UNIVERSITÉ DE LORRAINE | BIBLIOTHÈQUES UNIVERSITAIRES

AVERTISSEMENT
DROIT D'AUTEUR

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. Toute contrefaçon, plagiat ou reproduction illicite encourt une poursuite pénale.

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

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 122. 4
Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 335.2- L 335.10

UNIVERSITÉ DE LORRAINE
34 COURS LÉOPOLD — CS 25233
54052 NANCY CEDEX
WWW.UNIV-LORRAINE.FR

Ecole Doctorale BioSE (Biologie-Santé-Environnement)

Thèse

Présentée et soutenue publiquement pour l'obtention du titre de

DOCTEUR DE L'UNVERSITE DE LORRAINE

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

par Théa Pignot

Etude des phénotypes pro- et anti-inflammatoires des Cellules Stromales Mésenchymateuses issues de cordons ombilicaux ou de lots de cordons ombilicaux pour des applications de thérapies cellulaires

Soutenue le 26 mai 2026

Membres du jury :

Rapporteurs :	M. Jean-Christophe Pagès	PU-PH Directeur adjoint de l'Institut RESTORE, Directeur Scientifique EFS Occitanie Université de Toulouse, CNRS U-5070, EFS, Inserm U1301, Toulouse, France
	M. Nadir Kadri	PhD, Assistant Professeur Department of molecular medicine and surgery, Karolinska Institutet, Stockholm, Suède
Examinateurs :	Mme. Nathalie Rouas-Freiss (Présidente du jury)	PharmD, PhD, Cheffe de Service de Recherches en Hémato-Immunologie CEA/DRF/Institut de Biologie François Jacob, UMR 1342 Institut de Recherche Saint-Louis-INSERM-Université Paris Cité, Hôpital Saint-Louis, Paris, France
	Mme. Céline Huselstein	PU (Directrice de thèse) UMR 7365 CNRS-UL IMoPA, Faculté de Médecine, Maïeutique et Métiers de la Santé, Vandœuvre-lès-Nancy, France
	Mme. Caroline Laroye	MCU-PH (co-directrice de thèse) UMR 7365 CNRS-UL IMoPA, UTCT, CHRU, Nancy, France

UMR 7365 CNRS-Université de Lorraine : Ingénierie Moléculaire, Cellulaire et Physiopathologie (IMoPA). Biopôle de l'Université de Lorraine, Campus Brabois-Santé, Vandœuvre-lès-Nancy, France
Equipe CImIND (Cell engineering and Immunomodulation of Inflammatory and Neoplastic Disorders).

Sommaire :

Introduction 13

I. Les Cellules Souches 13

II. Les Cellules Souches/Stromales Mésenchymateuses (CSM) 14

1) Définition des CSM 14

2) Localisation des CSM au sein de l'organisme 15

III. Propriétés des CSM 16

1) Capacités de soutien envers la niche hématopoïétique 16

2) Capacités de différenciation et de réparation tissulaire 17

3) Capacités d'adressage tissulaire ciblé 18

4) Capacités immunomodulatrices 23

4.1) Immunomodulation par contact direct 23

4.2) Immunomodulation indirecte par action paracrine 27

4.3) Immunomodulation par transfert mitochondrial 32

5) Caractérisation des CSM 37

IV. Phénotype immunitaire des CSM 38

1) Plasticité immunitaire 38

2) Description des phénotypes CSM1/CSM2 40

3) Préconditionnement cellulaire *in vitro* 40

3.1) Préconditionnement par variation de l'environnement biochimique 41

3.2) Préconditionnement par variation des échanges gazeux 45

3.3) Préconditionnement par variation du mode de culture 45

3.4) Impact du temps et de la concentration des molécules de préconditionnement sur le comportement immunitaire des CSM 47

4) Voies de signalisation à l'origine des différents phénotypes immunitaires des CSM ... 53

V. Les CSM de la gelée de Wharton (CSM(GW)) 56

1) Localisation des CSM(GW) 56

2) Propriétés des CSM(GW) 58

VI. Utilisation des CSM en thérapie cellulaire 60

1) Intérêt des CSM en thérapie cellulaire 60

2) Les CSM en tant que médicament de thérapie innovante 62

VII. Intérêt des CSM en thérapie 65

1) Intérêt des CSM dans des pathologies inflammatoires 65

2) Intérêt des CSM dans des pathologies avec une immunoparalysie 67

3) Exemple de l'intérêt des CSM dans le sepsis ou le choc septique 67

VIII. Limites majeures de l'utilisation des CSM en thérapie cellulaire 72

IX. Objectifs du projet de Thèse 74

Matériel et Méthodes 75
I. Production d'une banque de CSM(GW) à partir de cordons ombilicaux 75
1) Isolement des CSM(GW) 75
2) Culture des CSM(GW) 76
3) Préconditionnement cellulaire 76
4) Cryoconservation 78
5) Réalisation d'un pool de CSM(GW) 78
II. Cytométrie en flux 78
III. Test Elisa 81
IV. Analyse des exosomes par NTA et MACSPlex 81
V. Coculture CSM-LT 82
VI. Mise en place d'une anergie lymphocytaire 83
VII. Transfert mitochondrial : des CSM vers les CMN 83
VIII. Migration 84
1) Chambre de Boyden 84
2) Test d'invasion 85
3) Test de blessure 86
IX. Détection protéique 86
1) Dosage protéique 86
2) Détection protéique sur membrane 87
3) Western Blots 88
X. Détection des microARN (miR) 91
XI. Analyse statistique 93
Résultats 94
I. Mise en place du protocole expérimental 94
1) Choix du préconditionnement cellulaire à appliquer aux CSM(GW) : impact du temps et de la concentration de stimulation 94
2) Impact de la congélation sur les phénotypes immunitaires 100
II. Etude phénotypique des CSM(GW) préconditionnées *in vitro* : à la recherche de biomarqueurs 102
1) Analyse des marqueurs immunomodulateurs et de costimulation 102
2) Analyse du sécrétome 104
2.1) Sécrétions cytokiniques et de facteurs immunomodulateurs 104
2.2) Sécrétions d'exosomes 105
3) Analyse de précurseurs plus précoces : exemple des microARN 107
III. Etudes fonctionnelles des CSM(GW) préconditionnées *in vitro* 108
1) Etude des capacités immunomodulatrices 108
1.1) Envers la prolifération des lymphocytes T 108

1.2) Médiées par le transfert mitochondrial 112
2) Etudes des capacités de migration 116
2.1) Etude des récepteurs de migration 116
2.2) Etude fonctionnelle de la migration 117
IV. Etude des voies de signalisation post-préconditionnement 118
V. Comment lisser la variabilité inter-donneur ? 125
1) Sélectionner des souches immunostimulantes ? 125
2) Constituer un pool de plusieurs souches de CSM ? 127
2.1) D'un point de vue phénotypique 127
2.2) D'un point de vue fonctionnelle 133
Discussion 142
Conclusion et perspectives 163

Liste des figures :

Figure 1 : Schéma illustrant les différents types de cellules souches au cours du développement embryonnaire 14
Figure 2 : Schéma de la localisation des CSM au sein de tissus adultes ou de tissus extra-embryonnaires 16
Figure 3 : Voies de signalisation issues de l'axe CXCL12/SDF-1-CXCR4 20
Figure 4 : Différents modes de transfert des mitochondries utilisés par les CSM 33
Figure 5 : Mécanismes d'immunomodulation médiés par les CSM 36
Figure 6 : Frise chronologique de l'histoire des CSM : de leur découverte aux mises à jour actuelles 38
Figure 7 : Synthèse des principales études mettant en avant le rôle pro- ou anti-inflammatoire de CSM préconditionnées ou non. 53
Figure 8 : Différentes voies de signalisation découlant de l'activation des TLR 3/4/7-8 et des récepteurs de type I et II à l'IFNγ et au TNFα 55
Figure 9 : Organisation du cordon ombilical humain 57
Figure 10 : Répartition de l'utilisation des CSM au sein des essais cliniques par pathologies 61
Figure 11 : Pathologie du sepsis et de son évolution : De sa source de départ aux manifestations physiopathologiques ou comment valoriser l'utilisation de CSM au sein de cette pathologie ?.. 71

Figure 12 : Différentes étapes d'isolement des CSM(GW) en culture in vitro. 75
Figure 13 : Processus de migration des CSM(GW) en Chambre de Boyden. 85
Figure 14 : Principe de la méthode TaqMan selon le protocole fourni par Thermo Fisher Scientific 93
Figure 15 : Expression de molécules de costimulation par des CSM(GW) non stimulées ou préconditionnées avec différentes souches de LPS telles que le LPS O55 : B5 (*E.Coli*), le LPS O111 : B4 (*E.Coli*), le LPS O26 : B6 (*E.Coli*) et le LPS *Salmonella enterica* 95
Figure 16 : Expression de molécules de costimulation par les CSM(GW) non stimulées ou préconditionnées avec du LPS, du R848, du 2-DG ou du TNFαPGE2 96
Figure 17 : Impact de la concentration et/ou du temps de préconditionnement des CSM(GW) d'un point de vue phénotypique, sécrétoire ou fonctionnel 97
Figure 18 : Expression de marqueurs et sécrétion cytokinique par les CSM(GW) non stimulées ou préconditionnées avec du LPS, du R848, du Poly I :C ou avec des combinaisons de ces molécules 99
Figure 19 : Phénotypage des CSM(GW) non stimulées ou préconditionnées avec du LPS, du R848, du Poly I :C ou de l'IFNγTNFα, selon les critères établis par l'ISCT 100
Figure 20 : Capacité d'immunomodulation des CSM(GW), sur la prolifération des lymphocytes T, selon leur statut frais ou décongelé 102
Figure 21 : Expression des molécules de costimulation par des CSM(GW) non stimulées ou préconditionnées avec du LPS, du R848, du Poly I :C ou de l'IFNγTNFα 103
Figure 22 : Expression des principales molécules immunomodulatrices, par des CSM(GW) non stimulées ou préconditionnées avec du LPS, du R848, du Poly I :C ou de l'IFNγTNFα 104
Figure 23 : Analyse du sécrétome des CSM(GW) non stimulées ou préconditionnées avec du LPS, du R848, du Poly I:C ou de l'IFNγTNFα 105
Figure 24 : Analyse des particules sécrétées par les CSM(GW) non stimulées ou préconditionnées avec du LPS, du R848, du Poly I :C ou de l'IFNγTNFα, au sein du surnageant de culture 106
Figure 25 : Expression des microARN au sein des CSM(GW) non stimulées ou préconditionnées avec du LPS, du R848, du Poly I :C ou de l'IFNγTNFα 107
Figure 26 : Capacités immunomodulatrices des CSM(GW) cocultivées avec des lymphocytes T 109
Figure 27 : Capacités immunomodulatrices des CSM(GW) cocultivées avec des LT rendus anergiques 112
Figure 28 : Transfert mitochondrial des CSM(GW) non stimulées ou préconditionnées avec du LPS, du R848, du Poly I :C ou de l'IFNγTNFα, vers les sous-populations immunitaires 114

