu à étudier différents préconditionnements cellulaires pouvant être utilisés pour fonctionnaliser les CSM dans une application de sepsis et voir comment ces **préconditionnements modulaient les propriétés immunomodulatrices et migratoires des cellules**. Les préconditionnements utilisés étaient ceux déjà décrits dans la littérature pour cette application à savoir : l'acide polyinosinique-polycytidylique (Poly I :C), le Lipopolysaccharide (LPS) ou encore le couple Interféron-gamma et Tumor Necrosis alpha. Nous avons également voulu comparer la réponse des cellules à ces préconditionnements connus pour *booster* les propriétés immunomodulatrices des cellules à un préconditionnement avec du Stromal cell-derived factor 1 (SDF-1) décrit, plutôt, pour favoriser les propriétés migratoires.

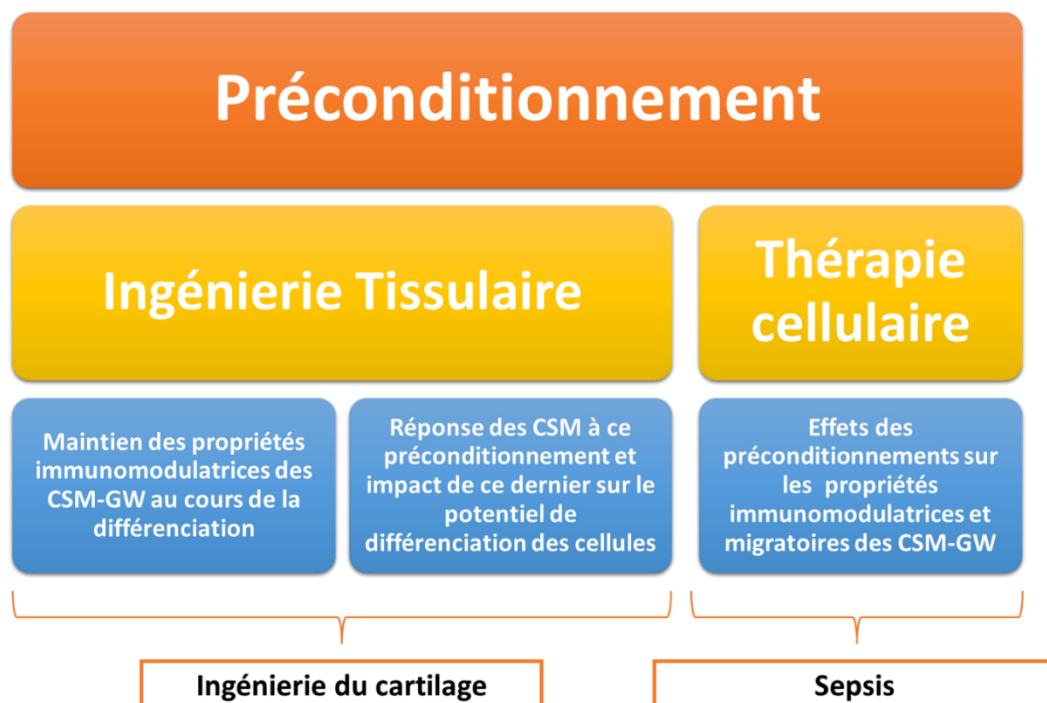


Figure 23 Représentation schématique des différents objectifs de la thèse.

Résultats

I- Etude des propriétés immunomodulatrices pendant la différenciation chondrocytaire des cellules souches/ stromales mésenchymateuses issues de la gelée de Wharton

Article 1 Are the Immune Properties of Mesenchymal Stem Cells from Wharton's Jelly Maintained during Chondrogenic Differentiation?

Charlotte Voisin, Ghislaine Cauchois, Loïc Reppel, Caroline Laroye, Laetitia Louarn, Chantal Schenowitz, Paulin Sonon, Isabelle Poras, Valentine Wang, Edgardo D. Carosella, Nadia Benkirane-Jessel, Philippe Moreau, Nathalie Rouas-Freiss, Danièle Bensoussan and Céline Huselstein

J. Clin. Med. 2020, 9, 423; doi:10.3390/jcm9020423

Intérêts de l'étude :

La première partie de ce projet de thèse est issu du fruit d'une collaboration initiée dans le cadre d'un financement de l'Agence National de la recherche (ANR) entre l'Unité de Thérapie cellulaire et banque de tissus (UTCT) du CHRU de Nancy, le laboratoire IMoPA, le CEA-IMETI de l'Hôpital Saint-Louis de Paris ainsi que l'UMR 1260 de l'INSERM-UNISTRA de Strasbourg. L'objectif de ce projet ANR-ATYPiCAL (*New Advanced TherapY medicinal Product for Cartilage defect treatment with extemporaneous association of a sCAffold and Wharton's jelly mesenchymaL stromal cells*) est la génération d'un nouveau Médicament de Thérapie Innovante pour le traitement des lésions cartilagineuses composé de cellules souches/stromales mésenchymateuses issues de la Gelée de Wharton et d'une matrice intelligente associées extemporanément.

Cette étude aborde l'utilisation des CSM issues du cordon ombilical et plus principalement de la gelée de Wharton, dans le domaine de l'ingénierie tissulaire. Pour cela, les cellules ont étéensemencées en monocouche jusqu'au passage 3 à l'UTCT. A la fin de ce passage 3, les cellules sont acheminées au laboratoire pour êtreensemencées dans un hydrogel d'alginate enrichi en acide hyaluronique (Alg/HA) et cultivées en condition de grade clinique. Cet environnement 3D est ainsi conçu dans le but d'influencer la différenciation des CSM-GW vers une voie chondrocytaire, pour *in fine*, les utiliser en tant que médicament de thérapie innovante afin de

combler et restaurer des lésions cartilagineuses. Les cellules ont été préconditionnées avec de l'Interféron- γ et du Tumor Necrosis Factor α pendant 48h avant la fin de leur culture en monocouche, ou après 5, 12, 19 ou 26 jours de culture tridimensionnelle, dans le but de mimer un contexte allogénique (figure 24). Aux jours 7, 14, 21 et 28, le potentiel de différenciation des CSM-GW a été étudié grâce à des coupes histologiques des biomatériaux et l'ajout de colorations au rouge Sirius et bleu Alcian, mais aussi par l'analyse de l'expression des collagènes de type I, II et X par cytométrie en flux. La viabilité cellulaire, l'impact du préconditionnement et de l'ensemencement en biomatériau ont été étudiés au cours du temps. Au niveau du potentiel immunomodulateur, les récepteurs liés à la synapse immunologique des CSM-GW ainsi que les molécules clés de l'immunomodulation cellulaire ont été analysés, par cytométrie en flux. Les effets paracrines des cellules ont été dosés par technique ELISA. Des tests fonctionnels d'immunogénicité et d'immunomodulation en culture mixte lymphocytaire ont été entrepris par le laboratoire CEA-IMETI de Paris. Pour terminer, les analyses des transcrits des molécules immunomodulatrices HLA-G ont été déterminés par réaction en chaîne par polymérase (PCR) par ce même laboratoire.

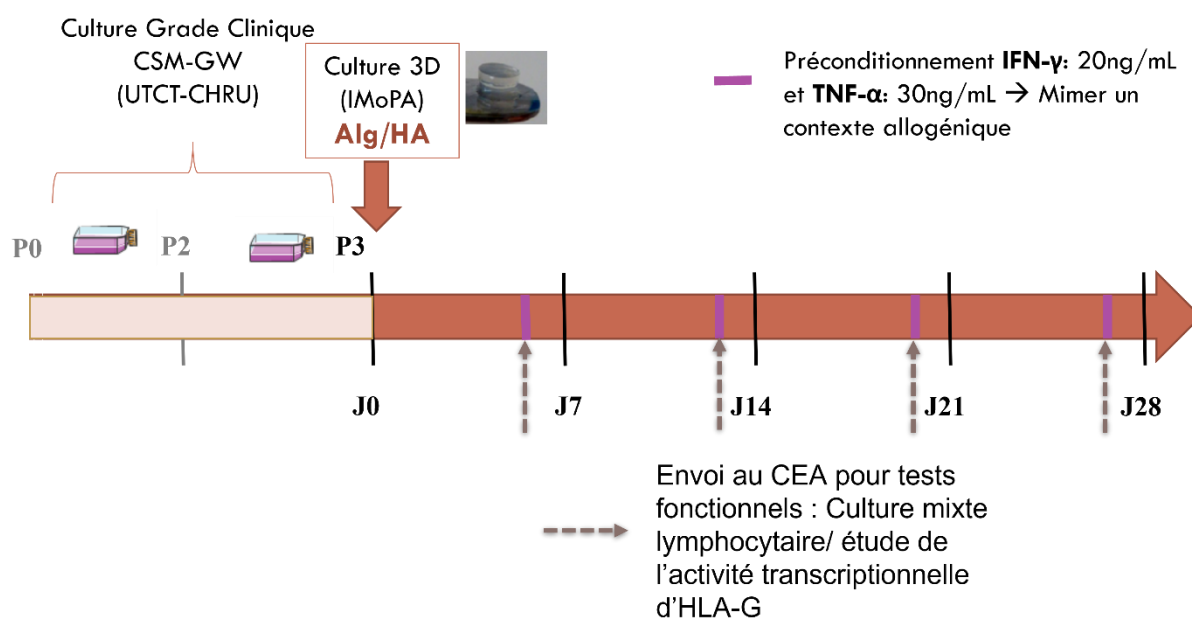


Figure 24 Méthodologie de culture en monocouche et en biomatériaux des cellules souches/stromales mésenchymateuses issues de la gelée de Wharton. La culture en monocouche est faite à l'Unité de thérapie cellulaire et tissulaire (UTCT) de Nancy, du passage 0 (P0) jusqu'à la fin du passage 3 (P3). A la fin du P3, les CSM sont ensemencées en biomatériau au laboratoire IMoPA puis sont cultivées pendant 28 jours (de J0 à J28). Un préconditionnement à l'IFN- γ et au TNF α est appliqué pendant 48h avant les jours 7, 14, 21 et 28 afin de mimer un contexte allogénique. Après chaque préconditionnement, les biomatériaux contenant les CSM sont envoyés au CEA-IMETI de Paris afin de les utiliser dans des tests fonctionnels de culture mixte lymphocytaire ainsi que pour étudier l'activité transcriptionnelle de la molécule HLA-G.

Résultats/ Discussion :

Dans cette étude, nous avons principalement montré qu'une prédifférenciation chondrogénique s'était mise en place à partir de 28 jours d'ensemencement en biomatériau d'Alg/HA. Toutefois, la viabilité cellulaire semblait diminuer au cours de cette différenciation. Pour ce qui est des propriétés immunes, le complexe majeur d'histocompatibilité de type II (HLA DP DQ DR) n'a jamais été exprimé au cours de la différenciation ni après stimulation à l'IFN/TNF. Les *checkpoints* immunitaires, PDL1, IDO ainsi que la molécule soluble HLA-G se sont avérés être exprimées tout au long de la différenciation, avec une diminution au cours du temps. Il est apparu que la stimulation à l'IFN et au TNF permettait d'augmenter l'expression de ces mêmes molécules. De la même manière, cela a été observé sur la sécrétion de facteurs immunomodulateurs comme l'IL6, le PD-L1, la PGE₂ et le TGF- β . Pour terminer, nous avons observé que les cellules cultivées en monocouche ainsi qu'en biomatériau apparaissaient non immunogènes et immunomodulatrices lors de leur usage en culture mixte lymphocytaire.

Les résultats ont montré que la culture des CSM dans un biomatériau d'Alg/HA modulait le phénotype immunomodulateur et/ou l'activité paracrine des CSM en voie de différenciation chondrocytaire (chondro-CSM). Même si le phénotype immunomodulateur semblait diminué, nous avons montré qu'après un engagement des CSM-GW dans la voie chondrocytaire, ces dernières étaient capables de diminuer l'activation des cellules immunitaires et de créer un environnement immunomodulateur propice à un contexte allogénique. Ainsi les CSM-GW ensemencées en biomatériau d'Alg/HA pourraient être utilisées en médecine régénérative dans un contexte allogénique dans le but de combler des lésions cartilagineuses. Des expérimentations *in vivo* font actuellement l'objet d'une nouvelle étude dans l'intention d'utiliser ces chondro-CSM en tant que médicament de thérapie innovante.



Article

Are the Immune Properties of Mesenchymal Stem Cells from Wharton's Jelly Maintained during Chondrogenic Differentiation?

Charlotte Voisin ^{1,2,*}, Ghislaine Cauchois ^{1,2}, Loïc Reppel ^{1,2,3}, Caroline Laroye ^{1,2,3} , Laetitia Louarn ^{4,5}, Chantal Schenowitz ^{4,5}, Paulin Sonon ^{4,5}, Isabelle Poras ^{4,5}, Valentine Wang ^{1,2}, Edgardo D. Carosella ^{4,5}, Nadia Benkirane-Jessel ⁶ , Philippe Moreau ^{4,5}, Nathalie Rouas-Freiss ^{4,5}, Danièle Bensoussan ^{1,3} and Céline Huselstein ^{1,2}

- ¹ UMR 7365 CNRS-Université de Lorraine, Ingénierie Moléculaire et Physiopathologie Articulaire (IMoPA), Biopôle de l'Université de Lorraine, Campus brabois-santé, Faculté de Médecine, 9 Avenue de la Forêt de Haye, BP 184, 54500 Vandœuvre-lès-nancy, France; ghislaine.cauchois@univ-lorraine.fr (G.C.); loic.reppel@univ-lorraine.fr (L.R.); c.laroye@chru-nancy.fr (C.L.); valentinewang21@gmail.com (V.W.); d.bensoussan@chru-nancy.fr (D.B.); Celine.Huselstein@univ-lorraine.fr (C.H.)
- ² UMS2008 IBSLor, Campus brabois-santé, 9 Avenue de la Forêt de Haye, BP20199, 54500 Vandœuvre-lès-nancy, France
- ³ CHRU de Nancy, Unité de Thérapie Cellulaire Banque de Tissus, 54500 Vandœuvre-lès-Nancy, France
- ⁴ CEA, DRF-Institut François Jacob, Service de Recherches en Hémato-Immunologie, Hôpital Saint-Louis, 75010 Paris, France; laetitia.louarn@gmail.com (L.L.); Chantal.Schenowitz@cea.fr (C.S.); paulinsonon@gmail.com (P.S.); isabelle.poras@cea.fr (I.P.); edgardo.carosella@cea.fr (E.D.C.); philippe.moreau@cea.fr (P.M.); nathalie.rouas-freiss@cea.fr (N.R.-F.)
- ⁵ Université de Paris, CEA, U976 HIPI Unit (Human Immunology, Physiopathology, Immunotherapy), Institut de Recherche Saint-Louis, 75010 Paris, France
- ⁶ INSERM-UNISTRA UMR1260, Regenerative Nanomedicine laboratory, Faculté de Médecine, FMTS, Strasbourg CEDEX F-67085, France; nadia.jessel@inserm.fr

* Correspondence: charlotte.voisin@univ-lorraine.fr; Tel.: +33-372-74-6585



Received: 20 December 2019; Accepted: 28 January 2020; Published: 4 February 2020

Abstract: Background: Umbilical mesenchymal stem/stromal cells (MSCs), and especially those derived from Wharton's jelly (WJ), are a promising engineering tool for tissue repair in an allogeneic context. This is due to their differentiation capacity and immunological properties, like their immunomodulatory potential and paracrine activity. Hence, these cells may be considered an Advanced Therapy Medicinal Product (ATMP). The purpose of this work was to differentiate MSCs from WJ (WJ-MSCs) into chondrocytes using a scaffold and to evaluate, in vitro, the immunomodulatory capacities of WJ-MSCs in an allogeneic and inflammatory context, mimicked by IFN- γ and TNF- α priming during the chondrogenic differentiation. Methods: Scaffolds were made from hydrogel composed by alginate enriched in hyaluronic acid (Alg/HA). Chondrogenic differentiation, immunological function, phenotype expression, but also secreted soluble factors were the different parameters followed during 28 days of culture. Results: During chondrocyte differentiation, even in an allogeneic context, WJ-MSCs remained unable to establish the immunological synapse or to induce T cell alloproliferation. Moreover, interestingly, paracrine activity and functional

immunomodulation were maintained during cell differentiation. Conclusion: These results show that WJ-MSCs remained hypoimmunogenic and retained immunomodulatory properties even when they had undergone chondrocyte differentiation.

Keywords: mesenchymal stem/stromal cells; immunomodulation; cell differentiation; allogeneic context; Advanced Therapy Medicinal Product

1. Introduction

For several years, regenerative medicine and tissue engineering (TE) have been hot fields in basic and clinical research. They rely on the replacement, repair, or restoration of injured tissue using scaffolds associated with stem cells [1]. Human mesenchymal stem/stromal cells (MSCs) seem very promising in this area for regenerating non-functional tissues because of their differentiation properties (adipocytes, chondrocytes, or osteocytes) [2–4].

First isolated from bone marrow in 1976 by Friedenstein, MSCs are described as fibroblastic cells of a mesodermal origin. Nowadays, MSCs can be isolated from a variety of other tissues including periosteum, trabecular bone, adipose tissue, synovial membrane, skin, or skeletal muscles [3]. They can also be found in fetal tissues like the placenta or the conjunctive tissue of the umbilical cord matrix, named Wharton's jelly (WJ) [5]. Although Wharton's jelly mesenchymal stem/stromal cells (WJ-MSCs) share similar characteristics with MSCs from adult tissues, they have higher proliferation potential, can differentiate in a large number of cells [6], and seem more immature based on their immunological properties. All these advantages make WJ a virtually inexhaustible source of stem cells, especially for allogeneic TE therapies. Furthermore, their sampling is neither invasive nor iatrogenic compared to adult tissue.

For degenerative osteoarthritic (OA) diseases, a therapeutic option could be the regeneration of cartilage defects. Thus, TE is a promising alternative that involves the development of biological substitutes composed of cells embedded into natural or synthetic scaffolds. Cartilage TE is based on three main aspects: the cell source, a three-dimensional (3D) framework that mimics the physiological environment of the tissue, and, finally, complete functionalization to reach the expected biological functions [7]. Regarding the cell source, MSCs, thanks to their ability to differentiate into various cells, are good candidates to differentiate in a 3D environment [8]. Indeed, a 3D environment is necessary to create an effective chondro-differentiation, most often using scaffolds. These scaffolds should be biodegradable or bioresorbable, biocompliant, non-immunogenic, and non-toxic for clinical use. Many types of scaffold can be built, like hydrogel, sponge, or mesh. They can be natural (alginate, hyaluronic acid, collagen, and fibrin) or synthetic (poly lactic-co-glycolic acid (PLGA) or polycaprolactone (PCL)). In this work, we chose to use alginate (Alg), a monophasic biomaterial that seems to provide an advantageous environment for chondrogenic differentiation. Alginate is a polysaccharide with a chemical structure composed of mannuronic acid (M) and guluronic acid (G); it can be mixed with an extracellular matrix component like hyaluronic acid (HA), a cartilage matrix component [9,10]. Functionalization may be achieved by adding growth factors such as Type 2 Bone Morphogenic Protein (BMP2) or Transforming Growth Factor- β (TGF- β) [9–12].

More recently, MSCs have been studied for their immunomodulatory properties. These cells can escape from the recipient's immune system and modulate it, allowing their use in an

allogeneic context. The immune properties of MSCs rely on three main mechanisms: the arrest of the cell cycle of immune cells at the G1 phase, a direct interaction of MSCs with immune cells, and a paracrine effect. They express neither major histocompatibility complex class II (MHC-II) nor the costimulatory molecules: CD80, 86, and 40, which are important molecules of the immunological synapse. Consequently, they are not recognized by CD4+ T lymphocytes and cannot activate T cells [13–15]. It was also reported that MSCs have anti-inflammatory properties in a pro-inflammatory context in the presence of Interferon- γ (IFN- γ). This immunosuppressive activity is related to the expression of a strong immune checkpoint molecule, Programmed Death-Ligand 1 (PD-L1) named CD274 or even B7-H1. When these ligands are expressed on the cell surface, they bind to the PD-1 receptor on T cells and allow their inactivation. Immunomodulation has also been linked to other molecules such as Indoleamine 2,3 dioxygenase (IDO). This enzyme (IDO) induces regulatory T cells by depleting tryptophan from the extracellular environment, secondarily preventing proliferation of T cells [16].

A non-classic HLA class I molecule, i.e., HLA-G (a molecule involved in maternofetal tolerance) has been implicated in MSC-mediated immunomodulation by direct (membrane) or indirect (soluble) contact [17]. HLA-G molecules expressed by MSCs fulfill an important function since the blockade of HLA-G with neutralizing antibodies was shown to reverse the ability of MSC to (i) generate the in vitro expansion of CD4+CD25+ FoxP3+ regulatory T cells, (ii) inhibit the alloproliferative T cell response, and (iii) suppress the cytotoxic function of Natural Killer (NK) cells. These results show that HLA-G molecules actively contribute to the immunomodulatory properties exhibited by MSCs [18]. MSCs can secrete many other soluble factors, such as growth factors, cytokines, chemokines or immune molecules, to create an immunosuppressive environment. These soluble factors will behave as mediators suppressing the proliferation of NK or T cells, especially with Prostaglandin E2 (PGE-2), Transforming Growth Factor- β (TGF- β) or Hepatocyte Growth Factor (HGF). Moreover, several cytokines, like Interleukin 6 and 10 (IL-6 and IL-10), have also been involved in this mechanism, to prevent inflammation and the differentiation of dendritic cells. Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) was suggested to act in anti-apoptosis and inflammation modulation [15,19]. Other soluble molecules and chemokines may also contribute to immunosuppression, among them PD-L1, which can be secreted to induce tolerance [20].

In this study, we designed a biomaterial using MSCs from Wharton's jelly as an Advanced Therapy Medicinal Product (ATMP). However, the persistence of the immune properties of WJ-MSCs during chondrogenic differentiation remains unknown, especially when WJ-MSCs are embedded into a scaffold and submitted to an allogeneic context. Therefore, the aim of this study was to investigate immunomodulatory properties of this innovative product manufactured with WJ-MSCs encapsulated in an alginate-based hydrogel enriched with hyaluronic acid (Alg/HA) to guide chondrocyte differentiation.

2. Experimental Section

2.1. Human Umbilical Cord Collection, Wharton Jelly-Mesenchymal Stem Cell Isolation, Expansion, and Conservation

Umbilical cords ($n = 7$, named C1 to C7) were collected at the Maternity Hospital of Nancy. This collection was approved by the Nancy Hospital ethics committee and French Ministry of Research (No. DC-2014-2114). All the productions of WJ-MSCs were performed in clinical grade conditions with a complete medium containing α -MEM culture medium (Macopharma, Mouvaux, France) enriched with 5% Platelet lysate (Macopharma, Mouvaux, France) and

according to good manufacturing practices. After brief immersion of the umbilical cord in an antibiotic-antifungal solution, it was cut into thin sections and placed in small flasks (Dutscher, France) containing a complete medium at 37 °C and 5% CO₂ under hypoxia conditions (2% of O₂). The medium was changed after 4 to 5 days. After 10 days, when cell migration was observed, cord pieces were removed and the medium changed.

At the end of Passage 0 (P0), when 80–90% subconfluence was reached, WJ-MSCs were rinsed with

Phosphate Buffered Saline (PBS, Macopharma, Mouvaux, France), detached by trypsin action (TrypLe,

Fischer Scientific, France) and washed by centrifugation. The cells were seeded in Passage 1 (P1) with a seeding kit (Macopharma, Mouvaux, France) in CellStack culture containing two chambers (Macopharma, Mouvaux, France) at a density of 1000 cells per cm². At the end of Passage 2 (P2), WJ-MSCs were frozen in a cryopreservation solution (80% albumin and 20% DMSO) and stored in vapor phase nitrogen. For thawing, WJ-MSCs were quickly thawed and washed before being cultivated at 37 °C under hypoxic conditions, as previously described. After reaching 80–90% subconfluence, WJ-MSCs were harvested to be seeded in Alg-based hydrogels. This step corresponded to Day 0 (D0) of the chondro-differentiation process.

2.2. Quality Controls

2.2.1. Donor Serology and MSC Production Sterility

Umbilical cords were tested for HIV, HBV and HCV via a serological and nucleic acid test (NAT), and for HTLV, Syphilis, EBV, CMV, and toxoplasmosis via serological tests. Cells were tested during expansion, at each medium change, trypsinization stage, and before cryopreservation with BacT/Alert device (BioMérieux, Marcy-l'Etoile, France), for aerobic and anaerobic bacteria absence.

2.2.2. MSC Characterization

Before cryopreservation, cells were detached with TrypLe and counted by trypan blue dye exclusion. Immunophenotype and viability of WJ-MSCs were performed using flow cytometry. Cells were stained with antibodies from the Human MSC Analysis Kit (BD Stemflow™, BD Biosciences, San

Diego, CA, USA), including the MSC positive cocktail (CD90-FITC (Fluorescein isothiocyanate), CD105-PerCP-Cy™5.5 (Peridinin Chlorophyll Protein-Cyanin), CD73-APC (Allophycocyanine), CD44-PE (phycoerythrin)) and the MSC negative cocktail (CD45-PE, CD34-PE, CD11b-PE, CD19-PE and HLA-DR-PE). Seven-Amino-Actinomycin D (7-AAD) (BD Biosciences, San Jose, CA, USA) staining

was also performed as a viability assessment.

The clonogenic capacity was evaluated using colony-forming unit fibroblast (CFU-F) assays. MSCs were seeded in T25 flasks, at 10 and 20 cells/cm². They had been cultured for 10 days in the previously described complete medium. Then, they were washed with PBS, fixed with ethanol, stained with a Giemsa solution (Sigma, St. Louis, MO, USA), and rinsed with water. A Colony-forming unit fibroblast of more than 50 cells were scored and the percentage of clonogenicity was calculated based on the ratio of the number of colonies counted and the number of cells seeded.

Adipogenic and osteogenic differentiations were performed according to the manufacturer's instructions (Differentiation Media BulletKits, Lonza, Switzerland). Calcium mineralization was assessed by coloration with Alizarin Red (Sigma, St. Louis, MO, USA), and fluorescent staining was performed with AdipoRed™ (Lonza, Basel, Switzerland) to detect lipid droplets, which were observed by confocal microscopy.

MSC karyotype was performed by the Genetics Laboratory of Nancy Hospital. Mitoses were blocked briefly in the metaphase stage by colchicine, and then subjected to a hypotonic and fixed shock.

Standard cytogenetic analysis was performed in quinacrinebanding (QFQ banding).

2.3. Construction of Scaffolds Seeded with WJ-MSCs for Chondrogenic Differentiation

After the detachment of trypsin-EDTA (0.025%) at P3, WJ-MSCs were washed and seeded, according to previous studies [11,21,22], in a solution of GMP grade alginate (Novamatrix, Sandvika, Norway) enriched in ultrapure hyaluronic acid (Novamatrix, Sandvika, Norway) in a ratio of 4:1 dissolved in 0.9% NaCl. The solution was delivered drop by drop and polymerized with CaCl_2 in plastic inserts contained in a 24-well plate. Afterwards, scaffolds were put in contact with Dubelcco's Modified Eagle Medium High Glucose (DMEM, Sigma, St. Louis, MO, USA) with 1 mM CaCl_2 . Ten percent clinical grade fetal bovine serum (GEHealthcare, HyClone, Fisher Scientific, Illkirch, France), 2mM glutamine, 100 IU/mL penicillin, 100 $\mu\text{g/mL}$ streptomycin and 2.5 $\mu\text{g/mL}$ amphotericin B were added to this medium. DMEM concentrate containing 100 $\mu\text{g/mL}$ sodium pyruvate, 50 $\mu\text{g/mL}$ ascorbic acid, 4 $\mu\text{g/mL}$ L-proline, and 10 nM dexamethasone was also added to the medium. Scaffolds were incubated in hypoxic conditions (5% CO_2 and 2% O_2) at 37 °C; the medium was changed twice a week until Day 28 (D28) of the culture. During these days of differentiation, cells were called chondro-MSCs. After 14 (D14) and 28 (D28) days of culture in scaffolds, the cells were extracted from the hydrogel scaffolds using 55 mM sodium citrate (Sigma, St. Louis, MO, USA) and 50 mM EDTA solution (Merck, Darmstadt, Germany) for 5 min. After centrifugation (300 g, 5 min), flow cytometry, and Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction (RT-PCR) analysis, mixed lymphocyte reactions were performed and compared with MSCs at the end of P3 of monolayer expansion (D0).

2.4. IFN- γ /TNF- α Priming of WJ-MSCs during Monolayer Expansion or Chondro-MSCs in Alg/HA Scaffolds

To mimic the inflammatory environment, cells (WJ-MSCs and chondro-MSCs) were stimulated with IFN- γ (20 ng/mL) and TNF- α (30 ng/mL) (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Germany), which were added to the culture medium. This stimulation occurred 48 hours before sub-confluence for monolayer culture and before D14 and D28 of 3D culture.

2.5. Histology

Scaffolds were fixed in 4% paraformaldehyde (Sigma, France), 100mM sodium cacodylate trihydrate and 10 mM CaCl_2 dissolved in distilled water. They were dehydrated in ethanol baths of different concentrations and included in paraffin. Five micrometer sections were made and stained with sirius red (Sigma, St. Louis, MO, USA) and alcian blue (Searle Diagnostic, High Wycombe, UK) to detect total collagen fibers and proteoglycans, respectively. Images were acquired with the microscope DMD108 using X20 magnification (Leica, Wetzlar, Germany).

2.6. Flow Cytometry Experiments

Immune phenotype (membrane and intracellular) as well as pericellular collagen synthesis were analyzed by flow cytometry at the end of monolayer expansion (prior to encapsulation in the hydrogel) and throughout the scaffold culture. Immunolabeling was performed under saturating conditions; antibodies were considered to bind to surface antigens through monovalent

interaction. Cells removed from Alg-based scaffolds were incubated with PBS/Bovine Serum Albumin 0.5% (PBS/BSA) (Sigma, St. Louis, MO, USA) and stained for 30 min at room temperature with direct membrane antibodies:

CD34-PE, CD73-APC (BD Biosciences, San Jose, CA, USA), CD40-PE, CD80-PE, CD86-FITC (Miltenyi

Biotech, Bergisch Gladbach, Germany), CD45-FITC (Dako Agilent, Santa Clara, CA, USA), CD90-FITC, CD105-PE, CD166-PE (Beckman Coulter, Brea, CA, USA), HLA-DPDQDR-FITC (Sony Biotechnology, San Jose, CA, USA) and PD-L1-APC (eBiosciences, San Diego, CA, USA). We used intracellular staining in order to detect unsecreted soluble molecules localized in the cytoplasm (soluble HLA-G and IDO). The Cytotfix/Cytoperm kit (BD Biosciences, San Jose, CA, USA) was used to permeabilize the membrane according to manufacturer's instructions. Secretion was not blocked as we had not previously observed any difference with secretion blockage. Then, cells were stained for 30 min at room temperature with anti-HLA-G1-FITC (MEM-G9 clone), anti- C-terminal amino acid sequence (22-mer) of soluble HLA-G5 and HLA-G6 proteins-FITC (2A12 clone) (Exbio, Vestec, Czech Republic), and anti-IDO-Alexa Fluor 488 (R&D systems, Minneapolis, MN, USA) antibodies.

WJ-MSCs were incubated for 30 min with rabbit anti-human type I, II, and X collagen antibodies

(1:20) (Abcam, Cambridge, UK). Afterwards, cells were washed with PBS-BSA and centrifuged before being incubated for 30 min with a secondary antibody, a goat anti-rabbit IgG Alexa Fluor 488 (1:20) (Molecular Probes, Eugene, OR, USA). Negative controls were performed to detect cell auto-fluorescence.

Viability was performed with the LIVE/DEAD kit (Invitrogen, Cergy Pontoise, France). Then, cells were analyzed with the Gallios flow cytometer (Beckman Coulter, Brea, CA, USA) with an acquisition of 10,000 events. The cytometer was calibrated daily with Flow-Check Pro fluorospheres (Beckman Coulter, Brea, CA, USA). Flow cytometry results were analyzed with KALUZA software (Beckman Coulter, Brea, CA, USA).

2.7. Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA)

For Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA), cells were cultivated in Passage 3, for monolayer (WJ-MSCs on Day 0), and in biomaterial (chondro-MSCs on Day 7, 14 and 28). Culture media were collected and centrifuged (1000 rpm/min, 5 min) before storage at -20°C . Soluble molecules secreted by WJ-MSCs and chondro-MSCs were measured by direct ELISA for PGE2, and sandwich ELISA for IL-6, IL-10, VEGF, TGF- β 1, HGF, and PD-L1 (DuoSet Kit, R&D Systems, Minneapolis, MN,

USA), as described by the manufacturer. The detection limits were 2500 to 39 pg/mL for PGE2, 600 to 9.38 pg/mL for IL-6, 2000 to 31.3 pg/mL for IL-10, VEGF and TGF- β , 8000 to 125 pg/mL for HGF, and, finally, 10,000 to 156 pg/mL for PD-L1. After media collection, the cells were counted. The supernatants were diluted except for IL-10, and ELISA values were corrected for total cell numbers.

2.8. Mixed Lymphocyte Reaction (MLR)

Mixed Lymphocyte Reaction was performed to test the immunogenic and immunoregulatory properties of WJ-MSCs and chondro-MSCs licensed or unlicensed with inflammatory cytokines. For this purpose, WJ-MSCs or chondro-MSCs pretreated or not pretreated with 20 ng/mL IFN- γ and 30 ng/mL TNF- α for 48 h were used as stimulating cells (immunogenicity assay) or third-party cells (immunosuppression assay) toward HLA-mismatched T cells presented into peripheral blood mononuclear cells (PBMC). PBMC were isolated from the

blood of healthy volunteer donors from the French Blood Establishment (EFS, Saint-Louis Hospital, Paris, France) by density-gradient centrifugation over Ficoll-Paque PLUS (Sigma, St. Louis, MO, USA). Human B lymphoblastoid cell lines (LCL) 721.221 (ATCC®1855™, Manassas, VA, USA), HLA class II-positive cells, were irradiated at a 75 Gy dose to be used either as a positive control in immunogenicity assay or as a stimulator cell in the immunosuppression assay. MLR experiments were set up in RPMI supplemented with 10% heat-inactivated fetal calf serum. In immunogenicity assays, PBMC (1×10^5 cells/100 μ L) and MSCs (from 0.5×10^5 to 0.03×10^5 cells/100 μ L) or LCL (0.5×10^5 cells/100 μ L) were seeded in each well of 96-well plate. In the immunosuppression assay, PBMC (1×10^5 cells/50 μ L), LCL (0.5×10^5 cells/50 μ L), and MSCs (from 0.5×10^5 to 0.03×10^5 cells/100 μ L) were seeded in each well of 96-well plate. In all assays, MLR lasted for 6 days at 37 °C in a humidified 5% CO₂ and 21% O₂ air atmosphere (normoxic conditions). On Day 5, [3H]-thymidine (1 mCi/well; PerkinElmer, Waltham, MA, USA) was added to each well and the solution was incubated for another 18 h. Cells were then harvested on filtermates A, and thymidine incorporation into the DNA was quantified using a β counter (Wallac 1450; Pharmacia, ALT, Amersham, UK). Allogeneic PBMC stimulated by LCL were considered maximal MLR (100% alloproliferation).

2.9. RT-PCR Analysis for HLA-G Expression and Regulation

Total RNA was extracted using miRNeasy Mini Kit (Qiagen, Hilden, Germany), according to the manufacturer's instructions. A total of 1 to 5 μ g of total RNA from each sample was reverse-transcribed to cDNA using oligo-(dT) 12–18 priming and Moloney Murine Leukemia Virus (M-MLV) (Invitrogen, Cergy Pontoise, France) at 42 °C for 1 hour. Duplex Real-time RT-PCR was performed in duplicates on 0.1–0.5 μ g of cDNA in an ABI Prism 7000 SDS (Applied Biosystems, Courtaboeuf, France) with 40 amplification rounds using AmpliTaq™ DNA Polymerase with Buffer I

(Applied Biosystems), predeveloped TaqMan GAPDH (Applied Biosystems) as an internal control, HLA-G specific primers that amplify exon 5 (forward: 5'-CTGGTTGTCCTTGCAGCTGTAG; reverse:

5'-CCTTTTCAATCTGAGCTCTTCTTTCT) (Eurogentec, Seraing, Belgium), and a TaqMan probe (FAM reporter and TAMRA quencher; 5'-CACTGGAGCTGCGGTCGCTGCT)(Applied Biosystems). Quantification relative to HLA-G-positive choriocarcinoma JEG-3 cells (assigned a value of 1) was determined using the $\Delta\Delta C_t$ method [23]. Standard RT-PCR was carried out on 0.5 μ g cDNA with pan HLA-G specific primers G.257F (forward: 5'-GGAAGAGGAGACACGGAACA; exon 2) / G.1004R (reverse: 5'-CCTTTTCAATCTGAGCTCTTCTTT; exon 5/exon 6) and HLA-G5 specific primers G.526F (forward: 5'-CCAATGTGGCTGAACAAAGG; exon 3) / G.i4b (reverse: 5'-AAAGGAGGTGAAGGTGAGGG; intron 4) for 35 cycles, and β -actin as an internal control (forward: 5'-ATCTGGCACCAACCTTCTACAATGAGCTGCG; reverse: 5'-CGTCATACTCCTGCTTGCTGATCCACATCTGC) [24] for 16 cycles. After amplification, PCR products were separated on a 1.5% agarose gel containing Ethidium Bromide.

2.10. Statistical Analysis

Statistical tests and graphic representations were performed with GraphPad Prism 6 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA). All the data are presented as mean $\pm$ standard deviation (SD) of independent experiments with cells from different donors that were pooled. Significant

statistical differences were calculated using one- or two-way ANOVA (analysis of variance). A *p*-value less than 0.05 was considered significant for the ANOVA. If significance existed, a post-hoc analysis was performed using the Bonferonni post-tests to evaluate significance for all experiments. For mixed lymphocyte reaction (MLR) results, the Mann–Whitney test was used to determine the significance between two groups. The difference was considered significant when the *p*-value was below 0.05.

3. Results

3.1. Cell Quality Control

We first characterized the studied WJ-MSCs. The average cell population doubling time in P3 cell cultures was 1.69 ± 0.3 days (Figure 1), when seeding density of 1000 cells/cm² was applied. The viability was higher than 97% at the end of GMP expansion. Immunophenotypic characterization of cells using flow cytometry demonstrated that MSCs remained negative for CD14, CD34, HLA-DR, CD11b, and CD19 and positive for CD73, CD90, CD105, and CD44, with expression levels above 97%. Moreover, the isolated UC-derived cell populations exhibited clonogenic capacities and a potential to differentiate along osteogenic lineage and, less extended, adipogenic lineage. Moreover, MSC productions presented no bacterial contamination and a normal karyotype (Figure 1).

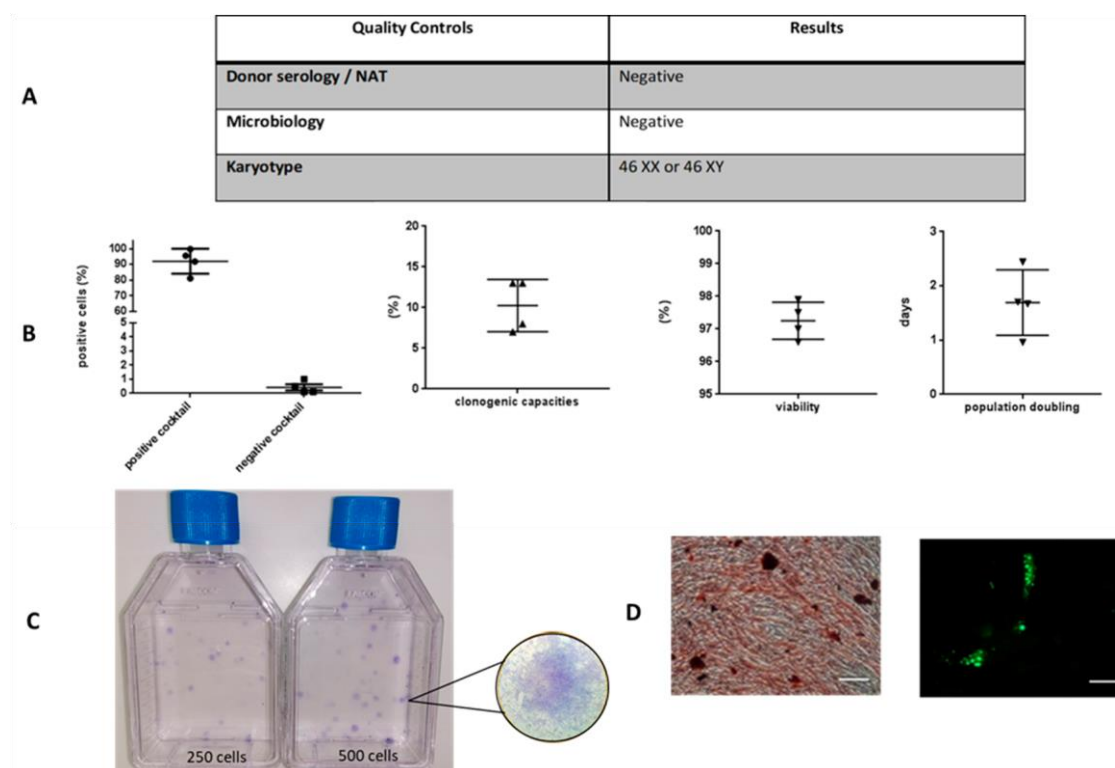


Figure 1. Characterization of Wharton jelly-mesenchymal stem/ stromal cells (WJ-MSCs) at the end of Good Manufacturing Practice (GMP) expansion (passage 3). Serology, Nucleic acid test (NAT), microbiology and karyotype (**A**) were determined for all cords. Graphics represent positive (Cluster of Differentiation 90 (CD), CD105, CD73, and CD44) and negative (CD45, CD34, CD11B, CD19, and Human Leukocyte Antigen (HLA) DR) cocktails, percentage of clonogenic capacities, viability and population doubling in days (**B**). Representative clonogenic capacity (**C**) and osteogenic and adipogenic differentiation are presented in (**D**). Scale bars correspond to 100 μ m. Data are expressed as mean $\pm$ SD (*N* = 4 independent cords).

3.2. Chondrocyte Differentiation

Chondrocyte differentiation was evaluated using Alg-based hydrogel during 28 days through collagen and proteoglycan synthesis. After 28 days of culture in Alg/HA hydrogel, a beginning of matrix synthesis was observed around cells on the histological sections. This was confirmed both by a sirius red stain to detect total collagen and an alcian blue stain to detect total proteoglycan (Figure 2A). More precisely, we showed that MSCs seeded in Alg/HA scaffolds expressed mainly type II collagen on D28 of the differentiation but also type I (Figure 2B). It appears that type X collagen associated with hypertrophic chondrocyte was not expressed on D14 or on D28 of chondrogenic differentiation.

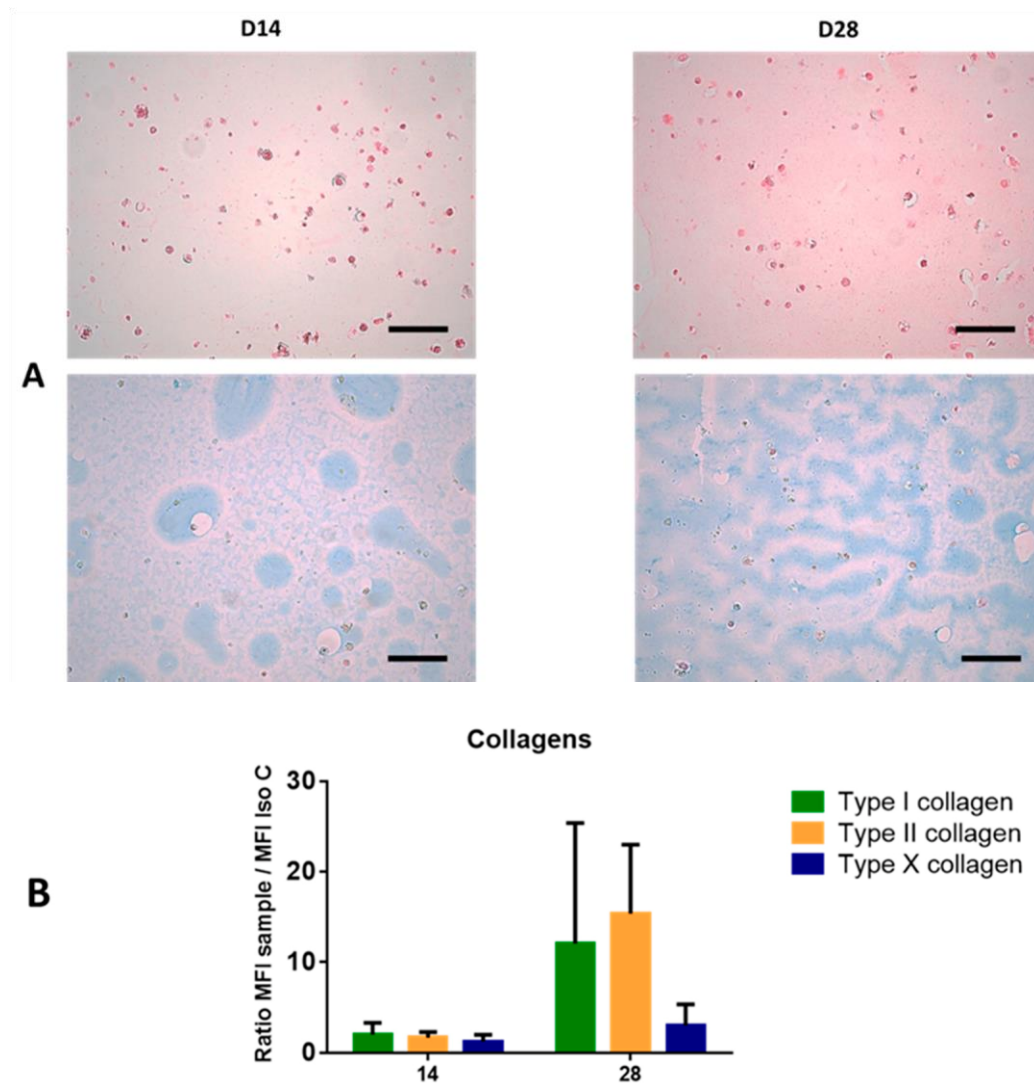


Figure 2. Chondrogenic differentiation represented by matrix synthesis (A) and pericellular collagen expression (B). The synthesized matrix by chondro-MSCs seeded in alginate (Alg)/hyaluronic acid (HA) hydrogels was studied in histological sections (A) through the detection of collagen fibers (sirius red staining) and proteoglycans (alcian blue staining). Histological sections were obtained on Day 14 (D14) and Day 28 (D28) of chondrocyte differentiation. Scale bars correspond to 100 μ m. Pericellular collagens (type I, II and X collagen) around chondro-MSCs were analyzed by flow cytometry in ratio of mean fluorescence intensity (MFI) of the sample compared with the isotype control (Iso C) (B) at different time points of cell culture (D14 and D28). Biomaterial dissolution was performed before indirect staining. Data are expressed as mean $\pm$ SD ($N = 3$ independent cords). No statistically significant difference was observed.

3.3. Viability

Above all, we checked cell viability both during 3D culture into Alg/HA hydrogel and also when cells were stimulated with IFN- γ and TNF- α . These two conditions may have had an impact not only on cellular behavior but also on cell viability. We observed no significant difference between cells seeded in biomaterial with or without stimulation during the differentiation, although cells seeded in biomaterial appear to be less viable than monolayer cells (Figure 3).

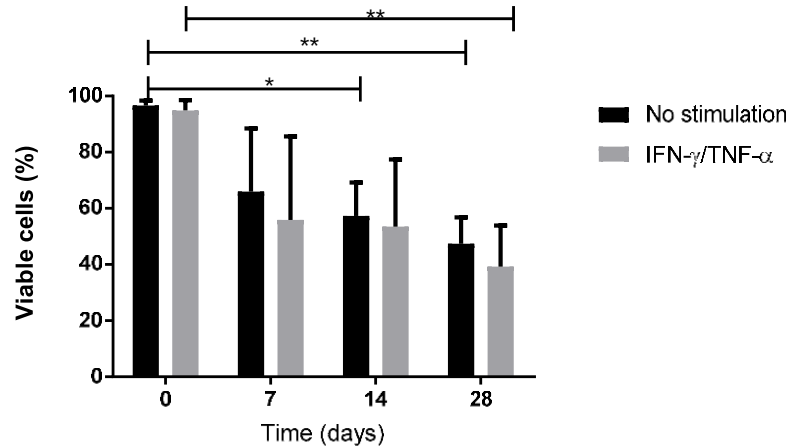


Figure 3. Cell viability for stimulated (IFN- γ and TNF- α) or unstimulated MSCs (day 0) and chondro-MSCs during 28 days of culture in Alg/HA hydrogels. Data are expressed as mean $\pm$ SD ($N = 4$ independent cords). * $p < 0.05$ and ** $p < 0.01$.

Since cell viability was investigated by flow cytometry with an antibody that reacts with amines (LIVE/DEAD kit, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA), it was possible to detect cell viability in all analyzed samples. Results in flow cytometry were obtained using a gate only on viable cells, with this method for all results.

3.4. Immune phenotype

3.4.1. Immune Synapse Markers

The activation of the immune system in an allogeneic context (T lymphocyte activation) is associated with the expression of co-stimulatory molecules: CD80, CD86, and CD40, and with the expression of MHC-II. First of all, it should be noted that the only significant variations observed were not in the proportion of positive cells for a marker but rather in the mean fluorescence intensity on the cell surface, reflecting the number of receptors expressed per cell (Figure 4). No expression of MHC-II molecules was observed (HLA DP-DQ-DR), regardless of the culture conditions or the culture duration. Among the costimulation molecules, CD80 was never expressed and CD86 was detected only on cells stimulated with IFN- γ and TNF- α throughout the entire process of differentiation, and on D28 in the absence of stimulation. Finally, the CD40 molecule was highly expressed in stimulated monolayer cells and only slightly on stimulated chondro-MSCs on D14 and D28, significantly only as a ratio of mean fluorescence intensity ($p < 0.0001$) (Figure 4).

3.4.2. Immunomodulatory Factors

Several molecules contribute to immune properties, especially molecules involved in immunomodulation. PD-L1 expression decreased between D0 and D28 regardless of culture

condition, but remained expressed throughout these cultures only with IFN- γ and TNF- α stimulation. A significant difference was observed between the stimulated and non-stimulated cells on D14 of the differentiation only in ratio of mean fluorescence intensity.

We observed a significant difference between WJ-MSCs and chondro-MSCs for IDO and soluble HLA-G, but no major difference was observed between stimulated and non-stimulated cells stimulated only in ratio of mean fluorescence intensity (Figure 5). However, no expression for membrane and soluble HLA-G1 was observed.

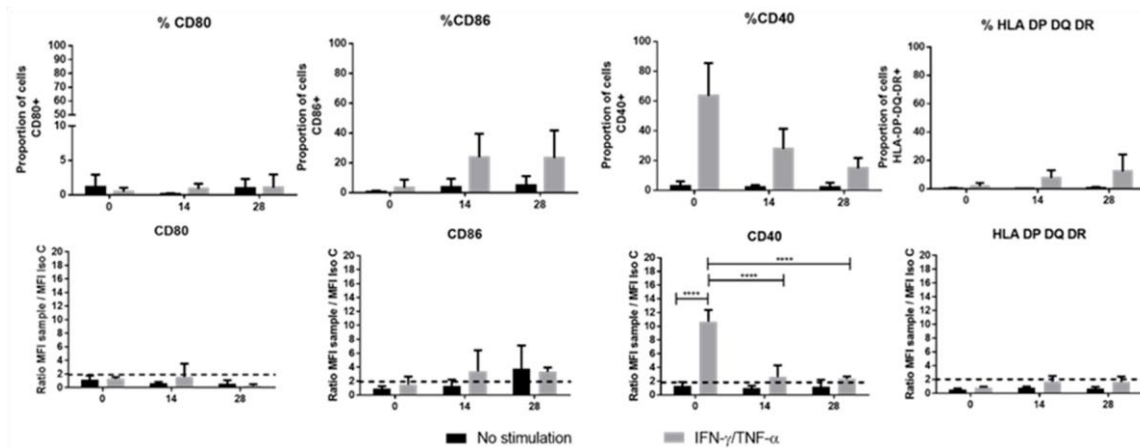


Figure 4. Main molecule expression related to the immunological synapse. These molecules (CD80, 86, 40 and Human Leucocyte Antigen (HLA)-DP-DQ-DR) were studied on Day 0 (monolayer) and during chondrogenic differentiation (day 14 and 28) in two conditions (with Interferon- γ (IFN- γ) and Tumor Necrosis Factor- α (TNF- α) stimulation (grey color) or without stimulation (black color). Results were obtained by flow cytometry and calculated in proportion of positive cell for each marker (up results) and ratio of mean fluorescence intensity of the sample compared with the isotype control (down results). The dotted lines represent the expression level for each molecule ratio higher than 2 between sample and isotypic control (down results). Data are expressed as mean $\pm$ SD ($N = 3$ independent cords minimum), **** $p < 0.0001$.

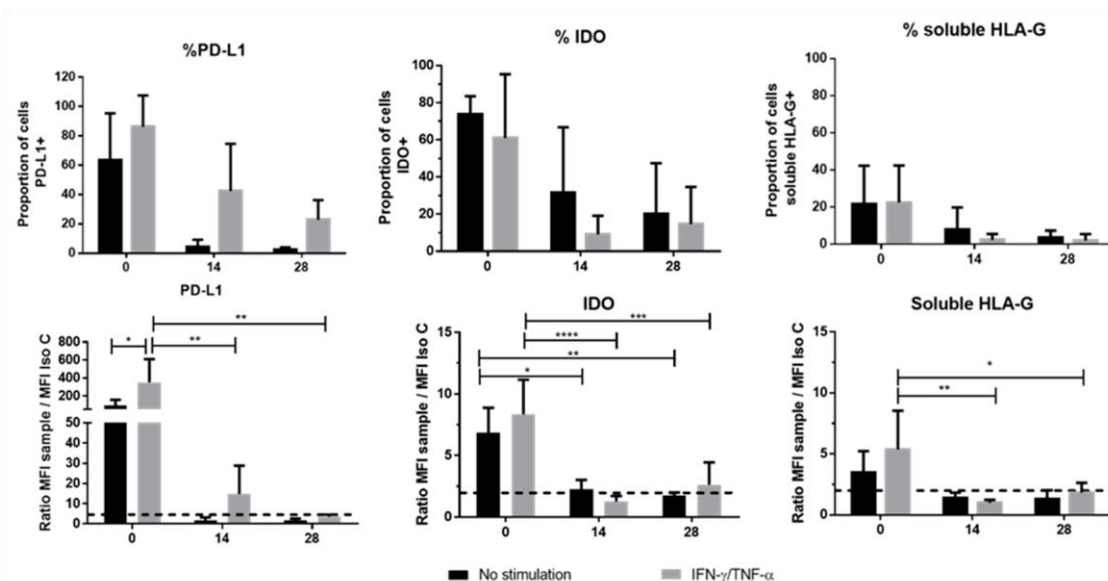


Figure 5. Immune checkpoint molecules involved in cell immunomodulation. Membrane Programmed death-ligand 1 (PD-L1), Indoleamine 2,3 dioxygenase (IDO) enzyme and soluble Human Leucocyte Antigen G (HLA-G) were studied on Day 0 (monolayer) and during chondrogenic differentiation (Day 14 and 28) in two conditions (with stimulation (grey color) or without stimulation (black color)). Results were obtained by flow cytometry and calculated in proportion of positive cell for each marker (up results)

and in ratio of mean fluorescence intensity of the sample compared with the isotopic control (down results). The dotted lines represent the expression level for each molecule (ratio higher than 2 between sample and isotopic control). Data are expressed as mean $\pm$ SD ($N = 3$ independent cords minimum), * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$; **** $p < 0.0001$.

Immunomodulatory properties are also found through a contact independent pathway with other secretions of soluble factors. Seven molecules were dosed in MSCs supernatant: PGE2, HGF, TGF- β 1, IL-6, IL-10, PD-L1 and VEGF. We observed that each molecule was expressed, especially when cells were stimulated with IFN- γ and TNF- α , except for IL-10 and VEGF. Throughout the chondrocytic differentiation soluble factors were produced with no differences from the monolayer, except for HGF, which had a slight decrease after monolayer seeding and for IL-10 on Day 28 (Figure 6).

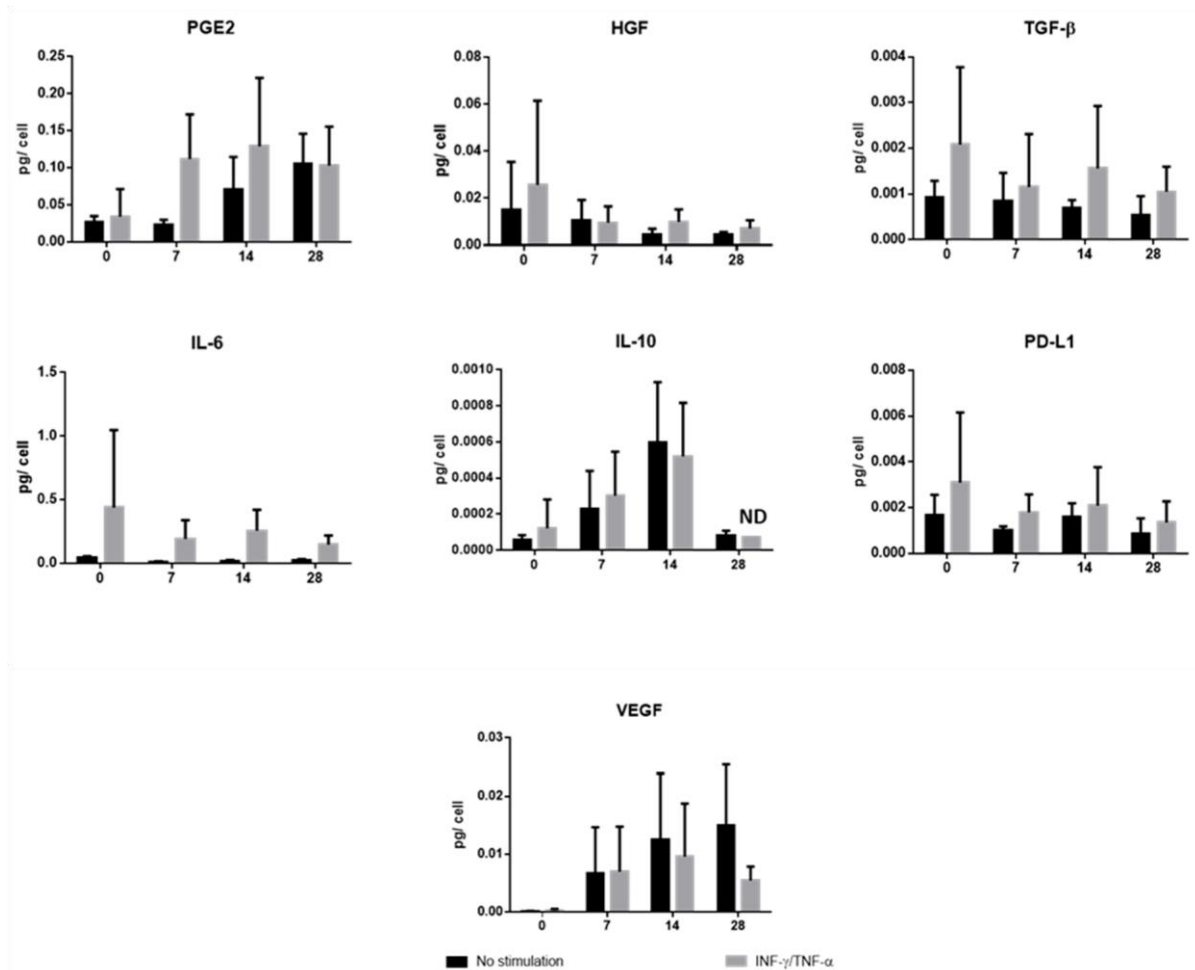


Figure 6. Cytokines (Interleukin 6 (IL-6) and Interleukin 10 (IL-10)), growth factors (hepatocyte growth factor (HGF), transforming growth factor beta 1 (TGF- β 1) and vascular endothelial growth factor (VEGF)) and other molecules (Prostaglandin E2 (PGE2) and soluble PD-L1) secreted by mesenchymal stem/stromal cells (MSCs) on Day 0 (monolayer) and during chondrogenic differentiation (Day 7, 14, and 28) in two conditions (with stimulation (grey color) or without stimulation (black color)). Results were obtained with Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) and were calculated in picogram per cell. Data are expressed as mean $\pm$ SD ($N = 3$ independent cords minimum); ND means non-detectable for the other 2 cords.

3.5. Immune Functional Properties of WJ-MSCs and Chondro-MSCs

WJ-MSCs are thought to have a high potential in therapies aimed at repairing cartilage defects from various etiologies. In this context, our present work entailed assessing, from an immunological perspective, if (i) allogeneic WJ-MSCs could be used without a risk of rejection instead of autologous MSCs from bone marrow or adipose tissue and if (ii) chondrogenic differentiation of WJ-MSCs affects their immunological properties. For this purpose, we evaluated both immunogenicity and immunomodulation properties of WJ-MSCs (on Day 0) and chondro-MSCs (on D28 along the chondro-differentiation process) in HLA-mismatched settings.

To assess the immunogenicity of both WJ-MSCs and chondro-MSCs, we studied their ability to be recognized as allogeneic-stimulating cells by HLA-mismatched T cells present in the responding PBMC. The MLR based on the use of HLA class II+ LCL stimulating cells facing the HLA-mismatched PBMC constituted the positive control. Results showed no T cell alloproliferation in response to various amounts of WJ-MSCs (Figure 7A–C) or chondro-MSCs (Figure 7D–F), even at high doses (50,000 cells corresponding to 1:0.5 PBMC:MSC ratio) and after licensing with IFN- γ and TNF- α . Figure 6 shows raw data obtained with three distinct representative PBMC:WJ-MSCs (A–C) or chondro-MSCs (D–F) allogeneic combinations. In Figure 6F, only the highest PBMC:MSC ratio (1:0.5) was tested due to limited chondro-MSCs cell numbers. Although inter-individual variability was observed, similar results were obtained using 7 distinct WJ-MSCs with PBMC from three distinct donors.

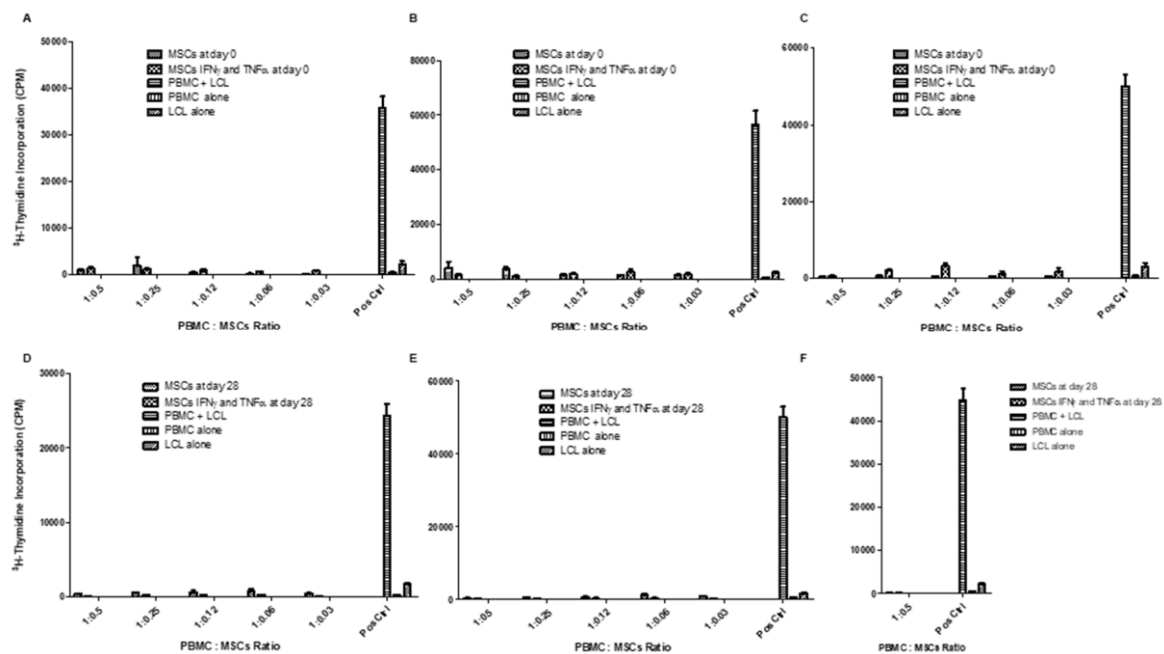


Figure 7. WJ-MSCs (Day 0) and chondro-MSCs (Day 28) showed hypo-immunogenicity even with

IFN- γ and TNF- α pre-treatment. Distinct WJ-MSCs (A–C) and chondro-MSCs (D–F) primed with pro-inflammatory cytokines, or not, were used as stimulators facing HLA-mismatched PBMC at various PBMC:MSC ratios. Pre-irradiated LCL cells were used as a positive control (Pos Ctrl) to stimulate PBMC alloproliferation (PBMC + LCL). Data are expressed as mean CPM $\pm$ SD. CPM—count per minute; LCL—lymphoblastoid cell line; PBMC—peripheral blood mononuclear cell.

To examine the immunomodulatory properties of WJ-MSCs and chondro-MSCs, we studied their ability to affect T cell alloproliferation as third-party cells in a classic MLR (immunosuppression assay). Our data revealed that WJ-MSCs and chondro-MSCs inhibit T

cell alloproliferation in a dose-dependent manner. Figure 8 displays raw data obtained with three representative PBMC:LCL:WJ-MSC (A–C) or chondro-MSC (D–F) allogeneic combinations, respectively. When considering the T cell alloproliferation toward LCL to be 100%, the inhibition exerted by WJ-MSCs or chondro-MSCs was 50% ($p < 0.0001$) and 97% ($p = 0.005$), respectively, at a PBMC:MSC ratio of 1:0.5; 54% ($p < 0.0001$) and 66% ($p = 0.005$), respectively, at a PBMC:MSC ratio of 1:0.25; 63% ($p < 0.0001$) and 32% ($p = 0.045$), respectively, at a PBMC:MSC ratio of 1:0.12; and 43% ($p < 0.0001$) at a PBMC:MSC ratio of 1:0.06. Notably, the immunomodulatory potential of chondro-MSCs was higher after licensing with IFN- γ and TNF- α (98% ($p = 0.0005$), 93% ($p = 0.005$), and 60% ($p = 0.005$) at a PBMC:MSC ratio of 1:0.5, 1:0.25 and 1:0.12 respectively). These results were obtained with three distinct cords and three distinct PBMCs. It is important to note that we observed individual variability among the distinct MSCs and PBMCs tested.

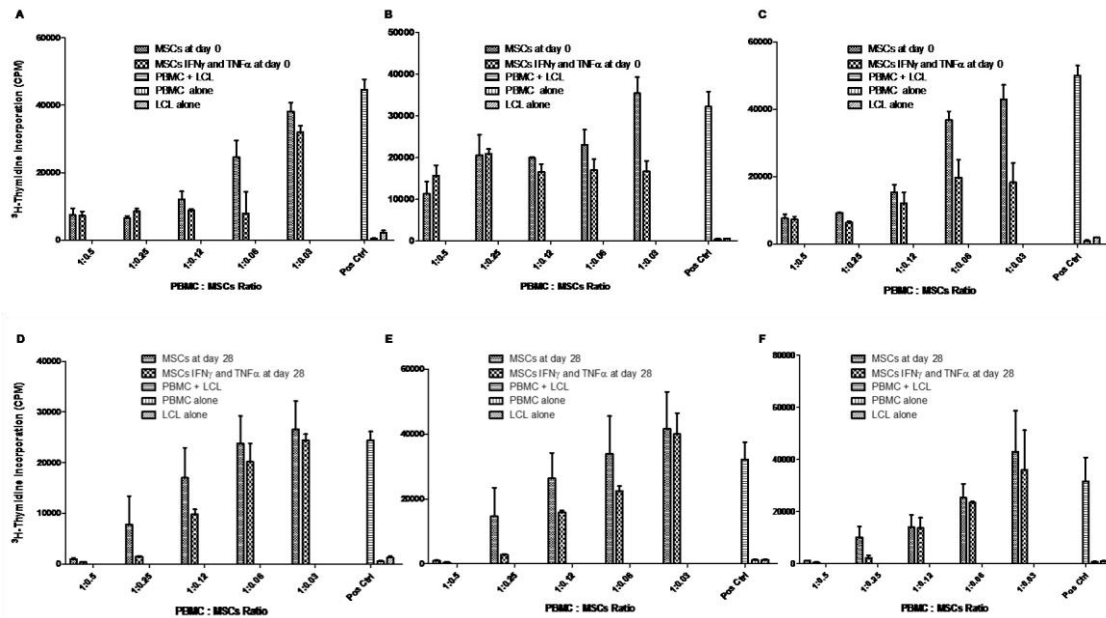


Figure 8. WJ-MSCs (Day 0) and chondro-MSCs (Day 28) showed immunomodulatory properties in a dose dependent manner. Distinct WJ-MSCs (A–C) and chondro-MSCs (D–F) primed with pro-inflammatory cytokines, or not, were added as third-party cells at various ratios into an MLR using PBMC as HLA-mismatched responder T cells towards irradiated LCL used as stimulating cells. Control without MSCs correspond to PBMC+LCL (Pos Ctrl). Data are expressed as mean CPM $\pm$ SD. CPM—count per minute; MLR—mixed lymphocyte reaction; LCL—lymphoblastoid cell line; PBMC—peripheral blood mononuclear cell.

3.6. HLA-G Transcriptional Activity in WJ-MSC Upregulated during Chondrogenic Differentiation and Boosted by Inflammatory Environment

Considering the key role of HLA-G in immunoregulatory processes [18], we further examined mechanisms regulating its protein expression in WJ-MSC expansion (Day 0) and during chondrogenic differentiation (D14 and D28) (Figure 4) by analyzing HLA-G transcriptional activity. We performed real-time and standard RT-PCR targeting HLA-G transcripts in cells derived from three umbilical cords treated or not treated with IFN- γ and TNF- α . We observed the absence or very low levels of HLA-G transcriptional activity in WJ-MSCs on Day 0 and a weak upregulation upon stimulation. The amount of HLA-G transcripts increased during chondrogenic differentiation, particularly in the presence of an inflammatory microenvironment (Figure 9). Notably, the increase in transcriptional activity varied according to the umbilical cord; with low activity for C5 and high activity for C2 (Figure 9A). Finally, all

alternative transcripts were involved, including HLA-G5, which encodes the soluble HLA-G molecule.

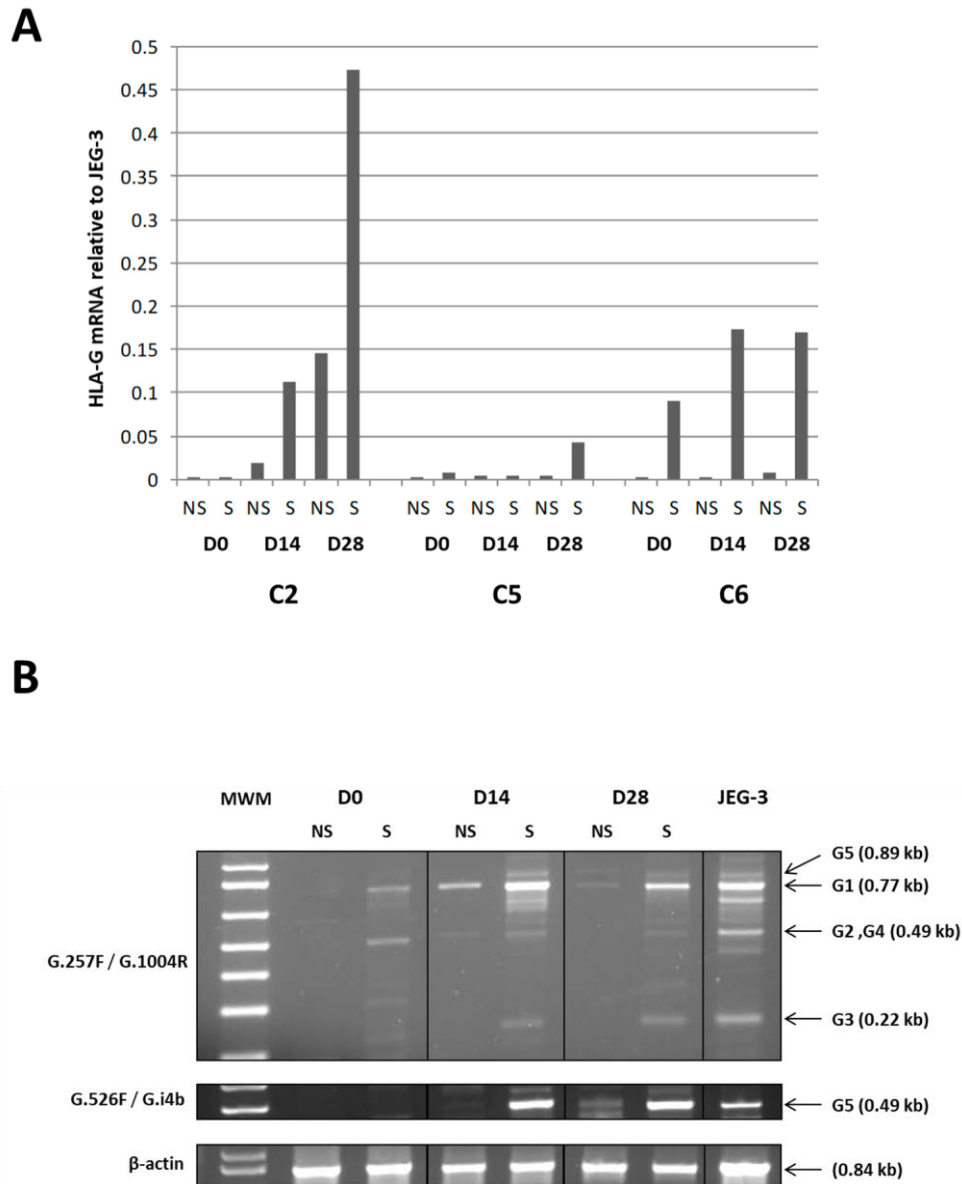


Figure 9. Real-time RT-PCR analysis. **(A)** showing relative quantities of HLA-G transcripts in WJ-MSC from three umbilical cords (C2, C5, C6) at the end of the cell expansion, Day 0 (D0), and on Day 14 (D14) and Day 28 (D28) during chondrogenic differentiation in Alg/HA hydrogel, in the absence (NS) or presence (S) of Interferon γ (IFN- γ) and Tumor Necrosis Factor α (TNF- α). The amount of HLA-G transcripts in JEG-3 cells was assigned a value of 1. No variation of GAPDH mRNA levels were observed considering the conditions used and chondrogenic differentiation. Representative standard RT-PCR analysis **(B)** was performed with the C6 umbilical cord on D0, D14, and D28, and JEG-3 cells targeting least alternative transcripts HLA-G1,-G2,-G3/G4 and G5 with primer set G.257F / G.1004R and HLA-G5 alone with primer set G.526F/G.i4b. β -actin amplification was used as internal control. MWM—molecular weight marker; NS and S-WJ-MSCs not stimulated or stimulated, respectively, with IFN- γ and TNF- α . PCR products obtained with each primer set were collected from the same agarose gel to assemble the picture.

4. Discussion

Regenerative medicine emerged a few years ago for cartilage reparation and has become a promising therapeutic alternative especially using adult MSCs in combination with innovative scaffolds. However, as BM-MSC capacities have been shown to decrease with the donors' age [25], we investigated Wharton's jelly from the umbilical cord as an alternative source of MSCs. WJ-MSCs seem more immature from an immunological point of view, have a higher proliferation potential, and can differentiate into a higher number of tissues. The strategy will be to implement WJ-MSCs seeded in a 3D scaffold in an allogeneic context. However, the maintenance of their immunomodulatory properties and their paracrine activity during chondrogenic differentiation remain unknown. The aim of our work was, thus, to investigate, at the same time, the differentiation of WJ-MSCs for the treatment of cartilage defects and the persistence of their immunomodulatory effects on the immune system. We propose an innovative model of cartilage engineering using WJ-MSCs produced as an Advanced Therapy Medicinal Product (ATMP) made from only clinical-grade reagents or synthetic reagents with no animal protein. This product was extemporaneously embedded into an Alg/HA layer guiding cells to chondrogenic differentiation. We demonstrated that WJ-MSCs seeded in this biomaterial were engaged in the process of chondrocyte differentiation from Day 14, while maintaining their immunomodulatory properties.

Above all, we showed that at the end of monolayer expansion, the obtained cells could be considered mesenchymal stromal/stem cells in accordance with the International Society for Cell and Gene Therapy (ISCT) [5], due to their stemness, clonogenicity, surface marker expression, infectious markers, microbiology, and karyotype. In our GMP condition, WJ-MSCs displayed robust proliferation abilities. Self-renewal and high proliferation capacity are known to be essential for MSCs to maintain stemness characteristics during in vitro culture. Regarding differentiation, despite appropriate culture medium for adipogenic differentiation, WJ-MSCs weakly differentiated into adipocytes, as reported by Reppel et al. [11]. It is well-known that adipogenic induction could be regulated by Insulin-like growth factor binding protein 2 (IGFBP2) expression. Recently Wang et al. showed that, in WJ-MSCs, IGFBP2 expression was negatively regulated by BCL6 corepressor (BCOR) [26], which could partially explain the difficulty of cells to engage in this differentiation. Our results also showed the multilineage differentiation potential of WJ-MSCs, particularly for osteogenesis and chondrogenesis. Given our goal, we initiated chondrocyte differentiation into Alg/HA hydrogels. On Day 28, MSCs underwent chondrocyte differentiation attested by the beginning of collagen synthesis, especially type II collagens,

which could reflect matrix production associated with hyaline cartilage. Type I collagen seems to be highly expressed from the beginning of 3D culture, certainly due to a physiological expression of type I collagen by MSCs in the umbilical cord matrix as shown by Margossian et al. [27]. However, the presence of type X collagen expressed by hypertrophic chondrocytes was quite low, indicating a chondrocyte-limited differentiation. Our results confirm that the composition of the hydrogel alone can guide WJ-MSCs in a process of chondrocyte differentiation. These results are in agreement with previous studies [11,22,28] but are the first obtained from a study that follows good manufacturing practices with the aim of using the biomaterial and chondro-MSCs derived from Wharton's jelly as an ATMP. Moreover, during cell differentiation, we showed a decrease in cell viability in biomaterials with respect to monolayer. We have previously described this evolution when cells were encapsulated in alginate enriched in hyaluronic acid and have shown that mechanical environment influences cell behavior and viability [22]. However, we observed that viable cells remain functional and are not only able to induce chondrocyte differentiation but also inhibit T cell alloproliferation.