Figure 29 : Corrélation entre le transfert mitochondrial des CSM(GW) non stimulées ou préconditionnées avec du LPS, du R848, du Poly I :C ou de l'IFNγTNFα et la prolifération des sous-populations immunitaires 115
Figure 30 : Expression des récepteurs de migration au sein des CSM(GW) non stimulées ou préconditionnées avec du LPS, du R848, du Poly I :C ou de l'IFNγTNFα 116
Figure 31 : Capacité migratoire des CSM(GW) non stimulées ou préconditionnées avec du LPS, du R848, du Poly I :C ou de l'IFNγTNFα. 117
Figure 32 : Expression des récepteurs TLR au sein des CSM(GW) non stimulées ou préconditionnées 119
Figure 33 : Expression de la protéine rapportrice au sein des CSM(GW) non stimulées ou préconditionnées 120
Figure 34 : Expression relative des protéines impliquées dans la voie de signalisation NF-kB au sein des CSM(GW) non stimulées ou préconditionnées avec du LPS, du R848, du Poly I :C ou de l'IFNγTNFα 121
Figure 35 : Expression relative des facteurs de transcription impliqués dans la production d'IFN de type I par des CSM non stimulées ou préconditionnées avec du LPS, du R848, du Poly I :C ou de l'IFNγTNFα 123
Figure 36 : Analyse des protéines exprimées par des CSM(GW) non stimulées ou préconditionnées avec du LPS, du R848, du Poly I :C ou de l'IFNγTNFα 124
Figure 37 : Analyse du sécrétome de la souche de CSM(GW) T8 non stimulées ou préconditionnées avec du LPS, du R848, du Poly I:C ou de l'IFNγTNFα 126
Figure 38 : Capacités immunomodulatrices de la souche de CSM(GW) T8 non stimulées ou préconditionnées avec du LPS, du R848, du Poly I:C ou de l'IFNγTNFα 127
Figure 39 : Phénotypage du pool de CSM(GW) non stimulé ou préconditionné avec du LPS, du R848, du Poly I :C ou de l'IFNγTNFα, selon les critères établis par l'ISCT 128
Figure 40 : Expression des molécules immunomodulatrices et de costimulation par le pool de CSM(GW) non stimulé ou préconditionné avec du LPS, du R848, du Poly I :C ou de l'IFNγTNFα 130
Figure 41 : Analyse des particules sécrétées par le pool de CSM(GW) non stimulé ou préconditionné avec du LPS, du R848, du Poly I :C ou de l'IFNγTNFα, au sein du surnageant de culture 130
Figure 42 : Expression des microARN au sein du pool de CSM(GW) non stimulé ou préconditionné avec du LPS, du R848, du Poly I :C ou de l'IFNγTNFα 131
Figure 43 : Analyse du sécrétome du pool des CSM(GW) non stimulé ou préconditionné avec du LPS, du R848, du Poly I:C ou de l'IFNγTNFα 133

Figure 44 : Capacités immunomodulatrices du pool de CSM(GW) non stimulé ou préconditionné avec du LPS, du R848, du Poly I :C ou de l'IFNγTNFα, et cocultivé avec des lymphocytes T 134
Figure 45 : Capacités immunomodulatrices du pool de CSM(GW) cocultivé avec des LT rendus anergiques 135
Figure 46 : Capacités immunomodulatrices du pool de CSM(GW) non stimulé ou préconditionné avec du LPS, du R848, du Poly I :C ou de l'FNγTNFα, médiées par le transfert mitochondrial vers les sous-populations immunitaires 138
Figure 47 : Capacités immunomodulatrices du pool de CSM(GW) médiées par le transfert mitochondrial vers les sous-populations immunitaires rendues anergiques. 140
Figure 48 : Expression des récepteurs de migration au sein du pool de CSM(GW) non stimulé ou préconditionné avec du LPS, du R848, du Poly I :C ou de l'IFNγTNFα. 141
Figure 49 : Capacité migratoire de pool de CSM(GW) non stimulé ou préconditionné avec du LPS, du R848, du Poly I :C ou de l'IFNγTNFα 141
Figure 50 : Effets des préconditionnements sur le phénotype immunitaire des CSM : une conclusion phénotypique et fonctionnelle de la caractérisation post-préconditionnement 164

Liste des tableaux :

Tableau 1 : Description des principaux récepteurs impliqués dans le chimiotactisme des CSM 21
Tableau 2 : Les différents préconditionnements moléculaires appliqués aux CSM. 48
Tableau 3 : Description des différents TLR stimulés dans notre étude[2]. 54
Tableau 4 : Description des produits de thérapie cellulaire basés sur l'utilisation de CSM et commercialisés. 63
Tableau 5 : Liste des différents types de préconditionnements testés en fonction de la concentration et du temps utilisé, afin d'obtenir un phénotype CSM1 ou CSM2. 77
Tableau 6 : Liste des anticorps utilisés lors de ce projet. 80
Tableau 7 : Liste des inhibiteurs de protéases/phosphatases utilisés. 87
Tableau 8 : Liste des kinases et autres protéines ciblées par le kit de détection protéique. 88
Tableau 9 : Description des différentes étapes de PCR aux températures, temps et cycles d'amplification recommandés par le fournisseur. 92
Tableau 10 : Choix des molécules de préconditionnement ainsi que des temps et des concentrations adéquates de stimulations, afin d'obtenir un phénotype immunitaire CSM1ou CSM2. 98
Tableau 11 : Transductions ou transfections moléculaires appliquées aux CSM..... 166

Remerciements

La Thèse est plus qu'une formation universitaire, plus qu'une expérience professionnalisante, c'est une véritable aventure avec des hauts et des bas, des moments de joie et des moments difficiles. Au cours de ces années de doctorat, j'ai grandi professionnellement en réussissant à prendre confiance en moi, à parler devant un auditoire (en stressant un peu moins qu'avant), en me sentant à ma place, en renforçant mes connaissances scientifiques et ma curiosité pour la science. Mais j'ai grandi aussi personnellement en restant déterminée, en essayant de gérer mes émotions au mieux et en combattant mes angoisses. Ces années de travail acharné m'ont permis de mieux me connaître.

Ce fut un véritable plaisir de pouvoir travailler sur ce projet et d'avoir contribué du mieux que je le pouvais à son avancée. Ce fut un plaisir de travailler avec des collègues qui sont devenus des amis désormais. C'est pourquoi je vais essayer de tous vous remercier.

Tout d'abord, j'aimerais remercier mes membres du jury

- Mme. la Présidente du jury Nathalie Rouas-Freiss
- M. Jean-Christophe Pagès, rapporteur
- M. Nadir Kadri, rapporteur

pour leur intérêt porté à mon projet de thèse, leur disponibilité et leur implication.

Parmi ce jury je tiens à remercier également ma directrice de thèse, Mme Céline Huselstein qui m'a fait confiance, qui m'a accompagnée et transmis son savoir. Merci de m'avoir permis de pouvoir enseigner, de pouvoir présenter mes résultats lors de congrès internationaux. Ce sont des souvenirs que je vais garder en mémoire, comme ma première course avec vous aux Etats-Unis (à 5h du matin sous la pluie), les stands des commerciaux que nous avons dévalisés (ma valise ne fermait plus), et l'accueil incroyable des partenaires de l'IRN CesMeR lors de notre venue à Shanghai. Merci de votre bienveillance et de votre compréhension. Vous m'avez toujours encouragée à avancer quand les manips ne fonctionnaient pas exactement comme nous le souhaitions.

J'aimerais remercier au même titre ma co-directrice de thèse, Mme Caroline Laroye, pour son accompagnement et ses conseils. Merci d'avoir toujours pris le temps de savoir comment j'allais dans les périodes difficiles de rédaction et de discuter de mon ressenti. Je me souviendrais de ces initiatives pleines de bienveillance.

J'aimerais aussi remercier Mme Natalia De Isla. Merci de m'avoir laissé ma chance lors de mon stage de Master 1 que vous avez encadré. C'est notamment grâce à vous que j'ai pu continuer sur cette voie et je vous en suis très reconnaissante. Merci pour vos conseils, votre soutien, votre bienveillance et vos sourires au quotidien. C'est un vrai plaisir de travailler avec des gens comme vous.

J'aimerais également remercier tous les membres de l'équipe 6 (CImIND) passionnés par leur travail, avec une volonté de transmettre leurs savoirs. Un petit aparté pour remercier David Moulin qui a œuvré à la mise en place de sorties « team building » avec des expériences cocasses comme le Kayak !!! Merci aussi à Pascal Reboul, toujours partant pour des conseils constructifs notamment sur les statistiques et surtout pour sa bonne humeur et son humour dont j'ai souvent fait les frais. Merci aussi à Mme Danièle Bensoussan pour son implication dans mon article de thèse et pour sa bienveillance.

J'aimerais aussi remercier le directeur du laboratoire M. Bruno Charpentier, la co-directrice Mme. Marie-Thérèse Rubio et M. Jean-Yves Jouzeau pour m'avoir permis d'effectuer ma thèse au sein de ce laboratoire de recherche mais aussi pour leur implication dans l'unité.

J'en profite pour remercier les membres du conseil de l'Ecole Doctorale BioSE et tout particulièrement sa directrice, Mme Sophie Rahuel-Clermont ; en effet, j'ai pu apprendre tellement de choses au cours de mon mandat de représentante des doctorants. Cette expérience a été très enrichissante.

Je tiens à remercier aussi mes membres de CSI, Mme Juliette Peltzer et M. Antoine Kimmoun pour leur suivi au cours de ces 3 années de thèse, pour leurs conseils toujours constructifs et leurs encouragements sincères.

J'aimerais également remercier les collaborateurs avec qui j'ai pu travailler. Tout d'abord merci à Isabelle Behm-Ansmant pour son enthousiasme, son travail toujours ultra rapide et des explications soigneusement préparées. Merci pour ta bonne humeur, tes nombreux conseils bienveillants lors de la soumission de mon article. Ce fut un plaisir de travailler avec toi.

Merci à Jessica Schiavi et Kévin Audoux qui m'ont ouvert les portes des exosomes. Merci pour votre réactivité et votre disponibilité. Ce fut un plaisir de travailler avec vous et de partager le congrès à Shanghai. Kévin, merci pour ta réactivité à mes demandes parfois pressées avec un retour toujours d'excellente qualité et merci de ne pas avoir jugé ma façon de tenir des baguettes au congrès !

Merci également à Yingping Li pour sa collaboration au sein de mon projet LUE, sa douceur et sa gentillesse.

Merci aussi à Nathalie Rouss-Freiss et Charles Louis pour leur implication dans notre projet. Merci pour votre travail, nos discussions toujours intéressantes et votre enthousiasme contagieux.

Merci aussi aux personnes avec qui j'ai pu discuter de science ou d'autres choses au quotidien et plus précisément Nasser, Alizée, Preeti (merci de m'avoir fait progresser en anglais sans jugement et merci pour ton sourire, ta gentillesse), Marie, Cristina, Dai, Thomas, Paul, Anthony…

Merci à la team RU : Allan (oups on ne parlera pas de la bagarre d'eau dans le bureau), Valentine, Romain Perouf, Nathan. Nos repas du midi resteront une sacrée découverte. Valentine, merci pour tes nombreux conseils dès mon Master 2 et ton écoute sans faille. Romain P, merci de m'avoir fait rire avec tes nombreuses bêtises. Merci de m'avoir appris à tirer au Nerf même si ma vision de la cible n'est pas toujours parfaite. Je retiendrai ta phrase : « le stage de Master 2 est un sprint alors que la thèse est un marathon ». Nathan, merci d'avoir été là dans des périodes un peu compliquées, ton soutien m'a aidée, merci aussi d'avoir fait de moi une experte du WB.

Merci aux gens des bureaux d'à côté (un peu moins cool que nous, je plaisante bien sûr). Merci Alexandra et JA pour nos discussions voyages et certains points où nous étions raccord. Merci Mélanie, notre organisatrice de barbecue, notre conseillère et notre confidente.

Et le meilleur, ou pas, pour la fin : Merci à mes amies/amis du labo d'avoir toujours été là pour moi (non je ne vais pas pleurer), on en aura vécu des bons moments.

Merci Laura de m'avoir accueillie comme tu l'as fait à mon arrivée, d'avoir organisé tellement d'évènements dont on se souviendra tous. Merci de m'avoir réconfortée, écoutée pleurer, de m'avoir remotivée et de m'avoir reboostée, ça m'a beaucoup aidée. Merci d'avoir soulagé mes trapèzes lors de la rédaction. Tu mérites ta place n'en doute pas (PS : ne m'oublie pas sur la liste des invités au mariage).

Merci Jess d'être notre petit rayon de soleil, d'avoir la main sur le cœur et de nous gâter autant par ta générosité. Tu fais beaucoup pour nous tous alors un grand merci.

Merci Romain H pour ton acharnement sur ma personne que j'espère t'avoir rendu un peu ! Merci pour tes pauses un peu trop fréquentes à mon goût, surtout quand tu t'installes en face de moi pour parler dans ta barbe. Merci aussi pour les discussions très « professionnelles » que l'on a eues.

J'en profite pour remercier ton chef beaucoup plus sympa que toi. Hervé, merci de m'avoir fait découvrir de nombreuses activités sportives (padel, golf) dans lesquelles j'excelle maintenant. Merci pour tes nombreuses invitations barbecue, foot et tes succulents œufs au lait dégustés devant les matchs du PSG, parfois difficiles à digérer. J'espère qu'en sortant au bar avec nous tu t'es senti un peu plus jeune.

Merci aussi à mes voisines de bureau (promis Loris je ne te compte pas dedans). Merci Cindy pour toutes nos discussions que l'on ne peut avoir qu'entre nous, merci pour ta folie, tes blagues parfois lourdes mais souvent drôles. Je suis tellement contente qu'on ait pu se voir à Miami, ce seront des souvenirs gravés, surtout l'expérience du short mouillé (qui m'a valu beaucoup de moqueries).

Merci Sarah pour ta douceur, ta gentillesse si l'on peut utiliser ce terme et ton écoute, prends confiance, tu le mérites et promis on continuera à bruncher !!! Merci Loris (oui j'ai menti) d'avoir supporté mon acharnement et mes blagues répétitives à ton sujet mais en même temps il faut bien te faire parler un peu ! Pense toujours à ranger ton bureau et pas la peine de prendre des régimes de bananes pour les laisser pourrir sur ton bureau. Promis j'arrête.

Merci Lucile, pour tout ce que tu as fait pour moi, merci d'avoir été là si souvent quand j'en avais besoin (tu m'as énormément fait progresser sur tu sais quoi avec tes encouragements). Merci de m'avoir remise au sport en tant que coach personnel de tennis (uniquement terre battue pour moi dans la bulle dont l'humidité ne te plaisait pas trop) et de m'avoir fait aimer la lecture (qui l'eût cru). Merci d'être toujours à mon écoute, je suis trop contente de t'avoir rencontrée.

Merci Elodie, ça a tellement été dur quand tu es partie de la province pour retourner dans ton Paris mais on se voit toujours beaucoup (oui car tu adores Nancy, reconnais-le !) et ça me fait tellement plaisir. Merci d'avoir toujours pris bien soin de nous, culinairement parlant bien sûr et par toutes tes petites ou grosses attentions. J'ai même appris à aimer ta gênance légendaire, c'est pour dire et surtout tes photos portraits à ton avantage. Merci Merci Merci à mon binôme de labo et mon amie surtout, tu es incroyable.

Merci Damien d'avoir été aussi patient avec moi qui n'ai aucune patience (tu vois je sais reconnaître l'un de mes seuls défauts) et de m'avoir supportée. Merci de m'avoir accompagnée durant cette 3ème année. Ton soutien et ton écoute m'ont beaucoup aidée. Tu m'as permis de progresser et je voudrais te remercier pour cela. Merci d'être là quand je n'arrive pas à gérer l'à-côté du travail. Cindy tu avais bien vu.

Bon le plus important pour la fin… merci à ma famille d'être toujours là pour moi. Sans votre soutien rien n'aurait été possible. Vous avez toujours cru en moi et ces encouragements m'ont permis de rester déterminée. Merci d'avoir été là dans les différentes périodes de ma thèse, je vous en suis tellement reconnaissante (bon ça y est je pleure, comme d'habitude quoi !). Merci à ma maman pour la relecture (tu es aussi un peu une experte en CSM maintenant), merci à mon papa mon coach motivation, merci à ma sœur pour ses encouragements constants et ses conseils. Bref vous savez que je vous aime fort.

Merci aussi à Poupi mon chat (qui est en train de marcher sur l'ordinateur en ce moment même) dont le sommeil lors de mes longues journées de rédaction (oui il supporte très bien la charge mentale) m'a permis de me concentrer.

Enfin un petit merci à moi quand même d'avoir avancé malgré les difficultés et d'être resté déterminée à réussir ce doctorat ! Et ne m'oubliez pas surtout hein promis.

Introduction

I. Les Cellules Souches

Les cellules souches (CS) se définissent comme des cellules indifférenciées capables d'auto-renouvellement, de prolifération et de différentiation. En effet, les cellules souches participent par leur division symétrique à leur auto-renouvellement et par division asymétrique à leur différenciation en plusieurs types cellulaires peuplant les différents tissus de l'organisme. Les capacités de potentialité des cellules souches vont varier au cours du temps, si leur capacité de différenciation est élevée au cours du développement embryonnaire afin de générer l'ensemble des organes fonctionnels, elle diminue par la suite afin de permettre un renouvellement tissulaire[1]. Parmi les cellules souches, nous pouvons citer les CS totipotentes, comme la cellule zygote issue de la fécondation d'un ovule par un spermatozoïde. Ces CS possèdent la capacité maximale de potentialité en étant capables de générer l'entièreté des tissus d'un organisme (plus de 250 types cellulaires différents ainsi que les annexes extra-embryonnaires nécessaires au développement du fœtus. Les cellules pluripotentes comme les Cellules Souches Embryonnaires (CSE) sont, elles, capables de générer tous les types cellulaires à l'exception des annexes extra-embryonnaires telles que l'amnios, l'allantoïde, la vésicule vitelline et le placenta. Les cellules souches multipotentes telles que les Cellules Souches Hématopoïétiques (CSH), les Cellules Souches Nerveuses (CSN) et les Cellules Souches Mésenchymateuses (CSM) vont générer les cellules issues d'un même feuillet embryonnaire. Ainsi, les CSH vont se différencier en cellules myéloïdes ou lymphoïdes provenant du mésoderme, les CSN vont se différencier en neurones ou en cellules accessoires (astrocytes, oligodendrocytes) provenant du feuillet neuro-ectodermique et les CSM vont être capables de se différencier en cellules issues du feuillet mésodermique comme les adipocytes, les chondrocytes ou encore les ostéoblastes. Enfin, les cellules souches unipotentes ont un potentiel de différenciation plus restreint et ne vont générer qu'un type cellulaire. Par exemple, les cellules souches épidermiques ne produisent que des kératinocytes[2]. Selon leur caractère souche, les cellules peuvent être regroupées en trois catégories : (i) les Cellules Souches Adultes (CSA) qui sont multipotentes ou unipotentes, (ii) les Cellules Souches Embryonnaires (CSE), provenant de la masse interne du blastocyte, qui peuvent être totipotentes ou pluripotentes et (iii) les Cellules Souches Fœtales (CSF). Ces dernières sont considérées comme un état intermédiaire entre les CSE et les CSA parmi lesquelles on peut différencier les cellules somatiques fœtales qui se différencieront en cellules somatiques et les cellules souches germinales qui généreront les cellules de la lignée germinale (Figure 1).

Enfin une catégorie est à distinguer des autres, il s'agit des cellules souches pluripotentes induites (IPS) qui sont des cellules génétiquement reprogrammées à partir de cellules somatiques adultes différenciées afin de les rendre pluripotentes au même titre que des CSE (Figure 1). Pour cela une réexpression par transduction rétrovirale de quatre facteurs de transcription à savoir : Oct3/4, Sox2 ainsi que les oncogènes Klf4 et c-Myc est nécessaire[3]. La technique de mise au point de ces IPS par Shinya Yamanaka a fait l'objet d'un prix Nobel de médecine en 2012.

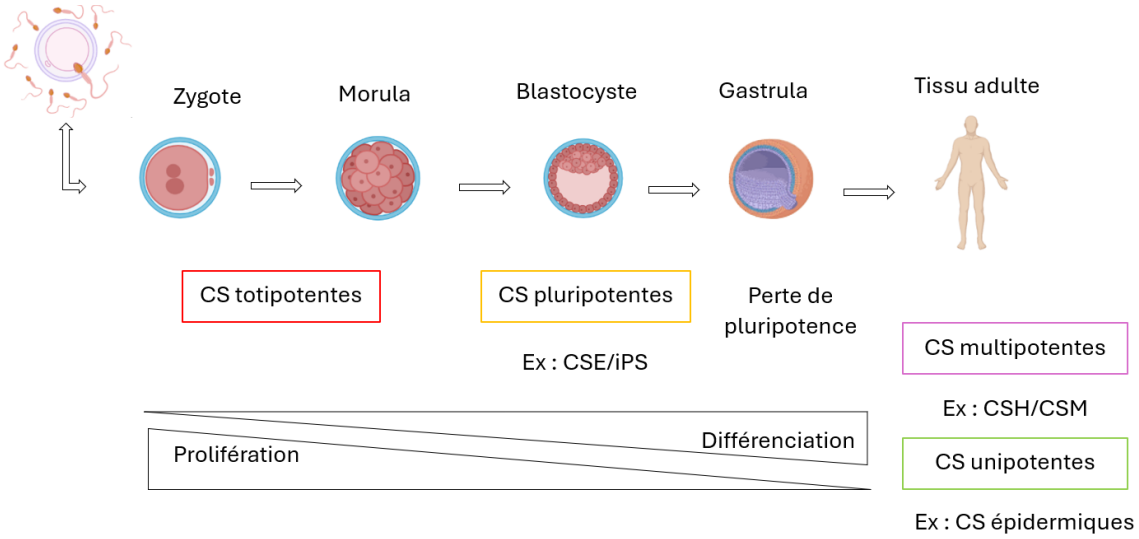


Figure 1 : Schéma illustrant les différents types de cellules souches au cours du développement embryonnaire ([1,2]).

II. Les Cellules Souches/Stromales Mésenchymateuses (CSM)

1) Définition des CSM

Les CSM se définissent comme des cellules souches multipotentes capables d'auto-renouvellement et de différentiation en cellules d'origines mésodermiques. Les CSM ont une origine mésodermique et proviennent plus précisément du mésenchyme. Initialement Alexander Friedenstein dans les années 1960-1970 a décrit pour la première fois chez la souris des progéniteurs mésenchymateux dans la moelle osseuse (MO) comme une population d'aspect fibroblastique capable de prolifération, de différenciation ostéoblastique et de soutien à l'hématopoïèse. Ces progéniteurs mésenchymateux furent nommés unités formant des colonies fibroblastiques (CFU-F Colony Forming Unit-Fibroblasts).

C'est seulement en 1991 que Caplan *et* al. utilisent le terme « Cellules Souches Mésenchymateuses » pour les décrire[4,5] et mettent en évidence l'intérêt thérapeutique des CSM de moelle osseuse en reconstruction osseuse grâce à leur capacité de différenciation cellulaire[6]. Si initialement le terme « cellule souche » a été utilisé, depuis 2005, l'ISCT recommande le terme « cellule stromale mésenchymateuse multipotente » plutôt que « cellules souche mésenchymateuse »[7]. Ce terme serait plus adapté à leur présence stromale dans l'organisme et à leurs nombreuses propriétés autres que la simple capacité de prolifération et de différenciation définissant les cellules souches.

2) Localisation des CSM au sein de l'organisme

Les CSM ont une présence ubiquitaire dans l'organisme et résident dans des niches (Figure 2). L'environnement de ces niches est propice à leur auto-renouvellement, à leur quiescence mais aussi à leur différenciation grâce aux nombreux facteurs intrinsèques qui s'y trouvent. La niche hématopoïétique au sein de la moelle osseuse, où les CSM ont été mises en évidence, est la mieux décrite. Il existe en réalité deux niches hématopoïétiques, la première dite endostéale et l'autre nommée niche périvasculaire. Au sein de la niche endostéale, les CSM vont participer à la différenciation des ostéoblastes, des fibroblastes ainsi que des adipocytes alors qu'au sein de la niche périvasculaire, les CSM sont comparables à des péricytes et peuvent interagir avec les CSH qu'elles activent[8]. Au sein de cette niche, l'environnement hypoxique va être favorable au maintien des CSM dans un stade indifférencié. En effet, il a été montré que l'expression du gène Oct4 et que l'activité de la télomérase étaient augmentées en condition hypoxique[9,10]. Outre la niche hématopoïétique, les CSM peuvent être présentes dans d'autres tissus adultes tels que le tissu adipeux (TA), la pulpe dentaire, le sang menstruel, le sang périphérique, le follicule pileux, la membrane synoviale, le muscle, le foie, le cœur ou encore les poumons[11].