Regarding the functional aspect of MSCs, we investigated whether WJ-MSCs (control cells on Day 0) and chondro-MSCs were able to induce an allogeneic stimulation. Thus, in the presence of PBMC from different-HLA healthy donors or LCL, both WJ-MSCs and chondro-MSCs were non-immunogenic and present immunomodulatory properties. This was observed mainly when cells were primed with IFN- γ and TNF- α , as previously reported with MSCs and chondro-MSCs from bone marrow and adipose tissue [29]. Indeed, it was once again demonstrated that IFN- γ and TNF- α priming is favorable for enhanced immunoregulatory properties, as shown by Prasanna et al. [30].

However, the immunoregulatory properties of immune cells are described to be regulated through cell-to-cell contact or the paracrine effect. To know how these properties are regulated by MSCs and chondro-MSCs, both immunogenicity and immunomodulatory properties were evaluated by analyzing the expression of stimulation molecules as well as immune checkpoints and T cell alloresponse, in the presence or absence of IFN- γ and TNF- α to mimic an allogeneic context.

Indeed, in a context where a donor is different from a recipient, immune cells can be activated through the implementation of the immunological synapse [31]. This synapse involves the MHC-II (HLA-DP-DQ-DR) as well as the co-stimulation molecules (CD40, CD80 and CD86) to activate and present the antigen to T-cells. It is well-known that, after monolayer expansion, MSCs do express neither MHC-II nor the previously mentioned co-stimulatory molecules [31]. In contrast, it has been reported that primed MSCs with IFN- γ and/or TNF- α enhance the expression of MHC-II but do not seem to increase the levels of CD80 and CD86 [32]. In our study, unlike that of Ryan et al., who report an expression of MHC-II on BM-MSCs differentiated in chondrocytes in an alginate hydrogel [33], we did not observe any expression of MHC-II or CD80 by either WJ-MSCs or chondro-MSCs, whether cells were primed or not. Consequently, since MHC-II and co-stimulation molecules were not simultaneously present on WJ-MSCs or chondro-MSCs, the partial immunological synapse formed could not sustain the activation of T cells. These observed differences from the study of Ryan et al. may be due to the cell source as WJ-MSCs are described to have stronger immune capacities than BM-MSCs [34].

We also studied the expression of other checkpoint molecules, such as IDO, HLA-G and PD-L1. The expression level of IDO at the end of the 3D culture suggested that this enzyme could play a minor role in the immune properties of chondro-MSC. Taking into consideration the specific involvement of HLA-G in MSC-mediated immunomodulation, we focused our attention on the mechanisms involved in HLA-G expression levels [17]. First, high variation in the levels of HLA-G transcripts, likely driven by HLA-G polymorphism, was observed among the various umbilical cords [35]. Second, we found that global HLA-G transcription including *HLA-G1* and *HLA-G5* transcripts in WJ-MSCs and chondro-MSCs may have been stimulated by IFN- γ and TNF- α treatment, which is consistent with previously published results of MSCs derived from bone marrow and adipose tissue [29]. Interestingly HLA-G1 protein expression was not detected at the cell surface of either WJ-MSCs or chondro-MSCs in the presence or absence of treatment, suggesting that other membrane-bound isoforms may be upregulated at the cell surface and, thus, could participate in the immunomodulatory functions. In addition, we found that *HLA-G5* transcripts may be absent in WJ-MSCs even upon stimulation, while they were upregulated in chondro-MSCs. This result suggests that soluble HLA-G expression detected in WJ-MSCs involves other alternative transcripts. Discrepant results regarding HLA-G gene transcription and protein expression may be explained by post-transcriptional regulatory mechanisms, such as miRNAs that control HLA-G protein expression.

The receptor programmed death-1 (PD-1) was expressed on the cell surface of different immune cells like activated T and B cells. Interaction of PD-1 with its ligands, PD-L1/B7-H1

and PD-L2/B7-DC, provides an inhibitory signal in regulating cellular activation and proliferation. After 28 days of culture, the membrane-bound PD-L1 expression was extremely low, suggesting that the chondro-MSCs did not inhibit T cell proliferation this way. However, like Davies et al. [20], we detected soluble PD-1 ligands not only in culture media containing WJ-MSCs but also in culture media after 28 days of 3D culture, suggesting that the suppression of T cell activation could occur through the interaction of soluble PD-1 ligands secreted by WJ-MSCs and chondro-MSCs.

These results, therefore, suggest that the regulation of MSCs depends first and foremost on their secretory activity. To further explore the evolution of paracrine activity during cell differentiation,

we found that, in addition to soluble PD-L1, unprimed chondro-MSCs showed the ability to secrete immunomodulatory molecules, sometimes in the same proportions as WJ-MSCs, at the end of P3 (TGF- β 1, IL-6), and sometimes cell differentiation allowed better secretion than WJ-MSCs (PGE2, IL-10 and VEGF). In addition, priming with IFN- γ and TNF- α allowed better secretion of IL-6 and TGF- β by both WJ-MSCs and chondro-MSCs. As Zhao et al. [13] explained, these molecules specifically contribute to the generation of an immunosuppressive environment. Thus, TGF- β , PGE2 and IL-10 would induce regulatory T lymphocytes. IL-6 would inhibit the differentiation and maturation of dendritic cells. Finally, HGF would have repair characteristics and VEGF would have vascularization and proliferation properties [19,31]. Lastly, the ability of chondro-MSCs to release anti-inflammatory factors like PGE2 and IL-10 could attenuate the inflammatory environment of the joint [36].

5. Conclusions

In this study, mesenchymal stem/stromal cells once again emerged as a potential for cell therapy [37], especially MSCs derived from human umbilical cords [38]. The results showed that 3D culture modulates the immunomodulatory phenotype and/or the paracrine activity of chondro-MSCs. Here,

we have shown a reduced immunomodulatory phenotype but, nevertheless, a secretion that seems to be maintained. We reported that WJ-MSCs and chondro-MSCs were able to decrease the activation of immune cells as well as create an immunomodulatory environment that is promising for implementation in an allogeneic context. If further in vivo studies performed in pre-clinical models confirm these encouraging results, it will pave the way to a universal allogeneic therapy of cartilage defects.

Author Contributions: C.V.—collection and/or assembly of data, data analysis and interpretation, manuscript writing; G.C., L.L., C.S., P.S., I.P.—collection and/or assembly of data, data analysis, L.R., C.L.; V.W.—collection and/or assembly of data, data analysis and interpretation; N.B.-J., E.D.C.—conception and design; P.M., N.R.-F., D.B. and C.H.—conception and design, financial support, data analysis and interpretation. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research was funded by the “Agence Nationale de la Recherche” ANR-15-CE18-0025/ATYPiCAL. Paulin Sonon was supported by the Université Sorbonne Paris Cité/ Universidade de Sao Paulo joint research project 2017.

Acknowledgments: The authors would like to thank the maternity of CHRU-Nancy for the umbilical cord collection and the UMS2008 IBSLor- UMR1116 DCAC and, in particular, Huguette Louis for relevant training in flow cytometry and use of systems. The authors would like to thank Eduardo Donadi (Universidade Sao Paulo) for helpful discussion.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflicts of interest.

References

1. Polak, D.J. Regenerative medicine. Opportunities and challenges: A brief overview. *J. R. Soc. Interface* **2010**, *7*, S777–S781. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

2. Caplan, A.I. Mesenchymal Stem Cells in Regenerative Medicine. In *Handbook of Stem Cells*; Elsevier: Duivendrecht, The Netherlands, 2013; pp. 493–502.
3. Barry, F.P.; Murphy, J.M. Mesenchymal stem cells: Clinical applications and biological characterization. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **2004**, *36*, 568–584. [[CrossRef](#)]
4. Han, Y.; Li, X.; Zhang, Y.; Han, Y.; Chang, F.; Ding, J. Mesenchymal Stem Cells for Regenerative Medicine. *Cells* **2019**, *8*, 886. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
5. Viswanathan, S.; Shi, Y.; Galipeau, J.; Krampera, M.; Leblanc, K.; Martin, I.; Nolte, J.; Phinney, D.G.; Sensebe, L.
Mesenchymal stem versus stromal cells: International Society for Cell & Gene Therapy (ISCT®) Mesenchymal Stromal Cell committee position statement on nomenclature. *Cytotherapy* **2019**, *21*, 1019–1024. [[PubMed](#)]
6. Wang, L.; Tran, I.; Seshareddy, K.; Weiss, M.L.; Detamore, M.S. A Comparison of Human Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stem Cells and Human Umbilical Cord-Derived Mesenchymal Stromal Cells for Cartilage Tissue Engineering. *Tissue Eng. Part A* **2009**, *15*, 2259–2266. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
7. Stoltz, J.F.; Bensoussan, D.; Decot, V.; Netter, P.; Ciree, A.; Gillet, P. Cell and tissue engineering and clinical applications: An overview. *Biomed. Mater. Eng.* **2006**, *16*, S3–S18.
8. Demoor, M.; Ollitrault, D.; Gomez-Leduc, T.; Bouyoucef, M.; Hervieu, M.; Fabre, H.; Lafont, J.; Denoix, J.-M.; Audigier, F.; Mallein-Gerin, F.; et al. Cartilage tissue engineering: Molecular control of chondrocyte differentiation for proper cartilage matrix reconstruction. *Biochim. Biophys. Acta BBA-Gen. Subj.* **2014**, *1840*, 2414–2440. [[CrossRef](#)]
9. Cao, Z.; Dou, C.; Dong, S. Scaffolding Biomaterials for Cartilage Regeneration. *J. Nanomater.* **2014**, *2014*, 1–8. [[CrossRef](#)]
10. Schiavi, J.; Reppel, L.; Charif, N.; de Isla, N.; Mainard, D.; Benkirane-Jessel, N.; Stoltz, J.-F.; Rahouadj, R.; Huselstein, C. Mechanical stimulations on human bone marrow mesenchymal stem cells enhance cells differentiation in a three-dimensional layered scaffold. *J. Tissue Eng. Regen. Med.* **2018**, *12*, 360–369. [[CrossRef](#)]
11. Reppel, L.; Schiavi, J.; Charif, N.; Leger, L.; Yu, H.; Pinzano, A.; Henrionnet, C.; Stoltz, J.-F.; Bensoussan, D.; Huselstein, C. Chondrogenic induction of mesenchymal stromal/stem cells from Wharton's jelly embedded in alginate hydrogel and without added growth factor: An alternative stem cell source for cartilage tissue engineering. *Stem Cell Res. Ther.* **2015**, *6*, 260. [[CrossRef](#)]
12. Somoza, R.A.; Welter, J.F.; Correa, D.; Caplan, A.I. Chondrogenic Differentiation of Mesenchymal Stem Cells: Challenges and Unfulfilled Expectations. *Tissue Eng. Part B Rev.* **2014**, *20*, 596–608. [[CrossRef](#)]
13. Zhao, Q.; Ren, H.; Han, Z. Mesenchymal stem cells: Immunomodulatory capability and clinical potential in immune diseases. *J. Cell. Immunother.* **2016**, *2*, 3–20. [[CrossRef](#)]
14. Galipeau, J.; Krampera, M.; Barrett, J.; Dazzi, F.; Deans, R.J.; Debruijn, J.; Dominici, M.; Fibbe, W.E.; Gee, A.P.; Gimble, J.M.; et al. International Society for Cellular Therapy perspective on immune functional assays for mesenchymal stromal cells as potency release criterion for advanced phase clinical trials. *Cytotherapy* **2016**, *18*, 151–159. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
15. Nauta, A.J.; Fibbe, W.E. Immunomodulatory properties of mesenchymal stromal cells. *Blood* **2007**, *110*, 3499–3506. [[CrossRef](#)]
16. Tipnis, S.; Viswanathan, C.; Majumdar, A.S. Immunosuppressive properties of human umbilical cord-derived mesenchymal stem cells: Role of B7-H1 and IDO. *Immunol. Cell Biol.* **2010**, *88*, 795–806. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
17. Selmani, Z.; Naji, A.; Zidi, I.; Favier, B.; Gaiffe, E.; Obert, L.; Borg, C.; Saas, P.; Tiberghien, P.; Rouas-Freiss, N.; et al. Human Leukocyte Antigen-G5 Secretion by Human Mesenchymal Stem Cells Is Required to Suppress T Lymphocyte and Natural Killer Function and to Induce CD4⁺CD25^{high}FOXP3⁺ Regulatory T Cells. *STEM CELLS* **2008**, *26*, 212–222. [[CrossRef](#)]
18. Carosella, E.D.; Rouas-Freiss, N.; Roux, D.T.-L.; Moreau, P.; LeMaoult, J. HLA-G. In *Advances in Immunology*; Elsevier: Duivendrecht, The Netherlands, 2015; Volume 127, pp. 33–144.
19. da Silva Meirelles, L.; Fontes, A.M.; Covas, D.T.; Caplan, A.I. Mechanisms involved in the therapeutic properties of mesenchymal stem cells. *Cytokine Growth Factor Rev.* **2009**, *20*, 419–427. [[CrossRef](#)]
20. Davies, L.C.; Heldring, N.; Kadri, N.; Le Blanc, K. Mesenchymal Stromal Cell Secretion of Programmed Death-1 Ligands Regulates T Cell Mediated Immunosuppression. *Stem Cells Dayt. Ohio* **2017**, *35*, 766–776. [[CrossRef](#)]
21. Avercenc-Léger, L.; Guerci, P.; Virion, J.-M.; Cauchois, G.; Hupont, S.; Rahouadj, R.; Magdalou, J.; Stoltz, J.-F.; Bensoussan, D.; Huselstein, C.; et al. Umbilical cord-derived mesenchymal stromal cells: Predictive obstetric factors for cell proliferation and chondrogenic differentiation. *Stem Cell Res. Ther.* **2017**, *8*, 161. [[CrossRef](#)]

22. Yu, H.; Cauchois, G.; Louvet, N.; Chen, Y.; Rahouadj, R.; Huselstein, C. Comparison of MSC properties in two different hydrogels. Impact of mechanical properties. *Biomed. Mater. Eng.* **2017**, *28*, S193–S200. [[CrossRef](#)]
23. Moreau, P.; Mouillot, G.; Rousseau, P.; Marcou, C.; Dausset, J.; Carosella, E.D. HLA-G gene repression is reversed by demethylation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2003**, *100*, 1191–1196. [[CrossRef](#)]
24. Paul, P.; Rouas-Freiss, N.; Moreau, P.; Cabestre, F.A.; Menier, C.; Khalil-Daher, I.; Pangault, C.; Onno, M.; Fauchet, R.; Martinez-Laso, J.; et al. HLA-G, -E, -F preworkshop: Tools and protocols for analysis of non-classical class I genes transcription and protein expression. *Hum. Immunol.* **2000**, *61*, 1177–1195. [[CrossRef](#)]
25. Li, Y.; Charif, N.; Mainard, D.; Bensoussan, D.; Stoltz, J.F.; de Isla, N. Donor's age dependent proliferation decrease of human bone marrow mesenchymal stem cells is linked to diminished clonogenicity. *Biomed. Mater. Eng.* **2014**, *24*, 47–52.
26. Wang, Y.; Liu, Y.; Fan, Z.; Liu, D.; Wang, F.; Zhou, Y. IGFBP2 enhances adipogenic differentiation potentials of mesenchymal stem cells from Wharton's jelly of the umbilical cord via JNK and Akt signaling pathways. *PLoS ONE* **2017**, *12*, e0184182. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
27. Margossian, T.; Reppel, L.; Makdissy, N.; Stoltz, J.-F.; Bensoussan, D.; Huselstein, C. Mesenchymal stem cells derived from Wharton's jelly: Comparative phenotype analysis between tissue and in vitro expansion. *Biomed. Mater. Eng.* **2012**, *22*, 243–254. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
28. Aleksander-Konert, E.; Paduszyn'ski, P.; Zajdel, A.; Dzierz'ewicz, Z.; Wilczok, A. In vitro chondrogenesis of Wharton's jelly mesenchymal stem cells in hyaluronic acid-based hydrogels. *Cell. Mol. Biol. Lett.* **2016**, *21*, 11. [[CrossRef](#)]
29. Du, W.-J.; Reppel, L.; Leger, L.; Schenowitz, C.; Huselstein, C.; Bensoussan, D.; Carosella, E.D.; Han, Z.-C.; Rouas-Freiss, N. Mesenchymal Stem Cells Derived from Human Bone Marrow and Adipose Tissue Maintain Their Immunosuppressive Properties After Chondrogenic Differentiation: Role of HLA-G. *Stem Cells Dev.* **2016**, *25*, 1454–1469. [[CrossRef](#)]
30. Prasanna, S.J.; Gopalakrishnan, D.; Shankar, S.R.; Vasandan, A.B. Pro-Inflammatory Cytokines, IFN γ and TNF α , Influence Immune Properties of Human Bone Marrow and Wharton Jelly Mesenchymal Stem Cells Differentially. *PLoS ONE* **2010**, *5*, e9016. [[CrossRef](#)]
31. Ryan, J.M.; Barry, F.P.; Murphy, J.M.; Mahon, B.P. Mesenchymal stem cells avoid allogeneic rejection. *J. Inflamm.* **2005**, *2*, 8. [[CrossRef](#)]
32. Chinnadurai, R.; Copland, I.B.; Patel, S.R.; Galipeau, J. IDO-independent suppression of T cell effector function by IFN- γ -licensed human mesenchymal stromal cells. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **2014**, *192*, 1491–1501. [[CrossRef](#)]
33. Ryan, A.E.; Lohan, P.; O'Flynn, L.; Treacy, O.; Chen, X.; Coleman, C.; Shaw, G.; Murphy, M.; Barry, F.; Griffin, M.D.; et al. Chondrogenic Differentiation Increases Antidonor Immune Response to Allogeneic Mesenchymal Stem Cell Transplantation. *Mol. Ther.* **2014**, *22*, 655–667. [[CrossRef](#)]
34. Mattar, P.; Bieback, K. Comparing the Immunomodulatory Properties of Bone Marrow, Adipose Tissue, and Birth-Associated Tissue Mesenchymal Stromal Cells. *Front. Immunol.* **2015**, *6*, 560. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
35. Dias, F.C.; Castelli, E.C.; Collares, C.V.A.; Moreau, P.; Donadi, E.A. The Role of HLA-G Molecule and HLA-G Gene Polymorphisms in Tumors, Viral Hepatitis, and Parasitic Diseases. *Front. Immunol.* **2015**, *6*, 9. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
36. Chen, F.H.; Tuan, R.S. Mesenchymal stem cells in arthritic diseases. *Arthr. Res. Ther.* **2008**, *10*, 223. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
37. Najar, M.; Bouhtit, F.; Melki, R.; Afif, H.; Hamal, A.; Fahmi, H.; Merimi, M.; Lagneaux, L. Mesenchymal Stromal Cell-Based Therapy: New Perspectives and Challenges. *J. Clin. Med.* **2019**, *8*, 626. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
38. Fan, C.-G.; Zhang, Q.; Zhou, J. Therapeutic Potentials of Mesenchymal Stem Cells Derived from Human Umbilical Cord. *Stem Cell Rev. Rep.* **2011**, *7*, 195–207. [[CrossRef](#)]



© 2020 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

II- Etude de l'effet de la confluence cellulaire sur les récepteurs immunologiques et de migration des cellules souches/stromales mésenchymateuses issues de la gelée de Wharton

Article 2 Effects of Cell Confluence on the Immunological and Migration Receptors of Wharton Jelly's Mesenchymal Stem Cells.

Charlotte VOISIN, Ghislaine CAUCHOIS, Danièle BENSOUSSAN and Céline HUSELSTEIN

Stem Cells and Regenerative Medicine, 2021. DOI :10.3233/BHR210029

Intérêts de l'étude :

La deuxième partie de ce projet de thèse a fait l'objet d'une publication après présentation par poster au 9^{ème} Symposium International Europe-Chine. Celui-ci s'est déroulé du 2 au 4 Octobre 2019 à Strasbourg.

Cette étude s'intéresse à l'optimisation et à l'utilisation des CSM-GW en thérapie cellulaire. En effet, il s'avère qu'un problème de migration apparaît après injection intraveineuse des CSM *in vivo*. Cette problématique n'est pas retrouvée en ingénierie tissulaire car le biomatériau est implanté directement *in situ*. L'amélioration de la migration des CSM-GW est une priorité afin d'utiliser ces cellules *in vivo* en thérapie cellulaire, notamment dans la maladie du greffon contre l'hôte, le choc septique ou encore plus récemment la COVID-19.

L'objectif de ces recherches est d'étudier les effets de l'expansion cellulaire et plus particulièrement, l'influence de la confluence cellulaire sur les propriétés immunologiques et migratoires des cellules souches/stromales mésenchymateuses. Pour cela, les CSM-GW ont été cultivées jusqu'au passage 3 et la confluence des cellules a été contrôlée et observée par microscopie en fonction de l'espace envahi dans la flasque : 50%, 80% ou bien 100% de recouvrement cellulaire (figure 25). Les molécules exprimées pour la mise en place de la synapse immunologique ainsi que les molécules immunomodulatrices ont été étudiées en fonction de la confluence des CSM-GW. D'autre part, l'expression de différentes molécules et récepteurs impliqués dans la migration des CSM-GW ont été investigués en fonction du taux de recouvrement des cellules. Ces deux sections ont pu être analysées par cytométrie en flux.

Pour finir, les CSM-GW ont été placées en chambres de Boyden afin d'observer leur fonctionnalité migratoire.

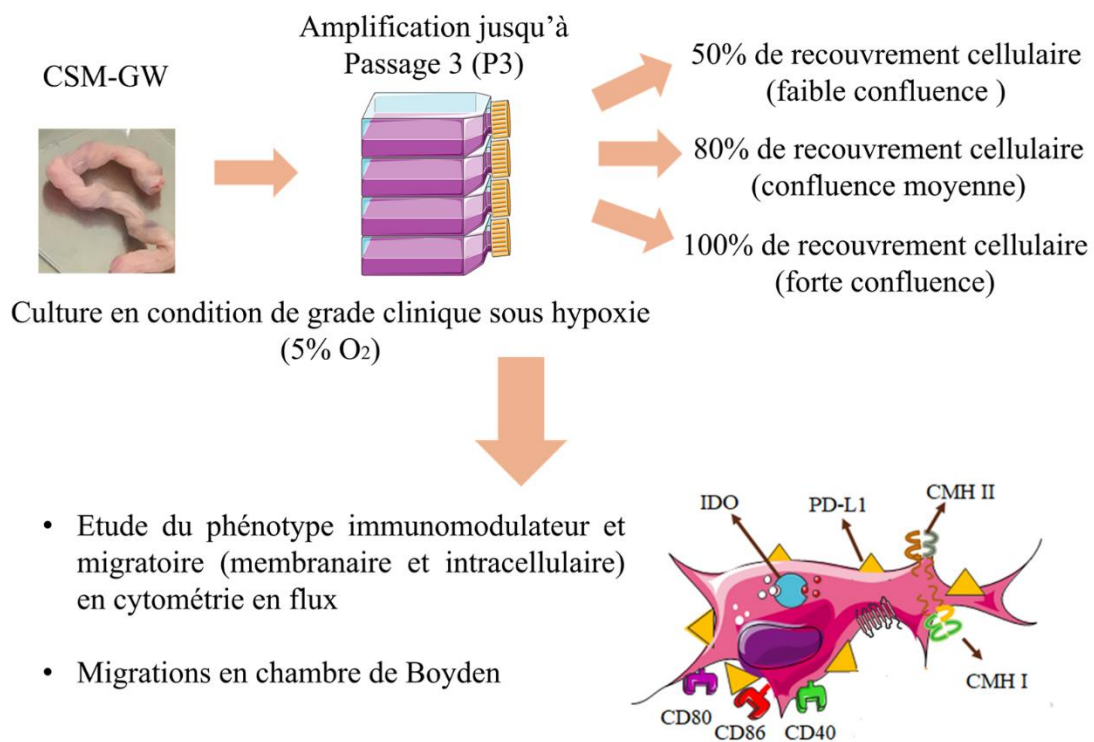


Figure 25 Méthodologie de culture et études des propriétés migratoires et immunomodulatrices des cellules souches/stromales mésenchymateuses en fonction du taux de confluence cellulaire. Les CSM-GW sont amplifiées jusqu'à la fin du passage 3 en condition de grade clinique et sous hypoxie. Les phénotypes immunomodulateur et migratoire ont été étudiés en fonction du taux de recouvrement cellulaire (50%, 80% ainsi que 100%). Pour finir, la fonctionnalité migratoire des CSM-GW a été expérimenté en chambre de Boyden.

Résultats/ Discussion :

Les résultats de cette étude montrent que les CSM-GW après passage 3 expriment certaines molécules de costimulation (principalement CD80 et CD86) ainsi que les *checkpoints* de l'immunité (PD-L1, HLA-G1, HLA-G5 et IDO) sans différence significative entre les taux de recouvrement cellulaire (50, 80 ou 100%). Le CMH de classe II n'est quant à lui jamais exprimé, ce qui montre que la synapse immunologique ne serait pas installée si les cellules étaient placées en condition allogéniques. Pour ce qui est de l'analyse des molécules liées à la migration cellulaire, il apparaît que le CD29 est exprimé significativement à 80% de confluence comparé à 50 et 100%. Il en est de même pour le CD44 à 50 et 80% de confluence par rapport à 100% de confluence cellulaire. Au regard de ces résultats, nous n'avons pas montré d'expression membranaire du récepteur CXCR4, récepteur principal de la migration. Toutefois

une expression du CXCR7 et 3 a pu être montrée. Les résultats de la migration cellulaire en chambre de Boyden nous permettent d'observer que les CSM-GW sont fonctionnellement capables de migrer et cela dans de plus forte proportion avec du lysat plaquettaire comme chimioattractant.

Cette nouvelle étude nous a donc permis de révéler que le contrôle de l'expansion cellulaire est primordial pour l'utilisation des cellules en thérapie cellulaire. En effet nous avons pu exposer que le taux de confluence cellulaire entraînait une répercussion sur l'expression des molécules, récepteurs de migration et d'immunomodulation. Une culture à faible confluence cellulaire semblerait bénéfique pour l'amélioration des propriétés immunomodulatrices et migratoires des CSM-GW. Toutefois, les mécanismes de migration des CSM doivent être par la suite étudiés méticuleusement afin d'optimiser les capacités migratoires lors d'une injection, dans un premier temps, chez l'animal.

Effects of Cell Confluence on the Immunological and Migration Receptors of Wharton Jelly's Mesenchymal Stem Cells

Charlotte VOISIN ^{a,c,1}, Ghislaine CAUCHOIS ^{a,c}, Danièle BENSOUSSAN ^{a,b,c}, and Céline

HUSELSTEIN ^{a,ca} *Université de Lorraine, CNRS, IMoPA, F-54000 Nancy, France;*

ghislaine.cauchois@univ-lorraine.fr, celine.huselstein@univ-lorraine.fr

^b *Université de Lorraine, CHRU-Nancy, Unité de Thérapie Cellulaire, Banque de Tissus, F-54000 Nancy, France;*

d.bensoussan@chru-nancy.fr

^c *UMS2008 IBSLor, F-54000 Nancy, France*

Abstract. Mesenchymal stem/stromal cells (MSCs) are a promising tool for cell-based therapy thanks to their ability to secrete trophic factors and immunomodulatory potential. So far, these cells are used to treat a variety of inflammatory diseases like sepsis or severe graft-versus-host disease (GvHD). Considering the number of cells required

for their use in cell therapy (between 1×10^3 – 10^6 cells/kg), a primary expansion is necessary. However, after an intravenous injection, few cells are found in tissue lesion or in bone marrow. One hypothesis is that chemotactic signals that guide MSCs to an appropriate environment would be altered during *in vitro* expansion.

It is therefore essential to define better conditions of expansion, particularly with good manufacturing process, to obtain enough MSCs, while preserving their immunomodulatory properties and expression of migration molecules. The aim of this research project is to investigate the effect of cell confluence on migration potential and immunological properties of Wharton's jelly (WJ) MSCs. This research is investigated with 3 levels of confluency, at 50, 80

and 100% of confluence by using good manufacturing practice (GMP).

We found a better expression of immunomodulatory molecules (PD-L1) and migratory molecules (CD44, membrane CXCR7) for cells that reached 50% confluence.

Furthermore, co-stimulatory molecules appear to be less expressed when MSCs are at low confluency.

In conclusion low confluence culture should be privileged to improve immunomodulatory and migration phenotype.

Keywords. Mesenchymal stem cell, Wharton Jelly, cell confluence, immunomodulation, migration

Introduction

Mesenchymal Stem/Stromal Cells (MSCs) are still at the center of scientific research, even after their discovery in 1976 [1]. Indeed, they were first studied for their strong differentiation and regeneration capacities but today, rather for their immunomodulatory and anti-inflammatory properties. They appear to be able to differentiate in many cell types like osteoblast, chondrocyte, neurocyte, cardiomyocyte [2].

These MSCs are found in many tissues like bone marrow, dental tissues, adipose tissues, amniotic fluid, human placenta [3] and more recently, Wharton Jelly of the umbilical cord [4].

Several advantages and disadvantages appear for each source and must be adapted [5], in fact the fetal source appears more promising because the resulting MSCs have a better capacity for proliferation and immunomodulation [6].

Thanks to their immunomodulatory properties, MSCs seem to be an interesting tool for cell therapy especially in an allogeneic context since they can robustly interact with cells of the innate and adaptive immune systems,

¹Corresponding Author: Charlotte Voisin; E-mail: charlotte.voisin@univ-lorraine.fr.

either to evade the recognition of the immune system, to stop inflammation and/or to create an immunosuppressive environment [7]. These properties are mediated by direct cell–cell contact through the expression of co-inhibitory molecules (Programmed death-ligand 1 (PD-L1), Indoleamine 2,3 dioxygenase (IDO) enzyme, Galectin-9) and the lack of expression of co-stimulatory molecules (CD80, CD86 and CD40) and the type II Major Histocompatibility Complex (MHC-II) [8]. Some of MSC immune properties could also be mediated through their secretions (HLAG₅, HGF, PGE₂, TGF- β ...) [9]. All these properties seem to be interesting to treat various immune disorders like GvH (Graft versus Host) or septic shock.

Furthermore, once injected into the patient's blood circulation, MSCs must migrate in inflammation site by chemotaxis. Even if the exact mechanism of MSCs recruitment to the site of injury remains less understood, it is well-known that chemokines and their receptors (CXCR4/CXCR7, CXCR3) are involved in this process. Some others receptors or molecules as CD44, Aquaporin 1, integrins are also described to control cell migration and homing [10–12].

Unfortunately, after intravenous injection, only 1–3% cells reach the inflammation site. Most of them are trapped in the lungs making homing process impossible [13, 14]. The loss of expression of homing molecules during expansion but also MSC culture protocols (passage number or cell aging [15, 16], cell confluence [17] or conditioned medium [10]) are part of the explanations described in the literature.

As several studies have shown there is an impact of cell confluence on MSC properties (CFU-F, population doubling and cell differentiation) [18]. In this study, we investigate the influence of expansion conditions particularly cell confluence on the immunological and migratory properties of Wharton's jelly-Mesenchymal Stem/Stromal Cells (WJ-MSCs).

Material and Methods

1.1. Human Umbilical Cord Collection, WJ-MSC Isolation and Expansion

Umbilical cords were collected at the Maternity Hospital of Nancy. This collection was approved by the Nancy Hospital ethics committee and French Ministry of Research (No. DC-2014-2114). All the productions of WJ-MSCs were performed in clinical grade conditions with a complete medium containing α -MEM culture medium (Macopharma, France) enriched with 5% of Platelet lysate (Macopharma, France) and according to good manufacturing practices. After a brief immersion of the umbilical cord in an antibiotic-antifungal solution, it was cut into thin sections and placed in small flasks (Fisher, France) containing a complete medium at 37 °C and 5% of CO₂ under hypoxia conditions (2% of O₂). The medium was changed after 4 to 5 days. After 10 days, when cell migration was observed, cord pieces were removed, and the medium changed. At the end of passage 0 (P0), when 80–90% subconfluence was reached, WJ-MSCs were washed with PBS (Macopharma, France), detached by trypsin action (TrypLe, Fischer Scientific, France) and washed by centrifugation. The cells were seeded in P1 with a seeding kit (Macopharma, France) in T75 flasks (Corning, USA) at a density of 1,000 cells per cm². At the end of P2, WJ-MSCs were frozen in a cryopreservation solution (90% albumin and 10% DMSO) and stored in –80 °C. For thawing, WJ-MSCs were quickly thawed and washed before being cultivated at 37 °C under hypoxic conditions as previously described. Cells in passage 3 having reached 50% (low confluence), 80 (subconfluence) or 100% confluence (high confluence) were detached and studied. The cell confluence was observed microscopically as a function of the space invaded by cells: 50%: confluence covered half of the culture surface of the flask, 100%: covered the entire culture surface and 80%: covered a surface between half and the whole cell's surface. In addition, cells were counted for each condition with trypan blue.

1.2. Flow Cytometry Experiments

Immune phenotype (membrane and intracellular level) were studied. Immunolabelling was performed under saturating conditions; antibodies were considered to bind to surface antigens through monovalent interaction. Cells were incubated with PBS/Bovine Serum Albumin 0.5% (PBS/BSA) (Sigma, France) and stained for 30 min at

room temperature with direct membrane antibodies:: anti-CD73-APC, anti-CD34-PE (BD biosciences, USA), and anti-CD45-FITC (Agilent, USA), anti-CD40-PE, anti-CD80-PE, anti-CD86-FITC (Miltenyi, France), anti-HLA-DPDQDR-FITC (Sony, USA), anti-CD90-FITC, anti-CD105-PE, anti-CD166-PE, anti-CD29-A700 (Biolegend, USA), anti-CD44-FITC (Beckman, USA) and anti-PD-L1-APC (eBiosciences, USA). For intracellular staining, the Cytofix/Cytoperm kit (BD Biosciences, USA) was used to permeabilize the membrane according to manufacturer's instructions. Then, cells were stained for 30 min at room temperature with anti-HLA-G1-FITC (MEM-G9 clone), anti- C-terminal amino acid sequence (22-mer) of soluble HLA-G5 and HLA-G6 proteins-FITC (2A12 clone) (Exbio, Czech Republic), anti-IDO-Alexa Fluor 488 (R&D systems, USA), anti-CXCR3-APC (Miltenyi, France), anti-CXCR4-A700 (Biotechne, USA), anti-CXCR7-APC (Biolegend, USA) antibodies. WJ-MSCs were incubated for 30 min with rabbit anti-AQP1 antibodies (Abcam, UK). Afterwards, cells were washed with PBS-BSA and centrifuged before they were incubated for 30 min with a secondary antibody, a goat anti-rabbit IgG Alexa Fluor 488 (Abcam, UK). Negative controls were performed to detect cell auto-fluorescence. Cells were analyzed with the Gallios flow cytometer (Beckman Coulter, USA) with an acquisition of 20,000 events. The cytometer was calibrated daily with Flow-Check Pro fluorospheres (Beckman Coulter, USA). Flow cytometry results were analyzed with KALUZA software (Beckman Coulter, USA).

1.3. Migration in Boyden Chamber

At the end of P3, WJ-MSCs were used for functional migration tests in Boyden chamber. One hundred thousand cells stained with a CellTracker (life technologies, USA) in 100 μ l medium were put in Fluoroblok inserts (Corning, USA) in the upper room on a membrane with 8 μ m pores. Culture medium with or without platelet lysate (5% as a positive control) was added in the lower room, culture plates were placed in normoxic conditions (5% CO₂, 21% O₂). Photos were taken after 24 h of migration with a fluorescent microscope Leica DMI3000B (10x/0,25 objective) (Leica, Germany). For fluorescence intensity quantification, Varioskan Flash microplate reader was used (Thermo Scientific, USA).

1.4. Statistical Analysis

Statistical tests and graphic representations were performed with GraphPad Prism 6 (GraphPad, USA). All the data is presented as means $\pm$ standard deviation (SD) of independent experiments with cells from different donors that were pooled. Significant statistical differences were calculated using one-/two-way ANOVA (analysis of variance) or unpaired t-test. A *p*-value less than 0.05 was considered significant for the tests. If significance existed, a post-hoc analysis would be performed using the Bonferroni post-tests for ANOVA to evaluate significance for all experiments.

Results and Discussion

1.5. Cell Phenotype and Count

First, we counted cells for all confluence conditions after trypsin action on P3 culture. We calculated, 1.25 million per flask for cells seeded at 50% confluence, 1.74 million for cells at 80% and 2.74 million per flask for cells at 100% confluence with less than 20% difference between the different cords.

We observed cell phenotype to characterize the cell type. These cells were positive for CD90, CD105, CD73 and CD166 but negative for CD34 and CD45 (Fig. 1).

So, we showed that our cells were considered as MSCs just as the International Society of Cell and Gene Therapy (ISCT) suggest it as a quality control [19].

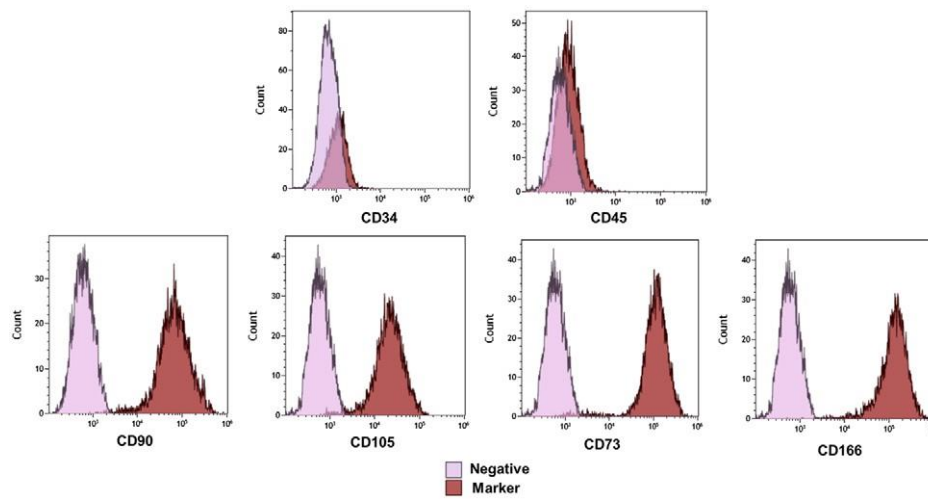


Figure 1. Cell phenotype characterized by flow cytometry. Negative control in light and marker (CD34, CD45, CD90, CD105, CD73 and CD166) in dark. The data represent fluorescence intensity for negative and each marker. Data are representative results of three independent cords.