Ces cellules peuvent aussi être présentes dans les annexes extra-embryonnaires comme le placenta, le sang de cordon ombilical, le cordon ombilical (CO) ou encore la gelée de Wharton (GW). Si les CSM de la moelle osseuse sont encore majoritairement utilisées en essais cliniques, elles sont suivies de près par les CSM de cordons ombilicaux et celles du tissu adipeux[12,13].

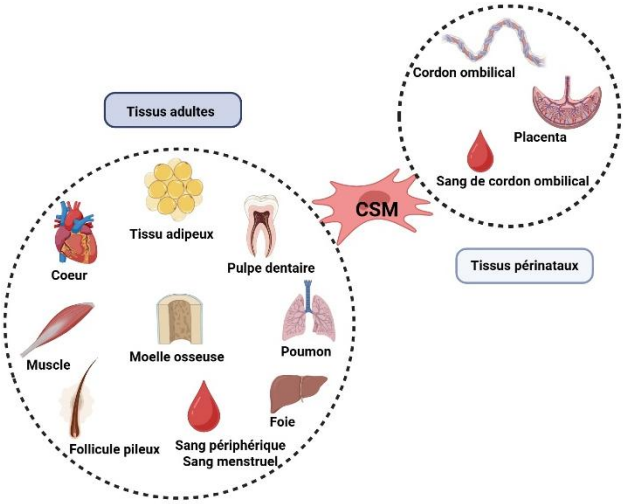


Figure 2 : Schéma de la localisation des CSM au sein de tissus adultes ou de tissus extra-embryonnaires ([11,12,13]).

III. Propriétés des CSM

Les CSM présentent de nombreuses propriétés telles que leur capacité de différenciation et de réparation tissulaire, leur capacité d'adressage tissulaire ciblé, leur capacité de soutien envers la niche hématopoïétique et leur capacité immunomodulatrice. Toutes ces fonctions en font une cible de choix en recherche avec de nombreux essais cliniques couvrant un large éventail de pathologies.

1) Capacités de soutien envers la niche hématopoïétique

La niche hématopoïétique se définit comme un environnement composé de nombreux types cellulaires : des cellules stromales (CSM, ostéoblastes, cellules endothéliales), des cellules immunitaires (macrophages, lymphocytes) et des cellules hématopoïétiques (CSH, progéniteurs hématopoïétiques). L'ensemble de ces cellules sécrète des molécules de signalisation, des facteurs de croissance, des cytokines, des chimiokines participant à la complexité du microenvironnement. Au sein de la niche, deux types de populations de CSM jouent un rôle complémentaire. Les CSM nestine-positives, participent au maintien de la quiescence des CSH et à leur rétention *via* la sécrétion de facteurs tels que CXCL12 et SCF (Stem Cell Factor). Les CSM leptine récepteur-positives vont, quant à elle, agir comme un soutien à l'hématopoïèse contribuant au maintien des CSH au sein de la niche et à la formation osseuse ainsi qu'à l'adipogénèse[14]. Au sein de la niche hématopoïétique, les CSM expriment des gènes de maintenance des CSH leur permettant *via*, une expression de la nestine, d'interagir physiquement avec les CSH environnantes[15].

Les CSM agissent aussi comme un soutien des CSH et des cellules progénitrices notamment par la sécrétion de protéines spécifiques constituant la Matrice Extra-Cellulaire (MEC) et des molécules d'adhérence conduisant à la régulation de leur prolifération, de leur différenciation, du maintien de leur quiescence, de leur rétention et de leur adressage tissulaire ciblé. L'ensemble de ces régulations va permettre une hématopoïèse efficace[15]. Au sein de cette niche, l'homéostasie est un processus permettant d'éviter une transformation maligne de certaines cellules. Cette homéostasie équivaut à une balance entre auto-renouvellement et différenciation, et entre quiescence et prolifération. Au sein de cette balance, les CSM jouent un rôle non négligeable[16]. Une étude a notamment expliqué le rôle des CSM dans l'hématopoïèse humaine montrant qu'après quatre à dix semaines post-transplantation de CSM humaines en intramédullaire, dans un modèle murin immunodéficient (NOD/SCID), ces cellules s'intégraient au sein de la moelle osseuse permettant ainsi une hématopoïèse fonctionnelle[262].

2) Capacités de différenciation et de réparation tissulaire

Les CSM sont capables de se différencier *a minima* en trois sous types cellulaires issus du mésoderme, à savoir, les adipocytes constituant le tissu adipeux, les chondrocytes constituant le cartilage et les ostéoblastes constituant le tissu osseux. Cependant les CSM possèdent une capacité de différenciation plus variée et peuvent, *in vitro*, former des cellules hépatiques, des cellules rénales, des cellules cardiaques ou encore des cellules neuronales[18].

Cette capacité de différenciation confère aux CSM un intérêt en médecine régénérative grâce à leur potentiel régénératif envers les tissus endommagés mais aussi à leur capacité d'angiogenèse médiée par la sécrétion de VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor). Ce potentiel de réparation a été démontré dans des modèles animaux ainsi que dans des essais cliniques visant à soigner des pathologies dégénératives. De plus, dans un contexte de cicatrisation, l'injection de CSM a permis de diminuer l'infiltration de cellules inflammatoires sur le site de blessures, de restaurer l'épithélium cutané avec une augmentation de la formation de phanères comme des follicules pileux, de régénérer les faisceaux de collagène conduisant à une amélioration de la régénération dermique et enfin de promouvoir l'angiogenèse[19].

Dans le traitement de l'endométriose, les CSM issues de cordons ombilicaux (CO) permettaient de restaurer l'épaisseur de l'endomètre, en augmentant le nombre de cellules endométriales, dans un modèle murin. De plus, l'injection de CSM augmentait le niveau d'ARNm VEGF endométrial conduisant à la formation de nouveaux vaisseaux. L'angiogénèse est un processus participant à la régénération endométriale permettant un apport en nutrition et en oxygène, essentiel à la génération de nouvelles cellules.

Ce processus étant principalement médié par le facteur VEGF cela souligne l'importante des CSM et de leurs sécrétions dans le processus de régénération[20].

Cependant plusieurs études ont souligné une dépendance des capacités régénératives des CSM en fonction de leur source de prélèvement. Cela pourrait s'expliquer par une composition cellulaire et moléculaire du microenvironnement variant d'un tissu à l'autre, ce qui soulèverait la question suivante : le rôle des CSM selon la physiologie ou la pathologie est-il tissu dépendant ?[21].

3) Capacités d'adressage tissulaire ciblé

Le terme « homing », défini par Lapidot *et* al. en 2005 dans des CSH pourrait se traduire par « un adressage ciblé » des cellules vers un tissu. Cet adressage tissulaire ciblé est un processus à plusieurs étapes englobant la migration, l'adhérence *via* les intégrines et la rétention fonctionnelle des cellules dans un tissu[22]. La notion d'adressage ciblé englobe aussi la capacité des CSM à effectuer une transmigration du réseau vasculaire vers le tissu[23].

Pour pouvoir effectuer leurs actions, il est important que les CSM migrent vers un tissu d'intérêt et s'y incorporent. Ainsi, les CSM endogènes peuvent être mobilisées de leur niche, comme la moelle osseuse, vers la circulation sanguine puis vers le tissu endommagé permettant une réparation tissulaire ou la modulation de l'inflammation, tant dans des conditions physiologiques que pathologiques (tumeurs, ostéoporose ou encore brûlures)[24,25].

Les cellules des tissus endommagés ou inflammés vont sécréter un ensemble de facteurs chimioattractants mobilisant, par chimiotactisme, les CSM. Parmi les molécules chimioattractantes, les chimiokines au fort pouvoir attractant, vont être capables de se fixer à leurs récepteurs pour induire une migration[26, 27].

Les chimiokines correspondent à une classe de petites cytokines permettant la migration cellulaire durant le développement embryonnaire, l'inflammation ou le maintien de l'homéostasie cellulaire. Ces chimiokines sont sécrétées par les cellules immunitaires, les cellules endothéliales ainsi que les CSM.

Il existe quatre familles de chimiokines classifiées en fonction de la position de leurs deux premières cystéines dans la position N-terminale de la chaîne d'acides aminés de la protéine :

- les chimiokines CC qui possèdent deux cystéines accolées dans leur partie N-terminale.

- les chimiokines CXC qui possèdent deux cystéines séparées par un acide aminé d'autre nature nommé X.

- les chimiokines XC composées uniquement d'une seule cystéine dans leur partie N-terminale.

- les chimiokines CX3C composées de deux cystéines séparées par trois autres acides aminés, comprenant qu'un seul membre CX3CL1 aussi appelé Fractalkine[17].

A l'instar des chimiokines décrites ci-dessus, il existe quatre sous familles de récepteurs, les récepteurs CCR fixant les chimiokines de type CC, les récepteurs XCR fixant les chimiokines XC et les récepteurs CXCR fixant les chimiokines de type CXC[28].

Il est à noter que la spécificité entre un récepteur et sa chimiokine n'est pas exclusive, en effet un ligand peut se fixer à plusieurs récepteurs et inversement un récepteur peut fixer plusieurs chimiokines, bien que la constance d'affinité puisse varier.

Concernant les CSM, plusieurs récepteurs aux chimiokines ont été décrits tels que CCR5, CXCR1/CXCR2, CXCR3 mais les plus exprimés sont CXCR4 et CXCR7 (Tableau 1). CXCR4 et CXCR7 sont respectivement des récepteurs de CXCL12 aussi appelée SDF-1. CXCR4 est le récepteur spécifique à CXCL12 alors que CXCR7 est considéré comme un récepteur atypique.

Si l'axe CXCR4-CXCL12 est bien décrit dans l'adressage tissulaire ciblé des CSH[30], dans le trafic leucocytaire[31] ou encore dans le processus de métastases tumorales[32], il joue également un rôle dans l'adressage tissulaire ciblé des CSM.

Des études ont démontré qu'une augmentation de l'expression de CXCR4 à la surface des CSM(MO) permettait une meilleure colonisation des CSM vers l'infarctus du myocarde dans un modèle de rat, conduisant à une amélioration des performances cardiaques, une restauration de l'épaisseur de la paroi ventriculaire antérieure et de l'amplitude de contraction ainsi qu'une restauration de la pression ventriculaire et ce comparé aux animaux traités avec une solution saline ou des CSM contrôles[273]. Lorsque des CSM(TA) étaient transduites afin de surexprimer CXCR4 et l'IL-10, leur migration devenait plus efficace que celle des CSM non transduites. De plus, après injection des CSM, surexprimant CXCR4/IL-10, dans des modèles murins humanisés de GvHD (Graft versus Host Disease), les auteurs ont montré une amélioration du poids des souris ainsi que du score clinique. Au niveau histopathologique, les souris traitées avec les CSM surexprimant CXCR4/IL-10 présentaient une diminution de l'infiltration leucocytaire (LT CD3+ et LT CD8+) au niveau du parenchyme pulmonaire et hépatique réduisant ainsi l'inflammation tissulaire[33]. Cette étude témoignant du lien étroit entre migration et efficacité des CSM soulignait que l'amélioration de la migration pouvait conduire à une amélioration clinique.

D'autres études utilisant un vecteur lentiviral permettant une surexpression de CXCR4 au niveau de CSM(TA), ont montré un adressage tissulaire ciblé, deux fois plus important en comparaison à la condition contrôle. Dans cette étude, l'utilisation d'un inhibiteur de CXCR4 a permis de confirmer le rôle de l'axe SDF-1/CXCR4 dans les capacités migratoires des CSM[34]. Concernant la mécanistique découlant de l'activation du récepteur CXCR4, brièvement, la fixation du ligand à son récepteur entraîne la dissociation des sous unités α, β, γ de la protéine G conjointe au récepteur conduisant à l'activation des voies de signalisation dépendantes de la protéine PLC, PIK3 ou Ras[29] participant à l'adressage tissulaire ciblé. Une voie de recyclage du récepteur CXCR4, dépendante de la protéine β-arrestine permet un contrôle de cette voie. Concernant le récepteur CXCR7, une activation préférentielle de la voie dépendante de la β-arrestine est à souligner (Figure 3).

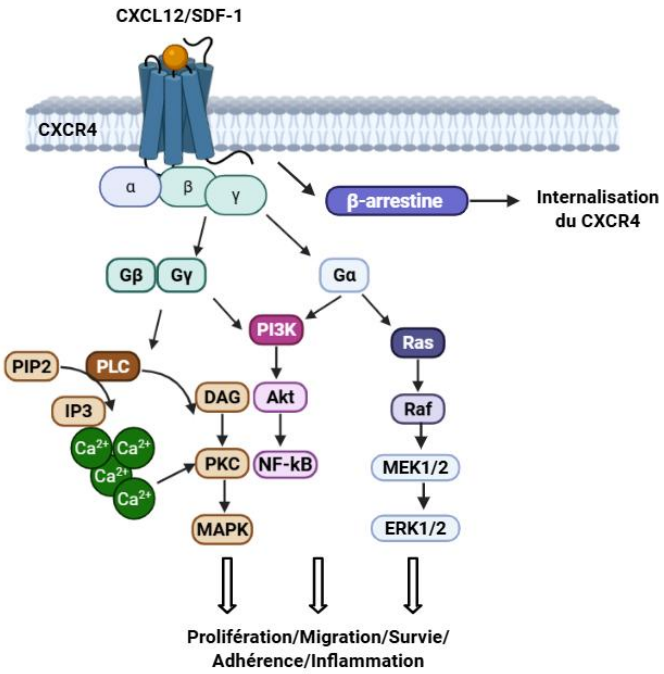


Figure 3 : Voies de signalisation issues de l'axe CXCL12/SDF-1-CXCR4 ([29]).
L'interaction de SDF-1 sur le récepteur CXCR4, à 7 domaines transmembranaires, couplé aux protéines G, active plusieurs voies de signalisation au sein des cellules, comme les CSM. Cet axe régule de nombreux processus physiologiques comme la prolifération, la migration, la survie…

Tableau 1 : Description des principaux récepteurs impliqués dans le chimiotactisme des CSM.

Récepteurs	Ligands principaux	Exemples de rôles fonctionnels	Niveau d'expression	Références bibliographiques
CXCR4/CXCR7	SDF-1/CXCL12	-Migration des CSM(MO) vers les tissus lésés (ex : peau avec une re-épithélialisation et une néovascularisation) - adressage tissulaire ciblé	++++	35,37
CCR10	CCL27	Migration des CSM(MO) vers les tissus lésés comme la peau	++	39
CCR7	CCL19/CCL21	Migration des CSM(MO) vers les tissus lésés comme la peau ou au niveau des organes lymphoïdes	++	283
CCR5	CCL5	Recrutement des CSM(MO) au niveau de la tumeur	++	41
CXCR3	CXCL9/CXCL10/CXCL11	Adressage tissulaire ciblé des CSM au niveau du rein et amélioration des symptômes lupiques	++	43

D'autres molécules chimioattractantes ont été décrites au niveau des CSM, on peut citer par exemple le TGF-β ou HGF. Le TGF-β, en interagissant avec ces récepteurs de type I et de type II, déclenche une voie canonique dépendante des SMADs2/3 et des voies non canoniques dépendantes des protéines ERK, Akt et de p38 permettant la migration des CSM[24].

Deux types d'adressage tissulaire ciblé peuvent se mettre en place en fonction du lieu d'injection des CSM :

- l'adressage tissulaire ciblé non-systémique dans le cas d'une injection locale dans le tissu cible où les cellules vont être guidées jusqu'au site lésé et/ou inflammé par chimiotactisme

- l'adressage tissulaire ciblé dit systémique, après injection des cellules par voie intra-veineuse, où la migration vers le tissu cible se fera suite à l'extravasation des cellules, du compartiment sanguin. A l'instar des leucocytes, ce mécanisme peut être découpé en cinq étapes : l'ancrage et roulement, l'activation, l'arrêt, la transmigration ou diapédèse et la migration[36].

Si le processus d'adressage tissulaire ciblé est décrit comme nécessaire à l'efficacité des CSM endogènes, il a été montré, qu'une heure après l'injection en intra-veineuse des CSM, elles se retrouvaient trappées dans les alvéoles pulmonaires[42]. Une étude visant à suivre la distribution des CSM(CO) après injection chez des souris BALB/c grâce à la méthode TEP (Tomographie par Emission de Positrons) a montré leur présence majoritaire dans les poumons, suivie par la rate et les reins. Lorsque les cellules étaient cultivées en 3D, sous forme de sphéroïdes pendant 48h ou 72h, leur taille diminuait, limitant en retour leur capture dans les poumons[47]. Les raisons de ce piégeage étaient, d'une part mécanique, puisque les CSM cultivées avaient une taille plus élevée que leurs homologues endogènes. Ainsi, elles perdaient en capacité de déformabilité, et ne parvenaient plus à passer les capillaires pulmonaires, conduisant à leur blocage. Une autre raison était d'ordre physiologique de par l'expression des intégrines (β1, α5, αVβ3) à la surface des CSM voyant leurs expressions augmenter lors de l'expansion des CSM en monocouche. Les intégrines exprimées à la surface des CSM peuvent interagir avec la fibronectine et la vitronectine exprimées à la surface des cellules endothéliales vasculaires, dans les poumons, conduisant le plus souvent à la capture des CSM. Les auteurs ont montré que (i) la culture en 3D des CSM ou (ii) le blocage fonctionnel des intégrines par des anticorps, diminuaient le taux d'intégrines exprimées par les CSM conduisant à une augmentation du taux de CSM circulant dans le sang et ainsi un meilleur adressage tissulaire ciblé au niveau du myocarde ischémique des souris BALB/c[49].

On estime à moins de 1% le taux de CSM retrouvées dans les tissus cibles 24h après injection. Après injection de 2×10^6 CSM humaines dans un modèle murin d'infarctus cardiaque, les CSM formaient très rapidement une embolie pulmonaire. Quarante-huit heures seulement après leur injection, 0,04% des cellules initialement injectées étaient retrouvées dans les tissus étudiés. Les autres ayant été dégradées par les macrophages pulmonaires pour former des corps apoptotiques. Cependant, dans cette étude, il a été démontré que dans le laps de temps où les CSM étaient intègres, elles sécrétaient des facteurs solubles comme le TSG-6 permettant de réduire l'inflammation, la taille de l'infarctus et d'améliorer la fonction cardiaque des souris[48].

Cela peut poser la question de la modification des CSM afin d'améliorer leurs capacités d'adressage tissulaire ciblé. Par exemple il a été montré, dans un modèle murin, que la modification en surface de CSM par du polyéthylène glycol (PEG), un polymère biocompatible, permettait de diminuer la capture des CSM dans les poumons et favorisait l'adressage tissulaire ciblé vers le foie[50]. Une stimulation biochimique pourrait également avoir un effet bénéfique sur les capacités migratoires des CSM.

Par exemple, certains auteurs ont montré que la stimulation des CSM par du TGFβ1 induisait un adressage tissulaire ciblé des CSM vers l'épithélium sinusoïdal hépatique[51].

Bien que la stimulation puisse être une solution afin d'améliorer la migration des CSM vers un tissu d'intérêt, l'incapacité de ces cellules à rejoindre un tissu cible pose également la question du mode d'administration des CSM pour maximiser leur chance d'atteindre le tissu d'intérêt. En effet, une étude a montré que l'administration de CSM(TA) directement dans le pancréas permettait de diminuer la glycémie chez des souris diabétiques, en augmentant le nombre d'îlots en comparaison à une injection des CSM dans la veine de la queue[52]. D'autres études ont montré que l'injection des CSM par la voie intra-artérielle diminuait le taux de CSM trappées dans les poumons et augmentait le nombre de CSM dans d'autres organes comme le foie[44,45]. Cependant une telle infiltration de CSM dans ces organes augmenterait le risque d'occlusion vasculaire au sein de ces tissus[46].

Le taux de cellules viables au sein du tissu d'intérêt va être une des variables nécessaires à l'efficacité thérapeutique des CSM. Même s'il a été montré un faible taux de survie et de maintien des CSM dans le tissu cible, leur action sécrétoire semble suffire à leur efficacité.

4) Capacités immunomodulatrices

L'une des caractéristiques les plus étudiée des CSM est leur capacité immunomodulatrice qui en fait un outil de choix pour le traitement de pathologies inflammatoires. Les CSM sont capables d'interagir avec des cellules de l'immunité (i) par contact direct, (ii) par une action paracrine *via* la sécrétion de cytokines, de chimiokines et d'exosomes ou encore (iii) par transfert mitochondrial[53].

Grâce à ces différents modes d'action les CSM exercent leurs capacités immunomodulatrices par inhibition de la prolifération et/ou de la différenciation de cellules immunitaires mais aussi par induction de cellules immunorégulatrices comme les LT régulateurs, les LB régulateurs et les cellules dendritiques régulatrices[54].

4.1) Immunomodulation par contact direct

Un premier type d'immunomodulation réside dans le contact direct entre CSM et cellules de l'immunité telles que les lymphocytes T (LT), les lymphocytes B (LB), les Natural Killer (NK), les cellules dendritiques, les macrophages, les monocytes et les neutrophiles (Figure 5).

En effet, les CSM sont en capacité d'interagir avec des sous-populations de LT afin de diminuer leur activation, leur prolifération et leur fonctionnalité ou en induisant des populations régulatrices comme les lymphocytes T régulateurs (Treg). Il a été montré que les CSM(CO) étaient capables d'inhiber l'activation et la différenciation des LT CD4+ en LTh1 et LTh17, fortement inflammatoires, et de promouvoir la maturation des LT régulateurs induit par l'IL-2[55]. De plus, il a été décrit que des CSM amniotiques récupérées suite à une césarienne étaient capables de réduire la prolifération des LT CD3+ et d'augmenter le taux de LT régulateurs. Cette capacité immunomodulatrice s'avérait plus importante suite à un contact direct entre CSM et Cellules Mononucléées du sang périphérique (CMN) en comparaison à un contact indirect par « transwell ». Ces CSM injectées dans un modèle murin de xéno-GvHD diminuaient le pourcentage de LT CD8+ en comparaison au groupe contrôle[56]. Bien que la capacité inhibitrice des CSM puisse être indépendante du contact, elle peut cependant amplifier l'activité sécrétoire des CSM, comme l'a montré la sécrétion de TGF-β par les CSM(TA) plus élevée lors d'un contact direct des CSM avec des CMN activées[57].

L'interaction entre CSM et monocytes a aussi été décrite par l'intermédiaire de certains auteurs ayant démontré que les CSM trappées dans les poumons étaient phagocytées par les monocytes entraînant des changements phénotypiques et fonctionnels au niveau de ces monocytes passant d'un phénotype CD14+/CD16- à un phénotype CD14+/CD16-/CD206+ exprimant PD-L1 et l'IL-10. Ces monocytes cultivés *in vitro* avec des lymphocytes étaient capables d'induire la formation de LT régulateurs Foxp3+[58]. Cela pourrait être comparé à un transfert de l'effet immunomodulateur médié par les CSM vers les monocytes.