1.6. Immunomodulatory Phenotype

We then studied whether WJ-MSCs are capable or not of being an antigen presenting cells and to promote, through the immunological synapse, molecular interactions underlying regulation with the immune response between T cells. The main co-stimulation molecules involved were: CD80, CD86, CD40 and the type II major histocompatibility complex (HLA DP DQ DR). In our study, we found a significant difference ($p < 0,05$) only in percentage of positive cell between 50% and 80% confluence for CD80 (Fig. 2A). But it appeared that if CD80 and CD40 were expressed in any conditions (ratio over 2 for 50, 80 and 100% confluence) (Fig. 2B), the CD86 molecule was expressed only at 100% confluence.

Finally, the class II Major Histocompatibility Complex (MHC) was not expressed in any conditions.

So, these results indicate that the main co-stimulation molecules involved in the formation of the immunological synapse were absent on WJ-MSCs making immune system activation impossible an allogeneic context.

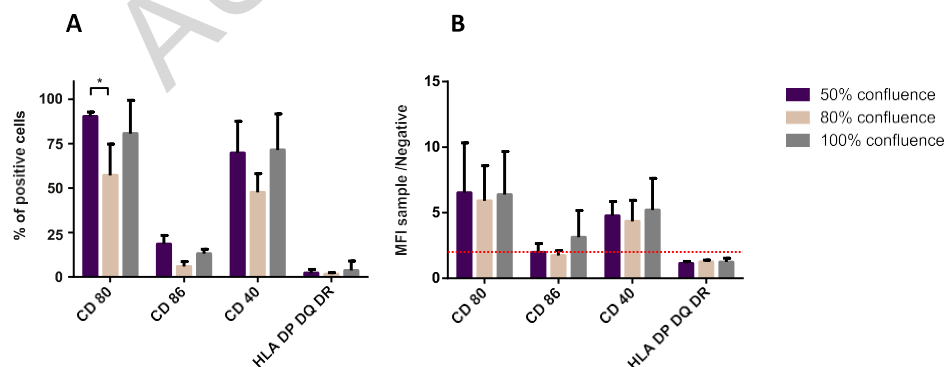


Figure 2. Molecules expression related to the immunological synapse. These molecules (CD80, 86, 40 and HLA-DP-DQ-DR) were studied at 50, 80 and 100% confluence. Results were obtained by flow cytometry and were calculated in percentage of positive cells (A) and in ratio of mean fluorescence intensity of the sample compared with negative cell (B). The dotted lines represent the expression level for each molecule (ratio higher than 2 between sample and negative cell). Data is expressed as mean $\pm$ SD (N = 3 independent cords minimum). * $p < 0,05$.

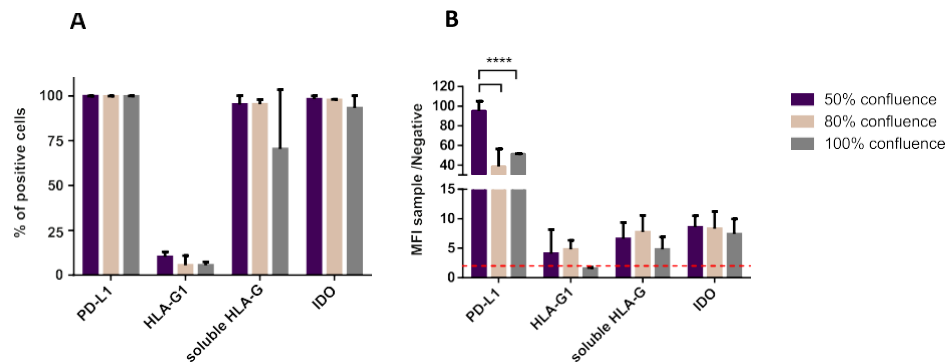


Figure 3. Immune checkpoint molecules involved in cell immunoregulation. Membrane PD-L1, HLA-G1, soluble HLA-G and IDO enzyme were studied at 50, 80 and 100% confluence. Results were obtained by flow cytometry and were calculated in percentage of positive cells (A) and in ratio of mean fluorescence intensity of the sample compared with negative cell (B). The dotted lines represent the expression level for each molecule (ratio higher than 2 between sample and negative cell). Data is expressed as mean $\pm$ SD (N 3 independent cords minimum). **** $p < 0,0001$.

1.7. Immunoregulatory Molecules

Several molecules generated by the immunoregulatory molecules are proving to be expressed like PD-L1, HLA-G1 (except cells at 100% confluence), soluble HLA-G and IDO enzyme. Approximately 100% of cells expressed these molecules (Fig. 3A).

Difference appeared in the number of molecules present on the surface of one cell, here expressed in ratio of mean fluorescence intensity of the sample compared with negative cell. Indeed, PD-L1 was significantly more expressed in ratio at low confluence (50% confluence) compared to sub-confluence (80% confluence) and high confluence (100% confluence) ($p < 0,0001$) (Fig. 3B).

It appeared that even if the most important checkpoints [8, 20] were expressed in our different cell expansion conditions, low confluence seems to enhance their expression especially for PD-L1 (the antiproliferative T Lymphocyte). Functional test as cocultures with T cell functional tests must be done to confirm this impact on cells.

1.8. Migratory Properties

After the molecules were involved in immunomodulation, we checked cell migratory phenotype through the expression of chemokine receptors (CXCR4, 7, 3), integrins- β 1 (CD29), hyaluronan receptor (CD44) and the water channel aquaporin 1, recently described by Meng *et al.*, [21] to be implied in cell migration. All these molecules were expressed by all cells in every condition except CXCR4 and less so for CXCR3 (Fig. 4A).

In number of molecules expressed for one cell, the CD29 was significantly more express at middle confluence (80% confluence) compared to 50% and 100% confluence ($p < 0,0001$). The same is observed for CD44 receptor, it was significantly more expressed at 50 and 80% confluence compared to 100% confluence ($p < 0,0001$). Only CXCR3 seems to be more expressed at high cellular confluence, but without significant difference with the other conditions (Fig. 4B).

With these phenotypic results, it appeared that WJ-MSCs would be able to engage the mechanisms of rolling and stop on the endothelial membrane after intravenous injection. This mechanism is particularly possible with integrin (CD29) and CD44 [22]. After, WJ-MSCs would embarking on a transmigration stage to pass the endothelium and thus migrate to the inflammatory site. Due to the expression of AQP1 and CXCR4 like Pelagalli *et al.* [10] showed it.

Thanks to previous results, we focus on cell seeded at 80% confluence to investigate cell migration properties *in vitro*. For this, functional test was made in Boyden chamber with five percent of platelet lysate as chemoattractant

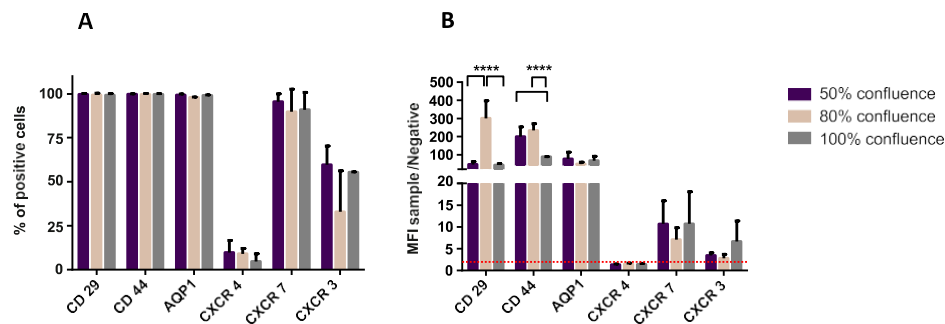


Figure 4. Migratory molecules involved in cell migration. Membrane CD44, AQP-1, CXCR4, 7 and 3 were studied at 50, 80 and 100% confluence. Results were obtained by flow cytometry and were calculated in percentage of positive cells (A) and in ratio of mean fluorescence intensity of the sample compared with negative cell (B). The dotted lines represent the expression level for each molecule (ratio higher than 2 between sample and negative cell). Data are expressed as mean $\pm$ SD (N = 3 independent cords minimum). **** $p < 0,0001$.

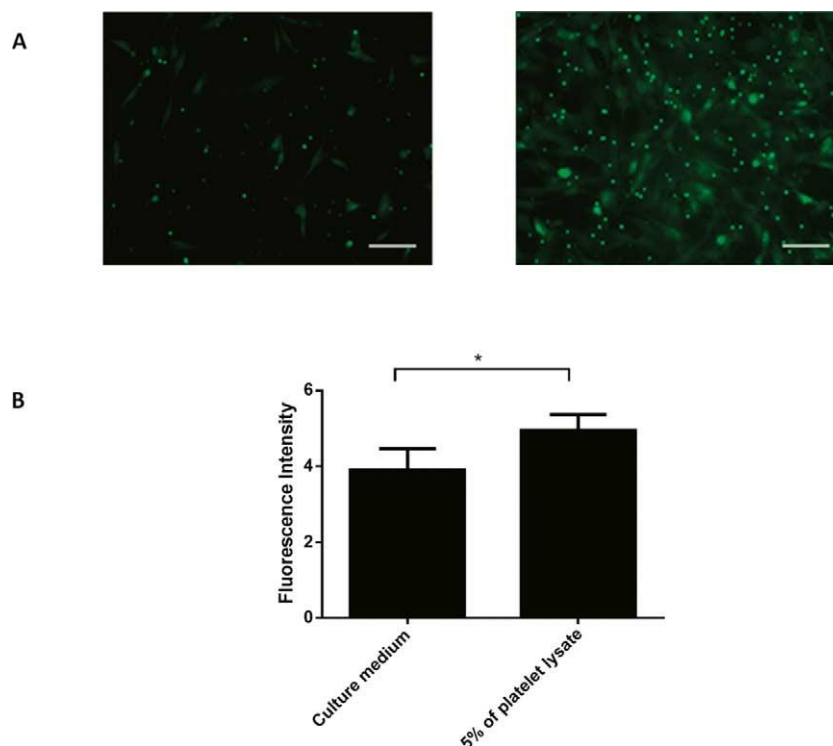


Figure 5. MSC's migration in Boyden chamber during 24 h at 80% confluence with culture medium (left) and 5% of platelet lysate (right) in the lower room, scale represent 100 μ m (A). Results are represented in histogram in fluorescence intensity (B). Data are expressed as mean $\pm$ SD (N = 3 independent cords minimum). * $p < 0,05$.

in the lower room. Pictures were analyzed after 24 h of migration (Fig. 5A). We showed that MSCs migrated poorly without chemoattractant in the lower room, but a significant migration was observed with platelet lysate (Fig. 5B) ($p < 0,05$).

Conclusion

Nowadays the immunomodulatory properties of different types of MSCs have been well demonstrated, but their homing capacity still needs to be improved [12]. In this study we focused on cell confluence to optimize immunomodulatory and migratory properties for umbilical cord MSCs.

To conclude, low confluence seems beneficial for immunomodulatory and migratory properties. However, as many cells are required for cell therapy, subconfluence culture seems to be a good understanding between the number of cells and better immunological and migratory properties. Conversely high-confluence culture does not appear to be a good alternative.

Moreover WJ-MSCs have the ability to migrate *in vitro* but further studies need to be investigated to understand the mechanisms of migration, including *in vivo* studies.

Acknowledgments

The authors would like to thank the maternity of CHRU-Nancy for the umbilical cord collection and the UMS2008 IBSLor-UMR1116 DCAC particularly Dr Huguette Louis for relevant training in flow cytometry and use of systems.

References

- [1] A.J. Friedenstein, J.F. Gorskaja, and N.N. Kulagina, Fibroblast precursors in normal and irradiated mouse hematopoietic organs., *Exp. Hematol.* **4** (1976) 267–274.
- [2] Y. Han, X. Li, Y. Zhang, Y. Han, F. Chang, and J. Ding, Mesenchymal Stem Cells for Regenerative Medicine, *Cells.* **8** (2019). doi:10.3390/cells8080886.
- [3] Z. Gazit, G. Pelled, D. Sheyn, N. Kimelman, and D. Gazit, Mesenchymal Stem Cells, in: *Handb. Stem Cells*, Elsevier, 2013: pp. 513–527. <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780123859426000457> (accessed May 23, 2016).
- [4] H.-S. Wang, S.-C. Hung, S.-T. Peng, C.-C. Huang, H.-M. Wei, Y.-J. Guo, Y.-S. Fu, M.-C. Lai, and C.-C. Chen, Mesenchymal Stem Cells in the Wharton's Jelly of the Human Umbilical Cord, *Stem Cells.* **22** (2004) 1330–1337. doi:10.1634/stemcells.2004-0013.
- [5] M. Najar, F. Bouhittit, R. Melki, H. Afif, A. Hamal, H. Fahmi, M. Merimi, and L. Lagneaux, Mesenchymal Stromal Cell-Based Therapy: New Perspectives and Challenges, in: *J. Clin. Med.*, 2019. doi:10.3390/jcm8050626.
- [6] P. Mattar, and K. Bieback, Comparing the Immunomodulatory Properties of Bone Marrow, Adipose Tissue, and Birth-Associated Tissue Mesenchymal Stromal Cells, *Front. Immunol.* **6** (2015). doi:10.3389/fimmu.2015.00560.
- [7] Q. Zhao, H. Ren, and Z. Han, Mesenchymal stem cells: Immunomodulatory capability and clinical potential in immune diseases, *J. Cell. Immunother.* **2** (2016) 3–20. doi:10.1016/j.jocit.2014.12.001.
- [8] S. Tipnis, C. Viswanathan, and A.S. Majumdar, Immunosuppressive properties of human umbilical cord-derived mesenchymal stem cells: role of B7-H1 and IDO, *Immunol. Cell Biol.* **88** (2010) 795–806. doi:10.1038/icb.2010.47.
- [9] L. da Silva Meirelles, A.M. Fontes, D.T. Covas, and A.I. Caplan, Mechanisms involved in the therapeutic properties of mesenchymal stem cells, *Cytokine Growth Factor Rev.* **20** (2009) 419–427. doi:10.1016/j.cytogfr.2009.10.002.
- [10] A. Pelagalli, A. Nardelli, E. Lucarelli, A. Zannetti, and A. Brunetti, Autocrine signals increase ovine mesenchymal stem cells migration through Aquaporin-1 and CXCR4 overexpression, *J. Cell. Physiol.* **233** (2018) 6241–6249. doi:10.1002/jcp.26493.
- [11] Y.-C. Guo, Y.-H. Chiu, C.-P. Chen, and H.-S. Wang, Interleukin-1 β induces CXCR3-mediated chemotaxis to promote umbilical cord mesenchymal stem cell transendothelial migration, *Stem Cell Res. Ther.* **9** (2018) 281. doi:10.1186/s13287-018-1032-9.
- [12] M. Ullah, D.D. Liu, and A.S. Thakor, Mesenchymal Stromal Cell Homing: Mechanisms and Strategies for Improvement, *IScience.* **15** (2019) 421–438. doi:10.1016/j.isci.2019.05.004.
- [13] A. De Becker, and I.V. Riet, Homing and migration of mesenchymal stromal cells: How to improve the efficacy of cell therapy?, *World J. Stem Cells.* **8** (2016) 73–87. doi:10.4252/wjsc.v8.i3.73.
- [14] J. Leibacher, K. Dauber, S. Ehser, V. Brixner, K. Kollar, A. Vogel, G. Spohn, R. Schäfer, E. Seifried, and R. Henschler, Human mesenchymal stromal cells undergo apoptosis and fragmentation after intravenous application in immune-competent mice, *Cytotherapy.* **19** (2017) 61–74. doi:10.1016/j.jcyt.2016.09.010.
- [15] L. Yueying, C. Naceur, M. Didier, B. Danièle, S. Jean-François, and de I. Natalia, Donor's age dependent proliferation decrease of human bone marrow mesenchymal stem cells is linked to diminished clonogenicity, *Biomed. Mater. Eng.* (2014) 47–52. doi:10.3233/BME-140973.

- [16] N. Charif, Y.Y. Li, L. Targa, L. Zhang, J.S. Ye, Y.P. Li, J.F. Stoltz, H.Z. Han, and N. de Isla, Aging of bone marrow mesenchymal stromal/stem cells: Implications on autologous regenerative medicine, *Biomed. Mater. Eng.* **28** (2017) S57–S63. doi:10.3233/BME-171624.
- [17] J. Ren, H. Wang, K. Tran, S. Civini, P. Jin, L. Castiello, J. Feng, S.A. Kuznetsov, P.G. Robey, M. Sabatino, and D.F. Stroncek, Human bone marrow stromal cell confluence: effects on cell characteristics and methods of assessment, *Cytotherapy*. **17** (2015) 897–911. doi:10.1016/j.jcyt.2015.03.607.
- [18] F.A.M. Abo-Aziza, and Z. A.A., The Impact of Confluence on Bone Marrow Mesenchymal Stem (BMMSC) Proliferation and Osteogenic Differentiation, *Int. J. Hematol.-Oncol. Stem Cell Res.* **11** (2017) 121–132.
- [19] M. Dominici, K. Le Blanc, I. Mueller, I. Slaper-Cortenbach, F.C. Marini, D.S. Krause, R.J. Deans, A. Keating, D.J. Prockop, and E.M. Horwitz, Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement, *Cytotherapy*. **8** (2006) 315–317. doi:10.1080/14653240600855905.
- [20] E.D. Carosella, N. Rouas-Freiss, D.T.-L. Roux, P. Moreau, and J. LeMaout, HLA-G, in: *Adv. Immunol.*, Elsevier, 2015: pp. 33–144. doi:10.1016/bs.ai.2015.04.001.
- [21] F. Meng, Y. Rui, L. Xu, C. Wan, X. Jiang, and G. Li, Aqp1 Enhances Migration of Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells Through Regulation of FAK and β -Catenin, *Stem Cells Dev.* **23** (2014) 66–75. doi:10.1089/scd.2013.0185.
- [22] F. Nitzsche, C. Müller, B. Lukomska, J. Jolkkonen, A. Deten, and J. Boltze, Concise Review: MSC Adhesion Cascade—Insights into Homing and Transendothelial Migration, *STEM CELLS*. **35** (2017) 1446–1460. doi:10.1002.stem.2614.

III- Etude des différents préconditionnements cellulaires sur l'immunomodulation et la migration des cellules souches/stromales mésenchymateuses de gelée de Wharton

Article 3 Impact of cell preconditioning on immunomodulation and migration properties of Wharton Jelly's Mesenchymal Stem cells.

Charlotte Voisin, Sara Nahle, Anne-Béatrice Notarantonio, Ghislaine Cauchois, Danièle Bensoussan et Céline Huselstein

En cours de soumission.

Intérêts de l'étude :

La dernière partie de ce projet de thèse porte sur l'optimisation des propriétés migratoires et immunomodulatrices des CSM-GW *via* l'utilisation de préconditionnements. Les cellules ont été amplifiées jusqu'à la fin du passage 3 puis un préconditionnement cellulaire a été appliqué pendant 1 ou 24 heures avec du Lipopolysaccharide (LPS), de l'acide Polyinosinic:polycytidylic (Poly I:C) ou du Stromal cell-derived factor 1 (SDF-1) et 48h avec de l'Interféron- γ et du Tumor Necrosis Factor α (IFN/TNF) (figure 26). Ces différents préconditionnements sont utilisés dans le but de promouvoir la migration des CSM-GW tout en conservant des propriétés immunomodulatrices optimales. L'effet du temps et du préconditionnement a été étudié du point de vue moléculaire, phénotypique et fonctionnel sur les propriétés immunomodulatrices des CSM-GW et également sur leurs propriétés migratoires. Pour les expérimentations moléculaires, des PCR quantitatives par transcription inverse (RT-qPCR) ont été entreprises. Au niveau phénotypique, l'expression des récepteurs a été analysée en cytométrie en flux. Les manipulations fonctionnelles mises en place pour étudier les propriétés immunomodulatrices des CSM-GW ont été faites grâce à des cocultures de Lymphocytes T. Pour finir, les migrations en chambre de Boyden ont été instaurées afin de quantifier les propriétés migratoires fonctionnelles des CSM-GW.

L'impact de cette étude serait après expansion, préconditionnement et conservation en banque, d'utiliser ces cellules en thérapie cellulaire pour des pathologies telles que la GvH, le sepsis ou encore la COVID-19.

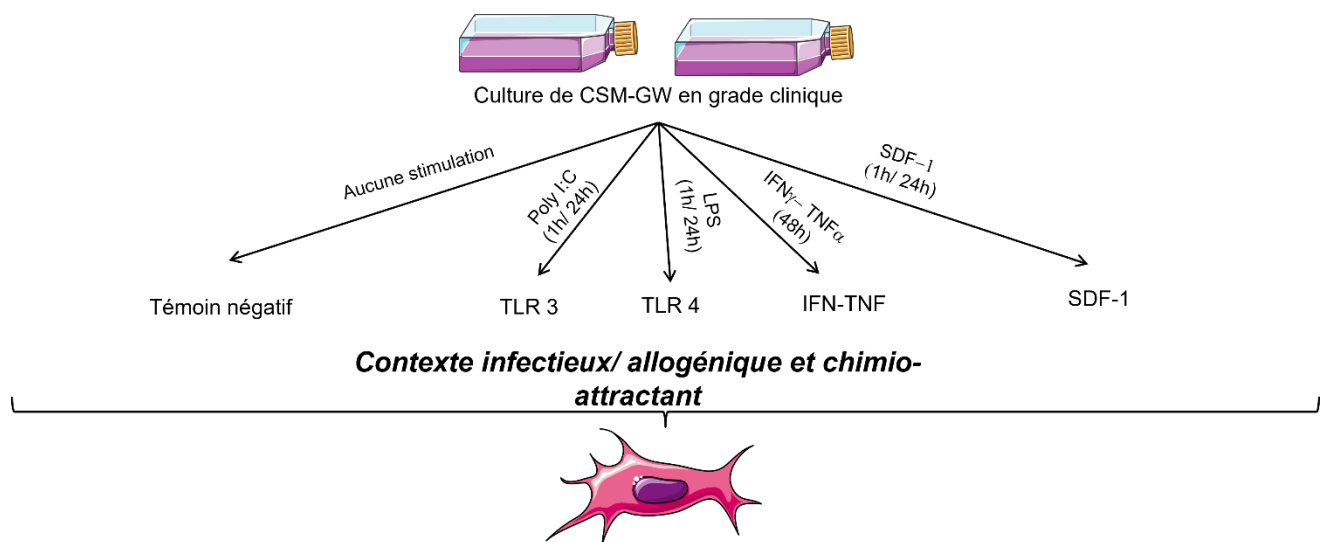


Figure 26 Méthodologie de preconditionnement des cellules souches/stromales mésenchymateuses. A la fin de leur culture en Passage 3, les CSM-GW sont preconditionnées pendant 1 et 24h à l'acide Polyinosinic:polycytidylic (Poly I:C) afin de stimuler le récepteur TLR3, au Lipopolysaccharide (LPS) afin de stimuler le TLR4, pendant 48h à l'Interféron- γ et au Tumor Necrosis Factor α (IFN γ /TNF α) et enfin pendant 1 et 24h au Stromal cell-derived factor 1 (SDF-1), tout cela dans le but de mimer un contexte respectivement infectieux, allogénique et chimio-attractant.

Résultats/ Discussion :

Les principaux résultats montrent que tous les preconditionnements apparaissent égaux du point de vue de la viabilité cellulaire et du taux de doublement cellulaire. Au niveau des marqueurs liés à la synapse immunologique, les molécules CD80, 86 et 40 se trouvent exprimés pour tous les preconditionnements avec une augmentation significative après le preconditionnement à l'IFN/TNF pour CD40 et CD80 par rapport aux cellules non preconditionnées, toutefois le CMH-II ne s'est vu exprimé dans aucune condition. Lors de tests fonctionnels en coculture avec des lymphocyte T activés, les CSM ont été capable d'inhiber la prolifération de ces derniers et ce, de manière significative.

Concernant les résultats d'immunomodulation, de nombreux transcrits de chimiokines comme RANTES, GRO α , MIF, GRO γ et ITAC se sont vues surexprimées significativement après preconditionnement à l'IFN/TNF. Au niveau membranaire, le marqueur immunomodulateur PDL1 était surexprimé de manière significative après 48h de preconditionnement à l'IFN/TNF. Pour ce qui est des facteurs solubles sécrétés par les CSM, l'IL-6, l'IL-8 ainsi que le PDL1 solubles ont été surexprimés significativement par rapport aux CSM non preconditionnées.

A propos des propriétés relatives à la migration des CSM-GW, le récepteur CXCR4 apparaît surexprimé au niveau moléculaire après 24h de préconditionnement au Poly I:C. Toutefois, ce récepteur se voit non exprimé au niveau membranaire, mais fortement au niveau intracellulaire. Après expérimentations fonctionnelles en chambre de Boyden, nous avons pu observer une migration optimale après préconditionnements au LPS et SDF. De plus, après ajout de l'antagoniste du CXCR4 (AMD3100), la migration cellulaire apparaît significativement inhibée pour les cellules préconditionnées au LPS et SDF alors qu'après ajout de l'antagoniste du CXCR3 (AMG487), la migration apparaît significativement diminuée après le préconditionnement à l'IFN/TNF. Cela laisse penser que les différents préconditionnements n'agissent pas de manière semblable sur la migration des CSM-GW.

Cette nouvelle étude a donc permis d'améliorer les propriétés immunomodulatrices grâce au préconditionnement à l'IFN/TNF et d'améliorer les propriétés de migration des CSM-GW après préconditionnement au LPS et SDF. Nous pourrions donc nous demander si un double préconditionnement à l'IFN/TNF et au LPS ou SDF, ne serait pas bénéfique dans le but de perfectionner ces deux propriétés.

Impact of cell preconditioning on immunomodulation and migration properties of Wharton's jelly Mesenchymal Stem/Stromal cells

Charlotte Voisin^{1,3*}, Sara Nahle^{1,3}, Anne-Béatrice Notarantonio^{1,3}, Ghislaine Cauchois^{1,3}, Danièle Bensoussan^{1,2,3} and Céline Huselstein^{1,3}

¹Université de Lorraine, CNRS, IMoPA, F-54000 Nancy, France

²Université de Lorraine, CHRU-Nancy, Unité de Thérapie Cellulaire, Banque de Tissus, F-54000 Nancy, France

³UMS2008 IBSLor, F-54000 Nancy, France

* Correspondence:

Corresponding Author

charlotte.voisin@univ-lorraine.fr

Keywords: Mesenchymal stem/ stromal cells, Wharton's jelly, Immunomodulation, Migration, Preconditioning, Interferon- γ , Tumor Necrosis Factor α , Toll-like receptors.

Abstract

Mesenchymal stem/stromal cells (MSC) have been extensively studied for two decades as they present very interesting properties like regenerative and immunomodulatory ones. Moreover, they can be largely expanded *in vitro* in 2-dimension-cultures but also in bioreactors according to GMP compliant protocols allowing their use into the patient as an advanced therapy medicinal product (ATMP), in some cases through market authorization. Unfortunately, MSC-*in vitro* expansion has been reported implicated in the loss of biological functions, as migratory properties. Thus, once infused *in vivo*, these cells are trapped in lungs in a very short time. Several studies report the advantages of preconditioning protocols to preserve the migration properties of MSC.

The purpose of this study is to define a preconditioning regimen that improves Wharton's jelly MSC (WJ-MSC) migration while maintaining their immunomodulatory properties. Different cell preconditioning were studied: Interferon- γ (IFN) and Tumor Necrosis Factor α (TNF), Lipopolysaccharide (LPS), Polyinosinic:polycytidylic acid (Poly I:C) or Stromal cell-derived factor 1 (SDF-1) during different time, 1h, 24h or 48h. These preconditioning regimens are used to mimic different environments, such as IFN/TNF preconditioning to reproduce an allogeneic situation, LPS to mimic a bacterial infection, Poly I:C to mimic a viral infection, while SDF is used to represent cell attraction and migration.

Results let appear that IFN/TNF is better for maintaining immunomodulatory properties, notably with an overexpression of chemokines transcripts (RANTES, GRO α , MIG, GRO γ and I-TAC), overexpression of ligand PD-L1 and an increase paracrine activity (IL6, IL8 and soluble PD-L1). While LPS, SDF and Poly I:C improve migration properties, with overexpression of CXCR4 transcript and increased migration into Boyden chamber with these 3 preconditioning.

To conclude, these different preconditioning regimens, could then be used together to improve both migration and immunomodulation of WJ-MSC. Notably to use these cells in cell therapy.

Introduction

Mesenchymal stem/ stromal cells (MSC) are widely studied since their first description in 1976 by Friedenstein (1). Their classical definition relies on the fact they (i) adhere to plastic, (ii) present certain differentiation clusters such as CD90, CD105 and CD73 and (iii) are negative for the type II major histocompatibility complex (MHC-II) and hematopoietic markers (CD45, CD34, CD14 and CD19) and (iv) are able to differentiate into osteocytes, adipocytes and chondrocytes (2). They can be found and isolated in different tissues: adipose tissue, articular cartilage, brain, dental tissue or perinatal tissue like amniotic membrane, placenta, Wharton's jelly or cord blood (3).

They have often been studied for their cell regeneration properties like bone or cartilage tissue regeneration. During the last decade, they have been increasingly studied for their immunomodulatory properties including the fact that they inhibit T cell proliferation and suppress the allogeneic T cell response, in a contact-dependent way (4). They can also modulate the immune system thanks to paracrine properties (5). So, they would be particularly effective in cell therapy in severe inflammatory diseases like septic shock (6) or Graft versus Host Disease (GvHD) (7) and more recently for the acute respiratory distress syndrome secondary to COVID-19 infections (8,9).

Unfortunately, after intravenous injection, MSC accumulate in the lungs and after 24 hours, less than 0.1% are found in other tissues (10) and the others do not pass the pulmonary barrier (11). The migration mechanism of Bone-Marrow MSC (BM-MSC) would involve the steps related to diapedesis, notably with a step of rolling, activation, arrest, and transmigration (12). The rolling step involves the glycoprotein CD44, but before the activation step is primarily mediated by the chemokine receptor CXCR4 which binds SDF-1. The arrest step is enabled by integrins and finally the last transmigration step requires matrix metalloproteinases. Most of these proteins and receptors seem to be expressed except for the CXCR4 receptor, which does not seem to be exposed on the surface of MSC (13,14). Then, *in vitro* expansion is described to alter the migration potential of MSC (15). In our previous work, we reported the effect of cell confluence during *in vitro* expansion on the expression of molecules involved in migration. Indeed, low-confluence cultures appear beneficial for immunomodulatory and migratory properties (16).

Many publications mentioned the interest of enhancing therapeutic properties of MSC during expansion. Cell preconditioning consists in stimulating cells during their *in vitro* expansion to potentiate some specific function or lineage-specific differentiation. For MSC based therapies, several preconditioning approaches are described using mainly either inflammatory cytokines, or hypoxia, or pharmacological drugs and chemical agents (17). The benefit is widely described, especially for the immune properties, as a general effect, pro-inflammatory preconditioning increases the immunosuppressive properties of MSC by stimulating the secretion of anti-inflammatory and immunomodulatory factors (18). More recently, many researchers try to enhance MSC migration (12,19) using different methods like change route administration, pretreatment or preconditioning or genetic modification.

To support this, Toll Like Receptor (TLR) stimulation seems to be interesting to enhance immunomodulatory and migratory MSC's properties. Indeed, Tomchuck *et al*, have shown that TLR3 stimulation with Polyinosinic:polycytidylic acid (Poly I:C) and TLR4 stimulation with Lipopolysaccharide (LPS) appeared to be a mechanism that would allow the recruitment, migration and activation of the immunomodulatory function of MSC in injured or stressed tissue (20). Later, the same team showed that Poly I:C and LPS increased MSC migration in Boyden chamber specifically after 1h of preconditioning compared to 24h. They also established that TLR4 stimulation increased the expression of pro-inflammatory mediators (pro-inflammatory phenotype: MSC 1) while TLR3 stimulation suppressed T cell activation (anti-inflammatory phenotype: MSC 2) (21).

Cell preconditioning could also contribute to improve those properties (22,17,23). The optimal preconditioning expected in MSC-based therapy will be the one which simultaneously improves immunomodulatory and migratory properties.

The aim of this work is to enhance migration properties while maintaining immunomodulatory features of WJ-MSC thanks to preconditioning regimens composed either of Interferon- γ (IFN) and Tumor Necrosis Factor α (TNF), LPS, Poly I:C or Stromal cell-derived factor 1 (SDF). We investigated the impact of those different preconditioning regimens on gene expression, cell phenotype, and on the immunomodulatory and migratory MSC properties.

Materials and Methods

1. WJ-MSC and HT-1080 culture

The umbilical cords were received from the Maternity Hospital of Nancy. This collection was approved by the Nancy Hospital ethics committee and French Ministry of Research (No. DC-2014-2114). Wharton's Jelly MSC from umbilical cords were grown according to Good Manufacturing Practice as previously described (16). Cells at passage 3 (P3) having reached 80% overage of the culture dish surface (named "subconfluence") were detached with Trypsin-Ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) (0.025%) and studied. In addition, viable cells were counted for each condition thanks to trypan blue dye exclusion with Bio-Rad TC20 Automated cell counter (BioRad, USA).

HT-1080 NucLight green cells (Sartorius company, Germany) were cultured in T75 flasks with alpha-MEM medium (Lonza, Switzerland) enriched with 10% fetal bovine serum, 2 mM glutamine, 100 IU/mL penicillin, 100 μ g/mL streptomycin, and 2.5 μ g/mL amphotericin B and changed every 3 days.

2. WJ-MSC preconditioning

WJ-MSC were preconditioned with 4 different regimens. To mimic an allogeneic environment with IFN (20ng/mL) and TNF (30ng/mL) (Miltenyi Biotec, Germany), this mix was added directly to the cultured medium for 48 hours before trypsinization. To mimic an inflammatory environment induced by a bacterial or a viral infection, LPS (Sigma, USA) or Poly I:C (Sigma, USA), respectively were added to the culture medium at a final concentration of 1 μ g/mL for 1 or 24 hours before trypsinization, as a positive control of migration, a medium supplemented with SDF-1 (Miltenyi Biotec, Germany) (30ng/mL) was used.

3. Transcript analysis by RT-qPCR

After P3, all cell conditions were manually detached and recovered in QIAzol (Qiagen, Germany) to be placed at -80°C. Then, total RNA was extracted with Phenol-chloroform method and dosed by NanoDrop One (ThermoScientific, USA). One hundred nanograms were used for cDNA synthesis. Gene's expression was determined by RT-qPCR using ViiA 7 Real-Time PCR System. Lists of primer sequences (Eurogentec, Belgium) used for RT-qPCR was kindly provided by K Bider, Hôpital Tel Hashomer, Ramat Gan, Israël (table 1). Reactions were set at 95°C for 30 seconds, followed by 40 cycles of 95°C for 15 sec and 60°C for 1 minute. Data were analyzed by QuantStudio Real-Time PCR System and expressed in fold changed compared to gene expression for unstimulated cells. The expression was calculated with the $\Delta\Delta$ Ct method with RPS29 (40S Ribosomal Protein S29) housekeeping gene. Cycle threshold above 35.0 were not considered for the analysis.

4. Flow cytometry experiments

Intracellular and membrane immunolabeling was performed under saturating conditions. Cells were incubated with phosphate-buffered saline/Bovine Serum Albumin 0.5% (PBS/BSA) (Sigma, France) and stained for 30 min at room temperature with direct membrane antibodies: anti-CD40-phycoerythrin (PE), anti-CD80-PE, anti-CD86-fluorescein isothiocyanate (FITC) (Miltenyi, France), anti-HLA-DP, DQ, DR-FITC (Sony, USA), anti-CD29-Alexa 700 (A700) (Biolegend, USA), anti-CD44-FITC (Beckman, USA) and anti-PD-L1-allophycocyanin (APC) (eBiosciences, USA). For intracellular staining, the Cytofix/ Cytoperm kit (BD Biosciences, USA) was used to permeabilize the membrane according to manufacturer's instructions. Then, cells were stained for 30 min at room temperature with anti- C-terminal amino acid sequence (22-mer) of soluble HLA-G5 and HLA-G6 proteins-FITC (2A12 clone) (Exbio, Czech Republic), anti-IDO-Alexa Fluor 488 (R&D systems, USA), anti-CXCR3-APC (Miltenyi, France), anti-CXCR4-A700 (Biotechne, USA), anti-CXCR7-APC (Biolegend, USA) antibodies. Lastly, an indirect immunolabeling was used to detect aquaporin. Briefly, WJ-MSC were incubated for 30 min with rabbit anti-AQP1 antibodies (Abcam, UK). Afterwards, cells were washed with PBS/BSA and centrifuged before they were incubated for 30 min with a secondary antibody, a goat anti-rabbit IgG Alexa Fluor 488 (Abcam, UK). Negative controls were performed to detect cell auto-fluorescence. Cells were analyzed with the Gallios flow cytometer (Beckman Coulter, USA) with an acquisition of 50,000 events. The cytometer was calibrated daily with Flow-Check Pro fluorospheres (Beckman Coulter, USA). Flow cytometry results were analyzed with KALUZA software (Beckman Coulter, USA).

5. Detection of soluble molecules by Enzyme-linked immunosorbent assay

For Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA), cells were cultivated in P3. Culture media were collected at the end of P3 before trypsinization and centrifuged (1000 rpm/min, 5 min) before storage at -20°C . Soluble molecules secreted by WJ-MSC were dosed, by competitive ELISA for PGE₂, and sandwich ELISA for IL-6, IL-8, IL-10, VEGF, TGF- β 1, HGF, PD-L1, SDF-1 and MIG (DuoSet Kit, R&D Systems, USA), as described by the manufacturer. When values were above the kit specifications, the samples were diluted. Quantification of soluble molecules was performed with plate reader Varioskan Flash (Thermo Fisher, USA) at 450nm.

6. T lymphocyte proliferation assays

Human peripheral blood mononuclear cells were obtained after gradient density separation derived from blood of healthy donors. T cells were purified with immunomagnetic negative selection Pan-T cells depletion kit (Miltenyi Biotec, Germany). The CD3⁺ cells were labeled with Carboxyfluorescein succinimidyl ester (CFSE) (BD Biosciences, USA) and activated by anti-CD3 and anti-CD28 antibodies (R&D Systems, USA). The co-culture was performed in a 96-well culture plate and included 50,000 WJ-MSC, preconditioned or not, and 50,000 T CD3⁺. Cells were cultured with 10% bovine serum albumin (BSA) added to RPMI medium (Gibco, ThermoFisher, USA) for 5 days in normoxic conditions (5% CO₂, 21% O₂). After these days, cells were collected, resuspended in Buffer, and washed during 5 minutes. Then the cells were stained at 4°C in the dark during 20min with antibodies, anti-CD3-PE (BD Biosciences, USA), anti-CD4-PE-Cyanin 7 (BD Biosciences, USA) and anti-CD8-peridinin-chlorophyll-protein complex cyanin 5.5 (PerCp Cy5.5) (BD Biosciences, USA). After this time, the cells were washed, resuspend and analyzed in flow cytometry with the Gallios flow cytometer (Beckman Coulter, USA).

7. Migration in Boyden chamber

At the end of P3, WJ-MSCs were used for functional migration tests in Boyden chamber. This technology was made with Cytoselect fluorometric format (Cell Biolabs, Inc, USA). Seventy thousand WJ-MSCs or HT-1080 serving as positive control were put in the upper room on a membrane with 8µm pores. Culture medium with or without platelet lysate, SDF-1 (50ng/mL) and MIG (30ng/mL) was added in the lower room. Before that, CXCR4 (AMD 3100) and CXCR3 (AMG 487) antagonists were incubated with MSCs for 1h and 2h respectively before being placed in the upper room. Culture plates were placed in normoxic conditions (5% CO₂, 21% O₂) for 24 hours. After that, cells were detached, lysed, and marked with fluorescent dye. Then, quantification of migration was performed with plate reader Varioskan Flash (Thermo Fisher, USA) at 480/520 nm.