Au sein d'une autre étude, des CSM(MO) étaient capables d'inhiber la différenciation des monocytes en cellules dendritiques présentatrices d'antigènes en empêchant leur progression dans le cycle cellulaire, démontré par une accumulation du nombre de monocytes en phase G0 et une diminution de l'expression de la cycline D2[59]. D'autres auteurs se sont intéressés au rôle immunomodulateur des CSM(CO) dans l'inhibition de la différenciation des monocytes en cellules dendritiques. En présence de CSM, les monocytes exprimaient fortement CD14, de faibles niveaux d'expression du marqueur immature CD1a, du marqueur mature CD83, ainsi que des molécules de costimulations CD80 et CD86[60].

Le rôle des CSM sur la prolifération, la différenciation et les fonctions immunitaires des LB a également été montré. L'interaction entre les CSM et les LB peut être dépendante du contact et peut faire intervenir d'autres acteurs. En effet, les CSM(TA) seraient capables d'inhiber la prolifération des LB de manière LT-dépendante.

Elles pourraient également directement cibler la différenciation des LB en diminuant la formation de plasmoblastes précurseurs de plasmocytes sécréteurs d'anticorps, mais aussi en induisant la formation de cellules CD19+CD24^{high}CD38^{high} productrices d'IL-10 aussi appelées lymphocytes B régulateurs[61].

Une autre étude a mis en évidence que les CSM(MO) autologues murines injectées permettaient de diminuer le taux de leucocytes infiltrants dans le foie fibrotique des souris et de diminuer le taux de cytokines/chimiokines pro-inflammatoires (IL-1α, IL-6, IL-17A/CCL2, CCL3, CCL4, CCL5, CXCL10) dans le sérum des souris. De plus, les CSM injectées diminuaient l'infiltration intrahépatique des LB ainsi que leur activation[62].

En réalité, le processus d'activation ou d'inhibition des cellules immunitaires repose sur des interactions moléculaires entre des ligands présents sur la Cellule Présentatrice d'Antigène (CPA) et leurs récepteurs spécifiques exprimés à la surface des cellules immunitaires. Ces interactions visent à limiter la durée et l'intensité de la réponse immunitaire. Il existe à la surface d'une CPA des récepteurs coactivateurs (qui renforcent l'activation de la cellule immunitaire) et des récepteurs coinhibiteurs (qui diminuent l'activation). C'est l'équilibre entre les signaux activateurs et les signaux inhibiteurs qui détermine si une cellule immunitaire peut s'activer.

- **Les points de contrôle inhibiteurs**

Les molécules PD-L1 et PD-L2 sont décrites comme des molécules inhibitrices.

Les CSM humaines issues de placenta ainsi que les CSM(GW) expriment des niveaux élevés à leur surface des protéines PD-L1/PD-L2 capables d'interagir avec les LT pour inhiber leur prolifération *via* un arrêt du cycle cellulaire. L'expression de PD-L1 par les CSM(GW) a, d'ailleurs, été utilisée comme indicateur des capacités immunomodulatrices[63,64].

PD-L1 et PD-L2 sont capables d'interagir avec leurs récepteurs PD-1 et PD-2 présents à la surface de LT et constituent ce que l'on appelle les « check-points » inhibiteurs à l'origine d'une régulation de la prolifération des LT.

Une étude a mis en évidence le rôle de PD-L1 dans les capacités immunomodulatrices des CSM *via* l'utilisation d'un modèle murin NOD de diabète, ayant reçu des anticorps monoclonaux afin de bloquer l'action de PD-L1. Dans ce modèle, une forte infiltration de LT CD3+ et de macrophages au niveau des îlots β entraînait une inflammation.

Lorsque ces mêmes souris recevaient des CSM(TA) humaines, une réduction significative du taux de LT et de macrophages au niveau des îlots pancréatiques avait été observée permettant un effet protecteur et un maintien du taux d'insuline[65].

D'autres molécules exprimées par les CSM jouent un rôle inhibiteur comme la molécule CTLA-4. Les CSM(MO) sont capables d'inhiber la prolifération des lymphocytes par l'intermédiaire de CTLA-4 mettant en avant les capacités immunosuppressives des CSM[66].

- **Les points de contrôle activateurs**

Plusieurs molécules vont permettre, en revanche, d'activer les cellules immunitaires. L'activation des LT va requérir trois signaux permettant leur prolifération et leur différenciation en sous population de LT. Le premier signal réside dans la reconnaissance antigénique par le LT d'une molécule du non soi ou d'une molécule modifiée, par l'interaction entre son TCR (T Cell Receptor) et une molécule du Complexe Majeur d'Histocompatibilité (CMH) exprimée par une CPA professionnelle. Ensuite une interaction entre les molécules de costimulation, exprimées par chaque sous type cellulaire, est nécessaire à leur activation et à la formation de la synapse immunologique, notamment entre les molécules CD80/CD86, exprimées par la CPA, et la molécule CD28 exprimée par le LT ou encore entre la molécule CD40 exprimée par la CPA et la molécule CD40L exprimée par le LT. Durant cette étape une interaction entre molécules inhibitrices peut avoir lieu entre la CPA et le LT (comme évoqué ci-dessus) entraînant un rétrocontrôle négatif. Cette régulation permet de maintenir une homéostasie lymphocytaire T ou alors un échappement de la réponse immunitaire à la tumeur. Enfin l'environnement cytokinique va également jouer un rôle dans l'activation du LT[67].

L'immunostimulation médiée par les molécules de classe II du CMH HLA-DR/DP/DQ et des molécules de costimulation n'est pas effective au sein des CSM en raison d'une absence ou d'une très faible expression de ces facteurs, faisant des CSM une cellule immunoprivilégiée. La faible immunogénicité des CSM s'explique aussi par la faible expression des molécules HLA de classe I (HLA-ABC) du CMH[69,70,71].

Le rôle de la molécule de costimulation CD80 exprimée par les CSM a été mis en évidence dans l'induction de populations régulatrices. Les CSM interagissaient par un mécanisme contact-dépendant avec les LT régulateurs induisant leur expression de FoxP3 et leur fonction immunosuppressive et ce par l'intermédiaire de la molécule CD80. L'inhibition de CD80 à la surface des CSM a confirmé l'implication de cette molécule notamment par une diminution de l'infiltration des LT régulateurs sur le tissu cible de souris allogreffées, impactant leur survie[68].

4.2) Immunomodulation indirecte par action paracrine

Un autre moyen d'immunomodulation décrit au niveau des CSM est lié à leur sécrétome (Figure 5). Comme décrit auparavant, après injection xénogénique chez l'animal ou allogénique chez l'humain, bien que les CSM soient très rapidement dégradées, leur action perdure plusieurs jours grâce à leurs sécrétions.

Le milieu conditionné issu de CSM, mis en contact avec une lignée de macrophages RAW264 .7, stimulés au lipopolysaccharide (LPS), a mis en avant l'importance du sécrétome des CSM sur leur capacité immunomodulatrice. Ce milieu conditionné a permis de supprimer la transcription des ARNm codant pour les cytokines pro-inflammatoires, les chimiokines et leurs récepteurs (IL-1β, IL-6, CCL2, CCL3, CCL4, CCL5, CCR2, CCR5), et ce grâce à l'inhibition de la phosphorylation des MAPK et du facteur de transcription NF-kB[72]. Cette activité paracrine immunomodulatrice fait intervenir de nombreux facteurs solubles comme IDO, PD-L1 soluble, PGE2 et HLA-G soluble, les facteurs de croissances (TGF-β1, HGF, FGF) mais aussi les cytokines anti-inflammatoires comme l'IL-4, l'IL-10 … ; qui vont être décrits ci-dessous.

- **Les glycoprotéines transmembranaires (PD-L)**

Une étude de 2017 a montré, pour la première fois, que les CSM(MO) étaient capables de sécréter des glycoprotéines transmembranaires appartenant à la famille B7 : PD-L1, PD-L2 participant à leur rôle immunomodulateur au niveau des LT et à l'induction d'une tolérance périphérique. Par des expériences de blocage des facteurs solubles PD-L, les auteurs ont montré par des systèmes de coculture en « transwell », que les CSM supprimaient la sécrétion d'IFNγ, de TNFα et d'IL-2 au niveau des LT activés et que le milieu conditionné des CSM entraînait une suppression de la prolifération des LT[73]. Une autre étude a prouvé que des CSM issues de l'amygdale sécrétaient le facteur PD-L1 conduisant à l'inhibition de la différenciation des LTh17. La transplantation de ces CSM dans un modèle murin de psoriasis supprimait les symptômes associés à cette pathologie grâce à l'action de PD-L1 sur les LTh17[74].

- **L'enzyme Indoléamine 2,3-Dioxygénase (IDO)**

D'autres molécules sécrétées par les CSM sont à l'origine de leurs capacités immunomodulatrices, notamment l'enzyme cytosolique IDO.

Cette dernière a la capacité de cataboliser localement le tryptophane, acide aminé essentiel, en N-formyl-kynurénine[75]. Cet acide aminé étant limitant pour les lymphocytes T, sa dégradation induit l'inhibition de leur prolifération ainsi que l'activation des LT effecteurs et des LT régulateurs.

Wang *et al*. se sont intéressés au rôle d'IDO au sein des CSM(CO) *via* son inhibition. Ils ont montré une amélioration de l'inflammation pulmonaire dans un modèle murin d'insuffisance pulmonaire aiguë. Après injection des CSM, le nombre de cellules immunitaires dans le liquide broncho-alvéolaire (LBA) diminuait tout comme l'infiltration de neutrophiles dans le tissu pulmonaire. En revanche, les CSM « Knock-down » pour IDO n'étaient plus en mesure de réduire l'inflammation. D'autres tests sur des modèles murins de péritonite ont montré l'action conjointe d'IDO et de TSG-6 dans la régulation de l'infiltration des neutrophiles et des macrophages sur la zone inflammée. Les auteurs en ont conclu que l'enzyme IDO, *via* ses métabolites, régulait positivement l'expression de TSG-6 en aval[76]. Il a même été montré que l'augmentation de l'enzyme IDO dans des CSM(GW) était l'une des voies majeures utilisée par ces cellules pour inhiber la prolifération des LT[284].

Un autre moyen immunomodulateur provoqué par l'action d'IDO provient de l'induction de populations immunitaires régulatrices. En effet, il a été décrit qu'une augmentation du taux de LT régulateurs (CD25+Foxp3+) était notamment due à une augmentation de l'enzyme IDO1, confirmée par l'utilisation de l'inhibiteur L-1MT[77].

- **La Prostaglandine E2 (PGE2)**

La prostaglandine E2, une des molécules immunomodulatrices la mieux décrite dans la littérature, peut être sécrétée par les CSM afin de limiter l'environnement inflammatoire. Ainsi, il a été démontré, dans un modèle murin d'insuffisance hépatique aiguë, que ce lipide sécrété par des CSM(MO) murines permettait d'inhiber l'inflammation hépatique ainsi que la mort des hépatocytes. PGE2 pourrait également inhiber la protéine TAK1 impliquée dans la voie NF-kB ainsi que l'activation de l'inflammasome NLRP3 au sein des macrophages hépatiques conduisant ainsi à une diminution de la production de cytokines pro-inflammatoires et à la polarisation des macrophages vers un profil anti-inflammatoire M2.

L'importance de PGE2 s'est révélée dans cette étude *via* l'utilisation de CSM surexprimant *COX2* ou sous exprimant *COX2*, l'enzyme catabolisant l'acide arachidonique en PGE2, appuyant le rôle de PGE2 dans les processus de régulation immunitaire[78].

Une autre étude a montré que des CSM(TA) cocultivées avec des macrophages augmentaient leur capacité de phagocytose. De plus les CSM(TA) diminuaient l'expression des molécules de costimulation CD86 et HLA-DR et favorisaient une population de cellules dendritiques matures régulatrices (CD14+/CD1a-) *via* leur sécrétion d'IL-6 et de PGE2[79].

- **La molécule HLA-G**

Une autre molécule indispensable aux capacités immunomodulatrices des CSM et pouvant être sécrétée est la molécule de classe I du CMH non classique à savoir HLA-G.

Cette molécule, initialement découverte dans les trophoblastes, contribue à la tolérance materno-fœtale et est exprimée par les CSM, surtout lorsque celles-ci dérivent de tissus extra-embryonnaires[80]. Bien que son expression reste faible dans les CSM de tissus adultes comme la moelle osseuse, une surexpression génétique de cette molécule au sein de CSM(MO) a permis de diminuer la sensibilité de lyse des cellules NK et de diminuer la prolifération des LT en comparaison aux CSM génétiquement non modifiées, mettant en évidence l'effet immunomodulateur de cette molécule soluble[81].

- **Les cytokines anti-inflammatoires**

Les cytokines anti-inflammatoires sont largement décrites dans le processus immunosuppresseur des CSM. Une étude préclinique sur la transplantation pulmonaire chez des porcs a mis en évidence l'importance de la cytokine anti-inflammatoire IL-10 dans le contrôle de l'inflammation. Pour cela des CSM(CO) humaines ont été génétiquement modifiées afin de surexprimer l'IL-10. Lors d'une perfusion pulmonaire *ex vivo*, les porcs avaient reçu soit une faible dose de $CSM^{IL\text{-}10}$ (20×10^6), soit une forte dose de $CSM^{IL\text{-}10}$ (40×10^6). La sécrétion de l'IL-10 avait ensuite été suivie durant la perfusion pulmonaire et après la transplantation d'un poumon chez le porc receveur, montrant une augmentation du taux d'IL-10, ayant pour conséquence un effet immunomodulateur dose-dépendant. Une faible dose de $CSM^{IL\text{-}10}$ injectées était bénéfique pour diminuer l'apoptose et favoriser l'activation des macrophages alors qu'une injection de $CSM^{IL\text{-}10}$ à forte dose résultait en une activation de l'inflammation et des LT CD8+ [82]. Bien que la sécrétion d'IL-10 par les CSM soit considérée comme un moyen thérapeutique dans cette étude, la dose d'IL-10 dans l'environnement doit être contrôlée. De surcroît, une modification génétique de CSM murines afin d'exprimer constitutivement l'IL-4, a permis de moduler des macrophages murins pro-inflammatoires M1 vers un profil anti-inflammatoire M2 exprimant au niveau protéique l'Arginase 1 et CD206[83].

- **Les facteurs de croissance**

Plusieurs facteurs de croissance se sont révélés comme de puissants facteurs immunomodulateurs au sein des CSM. La sécrétion d'HGF par des CSM(CO) entraînait une suppression de la différenciation des monocytes en cellules dendritiques présentatrices d'antigène au profit d'autres phénotypes cellulaires CD14+CD1a- voyant leur expression des molécules de costimulation, leur sécrétion de facteurs inflammatoires et leur capacité allostimulante diminuer [60].

Le TGF-β a lui aussi montré son rôle en tant que régulateur de l'inflammation au sein des CSM. En effet, la sécrétion de TGF-β par les CSM favorisait une polarisation des macrophages vers un profil M2 conduisant à une réduction du niveau de cytokines pro-inflammatoires et une amélioration des capacités phagocytaires des macrophages. L'action du TGF-β sur la réduction de l'inflammation serait médiée par la voie de signalisation Akt/FoxO1 [84,133].

- **Les Vésicules Extra-cellulaires (VE)**

Un autre moyen pour les CSM d'exercer leurs propriétés immunomodulatrices passe par la sécrétion de vésicules extra-cellulaires (VE). Ces VE se divisent en trois catégories, selon leur taille, leur composition et leur biogénèse :

- les exosomes avec une taille comprise entre 30 et 150nm
- les microvésicules avec une taille comprise entre 100 et 1000nm
- les corps apoptotiques dont la taille varie entre 500 et 1000nm [85].

Les VE se composent pour la majeure partie de lipides, d'acides nucléiques et de protéines. Plus de 194 types de lipides, 4 563 types de protéines et 1 639 types d'ARN messagers ont été rapportés au sein des VE [86]. Cela montre la richesse et la diversité des molécules composant les VE.

Les VE issues de CSM(MO) conservent à leur surface les marqueurs typiques des CSM humaines à savoir CD90, CD44 et CD73 et n'expriment pas les marqueurs hématopoïétiques CD34 et CD45. Ces mêmes VE expriment en surface les deux marqueurs caractéristiques des VE à savoir CD63 et CD81 [87].

Il a été décrit que les VE dérivant des CSM présentaient des capacités immunomodulatrices propres au CSM. Récemment une étude a montré que les VE dérivant de CSM(TA) réduisaient l'expression des molécules de costimulation CD80/CD86 exprimées par les CMN issues de patients asthmatiques et augmentaient le taux de TGF-β et de LT régulateurs mettant en avant l'effet immunomodulateur des VE[88].

Wang *et al*. décrivent également que les VE dérivant des CSM étaient en capacité de rétablir la balance LTh1 (CD4+IFNγ+) /LTh2 (CD4+IL-4+) et de réduire la population CD4+IL-17+ au profit des populations CD4+IL-10+ et CD4+TGF-β+ au sein de CMN issues de patients atteints de syndrome inflammatoire de type rhinite allergique[89].

- **Les microARN (miR)**

Un des composants les plus étudiés au sein des VE dérivant des CSM sont les microARN (miR). Les VE riches en miR anti-inflammatoires seraient capables par ce biais d'exercer leurs propriétés immunomodulatrices. Dans des modèles de sepsis associés ou non à une insuffisance pulmonaire aiguë, il a été montré que les miR étaient capables d'exercer une action thérapeutique[90]. De surcroît le miR146-5p, contenu dans les VE de CSM(CO) humaines, pouvait réguler négativement l'inflammation liée à l'insuffisance pulmonaire en ciblant TRAF6[91]. Le miR 27a-3p, un des miR les plus représentés au sein des VE, permettait d'améliorer l'insuffisance pulmonaire aiguë par transfert vers les macrophages alvéolaires. Enfin, le miR 27a-3p *via* NF-kB1 favoriserait la polarisation des macrophages vers un profil anti-inflammatoire M2[92].

Par ailleurs, il a été mis en évidence que le miR-181a, très présent dans les VE des CSM permettait de reprogrammer les macrophages. En effet, il a été observé que les VE étaient capables de diminuer le taux de TNFα et de l'IL-8 sécrétés par les macrophages stimulés au LPS ou avec le plasma de patients atteints d'un syndrome de détresse respiratoire aigüe (SDRA) grâce au miR-181a issu des VE. Le miR-181a entraînait une diminution de la protéine PTEN et une phosphorylation du facteur de transcription STAT5 conduisant à une augmentation de l'expression de SOCS1, une protéine clé impliquée dans la polarisation phénotypique des macrophages vers un profil M2[94].

Une autre équipe a constaté que l'injection d'exosomes issus de CSM murines prétraitées avec de l'IL-1β, dans un modèle murin de sepsis induit par ligature et ponction du caecum (CLP), permettait d'améliorer la survie des souris septiques par l'intermédiaire du miR-21 favorisant la polarisation des macrophages vers un profil M2[93].

4.3) Immunomodulation par transfert mitochondrial

Une partie des propriétés immunomodulatrices des CSM est issue de leur capacité à transférer des mitochondries vers des populations immunitaires (Figure 5).

La première étude à avoir décrit ce phénomène a montré, par des cocultures entre des CSM et une lignée de cellules cancéreuses (A549 p0) défectueuses ou délétées en ADN mitochondrial, que certaines cellules AR49 p0 retrouvaient une fonctionnalité mitochondriale. Par microscopie, les auteurs ont observé au niveau des CSM des prolongements cytoplasmiques en direction de cellules cibles à travers lesquelles des mitochondries circulaient[95]. En réalité ces prolongements cytoplasmiques sont des structures ressemblant à un nanotube de transfert aussi appelé « tunneling-nanotube » faisant un pont entre deux cellules[96].

Si initialement le don de mitochondries à des cellules cibles permettait de soutenir des cellules endommagées, d'améliorer la respiration aérobique, ou d'inhiber l'apoptose, d'autres fonctionnalités ont été découvertes notamment au niveau des cellules immunitaires. Une des études princeps a mis en lumière que le transfert de mitochondries de CSM(MO) par des nanotubes à des macrophages améliorait leur capacité de phagocytose. Un modèle murin de SDRA, infecté par *Escherichia.Coli* et ayant reçu une injection de CSM marquées au Mitotracker a montré que les mitochondries des CSM se retrouvaient en majorité dans les macrophages pulmonaires en comparaison aux monocytes ou neutrophiles pulmonaires et que ces macrophages voyaient leur index de phagocytose augmenter[97].

Comme de nombreux types cellulaires, les CSM peuvent transférer leurs mitochondries par différentes stratégies dont les terminologies ont été récemment clarifiées par l'ICMTTN (International Committee on Mitochondria Transfer and Transplantation Nomenclature)[98], à savoir :

(i) de manière dépendante du contact (Figure 4)

- Par un mécanisme de prolongements cytoplasmiques afin de former des nanotubes. Ces ponts cytoplasmiques d'actine/microtubule entre deux cellules sont le mode principal de transfert utilisé par les CSM et décrit dans la plupart des études princeps[95,97].
- Par l'intermédiaire de jonctions communicantes (« gap-junction communication »). Dans ce cas, les protéines de jonction communicante transmembranaires (connexine 43) s'associent en complexe pour former des hémicanaux aussi appelés connexons entre la cellule donneuse et la cellule receveuse, nécessaires pour le transfert de mitochondries[99].

La première description de ce moyen de transfert a été mise en évidence par Islam *et al.* entre des CSM(MO) et des cellules épithéliales alvéolaires lésées, dans un modèle murin de lésion pulmonaire aiguë (LPA) induite par LPS. Après formation de jonctions communicantes, contenant des connexines 43, entre les CSM et les cellules épithéliales, les VE issues des CSM étaient libérées permettant d'augmenter la concentration en ATP alvéolaire et protégeant ainsi les souris de la LPA[100,101].

- Par un mécanisme de fusion. L'avantage de ce mode de transfert est la libération massive de mitochondries par la cellule donneuse. En effet, il a été décrit que la longueur de la connexion intracellulaire était inversement proportionnelle au nombre de mitochondries transférées[102]. Bien que ce phénomène soit rare en condition physiologique, il peut être augmenté en cas de stress ou d'inflammation.

(ii) de manière contact indépendant (Figure 4)

- Par la sécrétion de mitochondries ou de composants mitochondriaux au sein de VE de grandes tailles (100-1000nm) ainsi que par des vésicules plus larges de 1 à 8µm de diamètre[103,347,348] mais également *via* des corps apoptotiques. Le transfert de mitochondries de CSM(MO) par l'intermédiaire de VE induirait un phénotype de macrophages anti-inflammatoire présentant une activité phagocytaire augmentée au sein d'un environnement de type SDRA (Syndrome de Détresse Respiratoire Aiguë)[104].

  De plus, au sein d'une autre étude, il a été constaté que les CSM(MO) murines empaquetaient des mitochondries intactes et fonctionnelles au sein de VE et que ce transfert de VE, contact indépendant, permettait d'enrichir des chondrocytes en mitochondries fonctionnelles[105].