8. Statistical Analysis

Statistical tests and graphic representations were performed with GraphPad Prism 9 (GraphPad, USA). All data is presented as means ± standard deviation (SD) of independent experiments with cells from different donors that were pooled. Significant statistical differences were calculated using one- /two-way ANOVA (analysis of variance). A *p*-value less than 0.05 was considered significant for the tests. If significance existed, a post-hoc analysis would be performed using the Tukey's post-tests for ANOVA to evaluate significance for all experiments.

Results

1. Impact of preconditioning on WJ-MSCs

We first verified if the different preconditioning regimens impacted WJ-MSCs renewal properties, specifically cell viability and population doubling level. The results (figure 1A and B) show that no difference appear between preconditioning and time of preconditioning. So, these molecules do not affect nor cell viability nor population doubling level (*p*>0.05).

Then, we examined the TLR, mainly TLR3 and TLR4, because their activation could modulate the function and therapeutic effect of MSCs.

So, we verified if LPS and Poly I:C preconditioning activate the Toll like receptor (TLR) 3 and 4 in WJ-MSCs. In the figure 2, TLR 3 and TLR4 are weakly expressed on cells preconditioned with Poly I:C and LPS, respectively (percentage under 2). But TLR 3 and 4 expression increases weakly after 24h appropriate preconditioning compared to 1h. In fact, TLR 4 expression was 1.21% for 24h preconditioning against 0.59% for 1h preconditioning (figure 2A) and TLR 3 expression was 1.34% for 24h preconditioning against 1.19% for 1h preconditioning (figure 2B).

2. WJ-MSCs's immune properties

We focus our first part on WJ-MSCs immune properties, notably by studying immune membrane phenotype and immunomodulatory properties in coculture with T cells. We assessed expression of surface molecules including costimulatory molecules (CD80, 86 and 40) and MHC-II. The expression of these surface molecules was evaluated through flow cytometry. Results were expressed in ratio mean fluorescence intensity (MFI) of the sample on the natural cell autofluorescence. If this ratio was under 2, the marker is considered negative. This results presentation in MFI allows to reflect the number of molecules present in cell.

Thus, figure 3A shows that regardless the preconditioning regimen used, no expression of HLA class II molecules DP, DQ, DR is observed. Whereas we showed a significant increased expression of some costimulatory molecules after IFN/TNF preconditioning: 8 MFI for CD80, 70 MFI for CD40 (*p*<0.01 and *p*<0.05 respectively) and between 1h and 24h preconditioning

with 7 MFI for SDF ($p<0.001$). At the same time, we studied immunomodulation capacities of WJ-MSC in a coculture with T cells. Results in figure 3B show that all MSC conditions can significantly inhibit the T cell proliferation. Significant results show an average T cell inhibition of 50 percent.

After that, we were interested in the WJ-MSC's chemoattraction properties mediated by soluble factors to attract immune cells. Then, chemokines transcripts level was performed. In the figure 4, the results presented are expressed in fold change compared to non-preconditioned cells. This means that when this ratio is higher than 1, a positive regulation is observed for the studied preconditioning.

Results reveal that for CCL and CXCL family transcripts, the mRNA from MSC preconditioned 48h with IFN/TNF is significantly expressed compared to non-preconditioned cells. This overexpression is visible especially for RANTES (CCL5) ($p<0.05$), GRO α (CXCL1) ($p<0.05$), MIG (CXCL9) ($p<0.0001$), GRO γ (CXCL3) ($p<0.0001$) and I-TAC (CXCL11) ($p<0.05$). The other transcripts MIP1a (CCL3), MIP1b (CCL4), MCP2 (CCL8), CCL22, SDF-1 (CXCL12), ENA-78 (CXCL5) and IP-10 (CXCL10) are expressed for WJ-MSC without significant difference between preconditioning (data not shown).

Concerning expression of the main immunomodulatory molecules, if PD-L1, IDO and HLA-G5 were expressed under all conditions (figure 5), only PD-L1 was significantly expressed on MSC preconditioned with IFN/TNF during 48h compared to cells without preconditioning ($p<0.001$).

In addition, we analyzed the potential of WJ-MSC to secrete interleukins, growth factors and immunity molecules to create an immunomodulatory environment. The supernatants of P3 were collected before trypsinization. As our different conditions showed identical population doubling levels, we then consider that the number of cells is identical therefore the observed differences are related to the preconditioning and not to a variable number of cells.

Different soluble factors were analyzed: PGE $_2$, VEGF, HGF, IL-6, IL-8, PDL1 and TGF- β 1 (figure 6). A significant increased secretion was observed only with 48h IFN/TNF preconditioning for IL6, IL8 and soluble PD-L1 compared to no preconditioning. SDF preconditioning showed a significant decrease of prostaglandin E $_2$ secretion compared to no preconditioning ($p<0.05$ for 1h SDF preconditioning and $p<0.01$ for 24h SDF preconditioning). VEGF was not secreted no preconditioning and a significant expression of this growth factor was observed for 1h LPS preconditioning ($p<0.05$) and 24h Poly I:C preconditioning ($p<0.01$). Significant difference appeared between 1h and 24h of Poly I:C, with an overexpression for 24h preconditioning ($p<0.05$). In contrast, no secretions were detected for IL10 and MIG.

3. WJ-MSC's migration properties

To determine the effect of preconditioning on WJ-MSC's migration, we first analyzed CXCR3, CXCR4, CXCR7 expression at both molecular and protein levels.

The results show in figure 7 a transcriptional activity for CXCR3, CXCR4, CXCR7 and AQP1 only for preconditioning with SDF and Poly I:C.

One significant difference is represented with an overexpression of CXCR4 transcript only with 24h Poly I:C preconditioning *versus* non-preconditioned cells.

Then we studied protein expression of these same receptors and pores. These can be expressed at the membrane level but also at the intracellular level. Flow cytometry results are expressed in MFI.

About membrane expression of migratory phenotype, it appears that CXCR3 and CXCR7 are slightly expressed (MFI higher than 2 for CXR3 and MFI higher than 5 for CXCR7 with and without preconditioning) (figure 8) while membrane CXCR4 is not observed. However, total (membrane and intracellular) CXCR3, CXCR4 and CXCR7 are largely expressed, with a

tendency to overexpression for IFN/TNF preconditioning for CXCR3 and CXCR7. For the other proteins related to migration, AQP1, CD44 and CD29 (figure 9) they appear to be highly expressed with no significant difference with or without preconditioning.

Finally, we tested migration capacities of WJ-MSC using the transwell migration assay. It appears that, regardless preconditioning conditions, cells migration is improved with addition of platelet lysate but with no significant difference. Cells preconditioned with SDF migrate significantly in greater proportion than cells with IFN and TNF preconditioning ($p<0.05$) (figure 10).

Regarding the results on migration-related mechanisms, two antagonists were added in advance to the cultures. The results in figure 11A show a significant decrease in migration for MSC preconditioned with LPS and SDF after contact with the CXCR4 antagonist. While IFN/TNF preconditioned cells show only a significant decrease in migration after contact with the CXCR3 antagonist (figure 11B).

Discussion

Mesenchymal stem/ stromal cells are still today studied for their numerous properties of regeneration but also for their immunomodulating potential. We focus this study on preconditioning to improve immunomodulatory and migratory properties in order to use WJ-MSC as an advanced therapy medicinal product (ATMP) (24). Here we used different molecules for the purpose of being used as preconditioning: LPS, SDF, Poly I:C and IFN/TNF. In this study, different preconditioning times (1h and 24h) were investigated considering the results of Waterman's team for TLR (21). The experiments using IFN/TNF were only set up after 48h of preconditioning because it was already the subject of a previous study (25).

In our previous researches (25,16), we showed that the expanded cells are positive for CD90, CD105, CD73, CD166 and negative for CD34 and CD45. In this new study, we take the same gating strategies and as requested by the International Society of Cell Therapy (ISCT) (2), we assume that our cells from Wharton's jelly have a stromal/mesenchymal phenotype.

The first thing we looked at was the impact that preconditioning could have on cell viability and proliferation. So, we have demonstrated that the four preconditioning does not affect cell properties while very few studies focus on the effect of preconditioning on cells.

Concerning the low expression of TLR 3 and 4, other teams have demonstrated that expression of TLR 4 is negative or very low expression for WJ-MSC and low expression of TLR3 under inflammatory conditions (26,27). However, all these researches show that the stimulation of these TLRs remains beneficial for the induction of the immunosuppressive power of MSCs.

Some molecules of synapse showed activation, like CD80, 86 or 40 in in almost all conditions but an overexpression appeared only with IFN/ TNF preconditioning specifically for CD80 and CD40. No expression was shown for type 2 major histocompatibility complex (HLA DP, DQ, DR), which leads us to believe that WJ-MSC cannot active immune system and T cell particularly. What has been proven with inhibition of T cell proliferation in contact coculture as we demonstrated and also Weiss *et al.*, (28). But any difference was observed between the preconditioning nor between the preconditioning times.

Beyond the cell-cell contact, the immunomodulation mechanism of MSC also involves the secretion of a certain number of soluble factors capable of interacting through paracrine effect with immune cells as PDL1, the IDO enzyme or the soluble HLAG5. In our study, these three molecules were expressed with and wo preconditioning, but only PDL1 was significantly overexpressed with IFN/TNF preconditioning compared to cells without preconditioning ($p<0.001$). Same overexpression with IFN/TNF is recovered in several chemokines transcripts which could mean that the cells would be able to attract and modulate immune cells to the inflammatory site. For the paracrine effects, this study shows various secretion involved in

immunomodulation. Especially with IFN and TNF preconditioning for IL6, IL8 and PDL1 expression. Same significant expression was demonstrated with IFN pretreatment for IL6 and IL8 in WJ-MSC by Raicevic team in 2011 (26). Taken together these secreted molecules act for an immunomodulatory environment (29).

In conclusion, it appears that at the molecular and protein levels, preconditioning with IFN and TNF results in a better immunomodulatory phenotype of WJ-MSC. These findings have been demonstrated in several studies for IFN and TNF, however no study to date has compared these four different preconditions.

The second innovative element of this study is the simultaneous analysis of immunomodulatory and migratory properties. Thus, we studied in this second part the properties related to the migration of WJ-MSC.

Concerning this functionality, the different steps of the process are limiting in the therapeutic action of MSC, that is why it is important to understand the mechanisms and improve it. Several hypotheses are then evoked, and it appears that the expansion of cells are a limiting factor in the loss of this migratory potential, as we have shown in our previous study with the impact of cell confluence (16). Also, cell preconditioning appears to be favorable especially in increasing MSC migration (22,17).

Like Tomchuck, we demonstrate that Poly I:C and LPS, with TLR 3 and TLR 4 activation are beneficial for the MSC migration (20), however compared with Waterman *et al.*, CXCR4 transcript and migration are beneficial with 24h preconditioning in comparison to 1h (21).

In addition, our results show that preconditioning with SDF would improve the migration rate of MSC as demonstrated in 2019 by Farashah *et al* (30).

Unfortunately, preconditioning with IFN and TNF did not show any benefit for WJ-MSC migration.

We showed that CXCR4 are not expressed on WJ-MSC's membrane as it was demonstrated for BM-MSC (14,31). In a recent study, it was observed that this low expression could be due to the enzymatic dissociation method of cells. This team showed that after dissociation with 0.05 % trypsin and 1mM EDTA, 5.6% of MSC expressed the CXCR4 receptor while after scraping, 30.4% of MSC expressed it (32). Then, non-enzymatic dissociation could preserve the CXCR4 receptor on the MSC surface.

To study CXCR4 and its potential involvement in MSC migration, we used antagonists before migrating cells in Boyden chamber.

The use of antagonists showed that the migration mechanism of WJ-MSC could be mainly due to the CXCR4. Then, for the first time we showed that migration is generated by the SDF-1/CXCR4 axis in WJ-MSC as demonstrated several times on bone marrow derived MSC (33).

Interestingly, no major difference was observed for immunomodulatory aspect between 24h or 1h preconditioning for LPS, SDF or Poly I:C unlike the work of Waterman (21). Even if CXCR4 transcripts was overexpressed during 24h preconditioning. So, we decided to perform functional migration after 24h preconditioning.

Conclusion

To conclude, this study shows that preconditioning with IFN/ TNF seems to be better for increase the immunodulatory properties of WJ-MSC while preconditioning with SDF, LPS or Poly I:C seems to improve cell migration. We could therefore ask ourselves if preconditioning with IFN/TNF mixed with the others preconditioning would not be a good alternative to boost immunomodulatory properties and cell migration at the same time. Moreover, the different preconditioning must be tested *in vivo*, for example in a GvHD or septic shock model.

Figures

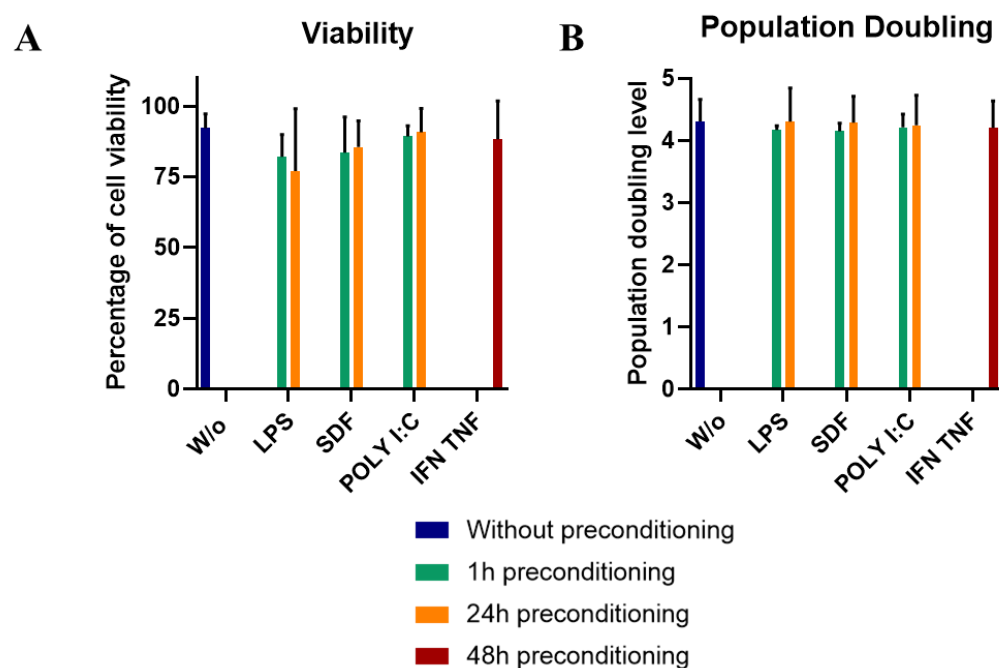


Figure 1 Cell viability and population doubling according to the different time (1h, 24h and 48h) and preconditioning (without preconditioning, LPS, SDF, Poly I:C and IFN/TNF). Cell viability and population doubling level (PDL) was performed with a count of trypan blue after 72 hours. PDL is study in Passage 3 after 8 days of culture. Data are expressed as mean $\pm$ SD. N= 4 independent umbilical cords.

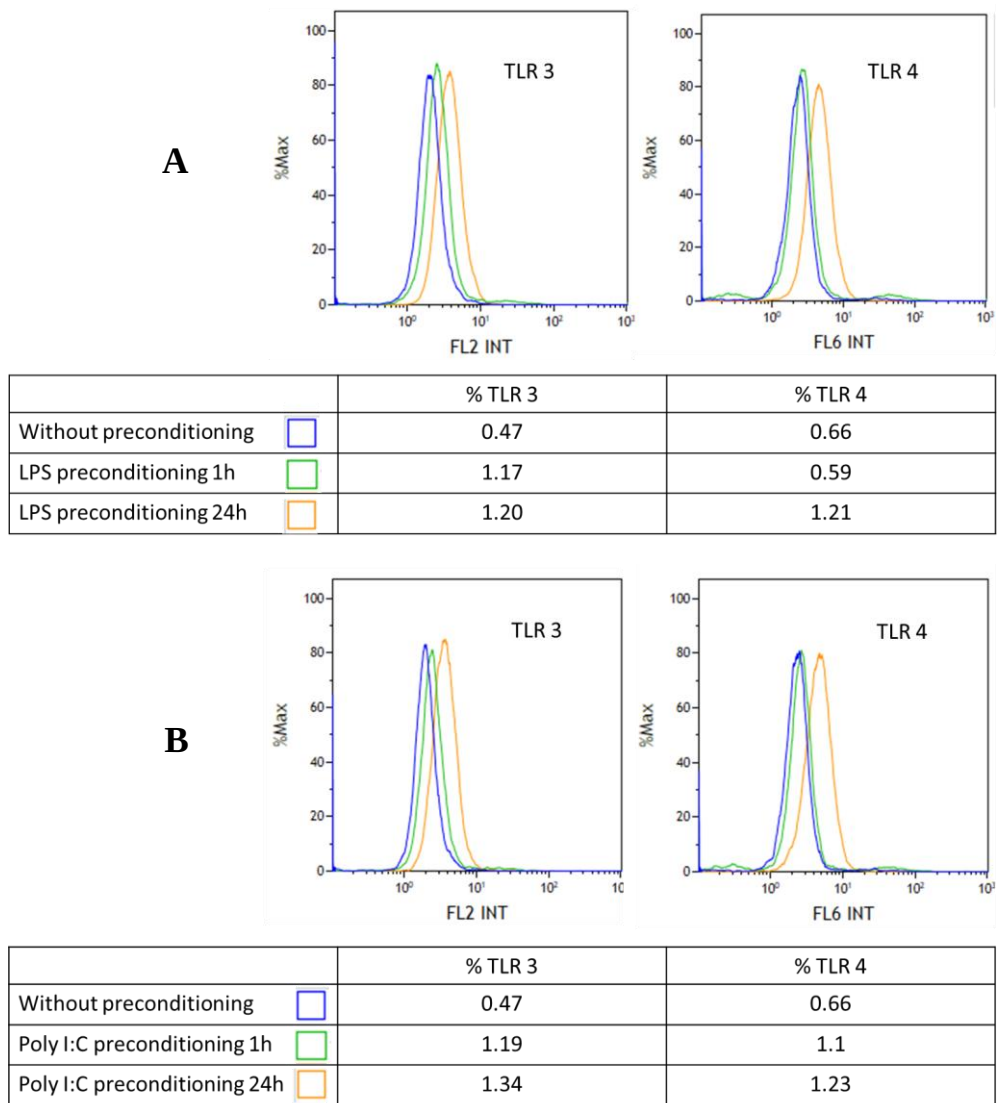


Figure 2 TLR 3 and 4 expressions without preconditioning (autofluorescence), with LPS (A) and Poly I:C (B) preconditioning during 1h and 24h. Data are expressed in percentage by flow cytometry.

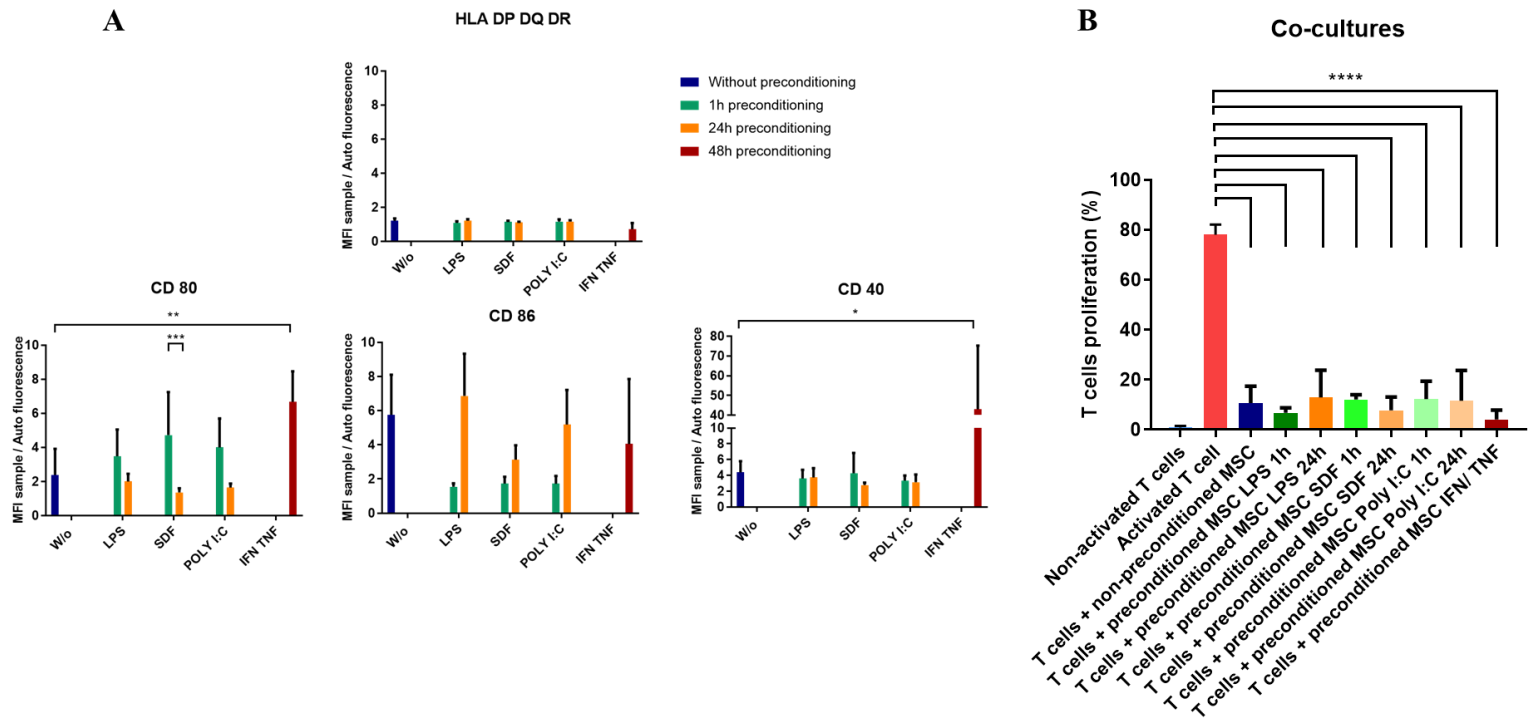


Figure 3 Immunological synapse marker's expression (A) and T cell proliferation in coculture WJ-MSC (B) according to the different time (1h, 24h and 48h) and preconditioning (without preconditioning, LPS, SDF, Poly I:C and IFN/TNF). Immunological synapse markers studied are HLA DP DQ DR, CD80, CD86 and CD40. Results are expressed in mean fluorescence intensity (MFI) of sample under cell autofluorescence. Results with MFI under 2 are considered negative for the marker. Cocultures was performed in 96 well with 50,000 WJ-MSC and 50,000 CD3⁺ tagged with Celltrace. Data are expressed by flow cytometry as mean $\pm$ SD. N= 4 independent cords for immunological synapses markers and N=3 for cocultures. * $p < 0.05$ ** $p < 0.01$ *** $p < 0.001$ **** $p < 0.0001$.

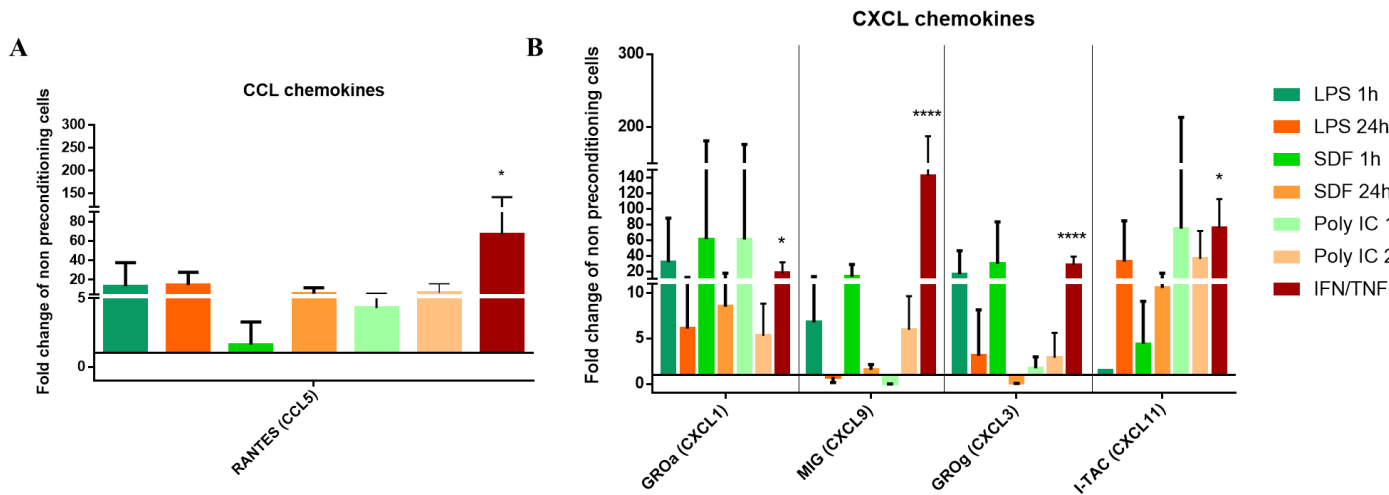


Figure 4 Real-time RT qPCR analysis for CCL (RANTES) and CXCL chemokines (GROa, MIG, GROg, I-TAC) according to the different time (1h, 24h and 48h) and preconditioning (without preconditioning, LPS, SDF, Poly I:C and IFN/TNF). Data are expressed in fold change compared to non-preconditioned cells as mean $\pm$ SD. N= 3 independent umbilical cords. * $p < 0.05$, **** $p < 0.0001$.

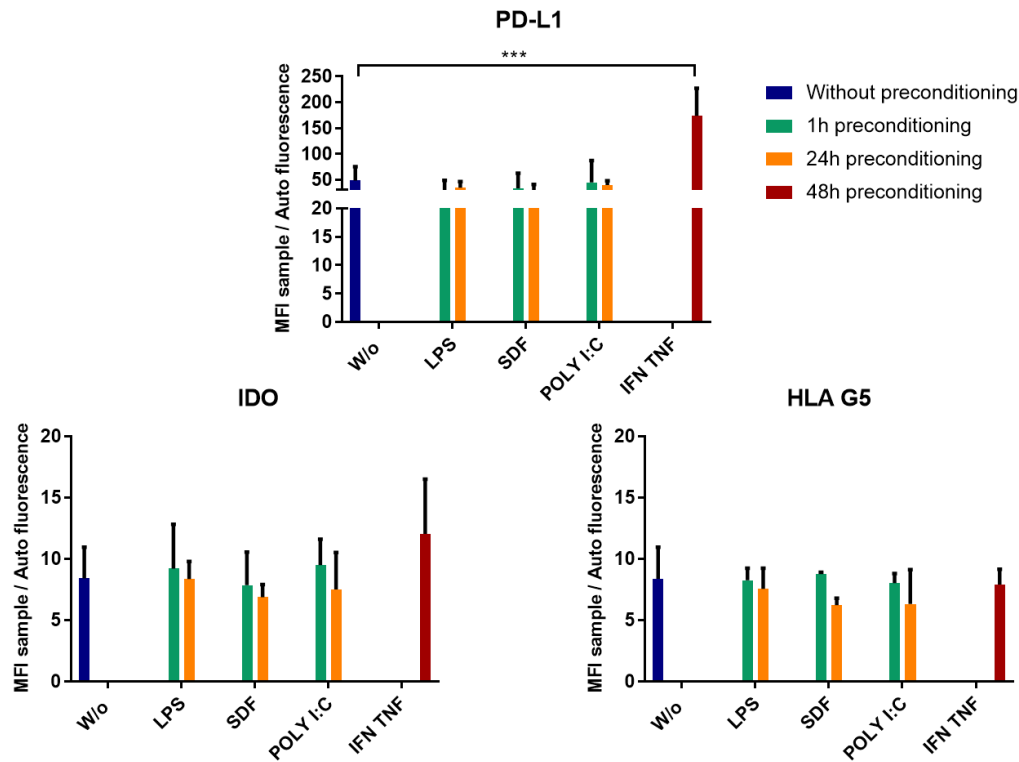


Figure 5 Immunomodulatory markers (PDL1, IDO and HLA G5) according to the different time (1h, 24h and 48h) and preconditioning (without preconditioning, LPS, SDF, Poly I:C and IFN/TNF). Results are expressed in mean fluorescence intensity (MFI) of sample under cell autofluorescence. Results with MFI under 2 are considered negative for the marker.

Data are expressed by flow cytometry as mean $\pm$ SD. N= 4. *** p<0.001.

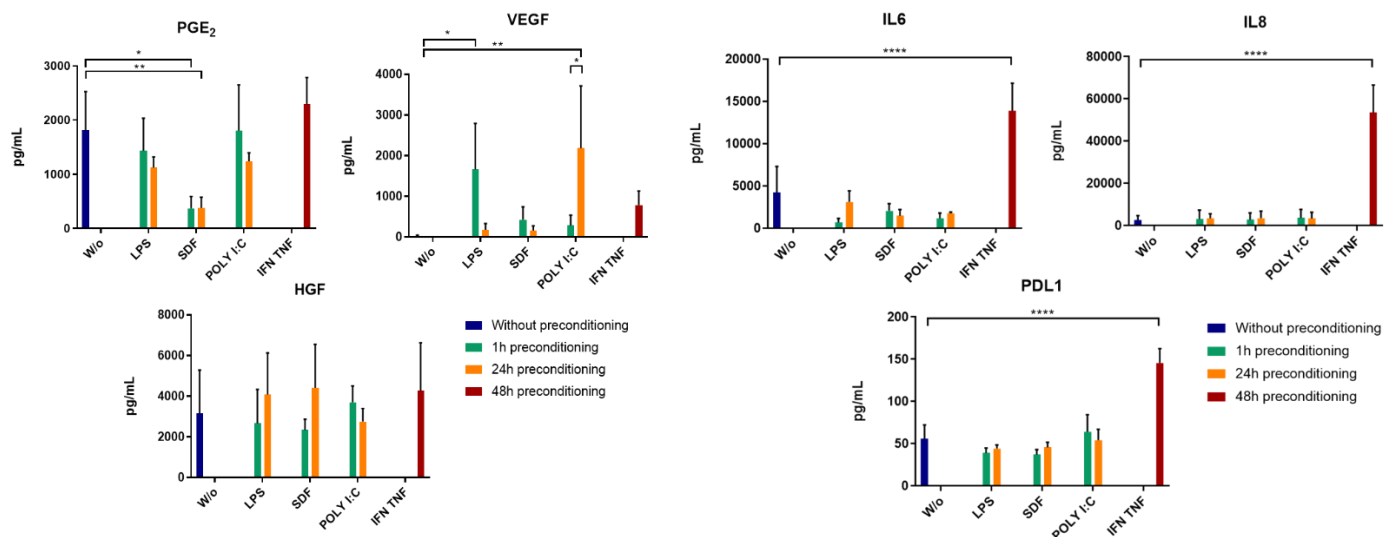


Figure 6 WJ-MSC's paracrine activity (PGE₂, VEGF, HGF, IL6, IL8 and PDL1) according to the different time (1h, 24h and 48h) and preconditioning (without preconditioning, LPS, SDF, Poly I:C and IFN/TNF). Data are expressed by ELISA technology as mean $\pm$ SD. N= 5 independent cords * p<0.05 ** p<0.01 **** p<0.0001.

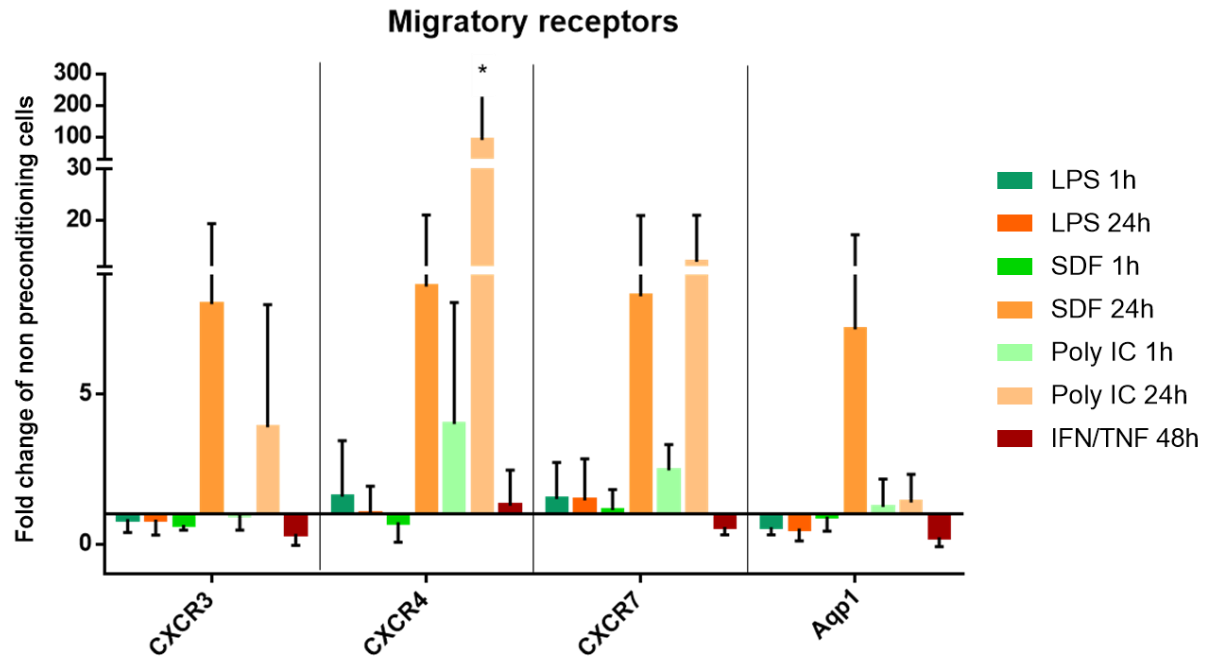


Figure 7 Real-time RT qPCR analysis for migratory receptors (CXCR3, CXCR4, CXCR7 and Aqp1) according to the different time (1h, 24h and 48h) and preconditioning (without preconditioning, LPS, SDF, Poly I:C and IFN/TNF). Data are expressed in fold change of non-preconditioning cells as mean $\pm$ SD. N= 3 independent cords. * $p < 0.05$.

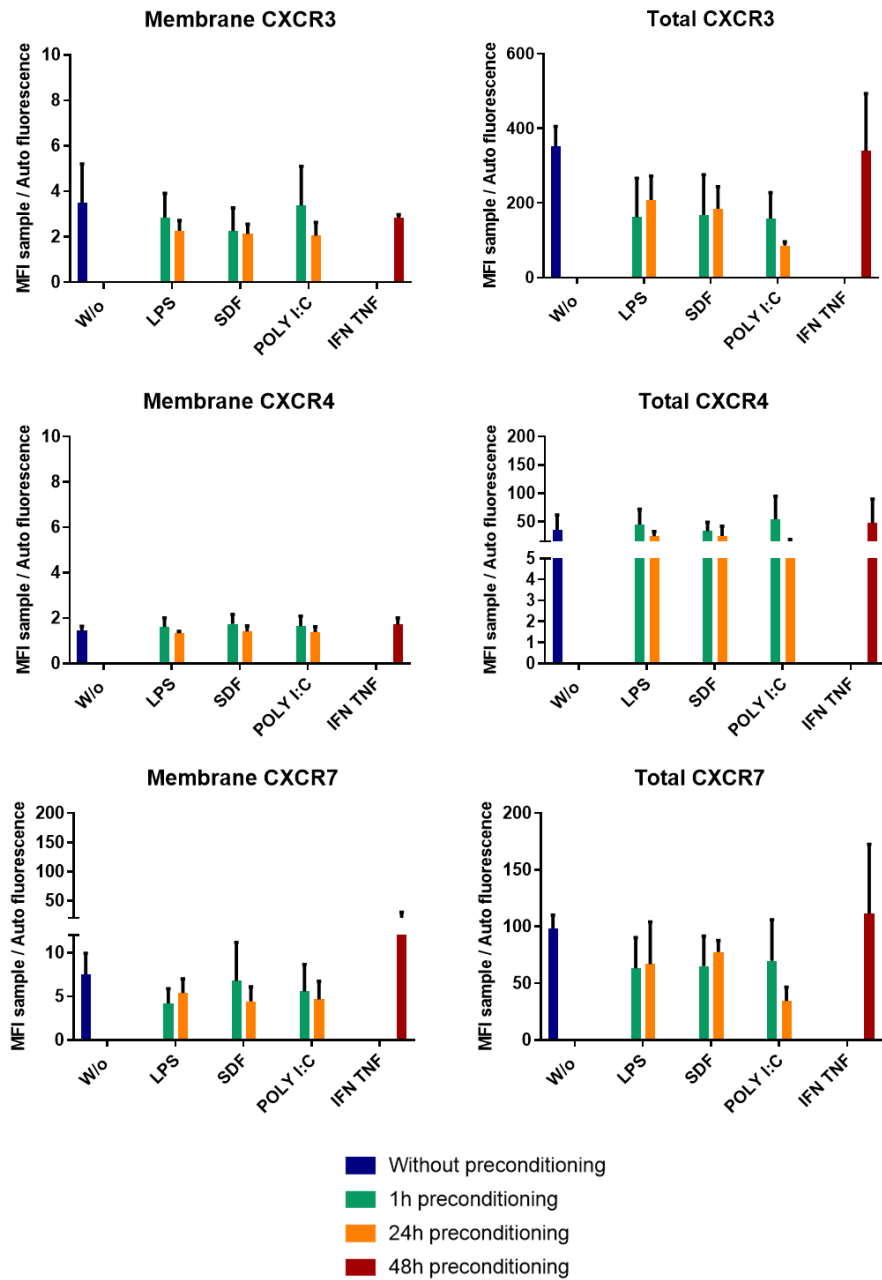


Figure 8 Membrane and total (membrane and intracellular) expression of CXCR3, 4 and 7 according to the different time (1h, 24h and 48h) and preconditioning (without preconditioning, LPS, SDF, Poly I:C and IFN/TNF). Data are expressed by flow cytometry as mean $\pm$ SD. N= 4 independent cords.

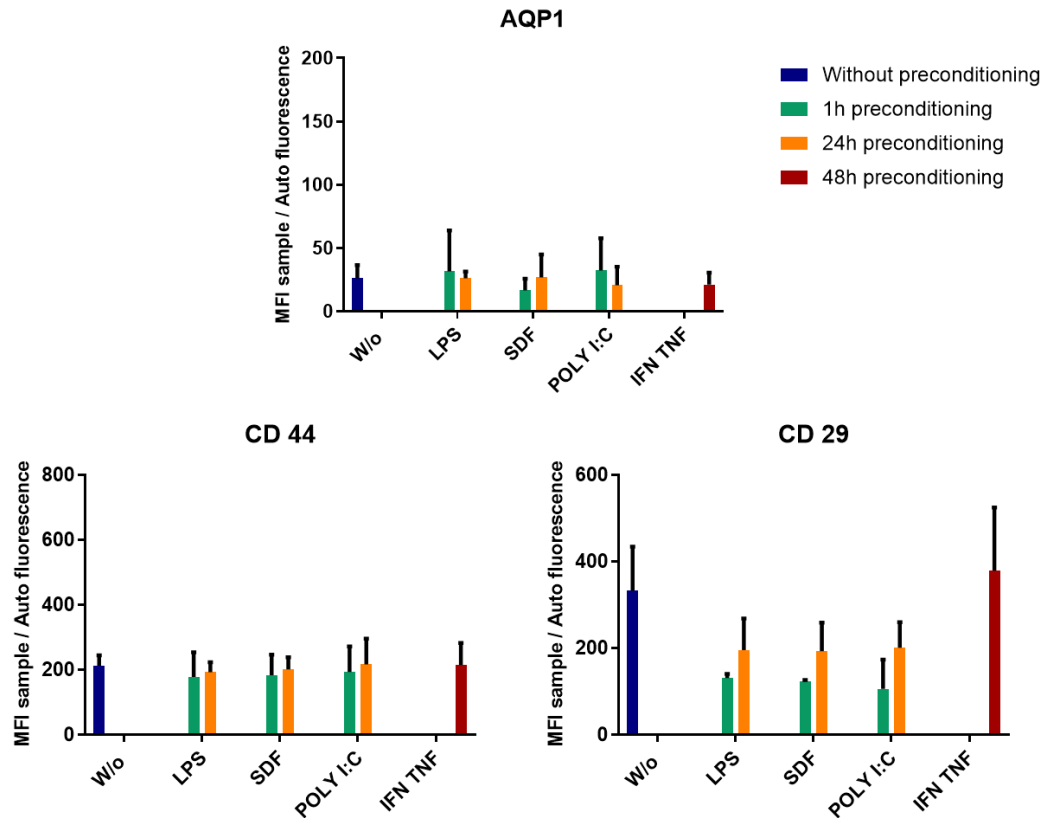


Figure 9 Migratory protein expression (Aqp1, CD44 and CD29) according to the different time (1h, 24h and 48h) and preconditioning (without preconditioning, LPS, SDF, Poly I:C and IFN/TNF). Data are expressed by flow cytometry as mean $\pm$ SD. N= 4 independent cords.

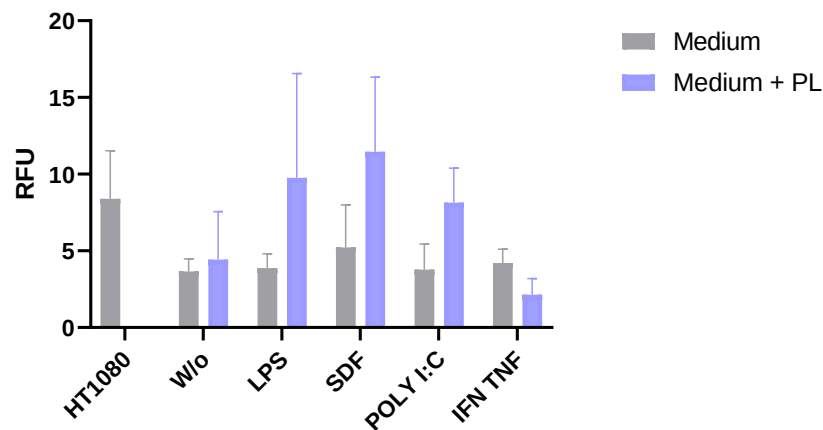


Figure 10 Migratory properties of preconditioned WJ-MSC in Boyden chamber. Results are expressed in ratio fluorescent unit (RFU) for HT1080 cells or MSC and its preconditioning (without preconditioning, LPS, SDF, Poly I:C and IFN/TNF). Chemoattractant used in the lower chamber was culture medium alone (gray color) either culture medium supplemented with platelet lysate (PL) (blue color). Data are expressed as mean $\pm$ SD. N= 2 independent cords in duplicate.

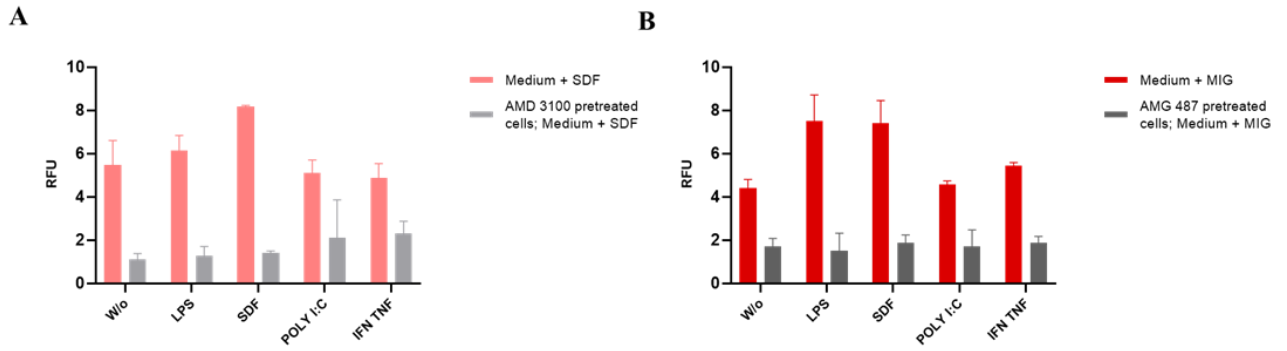


Figure 11 Migratory properties in Boyden chamber with chemoattractant: SDF (A) and MIG (B) in lower chamber and with cells pretreated with antagonist of CXCR4 and CXCR3 respectively: AMD 3100 (A) and AMG 487 (B). Results are expressed in ratio fluorescent unit (RFU) according to different preconditioning (without preconditioning, LPS, SDF, Poly I:C and IFN/TNF). Data are expressed as mean $\pm$ SD. N= 1 representative cord in duplicate.

Tables

Table 1 List and sequences of PCR primers by group used for this study.

Name		Sense	Anti-sense
CCL Family	RANTES (CCL5)	GCTGTCATCCTCATTGCTACTG	TGGTGTAGAAATACTCCTTGATGTG
	MIP1a (CCL3)	GCAACCAGTTCTCTGCATCA	TGGCTGCTCGTCTCAAAGTA
	MIP1b (CCL4)	GCTTTTCTTACACTGCGAGGA	CCAGGATTCACTGGGATCAG
	MCP2 (CCL8)	GGGACTTGCTCAGCCAGATTCAGT	CAGCACAGACCTCCTTGCCCC
	CCL22	TGCGCGTGTTGAAACACTT	TAGGCTCTTCATTGGCTCAGCT
CXCL Family	GROa (CXCL1)	AACCGAAGTCATAGCCACAC	GTTGGATTTGTCACTGTTTCAGC
	MIG (CXCL9)	GAAAGACCTTAAACAATTTGCCCCA	TCACATCTGCTGAATCTGGGTTT
	SDF-1 (CXCL12)	AGCCAACGTCAAGCATCTCAA	TCGGGTCAATGCACACTTGT
	ENA-78 (CXCL5)	GATCAGTAATCTGCAAGTGTTGCGC	CAAGACAAATTCCTTCCCGTTCTTCAG
	GROg (CXCL3)	CGCCCCAAACCGAAGTCATAGCCA	TGGTAAGGGCAGGGACCACCC
	IP-10 (CXCL10)	CCAGAATCGAAGGCCATCAAGA	TGGAAGCACTGCATCGATTTTG
	I-TAC (CXCL11)	GGACAACGATGCCTAAATCCCA	AGATGCTCTTTTCCAGGACTTCAT
Migratory receptors	CXCR3	CCAACCACAAGCACCAAAGC	GGCAACCTCGGCGTCATTTA
	CXCR4	GTAGCAAAGTGACGCCGAGG	AGTCATAGTCCCCTGAGCCC
	CXCR7	TCAGCACTAAGGGAGCCAGC	GATCCATCGTTCTGAGGCGG
	Aqp1	CATCTTCCGTGCCCTCATGT	CGAGTTCACACCATCAGCCA
Housekeeping gene	RPS29	TGCCGTACTGACGGAAACAC	TTCAAACCGGCACGGTCTGA

Additional Requirements

For additional requirements for specific article types and further information please refer to [Author Guidelines](#).

Conflict of Interest

The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Author Contributions

The Author Contributions section is mandatory for all articles, including articles by sole authors. If an appropriate statement is not provided on submission, a standard one will be inserted during the production process. The Author Contributions statement must describe the contributions of individual authors referred to by their initials and, in doing so, all authors agree to be accountable for the content of the work. Please see [here](#) for full authorship criteria.

Funding

Details of all funding sources should be provided, including grant numbers if applicable. Please ensure to add all necessary funding information, as after publication this is no longer possible.

Acknowledgments

We would like to thank the cytometry platform UMSIbslor for the material as well as their precious help and the Tel Hashomer Hospital, Ramat Gan in Israël, for their advice and list of primers.

References

1. Friedenstein AJ, Gorskaja JF, Kulagina NN. Fibroblast precursors in normal and irradiated mouse hematopoietic organs. *Experimental hematology* (1976) 4:267–274.
2. Dominici M, Le Blanc K, Mueller I, Slaper-Cortenbach I, Marini FC, Krause DS, Deans RJ, Keating A, Prockop DJ, Horwitz EM. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy* (2006) 8:315–317. doi:10.1080/14653240600855905
3. Viswanathan S, Shi Y, Galipeau J, Krampera M, Leblanc K, Martin I, Nolte J, Phinney DG, Sensebe L. Mesenchymal stem versus stromal cells: International Society for Cell & Gene Therapy (ISCT®) Mesenchymal Stromal Cell committee position statement on nomenclature. *Cytotherapy* (2019) 21:1019–1024. doi:10.1016/j.jcyt.2019.08.002
4. Zhao Q, Ren H, Han Z. Mesenchymal stem cells: Immunomodulatory capability and clinical potential in immune diseases. *Journal of Cellular Immunotherapy* (2016) 2:3–20. doi:10.1016/j.jocit.2014.12.001
5. da Silva Meirelles L, Fontes AM, Covas DT, Caplan AI. Mechanisms involved in the therapeutic properties of mesenchymal stem cells. *Cytokine & Growth Factor Reviews* (2009) 20:419–427. doi:10.1016/j.cytogfr.2009.10.002
6. Laroye C, Lemarié J, Boufenz A, Labroca P, Cunat L, Alauzet C, Groubatch F, Cailac C, Jolly L, Bensoussan D, et al. Clinical-grade mesenchymal stem cells derived from umbilical cord improve septic shock in pigs. *Intensive Care Med Exp* (2018) 6: doi:10.1186/s40635-018-0194-1
7. Godoy JAP, Paiva RMA, Souza AM, Kondo AT, Kutner JM, Okamoto OK. Clinical Translation of Mesenchymal Stromal Cell Therapy for Graft Versus Host Disease. *Front Cell Dev Biol* (2019) 7:255. doi:10.3389/fcell.2019.00255

8. Laroye C, Gibot S, Huselstein C, Bensoussan D. Mesenchymal stromal cells for sepsis and septic shock: Lessons for treatment of COVID-19. *STEM CELLS Translational Medicine* (2020) 9:1488–1494. doi:https://doi.org/10.1002/sctm.20-0239
9. Saldanha-Araujo F, Melgaço Garcez E, Silva-Carvalho AE, Carvalho JL. Mesenchymal Stem Cells: A New Piece in the Puzzle of COVID-19 Treatment. *Front Immunol* (2020) 11:1563. doi:10.3389/fimmu.2020.01563
10. Leibacher J, Dauber K, Ehser S, Brixner V, Kollar K, Vogel A, Spohn G, Schäfer R, Seifried E, Henschler R. Human mesenchymal stromal cells undergo apoptosis and fragmentation after intravenous application in immune-competent mice. *Cytotherapy* (2017) 19:61–74. doi:10.1016/j.jcyt.2016.09.010
11. Eggenhofer E, Benseler V, Kroemer A, Popp FC, Geissler EK, Schlitt HJ, Baan CC, Dahlke MH, Hoogduijn MJ. Mesenchymal stem cells are short-lived and do not migrate beyond the lungs after intravenous infusion. *Front Immunol* (2012) 3: doi:10.3389/fimmu.2012.00297
12. De Becker A, Riet IV. Homing and migration of mesenchymal stromal cells: How to improve the efficacy of cell therapy? *World J Stem Cells* (2016) 8:73–87. doi:10.4252/wjsc.v8.i3.73
13. Marquez-Curtis LA, Janowska-Wieczorek A. Enhancing the Migration Ability of Mesenchymal Stromal Cells by Targeting the SDF-1/CXCR4 Axis. *Biomed Res Int* (2013) 2013: doi:10.1155/2013/561098
14. Pelekanos RA, Ting MJ, Sardesai VS, Ryan JM, Lim Y-C, Chan JK, Fisk NM. Intracellular trafficking and endocytosis of CXCR4 in fetal mesenchymal stem/stromal cells. *BMC Cell Biol* (2014) 15:15. doi:10.1186/1471-2121-15-15
15. Rombouts WJC, Ploemacher RE. Primary murine MSC show highly efficient homing to the bone marrow but lose homing ability following culture. *Leukemia* (2003) 17:160–170. doi:10.1038/sj.leu.2402763
16. Voisin C, Cauchois G, Bensoussan D, le, Huselstein C, line. Effects of Cell Confluence on the Immunological and Migration Receptors of Wharton Jelly's Mesenchymal Stem Cells. *Stem Cells and Regenerative Medicine* (2021) 180–187. doi:10.3233/BHR210029
17. Noronha N de C, Mizukami A, Calíari-Oliveira C, Cominal JG, Rocha JLM, Covas DT, Swiech K, Malmegrim KCR. Priming approaches to improve the efficacy of mesenchymal stromal cell-based therapies. *Stem Cell Res Ther* (2019) 10:131. doi:10.1186/s13287-019-1224-y
18. Chinnadurai R, Copland IB, Patel SR, Galipeau J. IDO-independent suppression of T cell effector function by IFN- γ -licensed human mesenchymal stromal cells. *J Immunol* (2014) 192:1491–1501. doi:10.4049/jimmunol.1301828
19. Ullah M, Liu DD, Thakor AS. Mesenchymal Stromal Cell Homing: Mechanisms and Strategies for Improvement. *iScience* (2019) 15:421–438. doi:10.1016/j.isci.2019.05.004
20. Tomchuck SL, Zwezdaryk KJ, Coffelt SB, Waterman RS, Danko ES, Scandurro AB. Toll-Like Receptors on Human Mesenchymal Stem Cells Drive their Migration and Immunomodulating Responses. *Stem Cells* (2008) 26:99–107. doi:10.1634/stemcells.2007-0563
21. Waterman RS, Tomchuck SL, Henkle SL, Betancourt AM. A New Mesenchymal Stem Cell (MSC) Paradigm: Polarization into a Pro-Inflammatory MSC1 or an Immunosuppressive MSC2 Phenotype. *PLoS One* (2010) 5: doi:10.1371/journal.pone.0010088
22. Hu C, Li L. Preconditioning influences mesenchymal stem cell properties in vitro and in vivo. *J Cell Mol Med* (2018) 22:1428–1442. doi:10.1111/jcmm.13492

23. Lee B-C, Kang K-S. Functional enhancement strategies for immunomodulation of mesenchymal stem cells and their therapeutic application. *Stem Cell Res Ther* (2020) 11: doi:10.1186/s13287-020-01920-3
24. Mebarki M, Abadie C, Larghero J, Cras A. Human umbilical cord-derived mesenchymal stem/stromal cells: a promising candidate for the development of advanced therapy medicinal products. *Stem Cell Res Ther* (2021) 12: doi:10.1186/s13287-021-02222-y
25. Voisin C, Cauchois G, Reppel L, Laroye C, Louarn L, Schenowitz C, Sonon P, Poras I, Wang V, D. Carosella E, et al. Are the Immune Properties of Mesenchymal Stem Cells from Wharton's Jelly Maintained during Chondrogenic Differentiation? *Journal of Clinical Medicine* (2020) 9:423. doi:10.3390/jcm9020423
26. Raicevic G, Najar M, Stamatopoulos B, De Bruyn C, Meuleman N, Bron D, Tounougou M, Lagneaux L. The source of human mesenchymal stromal cells influences their TLR profile as well as their functional properties. *Cellular Immunology* (2011) 270:207–216. doi:10.1016/j.cellimm.2011.05.010
27. Mei Y-B, Zhou W-Q, Zhang X-Y, Wei X-J, Feng Z-C. Lipopolysaccharides Shapes the Human Wharton's Jelly-Derived Mesenchymal Stem Cells in Vitro. *CPB* (2013) 32:390–401. doi:10.1159/000354446
28. Weiss ML, Anderson C, Medicetty S, Seshareddy KB, Weiss RJ, VanderWerff I, Troyer D, McIntosh KR. Immune Properties of Human Umbilical Cord Wharton's Jelly-Derived Cells. *STEM CELLS* (2008) 26:2865–2874. doi:10.1634/stemcells.2007-1028
29. Amable PR, Teixeira MV, Carias RB, Granjeiro JM, Borojevic R. Protein synthesis and secretion in human mesenchymal cells derived from bone marrow, adipose tissue and Wharton's jelly. *Stem cell res ther* (2014) 5:53.
30. Farashah MSG, Pasbakhsh P, Omid A, Nekoonam S, Aryanpour R, Kashani IR. Preconditioning with SDF-1 Improves Therapeutic Outcomes of Bone marrow-derived Mesenchymal Stromal Cells in a Mouse Model of STZ-induced Diabetes. (2019) 11:8.
31. Wynn RF, Hart CA, Corradi-Perini C, O'Neill L, Evans CA, Wraith JE, Fairbairn LJ, Bellantuono I. A small proportion of mesenchymal stem cells strongly expresses functionally active CXCR4 receptor capable of promoting migration to bone marrow. *Blood* (2004) 104:2643–2645. doi:10.1182/blood-2004-02-0526
32. Pervin B, Aydın G, Visser T, Uçkan-Çetinkaya D, Aerts-Kaya FSF. CXCR4 expression by mesenchymal stromal cells is lost after use of enzymatic dissociation agents, but preserved by use of non-enzymatic methods. *Int J Hematol* (2021) 113:5–9. doi:10.1007/s12185-020-03043-0
33. Liu X, Duan B, Cheng Z, Jia X, Mao L, Fu H, Che Y, Ou L, Liu L, Kong D. SDF-1/CXCR4 axis modulates bone marrow mesenchymal stem cell apoptosis, migration and cytokine secretion. *Protein Cell* (2011) 2:845–854. doi:10.1007/s13238-011-1097-z

Discussion générale

Grâce à leurs propriétés de régénération et d'immunomodulation, les cellules souches/stromales mésenchymateuses sont encore très largement étudiées en 2021.

L'objectif de ce travail était d'étudier l'impact des conditions de culture et l'effet d'un préconditionnement sur les CSM-GW, en médecine régénérative comprenant l'ingénierie tissulaire et la thérapie cellulaire.

1. Différenciation des CSM

Concernant le domaine de l'ingénierie tissulaire, les résultats que nous avons pu démontrer confirment que les cellules souches/stromales mésenchymateuses sont capables d'initier une différenciation chondrogénique grâce à l'environnement du biomatériau d'alginate et d'acide hyaluronique et en absence de facteurs de croissance. Il est maintenant reconnu que l'environnement mécanique dans lequel se trouve une CSM contribue à orienter sa différenciation (Schiavi et al. 2018).

L'originalité de ce travail est d'avoir démontré que les CSM cultivées en biomatériau conservaient bien leurs propriétés immunomodulatrices tout le long de la culture. En effet, si de nombreuses études ont pu démontrer la capacité des CSM à se différencier en chondrocytes, très peu évoquent le potentiel immunomodulateur de ces cellules durant la différenciation. L'équipe de Zheng, s'est intéressée à la polyarthrite rhumatoïde et a pu aussi observer les effets immunomodulateurs des CSM différenciées en chondrocytes, en coculture avec des lymphocytes T. Néanmoins leurs CSM issues de la moelle osseuse n'étaient pas cultivées en biomatériau mais en pellets (Z. H. Zheng et al. 2008).

Une autre étude a pu mettre en évidence la réparation du cartilage et la modulation du système immunitaire engendrées par les CSM. Ils ont montré que ces effets pourraient non pas être dus directement aux CSM mais seraient générés par les exosomes relargués par celles-ci. Toutefois, ces expérimentations ont été réalisées sur des CSM immortalisées dérivées de cellules souches embryonnaires humaines (S. Zhang et al. 2018).

Toutes ces recherches garantissent le pouvoir de CSM à régénérer un défaut cartilagineux. Dans notre cas, le biomatériau constitué de CSM pourrait être utilisé en tant que MTI à des fins de greffes articulaires. Le substitut implantable serait habilité à être utilisé par un chirurgien directement *in situ* dans la lésion.

Si cette lésion s'avérait plus invasive et impactait l'os sous chondral, un dispositif permettant de le régénérer devrait y être ajouté. Une équipe de Strasbourg a ainsi mis en place un dispositif pour la régénération de l'os. Leurs études décrivent l'utilisation d'un implant constitué de nanofibres de Poly- ξ -Caprolactone fonctionnalisé avec du chitosan et des réservoirs contenant un facteur de croissance : la protéine morphogénétique osseuse 7 (BMP-7). Ce dispositif appelé « NanoM1 » a été combiné avec des CSM de moelle osseuse et a permis la régénération de l'os (Keller et al. 2015; 2019).

Une collaboration avec cette même équipe de Strasbourg nous a permis de travailler avec ce dispositif médical qu'est la membrane NanoM1, celle-ci produite par la société ARTiOS Nanomed. Des résultats non montrés dans ce manuscrit, utilisant des CSM-GW ensemencées en biomatériau d'Alg/HA disposées sur cette membrane ostéoconductrice NanoM1 ont pu confirmer non seulement la capacité des cellules à produire une matrice d'une part cartilagineuse et d'autre part osseuse mais qu'à nouveau, au cours du processus de différenciation, les CSM maintenaient leurs propriétés immunomodulatrices. Ces résultats semblent prouver que l'ensemble, composé de CSM-GW avec notre biomatériau d'Alg/HA ainsi que la membrane NanoM1 soit compétent à combler des défauts cartilagineux avec atteinte osseuse icompris dans des contextes allogéniques. Afin de corroborer cela, des tests *in vivo* sont en cours.

Dans le domaine de l'ingénierie tissulaire du cartilage, l'utilisation de CSM dérivées du cordon ombilical se voit toujours comme novatrice dû au plus faible nombre d'études répertoriées utilisant des CSM néonatales (moins de 20% des études traitant du sujet publiées et référencées dans PubMed). Ce qui prouve que peu de recherches sont encore faites sur les CSM issues du cordon ombilical, et que le *gold standard* reste encore les CSM issues de la moelle osseuse. Pourtant ces CSM issues de tissus néonataux comme le placenta, le cordon ombilical, la gelée de Wharton, semblent plus avantageuses. Le prélèvement de ces cellules se montre moins invasif que leurs homologues adultes comme la moelle osseuse ou le tissu adipeux. En plus de cela, les CSM issues de prélèvements néonataux possèdent des capacités de prolifération et de différenciation supérieures aux CSM issues de tissus adultes. Pour finir, ces CSM immatures se trouvent moins immunogènes et plus immunomodulatrices que des cellules issues de tissus adultes comme la moelle osseuse (Hass et al. 2011). Donders et son équipe ont pu révéler des différences de signature transcriptomique entre les CSM provenant de la gelée de Wharton et les CSM de moelle osseuse. Ils ont pu mettre en évidence de fortes propriétés immunomodulatrices dérivées des CSM-GW, par la surexpression de molécules

immunomodulatrices comme PD-L1 et de facteurs de croissances (Donders et al. 2018). Plus récemment, une équipe de Corée a pu montrer que les CSM dérivées de moelle osseuse et de cordon ombilical possédaient toutes deux des propriétés immunomodulatrices mais que ces cellules les exercent *via* différents mécanismes. L'expression de l'enzyme IDO demeure augmentée dans les CSM de moelle osseuse alors que la Prostaglandine E2, l'Interleukine 6 et les ligands PDL1 et PDL2 sont eux plus exprimés par les CSM de cordon ombilical (Song et al. 2020).

2. Immunomodulation engendrée par les CSM

Les propriétés immunomodulatrices émanant des CSM sont primordiales pour leur utilisation en contexte allogénique et donc en thérapie cellulaire.

Dans nos différentes études, nous avons pu mettre en évidence ces propriétés par le biais de plusieurs techniques et ce, au niveau membranaire, intracellulaire, paracrine et fonctionnel.

Il apparaît que les CSM dérivées de la gelée de Wharton sont immunomodulatrices lorsqu'elles sont cultivées et en voie de différenciation en biomatériau mais aussi lors de leur culture en 2D. Nous avons constaté que le préconditionnement à l'Interféron- γ et au Tumor Nécrosis Factor α permettait de potentialiser ces propriétés immunomodulatrices.

Cela a pu être confirmé dans plusieurs recherches et montrent à chaque fois l'amélioration de ces propriétés après ce préconditionnement. Par exemple, comme l'a montré l'équipe de Song, les deux cytokines inflammatoires : l'IFN- γ et le TNF α , améliorent la sécrétions de cytokines immunomodulatrices (Song et al. 2020).

Nous avons aussi pu démontrer que ces chondro-CSM, étaient capable d'inhiber la prolifération de lymphocytes T en culture mixte lymphocytaire et de la même manière, les CSM-GW cultivées en 2D étaient elles aussi capables d'inhiber significativement la prolifération des lymphocytes T en coculture. Ces résultats attestent de la fonctionnalité, des CSM issues du cordon ombilical mais aussi des cellules différenciées qui en découlent, à moduler les cellules du système immunitaire. Quelques études ont prouvé cette aptitude *in vitro* avec des CSM dérivées de cordon ombilical et de placenta. Cette capacité serait principalement due aux ligand PDL1 mais aussi grâce à l'enzyme IDO (G. Wang et al. 2013; X. Li et al. 2016). Concernant ce ligand PDL1, dans deux de nos études, nous avons pu, pour la première fois, démontrer sa sécrétion par les CSM dérivées de la gelée de Wharton (Voisin et al. 2020).

Tous ces résultats semblent donc montrer l'intérêt d'une thérapie par de CSM préconditionnées à l'IFN- γ et TNF α .

De nombreux essais cliniques ont ainsi pu être engagés grâce à la découverte de ces propriétés immunomodulatrices dans des applications telles que la sclérose en plaques, l'athérosclérose, dues au virus de l'immunodéficience humaine (VIH) ou encore la drépanocytose (M. Wang, Yuan, and Xie 2018).

Ainsi, des essais cliniques sont aujourd'hui entrepris, comme à Nancy, avec l'utilisation de CSM dans le cas de sepsis et notamment la défaillance d'organe qui s'en suit. Cet essai clinique est nommé « Effets de l'administration de cellules souches mésenchymateuses sur la défaillance d'un organe lors d'un choc septique : étude randomisée de phase II contrôlée par un comparateur » (NCT02883803) et est autorisé depuis fin 2018. La période COVID n'a pas été propice aux inclusions qui reprennent actuellement. Un second essai clinique a vu le jour plus récemment à la suite de la crise pandémique actuelle. Cet essai utilise des CSM dérivées de la gelée de Wharton dans la pathologie du COVID 19, notamment dans le but de contrer l'inflammation dans le syndrome de détresse respiratoire aiguë (SDRA). Il est répertorié depuis novembre 2020 sur le site *Clinical Trial*, sous le nom suivant : « Efficacité des perfusions de CSM de gelée de Wharton dans le syndrome de détresse respiratoire aiguë lié au SRAS-Cov-2 (COVID-19) (*MSC-COVID19*) » (NCT04625738). Les inclusions sont terminées et les analyses sont attendues pour fin 2021.

3. Migration des CSM

Afin d'optimiser l'utilisation des CSM en thérapie, les mécanismes liés à leur migration doivent encore être investigués et optimisés.

La migration cellulaire serait principalement due au récepteur CXCR4 présent à la surface de différents types cellulaires comme c'est le cas pour les leucocytes. En effet ce récepteur est étudié depuis de nombreuses années et serait lié à la migration des cellules permettant le développement de l'organisme entier mais aussi dans plusieurs pathologies comme le cancer ou encore le VIH (Miller, Banisadr, and Bhattacharyya 2008).

Ainsi ce récepteur se révèle comme une piste pour la migration des CSM, c'est pourquoi de nombreuses études se penchent sur le mécanisme de migration lié au CXCR4. Cependant beaucoup relatent le problème de la faible expression membranaire du récepteur CXCR4 sur les CSM. Par conséquent cela altérerait la migration de ces cellules.

Dans nos études portant sur la migration des CSM-GW, nous avons pu observer que le CXCR4 n'était pas exprimé au niveau membranaire mais fortement en intracellulaire.

L'équipe de Pelekanos a aussi mis cela en évidence sur des CSM-MO, avec seulement 4% d'expression du CXCR4 en membranaire (Pelekanos et al. 2014). Ceci a aussi été observé sur des CSM de moelle osseuse, avec moins de 1% du récepteur présent à leur surface (Wynn et al. 2004).

Afin de vérifier si ce récepteur est spécifiquement lié à la migration, l'AMD3100, un inhibiteur hautement spécifique de CXCR4 a été utilisé. Grâce à cet antagoniste, nous avons pu montrer une inhibition de la migration des CSM-GW en chambre de Boyden. Cela a pu être plusieurs fois démontré et prouve que la migration des CSM passe comme nous avons pu le montrer, par la voie issue du CXCR4 même si celui-ci est faiblement exprimé par les cellules (Wynn et al. 2004; Song et al. 2020).

À la suite de cela, des chercheurs se sont intéressés aux mécanismes liés à l'internalisation du CXCR4. Il a été rapporté que l'internalisation du récepteur était accompli dans les vésicules de recyclage et de dégradation (Kumar et al. 2011; Pelekanos et al. 2014).

Les équipes de Cepeda et de Pelekanos ont pu reverser l'internalisation de ce récepteur CXCR4 en inhibant le recyclage endocytaire. Ce qui démontre que cette internalisation semble être liée au recyclage et à la dégradation cellulaire dus aux endosomes et lysosomes (Cepeda et al. 2015; Pelekanos et al. 2014).

Plus récemment, une étude a révélé que les mécanismes de l'endocytose du CXCR4 étaient toujours inconnus. Cette même étude a pu mettre en évidence que l'endocytose aurait un impact sur la signalisation, l'internalisation et la modification post-traductionnelle du récepteur CXCR4 (DeNies et al. 2019).

En plus de modifier l'endocytose du CXCR4, des chercheurs tentent d'augmenter l'expression de ce récepteur dans le but d'accroître la migration des CSM. Différentes techniques sont alors utilisées, comme le preconditionnement, la transfection de CXCR4 ou encore l'utilisation de traitement chimique (Marquez-Curtis and Janowska-Wieczorek 2013). Dans un objectif d'application en thérapie cellulaire, nous avons choisi différents preconditionnements des CSM-GW pouvant potentialiser leur migration. Même si aucun preconditionnement n'a montré d'avantage quant à l'expression du CXCR4 au niveau membranaire, les preconditionnements au LPS, SDF ainsi qu'au Poly IC semblent favorables à la migration en chambre de Boyden par rapport au preconditionnement avec l'IFN- γ et le TNF α . Ceci conforte les résultats issues de l'étude de Waterman *et al*, qui montrent que la migration est augmentée après la stimulation des TLR 3 et 4 (Waterman et al. 2010; Tomchuck

et al. 2008). Par rapport au SDF-1, une autre étude a montré le bénéfice de ce préconditionnement sur leur potentiel de migration des CSM (Liu et al. 2011).

En plus de cela, l'effet du temps de préconditionnement n'a pas été significatif dans notre étude hormis pour l'expression de l'ARN messager du CXCR4 pour les cellules ayant été préconditionnées pendant 24h avec du Poly I:C. Tandis que l'équipe de Waterman a pu observer des différences de migration pour les préconditionnements stimulant les récepteurs TLR3 et TLR4, avec un profit de migration pour 1h de préconditionnement contrairement à 24h (Waterman et al. 2010).

En plus de l'impact des préconditionnements, la migration des CSM dérivées de la gelée de Wharton reste peu investiguée. Les principales études dans ce domaine concernent majoritairement les CSM de moelle osseuse. La seule étude initiée sur cellules fœtales a été faite sur la migration cellulaire des CSM issues de moelle osseuse de fœtus (Pelekanos et al. 2014).

Conclusions et perspectives

Dans nos études exposées précédemment, nous avons tout d'abord démontré que la gelée de Wharton est une source novatrice et privilégiée de cellules souches/stromales mésenchymateuses. Il est répertorié seulement depuis 2019 un nombre croissant d'articles mentionnant l'utilisation de CSM néonatales, pourtant il apparaît de plus en plus que ces cellules sont plus avantageuses que leurs homologues adultes vis-à-vis de leurs propriétés immunomodulatrices.

Nous avons aussi pu mettre en évidence les capacités immunomodulatrices émanant des CSM-GW cultivées en 2D mais aussi en 3D, en biomatériau durant un processus de différenciation chondrocytaire. Nous avons pu grâce à nos expérimentations, révéler que les mécanismes liés à la modulation du système immunitaire seraient mis en place par contact cellulaire mais aussi par la sécrétion de facteurs solubles.

Si le bénéfice d'un préconditionnement des CSM pour la thérapie cellulaire est avéré pour potentialiser la réponse des cellules une fois injectées chez le patient, nos études montrent l'importance de prendre en considération non seulement les propriétés immunomodulatrices mais aussi migratoires. En effet, si le préconditionnement à l'IFN γ et au TNF α permet d'accroître significativement les propriétés consentant à l'immunomodulation cellulaire, les propriétés de migrations sont significativement altérées. Il faudrait poursuivre l'étude en vérifiant si après cocultures, des lymphocytes T régulateurs sont présents, en recherchant par cytométrie en flux un phénotype CD4⁺CD25⁺FOXP3⁺.

En revanche, nos expérimentations révèlent que les CSM issues de la gelée de Wharton ont la capacité de migrer en chambre de Boyden. Il semblerait que ce mécanisme de migration soit dû au récepteur CXCR4 tout comme les CSM de moelle osseuse. Sans compter que les préconditionnements utilisés, comme le LPS, le SDF et le Poly I :C permettent d'améliorer les fonctionnalités migratoires. Dans une thérapie par CSM préconditionnée, il pourrait être intéressant d'utiliser un cocktail de cytokine/facteurs de croissance capables de potentialiser non seulement les propriétés immunomodulatrices des cellules mais aussi leur migration. Dans la mesure où les propriétés immunomodulatrices des CSM peuvent soit être orientées vers un profil pro-inflammatoire (CSM1) ou anti-inflammatoire (CSM2), il pourrait être envisagé d'affiner *via* le préconditionnement, le type de profil attendu.

Parallèlement au préconditionnement, l'expansion cellulaire doit être finement contrôlée tout au long de la culture étant donné que nous avons pu déceler un lien étroit entre la confluence cellulaire et les propriétés immunomodulatrices et migratoires des CSM.

Les perspectives de ces travaux seraient de vérifier toutes ces données *in vivo* dans différents modèles animaux. Dans un premier temps dans un modèle animal présentant des lésions cartilagineuses et ostéochondrales et dans un second temps dans un modèle animal inflammatoire comme le modèle humanisé de souris NSG pour mimer une GvH (D'Aveni et al. 2015) ou encore dans un modèle de cochon par induction d'une péritonite afin de mimer un choc septique (Laroye et al. 2018). Ces modèles se trouvent tous deux au laboratoire et pourraient être facilement utilisés après accord du comité d'éthique en expérimentation animal, afin de conforter nos hypothèses *in vitro*.

Concernant la migration, d'autres analyses doivent être instaurées afin d'approfondir son fonctionnement. Plus spécifiquement en caractérisant l'endocytose du CXCR4, au moyen de colocalisations en microscopie confocale, dans l'intention de découvrir si les vésicules se trouvent dans les lysosomes ou les endosomes, soit en voie de dégradation ou de recyclage, respectivement.

Si tout cela se confirme, il pourrait être envisagé de produire les CSM dérivées de la gelée de Wharton en condition de grade clinique dans le but de les utiliser en tant que MTI pour combler des lésions cartilagineuses, en ingénierie tissulaire mais aussi pour traiter des pathologies inflammatoires, en thérapie cellulaire.

Références Bibliographiques

- Abumaree, M. H., M. A. Al Jumah, B. Kalionis, D. Jawdat, A. Al Khaldi, F. M. Abomaray, A. S. Fatani, L. W. Chamley, and B. A. Knawy. 2013. "Human Placental Mesenchymal Stem Cells (PMSCs) Play a Role as Immune Suppressive Cells by Shifting Macrophage Differentiation from Inflammatory M1 to Anti-Inflammatory M2 Macrophages." *Stem Cell Reviews and Reports* 9 (5): 620–41. <https://doi.org/10.1007/s12015-013-9455-2>.
- Adams, Gregor B., and David T. Scadden. 2006. "The Hematopoietic Stem Cell in Its Place." *Nature Immunology* 7 (4): 333–37. <https://doi.org/10.1038/ni1331>.
- Aleksander-Konert, Ewelina, Piotr Paduszyński, Alicja Zajdel, Zofia Dzierżewicz, and Adam Wilczok. 2016. "In Vitro Chondrogenesis of Wharton's Jelly Mesenchymal Stem Cells in Hyaluronic Acid-Based Hydrogels." *Cellular & Molecular Biology Letters* 21 (August). <https://doi.org/10.1186/s11658-016-0016-y>.
- Almouemen, Nour, Helena M. Kelly, and Cian O'Leary. 2019. "Tissue Engineering: Understanding the Role of Biomaterials and Biophysical Forces on Cell Functionality Through Computational and Structural Biotechnology Analytical Methods." *Computational and Structural Biotechnology Journal* 17 (January): 591–98. <https://doi.org/10.1016/j.csbj.2019.04.008>.
- Avercenc-Léger, Léonore, Philippe Guerci, Jean-Marc Virion, Ghislaine Cauchois, Sébastien Hupont, Rachid Rahouadj, Jacques Magdalou, et al. 2017. "Umbilical Cord-Derived Mesenchymal Stromal Cells: Predictive Obstetric Factors for Cell Proliferation and Chondrogenic Differentiation." *Stem Cell Research & Therapy* 8 (1). <https://doi.org/10.1186/s13287-017-0609-z>.
- Bader, Peter, Zyrafete Kuçi, Shahrzad Bakhtiar, Oliver Basu, Gesine Bug, Michael Dennis, Johann Greil, et al. 2018. "Effective Treatment of Steroid and Therapy-Refractory Acute Graft-versus-Host Disease with a Novel Mesenchymal Stromal Cell Product (MSC-FFM)." *Bone Marrow Transplantation* 53 (7): 852–62. <https://doi.org/10.1038/s41409-018-0102-z>.
- Bahsoun, Soukaina, Karen Coopman, and Elizabeth C. Akam. 2019. "The Impact of Cryopreservation on Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stem Cells: A Systematic Review." *Journal of Translational Medicine* 17 (November). <https://doi.org/10.1186/s12967-019-02136-7>.
- Ball, Lynne M., Maria E. Bernardo, Helene Roelofs, Maarten J. D. van Tol, Benedetta Contoli, Jaap Jan Zwaginga, Maria Antonia Avanzini, et al. 2013. "Multiple Infusions of Mesenchymal Stromal Cells Induce Sustained Remission in Children with Steroid-Refractory, Grade III-IV Acute Graft-versus-Host Disease." *British Journal of Haematology* 163 (4): 501–9. <https://doi.org/10.1111/bjh.12545>.
- Batsali, Aristeia, Charalampos Pontikoglou, Elisavet Kouvidi, Athina Damianaki, Aikaterini Stratigi, Maria-Christina Kastrinaki, and Helen A Papadaki. 2013. "Comparative Analysis Of Bone Marrow and Wharton's Jelly Mesenchymal Stem/Stromal Cells." *Blood* 122 (21): 1212–1212. <https://doi.org/10.1182/blood.V122.21.1212.1212>.
- Bernardo, Maria Ester, and Willem E. Fibbe. 2013. "Mesenchymal Stromal Cells: Sensors and Switchers of Inflammation." *Cell Stem Cell* 13 (4): 392–402. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2013.09.006>.
- Bhat, Samatha, Pachaiyappan Viswanathan, Shashank Chandanala, S. Jyothi Prasanna, and Raviraja N. Seetharam. 2021. "Expansion and Characterization of Bone Marrow Derived Human Mesenchymal Stromal Cells in Serum-Free Conditions." *Scientific Reports* 11 (1): 3403. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-83088-1>.

- Bouillon, Marlène, and Walid M. Mourad. 2003. "Complexe majeur d'histocompatibilité de classe II : diversité fonctionnelle." *médecine/sciences* 19 (10): 988–93. <https://doi.org/10.1051/medsci/20031910988>.
- Bourin, Philippe, Luc Sensebé, and Pierre Charbord. 2004. "Les Cellules Souches Mésoenchymateuses (CSM): Données, Controverses, Perspectives." *Hématologie* 10 (6): 434–43.
- Brown, J. M., K. Nemeth, N. M. Kushnir-Sukhov, D. D. Metcalfe, and E. Mezey. 2011. "Bone Marrow Stromal Cells Inhibit Mast Cell Function via a COX2-Dependent Mechanism." *Clinical and Experimental Allergy: Journal of the British Society for Allergy and Clinical Immunology* 41 (4): 526–34. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2222.2010.03685.x>.
- Caplan, Arnold I. 1991. "Mesenchymal Stem Cells." *Journal of Orthopaedic Research* 9 (5): 641–50.
- . 2007. "Adult Mesenchymal Stem Cells for Tissue Engineering versus Regenerative Medicine." *Journal of Cellular Physiology* 213 (2): 341–47. <https://doi.org/10.1002/jcp.21200>.
- . 2017. "Mesenchymal Stem Cells: Time to Change the Name!" *Stem Cells Translational Medicine* 6 (6): 1445–51. <https://doi.org/10.1002/sctm.17-0051>.
- Carrero, Rubén, Inmaculada Cerrada, Elisa Lledó, Joaquín Dopazo, Francisco García-García, Mari-Paz Rubio, César Trigueros, et al. 2012. "IL1 β Induces Mesenchymal Stem Cells Migration and Leucocyte Chemotaxis Through NF-KB." *Stem Cell Reviews* 8 (3): 905–16. <https://doi.org/10.1007/s12015-012-9364-9>.
- Cassatella, Marco A., Federico Mosna, Alessandra Micheletti, Veronica Lisi, Nicola Tamassia, Caterina Cont, Federica Calzetti, Martin Pelletier, Giovanni Pizzolo, and Mauro Krampera. 2011. "Toll-like Receptor-3-Activated Human Mesenchymal Stromal Cells Significantly Prolong the Survival and Function of Neutrophils." *Stem Cells (Dayton, Ohio)* 29 (6): 1001–11. <https://doi.org/10.1002/stem.651>.
- Cepeda, Edgar B., Tatjana Dediulia, Joan Fernando, Esther Bertran, Gustavo Egea, Estanislao Navarro, and Isabel Fabregat. 2015. "Mechanisms Regulating Cell Membrane Localization of the Chemokine Receptor CXCR4 in Human Hepatocarcinoma Cells." *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research* 1853 (5): 1205–18. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2015.02.012>.
- Cesarz, Zoe, and Kenichi Tamama. 2015. "Spheroid Culture of Mesenchymal Stem Cells." *Stem Cells International* 2016 (November): e9176357. <https://doi.org/10.1155/2016/9176357>.
- Chao, Pen-hsiu Grace, Warren Grayson, and Gordana Vunjak-Novakovic. 2007. "Engineering Cartilage and Bone Using Human Mesenchymal Stem Cells." *Journal of Orthopaedic Science* 12 (4): 398–404. <https://doi.org/10.1007/s00776-007-1147-9>.
- Charbord, Pierre, and Louis Casteilla. 2011. "La biologie des cellules souches mésenchymateuses d'origine humaine." *médecine/sciences* 27 (3): 261–67. <https://doi.org/10.1051/medsci/2011273261>.
- Charif, N., Y.Y. Li, L. Targa, L. Zhang, J.S. Ye, Y.P. Li, J.F. Stoltz, H.Z. Han, and N. de Isla. 2017. "Aging of Bone Marrow Mesenchymal Stromal/Stem Cells: Implications on Autologous Regenerative Medicine." Edited by J.-F. Stoltz, J. Magdalou, and D. Bensoussan. *Bio-Medical Materials and Engineering* 28 (s1): S57–63. <https://doi.org/10.3233/BME-171624>.
- Chen, Guoping, Takashi Ushida, and Tetsuya Tateishi. 2000. "A Hybrid Network of Synthetic Polymer Mesh and Collagen Sponge." *Chemical Communications* 0 (16): 1505–6. <https://doi.org/10.1039/B003508O>.

- . 2001. “Development of Biodegradable Porous Scaffolds for Tissue Engineering.” *Materials Science and Engineering: C*, SPECIAL ISSUE: Containing Papers from the Bionic Design Workshop 2000, Tsukuba, Japan, November 16-17, 2000, 17 (1): 63–69. [https://doi.org/10.1016/S0928-4931\(01\)00338-1](https://doi.org/10.1016/S0928-4931(01)00338-1).
- Chen, Xi, Haibo Xu, Chao Wan, Mervyn McCaigue, and Gang Li. 2006. “Bioreactor Expansion of Human Adult Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stem Cells.” *STEM CELLS* 24 (9): 2052–59. <https://doi.org/10.1634/stemcells.2005-0591>.
- Chen, Yanqing, Yunfan He, Xuecen Wang, Feng Lu, and Jianhua Gao. 2019. “Adipose-derived Mesenchymal Stem Cells Exhibit Tumor Tropism and Promote Tumorsphere Formation of Breast Cancer Cells.” *Oncology Reports* 41 (4): 2126–36. <https://doi.org/10.3892/or.2019.7018>.
- Chen, Zheng, Qianqian Chen, Haitao Du, Lijuan Xu, and Jun Wan. 2018. “Mesenchymal Stem Cells and CXCR4 Chemokine Receptor 4 Overexpression Improved the Therapeutic Effect on Colitis via Mucosa Repair.” *Experimental and Therapeutic Medicine* 16 (2): 821–29. <https://doi.org/10.3892/etm.2018.6233>.
- Cheng, Zhaokang, Lailiang Ou, Xin Zhou, Fei Li, Xiaohua Jia, Yinguo Zhang, Xiaolei Liu, et al. 2008. “Targeted Migration of Mesenchymal Stem Cells Modified With CXCR4 Gene to Infarcted Myocardium Improves Cardiac Performance.” *Molecular Therapy* 16 (3): 571–79. <https://doi.org/10.1038/sj.mt.6300374>.
- Chinnadurai, Raghavan, Ian B. Copland, Seema R. Patel, and Jacques Galipeau. 2014. “IDO-Independent Suppression of T Cell Effector Function by IFN- γ -Licensed Human Mesenchymal Stromal Cells.” *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 192 (4): 1491–1501. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1301828>.
- Chung, Kuei-Min, Shu-Ching Hsu, Yue-Ru Chu, Mei-Yao Lin, Weir-Tong Jiaang, Ruey-Hwa Chen, and Xin Chen. 2014. “Fibroblast Activation Protein (FAP) Is Essential for the Migration of Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells through RhoA Activation.” *PLoS ONE* 9 (2). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0088772>.
- Clevers, Hans. 2015. “What Is an Adult Stem Cell?” *Science* 350 (6266): 1319–20. <https://doi.org/10.1126/science.aad7016>.
- Corcione, Anna, Federica Benvenuto, Elisa Ferretti, Debora Giunti, Valentina Cappiello, Francesco Cazzanti, Marco Risso, et al. 2006. “Human Mesenchymal Stem Cells Modulate B-Cell Functions.” *Blood* 107 (1): 367–72. <https://doi.org/10.1182/blood-2005-07-2657>.
- Correa, Diego, and Steven A. Lietman. 2017. “Articular Cartilage Repair: Current Needs, Methods and Research Directions.” *Seminars in Cell & Developmental Biology*, SI: Cartilage Biology and Pathology, 62 (February): 67–77. <https://doi.org/10.1016/j.semcd.2016.07.013>.
- Coulombel, Laure. 2003. “Cellules souches tissulaires adultes: seing is not being.” *M/S : médecine sciences* 19 (6–7): 683–94.
- Dado, Dekel, and Shulamit Levenberg. 2009. “Cell–Scaffold Mechanical Interplay within Engineered Tissue.” *Seminars in Cell & Developmental Biology*, Regenerative Biology and Medicine: II and Patterning and Evolving the Vertebrate Forebrain, 20 (6): 656–64. <https://doi.org/10.1016/j.semcd.2009.02.001>.
- D’Aveni, Maud, Julien Rossignol, Tereza Coman, Shivajanani Sivakumaran, Stephen Henderson, Teresa Manzo, Pedro Santos e Sousa, et al. 2015. “G-CSF Mobilizes CD34⁺ Regulatory Monocytes That Inhibit Graft-versus-Host Disease.” *Science Translational Medicine* 7 (281): 281ra42–281ra42. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.3010435>.
- Davies, Lindsay C., Nina Heldring, Nadir Kadri, and Katarina Le Blanc. 2017. “Mesenchymal Stromal Cell Secretion of Programmed Death-1 Ligands Regulates T Cell Mediated

- Immunosuppression.” *Stem Cells (Dayton, Ohio)* 35 (3): 766–76.
<https://doi.org/10.1002/stem.2509>.
- De Becker, Ann, Paul Van Hummelen, Marleen Bakkus, Isabelle Vande Broek, Joke De Wever, Marc De Waele, and Ivan Van Riet. 2007. “Migration of Culture-Expanded Human Mesenchymal Stem Cells through Bone Marrow Endothelium Is Regulated by Matrix Metalloproteinase-2 and Tissue Inhibitor of Metalloproteinase-3.” *Haematologica* 92 (4): 440–49. <https://doi.org/10.3324/haematol.10475>.
- De la Rosa-Ruiz, María del Pilar, Marco Antonio Álvarez-Pérez, Víctor Adrián Cortés-Morales, Alberto Monroy-García, Héctor Mayani, Gladis Fragoso-González, Sara Caballero-Chacón, Daniel Diaz, Fernando Candanedo-González, and Juan José Montesinos. 2019. “Mesenchymal Stem/Stromal Cells Derived from Dental Tissues: A Comparative In Vitro Evaluation of Their Immunoregulatory Properties Against T Cells.” *Cells* 8 (12): 1491. <https://doi.org/10.3390/cells8121491>.
- Demoor, Magali, David Ollitrault, Tangni Gomez-Leduc, Mouloud Bouyoucef, Magalie Hervieu, Hugo Fabre, Jérôme Lafont, et al. 2014. “Cartilage Tissue Engineering: Molecular Control of Chondrocyte Differentiation for Proper Cartilage Matrix Reconstruction.” *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects* 1840 (8): 2414–40. <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2014.02.030>.
- Deng, Quan-Jun, Xiao-Feng Xu, and Jing Ren. 2018. “Effects of SDF-1/CXCR4 on the Repair of Traumatic Brain Injury in Rats by Mediating Bone Marrow Derived Mesenchymal Stem Cells.” *Cellular and Molecular Neurobiology* 38 (2): 467–77. <https://doi.org/10.1007/s10571-017-0490-4>.
- DeNies, Maxwell S., Luciana K. Rosselli-Murai, Santiago Schnell, and Allen P. Liu. 2019. “Clathrin Heavy Chain Knockdown Impacts CXCR4 Signaling and Post-Translational Modification.” *Frontiers in Cell and Developmental Biology* 7. <https://doi.org/10.3389/fcell.2019.00077>.
- Dominici, M., K. Le Blanc, I. Mueller, I. Slaper-Cortenbach, F.C Marini, D.S. Krause, R.J. Deans, A. Keating, D.J. Prockop, and E.M. Horwitz. 2006. “Minimal Criteria for Defining Multipotent Mesenchymal Stromal Cells. The International Society for Cellular Therapy Position Statement.” *Cytotherapy* 8 (4): 315–17. <https://doi.org/10.1080/14653240600855905>.
- Donders, Raf, Jeroen F.J. Bogie, Stylianos Ravanidis, Pascal Gervois, Marjan Vanheusden, Raphaël Marée, Marie Schrynemackers, et al. 2018. “Human Wharton’s Jelly-Derived Stem Cells Display a Distinct Immunomodulatory and Proregenerative Transcriptional Signature Compared to Bone Marrow-Derived Stem Cells.” *Stem Cells and Development* 27 (2): 65–84. <https://doi.org/10.1089/scd.2017.0029>.
- Duijvestein, Marjolijn, Manon E. Wildenberg, Mick M. Welling, Simone Hennink, Ilse Molendijk, Vanessa L. van Zuylen, Tjalling Bosse, et al. 2011. “Pretreatment with Interferon- γ Enhances the Therapeutic Activity of Mesenchymal Stromal Cells in Animal Models of Colitis.” *Stem Cells (Dayton, Ohio)* 29 (10): 1549–58. <https://doi.org/10.1002/stem.698>.
- Eggenhofer, E., V. Benseler, A. Kroemer, F. C. Popp, E. K. Geissler, H. J. Schlitt, C. C. Baan, M. H. Dahlke, and M. J. Hoogduijn. 2012. “Mesenchymal Stem Cells Are Short-Lived and Do Not Migrate beyond the Lungs after Intravenous Infusion.” *Frontiers in Immunology* 3 (September). <https://doi.org/10.3389/fimmu.2012.00297>.
- Elgaz, Sümeyye, Zyrafete Kuçi, Selim Kuçi, Halvard Bönig, and Peter Bader. 2019. “Clinical Use of Mesenchymal Stromal Cells in the Treatment of Acute Graft-versus-Host Disease.” *Transfusion Medicine and Hemotherapy* 46 (1): 27–34. <https://doi.org/10.1159/000496809>.

- Elstner, A., A. Damaschun, A. Kurtz, G. Stacey, B. Arán, A. Veiga, and J. Borstlap. 2009. "The Changing Landscape of European and International Regulation on Embryonic Stem Cell Research." *Stem Cell Research* 2 (2): 101–7. <https://doi.org/10.1016/j.scr.2008.10.003>.
- English, K., J. M. Ryan, L. Tobin, M. J. Murphy, F. P. Barry, and B. P. Mahon. 2009. "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." *Clinical & Experimental Immunology* 156 (1): 149–60. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2249.2009.03874.x>.
- European Medicines Agency. 2018. "Advanced Therapy Medicinal Products: Overview." Text. European Medicines Agency. September 17, 2018. <https://www.ema.europa.eu/en/human-regulatory/overview/advanced-therapy-medicinal-products-overview>.
- Farashah, Mohammad Sadegh Gholami, Parichehr Pasbakhsh, Ameneh Omid, Saied Nekoonam, Roya Aryanpour, and Iraj Regardi Kashani. 2019. "Preconditioning with SDF-1 Improves Therapeutic Outcomes of Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stromal Cells in a Mouse Model of STZ-Induced Diabetes" 11 (1): 8.
- Friedenstein, A. J., J. F. Gorskaja, and N. N. Kulagina. 1976. "Fibroblast Precursors in Normal and Irradiated Mouse Hematopoietic Organs." *Experimental Hematology* 4 (5): 267–74.
- Frith, Jessica E., Brian Thomson, and Paul G. Genever. 2010. "Dynamic Three-Dimensional Culture Methods Enhance Mesenchymal Stem Cell Properties and Increase Therapeutic Potential." *Tissue Engineering. Part C, Methods* 16 (4): 735–49. <https://doi.org/10.1089/ten.TEC.2009.0432>.
- Galipeau, Jacques, Mauro Krampera, John Barrett, Francesco Dazzi, Robert J. Deans, Joost Debruijn, Massimo Dominici, et al. 2016. "International Society for Cellular Therapy Perspective on Immune Functional Assays for Mesenchymal Stromal Cells as Potency Release Criterion for Advanced Phase Clinical Trials." *Cytotherapy* 18 (2): 151–59. <https://doi.org/10.1016/j.jcyt.2015.11.008>.
- Gao, F., S. M. Chiu, D. a. L. Motan, Z. Zhang, L. Chen, H.-L. Ji, H.-F. Tse, Q.-L. Fu, and Q. Lian. 2016. "Mesenchymal Stem Cells and Immunomodulation: Current Status and Future Prospects." *Cell Death & Disease* 7 (1): e2062–e2062. <https://doi.org/10.1038/cddis.2015.327>.
- Gazit, Zulma, Gadi Pelled, Dima Sheyn, Nadav Kimelman, and Dan Gazit. 2013. "Mesenchymal Stem Cells." In *Handbook of Stem Cells*, 513–27. Elsevier. <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780123859426000457>.
- Germain, D. 2009. "Les cellules souches pluripotentes induites." *Pathologie Biologie* 57 (7): 555–59. <https://doi.org/10.1016/j.patbio.2009.09.017>.
- Ghannam, Soufiane, Jérôme Pène, Gabriel Moquet-Torcy, Gabriel Torcy-Moquet, Christian Jorgensen, and Hans Yssel. 2010. "Mesenchymal Stem Cells Inhibit Human Th17 Cell Differentiation and Function and Induce a T Regulatory Cell Phenotype." *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 185 (1): 302–12. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.0902007>.
- Gieseke, Friederike, Judith Böhringer, Rita Bussolari, Massimo Dominici, Rupert Handgretinger, and Ingo Müller. 2010. "Human Multipotent Mesenchymal Stromal Cells Use Galectin-1 to Inhibit Immune Effector Cells." *Blood* 116 (19): 3770–79. <https://doi.org/10.1182/blood-2010-02-270777>.
- Girousse, Amandine, Maxime Mathieu, Quentin Sastourné-Arrey, Sylvie Monferran, Louis Casteilla, and Coralie Sengenès. 2021. "Endogenous Mobilization of Mesenchymal

- Stromal Cells: A Pathway for Interorgan Communication?" *Frontiers in Cell and Developmental Biology* 8: 1534. <https://doi.org/10.3389/fcell.2020.598520>.
- Godoy, Juliana A. P., Raquel M. A. Paiva, Aline M. Souza, Andrea T. Kondo, Jose M. Kutner, and Oswaldo K. Okamoto. 2019. "Clinical Translation of Mesenchymal Stromal Cell Therapy for Graft Versus Host Disease." *Frontiers in Cell and Developmental Biology* 7 (November): 255. <https://doi.org/10.3389/fcell.2019.00255>.
- Golchin, Ali, Ehsan Seyedjafari, and Abdolreza Ardeshirylajimi. 2020. "Mesenchymal Stem Cell Therapy for COVID-19: Present or Future." *Stem Cell Reviews and Reports*, April, 1–7. <https://doi.org/10.1007/s12015-020-09973-w>.
- Gomzikova, Marina O., Victoria James, and Albert A. Rizvanov. 2019. "Therapeutic Application of Mesenchymal Stem Cells Derived Extracellular Vesicles for Immunomodulation." *Frontiers in Immunology* 10: 2663. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.02663>.
- Götherström, Cecilia, Olle Ringdén, Charlotte Tammik, Eva Zetterberg, Magnus Westgren, and Katarina Le Blanc. 2004. "Immunologic Properties of Human Fetal Mesenchymal Stem Cells." *American Journal of Obstetrics and Gynecology* 190 (1): 239–45. <https://doi.org/10.1016/j.ajog.2003.07.022>.
- Guo, Yu-Chien, Yun-Hsuan Chiu, Chie-Pein Chen, and Hwai-Shi Wang. 2018. "Interleukin-1 β Induces CXCR3-Mediated Chemotaxis to Promote Umbilical Cord Mesenchymal Stem Cell Transendothelial Migration." *Stem Cell Research & Therapy* 9 (1): 281. <https://doi.org/10.1186/s13287-018-1032-9>.
- Haack-Sørensen, Mandana, and Jens Kastrup. 2011. "Cryopreservation and Revival of Mesenchymal Stromal Cells." *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)* 698: 161–74. https://doi.org/10.1007/978-1-60761-999-4_13.
- Han, Kyu Hyun, Han Ro, Ju Ho Hong, Eun Mi Lee, Bumrae Cho, Hye Jung Yeom, Myung-Gyu Kim, Kook-Hwan Oh, Curie Ahn, and Jaeseok Yang. 2011. "Immunosuppressive Mechanisms of Embryonic Stem Cells and Mesenchymal Stem Cells in Alloimmune Response." *Transplant Immunology* 25 (1): 7–15. <https://doi.org/10.1016/j.trim.2011.05.004>.
- Han, Yu, Xuezhou Li, Yanbo Zhang, Yuping Han, Fei Chang, and Jianxun Ding. 2019. "Mesenchymal Stem Cells for Regenerative Medicine." *Cells* 8 (8). <https://doi.org/10.3390/cells8080886>.
- Hass, Ralf, Cornelia Kasper, Stefanie Böhm, and Roland Jacobs. 2011. "Different Populations and Sources of Human Mesenchymal Stem Cells (MSC): A Comparison of Adult and Neonatal Tissue-Derived MSC." *Cell Communication and Signaling* 9 (1): 12. <https://doi.org/10.1186/1478-811X-9-12>.
- Hata, Kenji, Yoshifumi Takahata, Tomohiko Murakami, and Riko Nishimura. 2017. "Transcriptional Network Controlling Endochondral Ossification." *Journal of Bone Metabolism* 24 (2): 75. <https://doi.org/10.11005/jbm.2017.24.2.75>.
- He, Lihong, and Huanxiang Zhang. 2019. "MicroRNAs in the Migration of Mesenchymal Stem Cells." *Stem Cell Reviews and Reports* 15 (1): 3–12. <https://doi.org/10.1007/s12015-018-9852-7>.
- Hu, Chenxia, and Lanjuan Li. 2018. "Preconditioning Influences Mesenchymal Stem Cell Properties in Vitro and in Vivo." *Journal of Cellular and Molecular Medicine* 22 (3): 1428–42. <https://doi.org/10.1111/jcmm.13492>.
- Huang, Guo-Shiang, Pai-Shan Hsieh, Ching-Shiow Tseng, and Shan-hui Hsu. 2014. "The Substrate-Dependent Regeneration Capacity of Mesenchymal Stem Cell Spheroids Derived on Various Biomaterial Surfaces." *Biomaterials Science* 2 (11): 1652–60. <https://doi.org/10.1039/C4BM00053F>.

- Huang, H, H J Kim, E-J Chang, Z H Lee, S J Hwang, H-M Kim, Y Lee, and H-H Kim. 2009. "IL-17 Stimulates the Proliferation and Differentiation of Human Mesenchymal Stem Cells: Implications for Bone Remodeling." *Cell Death & Differentiation* 16 (10): 1332–43. <https://doi.org/10.1038/cdd.2009.74>.
- Hwang, Nathaniel S., Chao Zhang, Yong-Sung Hwang, and Shyni Varghese. 2009. "Mesenchymal Stem Cell Differentiation and Roles in Regenerative Medicine." *WIREs Systems Biology and Medicine* 1 (1): 97–106. <https://doi.org/10.1002/wsbm.26>.
- Jacob, George, Kazunori Shimomura, and Norimasa Nakamura. 2020. "Osteochondral Injury, Management and Tissue Engineering Approaches." *Frontiers in Cell and Developmental Biology* 8 (November): 580868. <https://doi.org/10.3389/fcell.2020.580868>.
- Jeyaraman, Madhan, Albin John, Santhosh Koshy, Rajni Ranjan, Talagavadi Channaiah Anudeep, Rashmi Jain, Kumari Swati, et al. 2021. "Fostering Mesenchymal Stem Cell Therapy to Halt Cytokine Storm in COVID-19." *Biochimica et Biophysica Acta. Molecular Basis of Disease* 1867 (2): 166014. <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2020.166014>.
- Jiang, C.M., J. Liu, J.Y. Zhao, L. Xiao, S. An, Y.C. Gou, H.X. Quan, et al. 2015. "Effets de l'hypoxie Sur Les Propriétés Immunomodulatrices Des Cellules Souches Mésenchymateuses Dérivées de La Gencive Humaine." *Journal of Dental Research* 94 (1): 69–77. <https://doi.org/10.1177/0022034514557671>.
- Jiang, Xiao-Xia, Yi Zhang, Bing Liu, Shuang-Xi Zhang, Ying Wu, Xiao-Dan Yu, and Ning Mao. 2005. "Human Mesenchymal Stem Cells Inhibit Differentiation and Function of Monocyte-Derived Dendritic Cells." *Blood* 105 (10): 4120–26. <https://doi.org/10.1182/blood-2004-02-0586>.
- J.LAUGIER , J-C.ROZÉ , U.SIMÉONI , E.SALIBA. 2006. "Soins aux nouveau-nés." EM-Consulte. 2006. <https://www.em-consulte.com/article/85907/soins-aux-nouveau-nés>.
- Jones, D. Leanne, and Amy J. Wagers. 2008. "No Place like Home: Anatomy and Function of the Stem Cell Niche." *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 9 (1): 11–21. <https://doi.org/10.1038/nrm2319>.
- Kabat, Maciej, Ivan Bobkov, Suneel Kumar, and Martin Grumet. 2019. "Trends in Mesenchymal Stem Cell Clinical Trials 2004-2018: Is Efficacy Optimal in a Narrow Dose Range?" *Stem Cells Translational Medicine* 9 (1): 17–27. <https://doi.org/10.1002/sctm.19-0202>.
- Karp, Jeffrey M., and Grace Sock Leng Teo. 2009. "Mesenchymal Stem Cell Homing: The Devil Is in the Details." *Cell Stem Cell* 4 (3): 206–16. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2009.02.001>.
- Keller, Laetitia, Sandy Eap, Jessica Schiavi, Olivier Huck, Leandro Jacomine, Christian Gauthier, Victor Sebastian, Pascale Schwinté, Nadia Jessel, and Florence Fioretti. 2015. "A Living Thick Nanofibrous Implant Bifunctionalized with Active Growth Factor and Stem Cells for Bone Regeneration." *International Journal of Nanomedicine*, February, 1061. <https://doi.org/10.2147/IJN.S72670>.
- Keller, Laetitia, Luc Pijnenburg, Ysia Idoux-Gillet, Fabien Bornert, Laila Benameur, Maryam Tabrizian, Pierrick Auvray, et al. 2019. "Preclinical Safety Study of a Combined Therapeutic Bone Wound Dressing for Osteoarticular Regeneration." *Nature Communications* 10 (1): 2156. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-10165-5>.
- Kellgren, J. H., and J. S. Lawrence. 1957. "Radiological Assessment of Osteo-Arthrosis." *Annals of the Rheumatic Diseases* 16 (4): 494–502.
- Khalilifar, Mohammad Ali, Mohamadreza Baghaban Eslaminejad, Mohammad Ghasemzadeh, Samaneh Hosseini, and Hossein Baharvand. 2019. "In Vitro and In

- Vivo Comparison of Different Types of Rabbit Mesenchymal Stem Cells for Cartilage Repair.” *Cell Journal (Yakhteh)* 21 (2): 150–60.
<https://doi.org/10.22074/cellj.2019.6149>.
- Kim, Dae Seong, In Keun Jang, Myoung Woo Lee, Young Jong Ko, Doo-Hoon Lee, Ji Won Lee, Ki Woong Sung, Hong Hoe Koo, and Keon Hee Yoo. 2018. “Enhanced Immunosuppressive Properties of Human Mesenchymal Stem Cells Primed by Interferon- γ .” *EBioMedicine* 28 (January): 261–73.
<https://doi.org/10.1016/j.ebiom.2018.01.002>.
- Kim, Nayoun, and Seok-Goo Cho. 2013. “Clinical Applications of Mesenchymal Stem Cells.” *The Korean Journal of Internal Medicine* 28 (4): 387–402.
<https://doi.org/10.3904/kjim.2013.28.4.387>.
- Kolios, George, and Yuben Moodley. 2013. “Introduction to Stem Cells and Regenerative Medicine.” *Respiration* 85 (1): 3–10. <https://doi.org/10.1159/000345615>.
- Kumar, Ashok, Kimberly N. Kremer, Daniel Dominguez, Madhavi Tadi, and Karen E. Hedin. 2011. “G α 13 and Rho Mediate Endosomal Trafficking of CXCR4 into Rab11+ Vesicles upon SDF-1 Stimulation.” *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 186 (2): 951–58. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1002019>.
- Kuo, C.K., and R.S. Tuan. 2003. “Tissue Engineering with Mesenchymal Stem Cells.” *IEEE Engineering in Medicine and Biology Magazine* 22 (5): 51–56.
<https://doi.org/10.1109/MEMB.2003.1256272>.
- Labusca, Luminita, Dumitru Daniel Herea, and Kaveh Mashayekhi. 2018. “Stem Cells as Delivery Vehicles for Regenerative Medicine-Challenges and Perspectives.” *World Journal of Stem Cells* 10 (5): 43–56. <https://doi.org/10.4252/wjsc.v10.i5.43>.
- Lane, Steven W., David A. Williams, and Fiona M. Watt. 2014. “Modulating the Stem Cell Niche for Tissue Regeneration.” *Nature Biotechnology* 32 (8): 795–803.
<https://doi.org/10.1038/nbt.2978>.
- Lanzoni, Giacomo, Elina Linetsky, Diego Correa, Shari Messinger Cayetano, Roger A. Alvarez, Dimitrios Kouroupis, Ana Alvarez Gil, et al. 2021. “Umbilical Cord Mesenchymal Stem Cells for COVID-19 Acute Respiratory Distress Syndrome: A Double-Blind, Phase 1/2a, Randomized Controlled Trial.” *STEM CELLS Translational Medicine* 10 (5): 660–73. <https://doi.org/10.1002/sctm.20-0472>.
- Larghero, J., L. Vija, S. Lecourt, L. Michel, F. Verrecchia, and D. Farge. 2009. “Cellules souches mésenchymateuses et immunomodulation : vers de nouvelles stratégies immunosuppressives pour le traitement des maladies auto-immunes ?” *La Revue de Médecine Interne* 30 (3): 287–99. <https://doi.org/10.1016/j.revmed.2008.08.019>.
- Laroye, Caroline, Amir Boufenzar, Lucie Jolly, Lisiane Cunat, Corentine Alauzet, Jean-Louis Merlin, Clémence Yguel, Danièle Bensoussan, Loïc Reppel, and Sébastien Gibot. 2019. “Bone Marrow vs Wharton’s Jelly Mesenchymal Stem Cells in Experimental Sepsis: A Comparative Study.” *Stem Cell Research & Therapy* 10 (1): 192.
<https://doi.org/10.1186/s13287-019-1295-9>.
- Laroye, Caroline, Mélanie Gauthier, Hélène Antonot, Véronique Decot, Loïc Reppel, and Danièle Bensoussan. 2019. “Mesenchymal Stem/Stromal Cell Production Compliant with Good Manufacturing Practice: Comparison between Bone Marrow, the Gold Standard Adult Source, and Wharton’s Jelly, an Extraembryonic Source.” *Journal of Clinical Medicine* 8 (12): 2207. <https://doi.org/10.3390/jcm8122207>.
- Laroye, Caroline, Sébastien Gibot, Céline Huselstein, and Danièle Bensoussan. 2020. “Mesenchymal Stromal Cells for Sepsis and Septic Shock: Lessons for Treatment of COVID-19.” *STEM CELLS Translational Medicine* 9 (12): 1488–94.
<https://doi.org/10.1002/sctm.20-0239>.

- Laroye, Caroline, Sébastien Gibot, Loïc Reppel, and Danièle Bensoussan. 2017. "Concise Review: Mesenchymal Stromal/Stem Cells: A New Treatment for Sepsis and Septic Shock?" *STEM CELLS* 35 (12): 2331–39. <https://doi.org/10.1002/stem.2695>.
- Laroye, Caroline, Jérémie Lemarié, Amir Boufenzer, Pierre Labroca, Lisiane Cunat, Corentine Alauzet, Frédérique Groubatch, et al. 2018. "Clinical-Grade Mesenchymal Stem Cells Derived from Umbilical Cord Improve Septic Shock in Pigs." *Intensive Care Medicine Experimental* 6 (August). <https://doi.org/10.1186/s40635-018-0194-1>.
- Lataillade, Jean-Jacques, Philippe Brunet de la Grange, Georges Uzan, and Marie-Caroline Le Bousse-Kerdilès. 2010. "Les cellules souches ont-elles l'âge de leur niche ? - À la recherche d'un sérum de jeunesse...." *médecine/sciences* 26 (6–7): 582–85. <https://doi.org/10.1051/medsci/2010266-7582>.
- Lau, Katherine, Ralf Paus, Stephan Tiede, Philip Day, and Ardeshtir Bayat. 2009. "Exploring the Role of Stem Cells in Cutaneous Wound Healing." *Experimental Dermatology* 18 (11): 921–33. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0625.2009.00942.x>.
- Le Blanc, Katarina, Francesco Frassoni, Lynne Ball, Franco Locatelli, Helene Roelofs, Ian Lewis, Edoardo Lanino, et al. 2008. "Mesenchymal Stem Cells for Treatment of Steroid-Resistant, Severe, Acute Graft-versus-Host Disease: A Phase II Study." *Lancet (London, England)* 371 (9624): 1579–86. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(08\)60690-X](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(08)60690-X).
- Le, Hanxiang, Weiguo Xu, Xiuli Zhuang, Fei Chang, Yinan Wang, and Jianxun Ding. 2020. "Cellules Souches Mésoenchymateuses Pour La Régénération Du Cartilage." *Journal of Tissue Engineering* 11 (January): 2041731420943839. <https://doi.org/10.1177/2041731420943839>.
- Lee, Byung-Chul, and Kyung-Sun Kang. 2020. "Functional Enhancement Strategies for Immunomodulation of Mesenchymal Stem Cells and Their Therapeutic Application." *Stem Cell Research & Therapy* 11 (September). <https://doi.org/10.1186/s13287-020-01920-3>.
- Lee, Byung-Chul, Nari Shin, Jin Young Lee, Insung Kang, Jae-Jun Kim, Seung Eun Lee, Soon Won Choi, Gill A. Webster, and Kyung-Sun Kang. 2018. "MIS416 Enhances Therapeutic Functions of Human Umbilical Cord Blood-Derived Mesenchymal Stem Cells Against Experimental Colitis by Modulating Systemic Immune Milieu." *Frontiers in Immunology* 9. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.01078>.
- Leibacher, Johannes, Katrin Dauber, Sabrina Ehser, Veronika Brixner, Katarina Kollar, Anja Vogel, Gabi Spohn, Richard Schäfer, Erhard Seifried, and Reinhard Henschler. 2017. "Human Mesenchymal Stromal Cells Undergo Apoptosis and Fragmentation after Intravenous Application in Immune-Competent Mice." *Cytotherapy* 19 (1): 61–74. <https://doi.org/10.1016/j.jcyt.2016.09.010>.
- Lemarié, J, and S Gibot. 2020. "(Chapitre 167 du traité complet)," 20.
- Leo, Andrew J., and Daniel A. Grande. 2006. "Mesenchymal Stem Cells in Tissue Engineering." *Cells Tissues Organs* 183 (3): 112–22. <https://doi.org/10.1159/000095985>.
- Li, Deng, Peng Wang, Yuxi Li, Zhongyu Xie, Le Wang, Hongjun Su, Wen Deng, Yanfeng Wu, and Huiyong Shen. 2015. "All-Trans Retinoic Acid Improves the Effects of Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stem Cells on the Treatment of Ankylosing Spondylitis: An In Vitro Study." *Stem Cells International* 2015: 484528. <https://doi.org/10.1155/2015/484528>.
- Li, Jun, Yongcan Huang, Jun Song, Xiaolin Li, Xintao Zhang, Zhiyu Zhou, Di Chen, et al. 2018. "Cartilage Regeneration Using Arthroscopic Flushing Fluid-Derived Mesenchymal Stem Cells Encapsulated in a One-Step Rapid Cross-Linked Hydrogel."

- Acta Biomaterialia* 79 (October): 202–15.
<https://doi.org/10.1016/j.actbio.2018.08.029>.
- Li, Qiang, Aijun Zhang, Changbo Tao, Xueyang Li, and Peisheng Jin. 2013. “The Role of SDF-1-CXCR4/CXCR7 Axis in Biological Behaviors of Adipose Tissue-Derived Mesenchymal Stem Cells in Vitro.” *Biochemical and Biophysical Research Communications* 441 (3): 675–80. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2013.10.071>.
- Li, Xiuying, Zhuo Xu, Jinping Bai, Shuyuan Yang, Shuli Zhao, Yingjie Zhang, Xiaodong Chen, and Yimin Wang. 2016. “Umbilical Cord Tissue-Derived Mesenchymal Stem Cells Induce T Lymphocyte Apoptosis and Cell Cycle Arrest by Expression of Indoleamine 2, 3-Dioxygenase.” *Stem Cells International* 2016 (June): e7495135. <https://doi.org/10.1155/2016/7495135>.
- Liu, Xiaolei, Biyan Duan, Zhaokang Cheng, Xiaohua Jia, Lina Mao, Hao Fu, Yongzhe Che, Lailiang Ou, Lin Liu, and Deling Kong. 2011. “SDF-1/CXCR4 Axis Modulates Bone Marrow Mesenchymal Stem Cell Apoptosis, Migration and Cytokine Secretion.” *Protein & Cell* 2 (10): 845–54. <https://doi.org/10.1007/s13238-011-1097-z>.
- LOI N° 2021-1017 Du 2 Août 2021 Relative à La Bioéthique (1). 2021. 2021-1017.
- Magalon, Jeremy, Pauline François, Mélanie Velier, Fanny Grimaud, Julie Veran, Boris Calmels, and Florence Sabatier. 2018. “Thérapie cellulaire et cellules souches en 2018.” *Revue Francophone des Laboratoires* 2018 (507): 34–43. [https://doi.org/10.1016/S1773-035X\(18\)30355-1](https://doi.org/10.1016/S1773-035X(18)30355-1).
- Mäkelä, Tuomas, Reijo Takalo, Oiva Arvola, Henri Haapanen, Fredrik Yannopoulos, Roberto Blanco, Lauri Ahvenjärvi, et al. 2015. “Safety and Biodistribution Study of Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stromal Cells and Mononuclear Cells and the Impact of the Administration Route in an Intact Porcine Model.” *Cytotherapy* 17 (4): 392–402. <https://doi.org/10.1016/j.jcyt.2014.12.004>.
- Marquez-Curtis, Leah A., and Anna Janowska-Wieczorek. 2013. “Enhancing the Migration Ability of Mesenchymal Stromal Cells by Targeting the SDF-1/CXCR4 Axis.” *BioMed Research International* 2013. <https://doi.org/10.1155/2013/561098>.
- Marquez-Curtis, Leah A., Anna Janowska-Wieczorek, Locksley E. McGann, and Janet A. W. Elliott. 2015. “Mesenchymal Stromal Cells Derived from Various Tissues: Biological, Clinical and Cryopreservation Aspects.” *Cryobiology* 71 (2): 181–97. <https://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2015.07.003>.
- Mebarki, Miryam, Camille Abadie, Jérôme Larghero, and Audrey Cras. 2021. “Human Umbilical Cord-Derived Mesenchymal Stem/Stromal Cells: A Promising Candidate for the Development of Advanced Therapy Medicinal Products.” *Stem Cell Research & Therapy* 12 (1): 152. <https://doi.org/10.1186/s13287-021-02222-y>.
- Meisel, Roland, Andree Zibert, Maurice Laryea, Ulrich Göbel, Walter Däubener, and Dagmar Dilloo. 2004. “Human Bone Marrow Stromal Cells Inhibit Allogeneic T-Cell Responses by Indoleamine 2,3-Dioxygenase-Mediated Tryptophan Degradation.” *Blood* 103 (12): 4619–21. <https://doi.org/10.1182/blood-2003-11-3909>.
- Ménard, Cédric, and Karin Tarte. 2011. “Immunosuppression et Cellules Souches Mésenchymateuses Mieux Comprendre Une Propriété Thérapeutique Majeure.” *Médecine/Sciences* 27 (3): 269–74.
- Meng, Fanbiao, Yunfeng Rui, Liangliang Xu, Chao Wan, Xiaohua Jiang, and Gang Li. 2014. “Aqp1 Enhances Migration of Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells Through Regulation of FAK and β -Catenin.” *Stem Cells and Development* 23 (1): 66–75. <https://doi.org/10.1089/scd.2013.0185>.
- Meng, Fanping, Ruonan Xu, Siyu Wang, Zhe Xu, Chao Zhang, Yuanyuan Li, Tao Yang, et al. 2020. “Human Umbilical Cord-Derived Mesenchymal Stem Cell Therapy in Patients

- with COVID-19: A Phase 1 Clinical Trial.” *Signal Transduction and Targeted Therapy* 5 (1): 1–7. <https://doi.org/10.1038/s41392-020-00286-5>.
- Messaoudi, Océane, Christel Henrionnet, Kevin Bourge, Damien Loeuille, Pierre Gillet, and Astrid Pinzano. 2020. “Stem Cells and Extrusion 3D Printing for Hyaline Cartilage Engineering.” *Cells* 10 (1): 2. <https://doi.org/10.3390/cells10010002>.
- Miceli, Vitale, Matteo Bulati, Gioacchin Iannolo, Giovanni Zito, Alessia Gallo, and Pier Giulio Conaldi. 2021. “Therapeutic Properties of Mesenchymal Stromal/Stem Cells: The Need of Cell Priming for Cell-Free Therapies in Regenerative Medicine.” *International Journal of Molecular Sciences* 22 (2): 763. <https://doi.org/10.3390/ijms22020763>.
- Miller, Richard J., Ghazal Banisadr, and Bula J. Bhattacharyya. 2008. “CXCR4 Signaling in the Regulation of Stem Cell Migration and Development.” *Journal of Neuroimmunology, Chemokines and Chemokine Receptors in the Nervous System*, 198 (1): 31–38. <https://doi.org/10.1016/j.jneuroim.2008.04.008>.
- Mohyeldin, Ahmed, Tomás Garzón-Muvdi, and Alfredo Quiñones-Hinojosa. 2010. “Oxygen in Stem Cell Biology: A Critical Component of the Stem Cell Niche.” *Cell Stem Cell* 7 (2): 150–61. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2010.07.007>.
- Moll, Guido, Jessica J. Alm, Lindsay C. Davies, Lena von Bahr, Nina Heldring, Lillemor Stenbeck-Funke, Osama A. Hamad, et al. 2014. “Do Cryopreserved Mesenchymal Stromal Cells Display Impaired Immunomodulatory and Therapeutic Properties?” *STEM CELLS* 32 (9): 2430–42. <https://doi.org/10.1002/stem.1729>.
- Morin-Poulard, Ismaël, Isabelle Louradour, Nathalie Vanzo, and Michèle Crozatier. 2014. “La niche hématopoïétique de la drosophile : Un modèle d’étude in vivo du microenvironnement contrôlant les cellules souches hématopoïétiques.” *M/S. Médecine sciences [ISSN papier : 0767-0974 ; ISSN numérique : 1958-5381]*, 2014, Vol. 30, N° 1; p. 76-81. <https://doi.org/10.1051/medsci/20143001017>.
- Munir, Hafsa, Lewis S. C. Ward, and Helen M. McGettrick. 2018. “Mesenchymal Stem Cells as Endogenous Regulators of Inflammation.” *Advances in Experimental Medicine and Biology* 1060: 73–98. https://doi.org/10.1007/978-3-319-78127-3_5.
- Music, E., K. Futrega, and M. R. Doran. 2018. “Sheep as a Model for Evaluating Mesenchymal Stem/Stromal Cell (MSC)-Based Chondral Defect Repair.” *Osteoarthritis and Cartilage* 26 (6): 730–40. <https://doi.org/10.1016/j.joca.2018.03.006>.
- Nasef, Aisha, Alain Chapel, Christelle Mazurier, Sandrine Bouchet, Manuel Lopez, Noelle Mathieu, Luc Sensebé, et al. 2006. “Identification of IL-10 and TGF- β Transcripts Involved in the Inhibition of T-Lymphocyte Proliferation During Cell Contact With Human Mesenchymal Stem Cells.” *Gene Expression* 13 (4): 217–26. <https://doi.org/10.3727/000000006780666957>.
- Neybecker, Paul, Christel Henrionnet, Elise Pape, Didier Mainard, Laurent Galois, Damien Loeuille, Pierre Gillet, and Astrid Pinzano. 2018. “In Vitro and in Vivo Potentialities for Cartilage Repair from Human Advanced Knee Osteoarthritis Synovial Fluid-Derived Mesenchymal Stem Cells.” *Stem Cell Research & Therapy* 9 (November): 329. <https://doi.org/10.1186/s13287-018-1071-2>.
- Nitzsche, Franziska, Claudia Müller, Barbara Lukomska, Jukka Jolkkonen, Alexander Deten, and Johannes Boltze. 2017. “Concise Review: MSC Adhesion Cascade—Insights into Homing and Transendothelial Migration.” *STEM CELLS* 35 (6): 1446–60. <https://doi.org/10.1002/stem.2614>.
- Noronha, Nádia de Cássia, Amanda Mizukami, Carolina Caliári-Oliveira, Juçara Gastaldi Cominal, José Lucas M. Rocha, Dimas Tadeu Covas, Kamilla Swiech, and Kelen C. R. Malmegrim. 2019. “Priming Approaches to Improve the Efficacy of Mesenchymal

- Stromal Cell-Based Therapies.” *Stem Cell Research & Therapy* 10 (1): 131. <https://doi.org/10.1186/s13287-019-1224-y>.
- Ock, Sun-A, and Gyu-Jin Rho. 2011. “Effect of Dimethyl Sulfoxide (DMSO) on Cryopreservation of Porcine Mesenchymal Stem Cells (PMSCs).” *Cell Transplantation* 20 (8): 1231–39. <https://doi.org/10.3727/096368910X552835>.
- O’Donoghue, Keelin, and Nicholas M. Fisk. 2004. “Fetal Stem Cells.” *Best Practice & Research Clinical Obstetrics & Gynaecology*, Stem Cells in Obstetrics and Gynaecology, 18 (6): 853–75. <https://doi.org/10.1016/j.bpobgyn.2004.06.010>.
- Oliveira-Bravo, Martha, Bruno Braga Sangiorgi, Josiane Lilian dos Santos Schiavinato, Juliana Lott Carvalho, Dimas Tadeu Covas, Rodrigo Alexandre Panepucci, Francisco de Assis Rocha Neves, Octávio Luiz Franco, Rinaldo Wellerson Pereira, and Felipe Saldanha-Araujo. 2016. “LL-37 Boosts Immunosuppressive Function of Placenta-Derived Mesenchymal Stromal Cells.” *Stem Cell Research & Therapy* 7 (December). <https://doi.org/10.1186/s13287-016-0448-3>.
- Papadopoulos, M. C., S. Saadoun, and A. S. Verkman. 2008. “Aquaporins and Cell Migration.” *Pflügers Archiv : European Journal of Physiology* 456 (4): 693–700. <https://doi.org/10.1007/s00424-007-0357-5>.
- Park, Siwan, Hwanseok Jang, Byung Soo Kim, Changmo Hwang, Gi Seok Jeong, and Yongdoo Park. 2017. “Directional Migration of Mesenchymal Stem Cells under an SDF-1 α Gradient on a Microfluidic Device.” *PLOS ONE* 12 (9): e0184595. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0184595>.
- Pawig, Lukas, Christina Klasen, Christian Weber, Jürgen Bernhagen, and Heidi Noels. 2015. “Diversity and Inter-Connections in the CXCR4 Chemokine Receptor/Ligand Family: Molecular Perspectives.” *Frontiers in Immunology* 6 (August). <https://doi.org/10.3389/fimmu.2015.00429>.
- Pelagalli, Alessandra, Anna Nardelli, Enrico Lucarelli, Antonella Zannetti, and Arturo Brunetti. 2018. “Autocrine Signals Increase Ovine Mesenchymal Stem Cells Migration through Aquaporin-1 and CXCR4 Overexpression.” *Journal of Cellular Physiology* 233 (8): 6241–49. <https://doi.org/10.1002/jcp.26493>.
- Pelekanos, Rebecca A, Michael J Ting, Varda S Sardesai, Jennifer M Ryan, Yaw-Chyn Lim, Jerry KY Chan, and Nicholas M Fisk. 2014. “Intracellular Trafficking and Endocytosis of CXCR4 in Fetal Mesenchymal Stem/Stromal Cells.” *BMC Cell Biology* 15 (1): 15. <https://doi.org/10.1186/1471-2121-15-15>.
- Pera, M.F., B. Reubinoff, and A. Trounson. 2000. “Human Embryonic Stem Cells.” *Journal of Cell Science* 113 (1): 5–10. <https://doi.org/10.1242/jcs.113.1.5>.
- Pittenger, M. F. 1999. “Multilineage Potential of Adult Human Mesenchymal Stem Cells.” *Science* 284 (5411): 143–47. <https://doi.org/10.1126/science.284.5411.143>.
- Pittenger, Mark F., Dennis E. Discher, Bruno M. Péault, Donald G. Phinney, Joshua M. Hare, and Arnold I. Caplan. 2019. “Mesenchymal Stem Cell Perspective: Cell Biology to Clinical Progress.” *Npj Regenerative Medicine* 4 (1): 1–15. <https://doi.org/10.1038/s41536-019-0083-6>.
- Poggi, Alessandro, Claudia Prevosto, Anna-Maria Massaro, Simone Negrini, Serena Urbani, Ivana Pierri, Riccardo Saccardi, Marco Gobbi, and Maria Raffaella Zocchi. 2005. “Interaction between Human NK Cells and Bone Marrow Stromal Cells Induces NK Cell Triggering: Role of Nkp30 and NKG2D Receptors.” *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 175 (10): 6352–60. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.175.10.6352>.
- Ponticiello, Michael S., Robert M. Schinagel, Sudha Kadiyala, and Frank P. Barry. 2000. “Gelatin-Based Resorbable Sponge as a Carrier Matrix for Human Mesenchymal Stem Cells in Cartilage Regeneration Therapy.” *Journal of Biomedical Materials Research*

- 52 (2): 246–55. [https://doi.org/10.1002/1097-4636\(200011\)52:2<246::AID-JBM2>3.0.CO;2-W](https://doi.org/10.1002/1097-4636(200011)52:2<246::AID-JBM2>3.0.CO;2-W).
- Poulsom, Richard, Malcolm R. Alison, Stuart J. Forbes, and Nicholas A. Wright. 2002. “Adult Stem Cell Plasticity.” *The Journal of Pathology* 197 (4): 441–56. <https://doi.org/10.1002/path.1176>.
- Rafiq, Qasim A, Karen Coopman, and Christopher J Hewitt. 2013. “Scale-up of Human Mesenchymal Stem Cell Culture: Current Technologies and Future Challenges.” *Current Opinion in Chemical Engineering, Biological engineering / Materials engineering*, 2 (1): 8–16. <https://doi.org/10.1016/j.coche.2013.01.005>.
- Remick, Daniel G. 2007. “Pathophysiology of Sepsis.” *The American Journal of Pathology* 170 (5): 1435–44. <https://doi.org/10.2353/ajpath.2007.060872>.
- Renzi, Sabrina, Tina Lombardo, Silvia Dotti, Sara S. Dessì, Pasquale De Blasio, and Maura Ferrari. 2012. “Mesenchymal Stromal Cell Cryopreservation.” *Biopreservation and Biobanking* 10 (3): 276–81. <https://doi.org/10.1089/bio.2012.0005>.
- Reppel, Loïc, Olivia Caunday, Stéphanie Bultel, Jean-François Stoltz, Céline Huselstein, and Danièle Bensoussan. 2012. “Cellules Souches et Nouvelle Loi de Bioéthique Française.” *Hématologie* 18 (3): 175–81. <https://doi.org/10.1684/hma.2012.0703>.
- Rodríguez-Fuentes, David E., Luis E. Fernández-Garza, John A. Samia-Meza, Silvia A. Barrera-Barrera, Arnold I. Caplan, and Hugo A. Barrera-Saldaña. 2021. “Mesenchymal Stem Cells Current Clinical Applications: A Systematic Review.” *Archives of Medical Research* 52 (1): 93–101. <https://doi.org/10.1016/j.arcmed.2020.08.006>.
- Rombouts, W J C, and R E Ploemacher. 2003. “Primary Murine MSC Show Highly Efficient Homing to the Bone Marrow but Lose Homing Ability Following Culture.” *Leukemia* 17 (1): 160–70. <https://doi.org/10.1038/sj.leu.2402763>.
- Rosová, Ivana, Mo Dao, Ben Capoccia, Daniel Link, and Jan A. Nolte. 2008. “Hypoxic Preconditioning Results in Increased Motility and Improved Therapeutic Potential of Human Mesenchymal Stem Cells.” *Stem Cells* 26 (8): 2173–82. <https://doi.org/10.1634/stemcells.2007-1104>.
- Saleh, Mahshid, Amir Abbas Vaezi, Rasoul Aliannejad, Amir Ali Sohrabpour, Seyedeh Zahra Fotook Kiaei, Mahdi Shadnough, Vahid Siavashi, et al. 2021. “Cell Therapy in Patients with COVID-19 Using Wharton’s Jelly Mesenchymal Stem Cells: A Phase 1 Clinical Trial.” *Stem Cell Research & Therapy* 12 (1): 410. <https://doi.org/10.1186/s13287-021-02483-7>.
- Sasaki, Akari, Mitsuru Mizuno, Manabu Mochizuki, and Ichiro Sekiya. 2019. “Mesenchymal Stem Cells for Cartilage Regeneration in Dogs.” *World Journal of Stem Cells* 11 (5): 254–69. <https://doi.org/10.4252/wjsc.v11.i5.254>.
- Schiavi, Jessica, Naceur Charif, Natalia de Isla, Danièle Bensoussan, Jean-François Stoltz, Nadia Benkirane-Jessel, and Céline Huselstein. 2012. “Does Making Method of Alginate Hydrogel Influence the Chondrogenic Differentiation of Human Mesenchymal Stem Cells?” *Engineering* 04 (10): 110–13. <https://doi.org/10.4236/eng.2012.410B028>.
- Schiavi, Jessica, Loïc Reppel, Naceur Charif, Natalia de Isla, Didier Mainard, Nadia Benkirane-Jessel, Jean-François Stoltz, Rachid Rahouadj, and Céline Huselstein. 2018. “Mechanical Stimulation on Human Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells Enhance Cells Differentiation in a Three-Dimensional Layered Scaffold.” *Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine* 12 (2): 360–69. <https://doi.org/10.1002/term.2461>.
- Schlosser, Kenny, Jia-Pey Wang, Claudia dos Santos, Keith R. Walley, John Marshall, Dean A. Fergusson, Brent W. Winston, et al. 2019. “Effects of Mesenchymal Stem Cell

- Treatment on Systemic Cytokine Levels in a Phase 1 Dose Escalation Safety Trial of Septic Shock Patients*.” *Critical Care Medicine* 47 (7): 918–25.
<https://doi.org/10.1097/CCM.0000000000003657>.
- Schneider, Natália, Fabiany da Costa Gonçalves, Fernanda Otesbelgue Pinto, Patrícia Luciana da Costa Lopez, Anelise Bergmann Araújo, Bianca Pfaffenseller, Eduardo Pandolfi Passos, et al. 2015. “Dexamethasone and Azathioprine Promote Cytoskeletal Changes and Affect Mesenchymal Stem Cell Migratory Behavior.” Edited by Damian Christopher Genetos. *PLOS ONE* 10 (3): e0120538.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0120538>.
- Schrepfer, S., T. Deuse, H. Reichenspurner, M. P. Fischbein, R. C. Robbins, and M. P. Pelletier. 2007. “Stem Cell Transplantation: The Lung Barrier.” *Transplantation Proceedings* 39 (2): 573–76. <https://doi.org/10.1016/j.transproceed.2006.12.019>.
- Seita, Jun, and Irving L. Weissman. 2010. “Hematopoietic Stem Cell: Self-Renewal versus Differentiation.” *WIREs Systems Biology and Medicine* 2 (6): 640–53.
<https://doi.org/10.1002/wsbm.86>.
- Selmani, Zohair, Abderrahim Naji, Ines Zidi, Benoit Favier, Emilie Gaiffe, Laurent Obert, Christophe Borg, et al. 2008. “Human Leukocyte Antigen-G5 Secretion by Human Mesenchymal Stem Cells Is Required to Suppress T Lymphocyte and Natural Killer Function and to Induce CD4+CD25highFOXP3+ Regulatory T Cells.” *STEM CELLS* 26 (1): 212–22. <https://doi.org/10.1634/stemcells.2007-0554>.
- Semedo, Patricia, Marina Burgos-Silva, Cassiano Donizetti-Oliveira, and Niels Olsen Saraiva Camara. 2011. *How Do Mesenchymal Stem Cells Repair? Stem Cells in Clinic and Research*. IntechOpen. <https://doi.org/10.5772/17574>.
- Shao, Yiru, Fangqing Zhou, Daikun He, Lin Zhang, and Jie Shen. 2019. “Overexpression of CXCR7 Promotes Mesenchymal Stem Cells to Repair Phosgene-Induced Acute Lung Injury in Rats.” *Biomedicine & Pharmacotherapy* 109 (January): 1233–39.
<https://doi.org/10.1016/j.biopha.2018.10.108>.
- Sheng, Huiming, Ying Wang, Yuqing Jin, Qiuyu Zhang, Yan Zhang, Li Wang, Baihua Shen, et al. 2008. “A Critical Role of IFN γ in Priming MSC-Mediated Suppression of T Cell Proliferation through up-Regulation of B7-H1.” *Cell Research* 18 (8): 846–57.
<https://doi.org/10.1038/cr.2008.80>.
- Shi, Chao, Ting Jia, Simon Mendez-Ferrer, Tobias M. Hohl, Natalya V. Serbina, Lauren Lipuma, Ingrid Leiner, Ming O. Li, Paul S. Frenette, and Eric G. Pamer. 2011. “Bone Marrow Mesenchymal Stem and Progenitor Cells Induce Monocyte Emigration in Response to Circulating Toll-like Receptor Ligands.” *Immunity* 34 (4): 590–601.
<https://doi.org/10.1016/j.immuni.2011.02.016>.
- Silva Meirelles, Lindolfo da, Aparecida Maria Fontes, Dimas Tadeu Covas, and Arnold I. Caplan. 2009. “Mechanisms Involved in the Therapeutic Properties of Mesenchymal Stem Cells.” *Cytokine & Growth Factor Reviews* 20 (5–6): 419–27.
<https://doi.org/10.1016/j.cytogfr.2009.10.002>.
- Sioud, M., A. Mobergslien, A. Boudabous, and Y. Fløisand. 2010. “Evidence for the Involvement of Galectin-3 in Mesenchymal Stem Cell Suppression of Allogeneic T-Cell Proliferation.” *Scandinavian Journal of Immunology* 71 (4): 267–74.
<https://doi.org/10.1111/j.1365-3083.2010.02378.x>.
- Song, Yunejin, Jung-Yeon Lim, Taekyu Lim, Keon-Il Im, Nayoun Kim, Young-Sun Nam, Young-Woo Jeon, et al. 2020. “Human Mesenchymal Stem Cells Derived from Umbilical Cord and Bone Marrow Exert Immunomodulatory Effects in Different Mechanisms.” *World Journal of Stem Cells* 12 (9): 1032–49.
<https://doi.org/10.4252/wjsc.v12.i9.1032>.

- Sotiropoulou, Panagiota, Sonia Perez, Angelos Gritzapis, Constantin Baxevanis, and Michael Papamichail. 2006. "Interactions Between Human Mesenchymal Stem Cells and Natural Killer Cells." *Stem Cells (Dayton, Ohio)* 24 (February): 74–85. <https://doi.org/10.1634/stemcells.2004-0359>.
- Spaggiari, Grazia Maria, Andrea Capobianco, Stelvio Becchetti, Maria Cristina Mingari, and Lorenzo Moretta. 2006. "Mesenchymal Stem Cell-Natural Killer Cell Interactions: Evidence That Activated NK Cells Are Capable of Killing MSCs, Whereas MSCs Can Inhibit IL-2-Induced NK-Cell Proliferation." *Blood* 107 (4): 1484–90. <https://doi.org/10.1182/blood-2005-07-2775>.
- Steward, Andrew J., and Daniel J. Kelly. 2015. "Mechanical Regulation of Mesenchymal Stem Cell Differentiation." *Journal of Anatomy* 227 (6): 717–31. <https://doi.org/10.1111/joa.12243>.
- Takahashi, Kazutoshi, and Shinya Yamanaka. 2006. "Induction of Pluripotent Stem Cells from Mouse Embryonic and Adult Fibroblast Cultures by Defined Factors." *Cell* 126 (4): 663–76. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2006.07.024>.
- Tipnis, Shabari, Chandra Viswanathan, and Anish S Majumdar. 2010. "Immunosuppressive Properties of Human Umbilical Cord-Derived Mesenchymal Stem Cells: Role of B7-H1 and IDO." *Immunology and Cell Biology* 88 (8): 795–806. <https://doi.org/10.1038/icb.2010.47>.
- Toma, Jean G., Mahnaz Akhavan, Karl JL Fernandes, Fanie Barnabé-Heider, Abbas Sadikot, David R. Kaplan, and Freda D. Miller. 2001. "Isolation of Multipotent Adult Stem Cells from the Dermis of Mammalian Skin." *Nature Cell Biology* 3 (9): 778–84.
- Tomchuck, Suzanne L., Kevin J. Zwezdaryk, Seth B. Coffelt, Ruth S. Waterman, Elizabeth S. Danko, and Aline B. Scandurro. 2008. "Toll-Like Receptors on Human Mesenchymal Stem Cells Drive Their Migration and Immunomodulating Responses." *Stem Cells (Dayton, Ohio)* 26 (1): 99–107. <https://doi.org/10.1634/stemcells.2007-0563>.
- Tuan, Rocky S., Genevieve Boland, and Richard Tuli. 2002. "Adult Mesenchymal Stem Cells and Cell-Based Tissue Engineering." *Arthritis Res Ther* 5 (1): 32. <https://doi.org/10.1186/ar614>.
- Ulrich-Vinther, Michael, Michael D. Maloney, Edward M. Schwarz, Randy Rosier, and Regis J. O'Keefe. 2003. "Articular Cartilage Biology." *JAAOS - Journal of the American Academy of Orthopaedic Surgeons* 11 (6): 421–30.
- Ungerer, Christopher, Patricia Quade-Lyssy, Heinfried H. Radeke, Reinhard Henschler, Christoph Königs, Ulrike Köhl, Erhard Seifried, and Jörg Schüttrumpf. 2014. "Galectin-9 Is a Suppressor of T and B Cells and Predicts the Immune Modulatory Potential of Mesenchymal Stromal Cell Preparations." *Stem Cells and Development* 23 (7): 755–66. <https://doi.org/10.1089/scd.2013.0335>.
- Usunier, Benoît, Marc Benderitter, Radia Tamarat, and Alain Chapel. 2014. "Management of Fibrosis: The Mesenchymal Stromal Cells Breakthrough." *Stem Cells International* 2014: 340257. <https://doi.org/10.1155/2014/340257>.
- Vacanti, Joseph P., and Robert Langer. 1999. "Tissue Engineering: The Design and Fabrication of Living Replacement Devices for Surgical Reconstruction and Transplantation." *The Lancet* 354 (July): S32–34. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(99\)90247-7](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(99)90247-7).
- Van Pham, Phuc. 2016. "Mesenchymal Stem Cells in Clinical Applications." In *Stem Cell Processing*, edited by Phuc Van Pham, 37–69. Sur Les Cellules Souches Dans Les Applications Cliniques. Cham: Springer International Publishing. https://doi.org/10.1007/978-3-319-40073-0_2.

- Venet, Fabienne, and Guillaume Monneret. 2018. "Advances in the Understanding and Treatment of Sepsis-Induced Immunosuppression." *Nature Reviews. Nephrology* 14 (2): 121–37. <https://doi.org/10.1038/nrneph.2017.165>.
- Viswanathan, S., Y. Shi, J. Galipeau, M. Krampera, K. Leblanc, I. Martin, J. Nolta, D.G. Phinney, and L. Sensebe. 2019. "Mesenchymal Stem versus Stromal Cells: International Society for Cell & Gene Therapy (ISCT®) Mesenchymal Stromal Cell Committee Position Statement on Nomenclature." *Cytotherapy* 21 (10): 1019–24. <https://doi.org/10.1016/j.jcyt.2019.08.002>.
- Voisin, Charlotte, Ghislaine Cauchois, Loïc Reppel, Caroline Laroye, Laetitia Louarn, Chantal Schenowitz, Paulin Sonon, et al. 2020. "Are the Immune Properties of Mesenchymal Stem Cells from Wharton's Jelly Maintained during Chondrogenic Differentiation?" *Journal of Clinical Medicine* 9 (2): 423. <https://doi.org/10.3390/jcm9020423>.
- Wang, Guoyan, Siying Zhang, Feifei Wang, Guangyun Li, Lixia Zhang, and Xiyang Luan. 2013. "Expression and Biological Function of Programmed Death Ligands in Human Placenta Mesenchymal Stem Cells." *Cell Biology International* 37 (2): 137–48. <https://doi.org/10.1002/cbin.10024>.
- Wang, Hwai-Shi, Shih-Chieh Hung, Shu-Tine Peng, Chun-Chieh Huang, Hung-Mu Wei, Yi-Jhih Guo, Yu-Show Fu, Mei-Chun Lai, and Chin-Chang Chen. 2004. "Mesenchymal Stem Cells in the Wharton's Jelly of the Human Umbilical Cord." *Stem Cells* 22 (7): 1330–37. <https://doi.org/10.1634/stemcells.2004-0013>.
- Wang, Mengyuan, Quan Yuan, and Liang Xie. 2018. "Mesenchymal Stem Cell-Based Immunomodulation: Properties and Clinical Application." *Stem Cells International*, 13.
- Waterman, Ruth S., Suzanne L. Tomchuck, Sarah L. Henkle, and Aline M. Betancourt. 2010. "A New Mesenchymal Stem Cell (MSC) Paradigm: Polarization into a Pro-Inflammatory MSC1 or an Immunosuppressive MSC2 Phenotype." *PLoS ONE* 5 (4). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0010088>.
- Wei, Xin, Xue Yang, Zhi-peng Han, Fang-fang Qu, Li Shao, and Yu-fang Shi. 2013. "Mesenchymal Stem Cells: A New Trend for Cell Therapy." *Acta Pharmacologica Sinica* 34 (6): 747–54. <https://doi.org/10.1038/aps.2013.50>.
- Won, J-Y, C-Y Park, J-H Bae, G Ahn, C Kim, D-H Lim, D-W Cho, W-S Yun, J-H Shim, and J-B Huh. 2016. "Evaluation of 3D Printed PCL/PLGA/ β -TCP versus Collagen Membranes for Guided Bone Regeneration in a Beagle Implant Model." *Biomedical Materials* 11 (5): 055013. <https://doi.org/10.1088/1748-6041/11/5/055013>.
- Wu, Fan, Jingqi Zheng, Zhixiong Li, and Mingxian Liu. 2019. "Haloysite Nanotubes Coated 3D Printed PLA Pattern for Guiding Human Mesenchymal Stem Cells (HMSCs) Orientation." *Chemical Engineering Journal* 359 (March): 672–83. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2018.11.145>.
- Wynn, Robert F., Claire A. Hart, Carla Corradi-Perini, Liam O'Neill, Caroline A. Evans, J. Ed Wraith, Leslie J. Fairbairn, and Ilaria Bellantuono. 2004. "A Small Proportion of Mesenchymal Stem Cells Strongly Expresses Functionally Active CXCR4 Receptor Capable of Promoting Migration to Bone Marrow." *Blood* 104 (9): 2643–45. <https://doi.org/10.1182/blood-2004-02-0526>.
- Xu, Yibo, Chuanxin Chen, Peter B. Hellwarth, and Xiaoping Bao. 2019. "Biomaterials for Stem Cell Engineering and Biomanufacturing." *Bioactive Materials* 4 (December): 366–79. <https://doi.org/10.1016/j.bioactmat.2019.11.002>.
- Yadav, Pooja, Ravina Vats, Afsareen Bano, and Rashmi Bhardwaj. 2020. "Mesenchymal Stem Cell Immunomodulation and Regeneration Therapeutics as an Ameliorative

- Approach for COVID-19 Pandemics.” *Life Sciences* 263 (December): 118588. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2020.118588>.
- Yagi, Hiroshi, Alejandro Soto-Gutierrez, Biju Parekkadan, Yuko Kitagawa, Ronald G. Tompkins, Naoya Kobayashi, and Martin L. Yarmush. 2010. “Mesenchymal Stem Cells: Mechanisms of Immunomodulation and Homing.” *Cell Transplantation* 19 (6): 667–79. <https://doi.org/10.3727/096368910X508762>.
- Yuan, Zhengqiang, Sofia Da Silva Lourenco, Elizabeth K. Sage, Krishna K. Kolluri, Mark W. Lowdell, and Sam M. Janes. 2016. “Cryopreservation of Human Mesenchymal Stromal Cells Expressing TRAIL for Human Anti-Cancer Therapy.” *Cytotherapy* 18 (7): 860–69. <https://doi.org/10.1016/j.jcyt.2016.04.005>.
- Zakrzewski, Wojciech, Maciej Dobrzyński, Maria Szymonowicz, and Zbigniew Rybak. 2019. “Stem Cells: Past, Present, and Future.” *Stem Cell Research & Therapy* 10 (February). <https://doi.org/10.1186/s13287-019-1165-5>.
- Zhang, Dongsheng, Guo-Chang Fan, Xiaoyang Zhou, Tiemin Zhao, Zeeshan Pasha, Meifeng Xu, Yi Zhu, Muhammad Ashraf, and Yigang Wang. 2008. “Over-Expression of CXCR4 on Mesenchymal Stem Cells Augments Myoangiogenesis in the Infarcted Myocardium.” *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* 44 (2): 281–92. <https://doi.org/10.1016/j.yjmcc.2007.11.010>.
- Zhang, Shipin, Shang Jiunn Chuah, Ruenn Chai Lai, James Hoi Po Hui, Sai Kiang Lim, and Wei Seong Toh. 2018. “MSC Exosomes Mediate Cartilage Repair by Enhancing Proliferation, Attenuating Apoptosis and Modulating Immune Reactivity.” *Biomaterials* 156 (February): 16–27. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2017.11.028>.
- Zhao, Qinjun, Hongying Ren, and Zhongchao Han. 2016. “Mesenchymal Stem Cells: Immunomodulatory Capability and Clinical Potential in Immune Diseases.” *Journal of Cellular Immunotherapy* 2 (1): 3–20. <https://doi.org/10.1016/j.jocit.2014.12.001>.
- Zheng, Jun, Hui Li, Liying He, Yiming Huang, Jianye Cai, Liang Chen, Chaorong Zhou, et al. 2018. “Preconditioning of Umbilical Cord-derived Mesenchymal Stem Cells by Rapamycin Increases Cell Migration and Ameliorates Liver Ischaemia/Reperfusion Injury in Mice via the CXCR4/CXCL12 Axis.” *Cell Proliferation* 52 (2). <https://doi.org/10.1111/cpr.12546>.
- Zheng, Z. H., X. Y. Li, J. Ding, J. F. Jia, and P. Zhu. 2008. “Allogeneic Mesenchymal Stem Cell and Mesenchymal Stem Cell-Differentiated Chondrocyte Suppress the Responses of Type II Collagen-Reactive T Cells in Rheumatoid Arthritis.” *Rheumatology* 47 (1): 22–30. <https://doi.org/10.1093/rheumatology/kem284>.
- Zhou, Changhui, Bo Yang, Yi Tian, Hongliang Jiao, Wendi Zheng, Jian Wang, and Fangxia Guan. 2011. “Immunomodulatory Effect of Human Umbilical Cord Wharton’s Jelly-Derived Mesenchymal Stem Cells on Lymphocytes.” *Cellular Immunology* 272 (1): 33–38. <https://doi.org/10.1016/j.cellimm.2011.09.010>.
- Ziaei, Mohammed, Jie Zhang, Dipika V. Patel, and Charles N. J. McGhee. 2017. “Umbilical Cord Stem Cells in the Treatment of Corneal Disease.” *Survey of Ophthalmology* 62 (6): 803–15. <https://doi.org/10.1016/j.survophthal.2017.02.002>.
- Zimmermann, Joshua A., Marian H. Hettiaratchi, and Todd C. McDevitt. 2017. “Enhanced Immunosuppression of T Cells by Sustained Presentation of Bioactive Interferon-γ Within Three-Dimensional Mesenchymal Stem Cell Constructs.” *Stem Cells Translational Medicine* 6 (1): 223–37. <https://doi.org/10.5966/sctm.2016-0044>.
- Zuk, Patricia A., Min Zhu, Peter Ashjian, Daniel A. De Ugarte, Jerry I. Huang, Hiroshi Mizuno, Zeni C. Alfonso, John K. Fraser, Prosper Benhaim, and Marc H. Hedrick. 2002. “Human Adipose Tissue Is a Source of Multipotent Stem Cells.” *Molecular Biology of the Cell* 13 (12): 4279–95. <https://doi.org/10.1091/mbc.E02-02-0105>.

Résumé/ Abstract

Résumé

Les cellules souches/stromales mésenchymateuses (CSM) sont étudiées depuis maintenant 45 ans pour leurs propriétés de différenciation/régénération et d'immunomodulation. Elles peuvent provenir de nombreux tissus, comme la moelle osseuse, le tissu adipeux, le cordon ombilical ou encore la gelée de Wharton issu de ce dernier. Elles sont examinées dans le but d'être appliquées dans les domaines de l'ingénierie tissulaire et de la thérapie cellulaire. Dans cette étude, nous nous focalisons sur la régénération du cartilage ainsi que la diminution de pathologies inflammatoires via l'utilisation de CSM issues de la gelée de Wharton (GW).

Le problème constaté en ingénierie tissulaire est que le cartilage est un tissu ayant un faible potentiel de reconstruction, tandis qu'en thérapie cellulaire un problème de migration se manifeste. Effectivement, après leur injection peu de cellules atteignent finalement le site inflammatoire/ lésé.

Le premier objectif de ce projet a été de cultiver en conditions de grade clinique, les CSM-GW, dans un biomatériau constitué d'alginate enrichi en acide hyaluronique (Alg/HA), afin d'engager une différenciation chondrogénique. En parallèle de cela, de l'Interféron- γ (INF- γ) associé au *Tumor Necrosis α* (TNF α) ont été appliqués dans l'environnement cellulaire afin de mimer un contexte allogénique. Le second objectif fut d'étudier ainsi qu'optimiser les propriétés de migration des CSM tout en maintenant des propriétés immunomodulatrices optimales. Pour cela, des préconditionnements ont été appliqués aux cellules : de l'INF- γ / TNF α , du Lipopolysaccharides (LPS), de l'acide polyinosinique-polycytidylique (Poly I:C) ainsi que du *Stromal cell-derived factor 1* (SDF1). Les résultats montrent que les CSM-GW en monocouche ainsi qu'en biomatériaux d'Alg/HA apparaissent non immunogènes ainsi qu'immunomodulatrices lorsqu'elles sont en coculture avec des lymphocyte T. Un début de différenciation chondrocytaire a pu être observé après 28 jours de culture des CSM en biomatériau. Le préconditionnement à l'INF- γ / TNF α permet aux CSM-GW d'exprimer plus fortement les molécules immunomodulatrices (PD-L1 membranaire et soluble, IL-6 et IL-8) tandis que les préconditionnements aux LPS, SDF et Poly I :C améliorent les propriétés migratoires des CSM-GW. Pour conclure, les CSM-GW semblent donc favorable pour une utilisation en condition allogénique. Nos études montrent que les CSM-GW pourraient être utilisées *in situ* pour la régénération du cartilage mais aussi injectée dans la circulation systémique pour contrer l'inflammation dans la maladie du greffon contre l'hôte, le sepsis ou encore la COVID19. Ainsi cela conforte leur application en tant que médicament de thérapie innovante (MTI).

Mots clés : Cellules souches/stromales mésenchymateuses ; gelée de Wharton ; régénération ; migration ; préconditionnement

Abstract

Mesenchymal stem/stromal cells (MSC) have been studied for 45 years for their differentiation/regeneration and immunomodulation properties. They can be derived from many tissues, such as bone marrow, adipose tissue, umbilical cord or even Wharton's jelly derived from the latter. They are applied in tissue engineering and cell therapy. In this study, we focus on the cartilage regeneration and the reduction of inflammatory pathologies with MSC derived from Wharton's Jelly (WJ).

The problem in tissue engineering is that cartilage is a tissue with a low reconstruction potential, while in cell therapy a migration problem occurs. Indeed, after their injection few cells finally reach the inflammatory/injured site.

The first objective of this project was to cultivate in clinical grade conditions, WJ-MSC, in a biomaterial constituted of alginate enriched in hyaluronic acid (Alg/HA), to initiate a chondrogenic differentiation. In parallel, Interferon- γ (INF- γ) associated with Tumor Necrosis α (TNF α) were applied in the cellular environment to mimic an allogeneic context. The second objective was to study and optimize the migration properties of MSC while maintaining optimal immunomodulatory properties. For this purpose, preconditioning was applied to cells: INF- γ / TNF α , Lipopolysaccharides (LPS), Polyinosinic-polycytidylic acid (Poly I:C) and Stromal cell-derived factor 1 (SDF1). The results show that MSC-WJ in monolayers as well as in Alg/HA biomaterials appear non-immunogenic as well as immunomodulatory when cocultured with T lymphocytes. The beginning of chondrocyte differentiation could be observed after 28 days of culture of MSC in biomaterial. Preconditioning with INF- γ / TNF α allows WJ-MSC to express more strongly immunomodulatory molecules (membrane and soluble PD-L1, IL-6 and IL-8) while preconditioning with LPS and SDF improves the migratory properties of WJ-MSC. In conclusion, they seem favorable for their use in allogeneic conditions. Our studies show that they could be used *in situ* for cartilage regeneration but also injected in systemic circulation to stop inflammation in graft-versus-host disease, sepsis or COVID19. This confirms their application as an advanced therapy medicinal product (ATMP).

Key words : Mesenchymal stem/stromal cells ; Wharton's jelly ; regeneration ; migration ; preconditioning