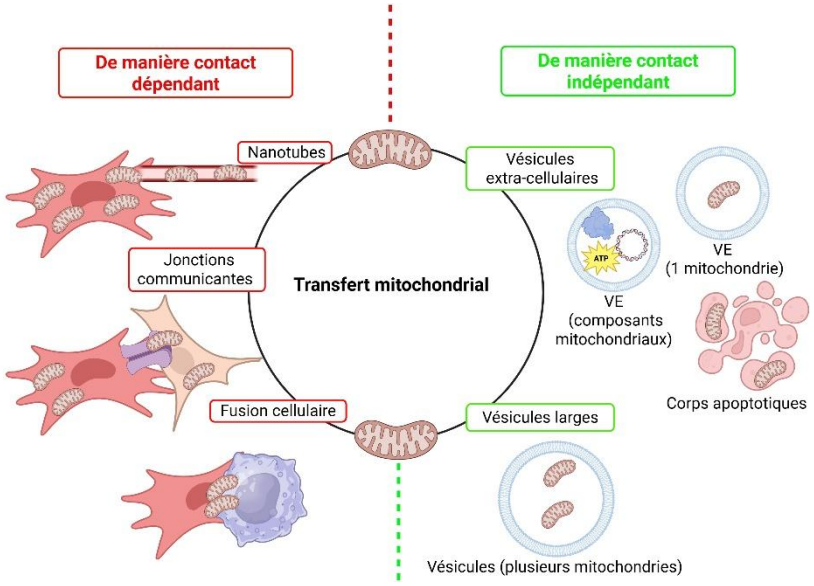


Figure 4 : Différents modes de transfert des mitochondries utilisés par les CSM ([95,97,99,102,103,104,105,347,348]).

Différentes études ont mis en évidence que le transfert de mitochondries était l'un des mécanismes à l'origine de l'immunomodulation des CSM et que les cellules cibles pouvaient être différentes des cellules de l'immunité.

Transfert vers les LT :

En effet, le transfert de mitochondries issues de CSM(MO) vers des LT CD4+ murins provoquait une diminution de la prolifération de ces LT et de leur production d'IFNγ. De plus, ce transfert limitait la régulation positive du facteur de transcription T-bet spécifique des LTh1 au niveau des LT CD4+ activés[106]. Dans cette étude les auteurs ont choisi la technique de MitoCeption pour transférer artificiellement les mitochondries des CSM aux LT. Il a également été mis en évidence que le transfert mitochondrial augmentait l'expression d'ARNm impliqués dans la différenciation des LT régulateurs (FoxP3, IL2RA, CTLA-4, TGF-β1), augmentant ainsi le taux de LT régulateurs CD25+FoxP3+[106].

De plus, des études ont mis en évidence le rôle du transfert mitochondrial vers les LT CD8+. Il a été montré que le transfert mitochondrial initié par des CSM(MO) murines allogéniques permettait la suppression fonctionnelle des LT CD8+. Cela ayant pour conséquence, une régulation négative de l'expression du facteur de transcription T-bet diminuant leur activation/différenciation en LT CD8+ effecteurs, leur expansion et leur production d'IFNγ[109]. Dans un modèle murin de GvHD, la transplantation de LT humains ayant reçu un transfert de mitochondries de la part des CSM, avait aussi permis de réduire l'infiltration de LTh1 et de LT CD8+ dans les tissus inflammés et de réduire le score pathologique au niveau des organes endommagés tels que le foie, les poumons et l'intestin, permettant ainsi d'augmenter la survie des souris[107].

Transfert vers les macrophages :

Dans un modèle murin de lésions pulmonaires induites au LPS, le traitement de macrophages alvéolaires murins par des VE dérivant de CSM(MO) avait permis de réduire le nombre de cellules inflammatoires infiltrantes, le nombre de neutrophiles ainsi que le taux de TNFα dans le liquide broncho-alvéolaire (LBA). Le mécanisme d'action passait probablement par le transfert de mitochondries puisque les mitochondries marquées par fluorescence au sein des VE se retrouvaient localisées dans les macrophages alvéolaires[104].

De même, Xia *et al*. ont observé que les VE provenant de CSM(TA) étaient capables de transférer des mitochondries à des macrophages alvéolaires, et ainsi d'augmenter le niveau d'ADN mitochondrial, le potentiel membranaire mitochondrial (PMM), l'activité phospho-oxydative (OXPHOS) et la production d'ATP des macrophages. Cette restauration de l'intégrité mitochondriale a conduit à un changement phénotypique des macrophages vers un profil M2 anti-inflammatoire ayant pour conséquence une diminution de la sécrétion d'IL-1β, de TNFα, de iNOS ainsi qu'une augmentation de la production d'IL-10 et de l'arginase-1. Les mitochondries transportées par les VE permettaient de restaurer le métabolisme des macrophages alvéolaires ainsi que l'homéostasie immunitaire afin d'atténuer l'inflammation pulmonaire[108]. Le transfert de mitochondries est également réalisable entre CSM et cellules régulatrices comme dans cette étude où des CSM(TA) allogéniques transféraient, de manière dépendant du contact, leurs mitochondries à des LT régulateurs afin d'améliorer leurs propriétés immunosuppressives. Les mitochondries transférées étaient fonctionnelles à hauteur de plus de 95%[53].

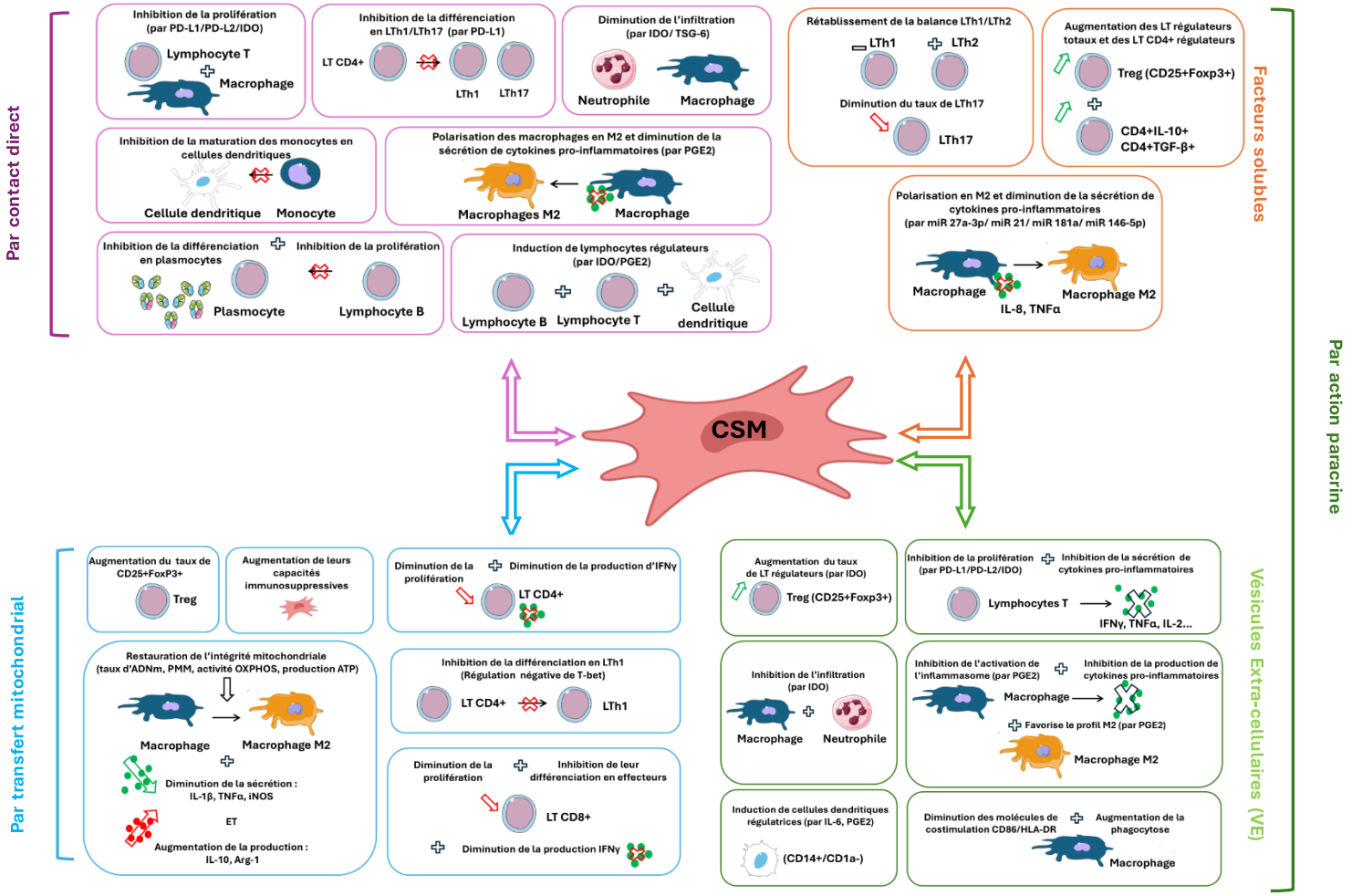


Figure 5 : Mécanismes d'immunomodulation médiés par les CSM.

5) Caractérisation des CSM

L'ensemble des connaissances sur les CSM ont permis de proposer, au fur et à mesure du temps des critères visant à les caractériser.

Le premier critère concerne leur morphologie. Les CSM sont des cellules adhérentes qui présentent une morphologie fibroblastique, à savoir un aspect fusiforme avec des prolongements cytoplasmiques. Afin de mieux les distinguer d'autres populations stromales, comme les fibroblastes d'aspect similaire et en l'absence de marqueurs qui leur soient propres, la définition de critères d'inclusion en tant que « CSM » a dû être mise en place. Ainsi, en 2006, l'ISCT (International Society of Gene and Cell Therapy) a émis des recommandations basées sur trois critères validant l'appellation « CSM ». Pour cela les CSM doivent (i) exprimer à leur surface les marqueurs CD105, CD90 et CD73, et ne pas exprimer les marqueurs hématopoïétiques CD34, CD45, CD14, CD19 ainsi que la molécule de classe II du CMH HLA-DR. (ii) Les cellules doivent être capables d'adhérer au plastique lorsqu'elles sont cultivées *in vitro*. (iii) Les cellules doivent être capables de se différencier *a minima* en adipocytes, chondrocytes et ostéoblastes[110].

Pour vérifier leur capacité de différenciation en ces trois types cellulaires, des tests de différenciation ostéogénique, adipogénique et chondrogénique doivent être réalisés dans des conditions de culture bien définies. Pour observer l'ostéogénèse, un suivi de la formation de nodules osseux par un marquage de la phosphatase alcaline, caractéristique de ce tissu, par rouge alizarine est classiquement utilisé. Pour mettre en évidence l'adipogénèse, un marquage des vacuoles lipidiques du tissu adipeux par l'oil red est préconisé[111]. Enfin pour mettre en évidence la chondrogenèse, une détection des protéoglycanes, spécifiques de la MEC cartilagineuse, peut être mis en évidence par une coloration au bleu alcian[112].

Un autre test indispensable au contrôle qualité des CSM est le test de clonogénicité qui permet de mettre en évidence le caractère souche de ces cellules. Ce test basé sur la capacité des CSM à former des colonies (CFU, Colony-Forming Unit), suite à un faible taux d'ensemencement est révélé grâce au cristal violet ou au giemsa, des colorants capables d'interagir avec des composés chargés négativement tels que des protéines membranaires, cytoplasmiques ou encore l'ADN intra-nucléaire[113]. Au-delà ces critères minimaux fixés par l'ISCT pour identifier les CSM, des tests fonctionnels sont également préconisés par l'ISCT depuis 2013. Au regard du nombre de publications croissant sur les CSM, ce comité propose une standardisation de la caractérisation immunologique des CSM en recommandant une analyse des molécules produites par les CSM, en cytométrie en flux[114].

En 2015, trois méthodes d'analyses sont proposées en vue d'une utilisation comme produits cliniques, basées sur l'analyse quantitative d'ARN cibles, l'analyse de marqueurs fonctionnels de surface par cytométrie en flux et la détection de protéines au sein du sécrétome[115]. Enfin en 2019, l'ISCT recommande l'indication du tissu d'origine lors de l'utilisation de l'acronyme « CSM » mais aussi la mise en place d'essais fonctionnels permettant de démontrer les propriétés des CSM sans les imposer de façon générique mais selon le mode d'action thérapeutique des CSM souhaité[116] (Figure 6).

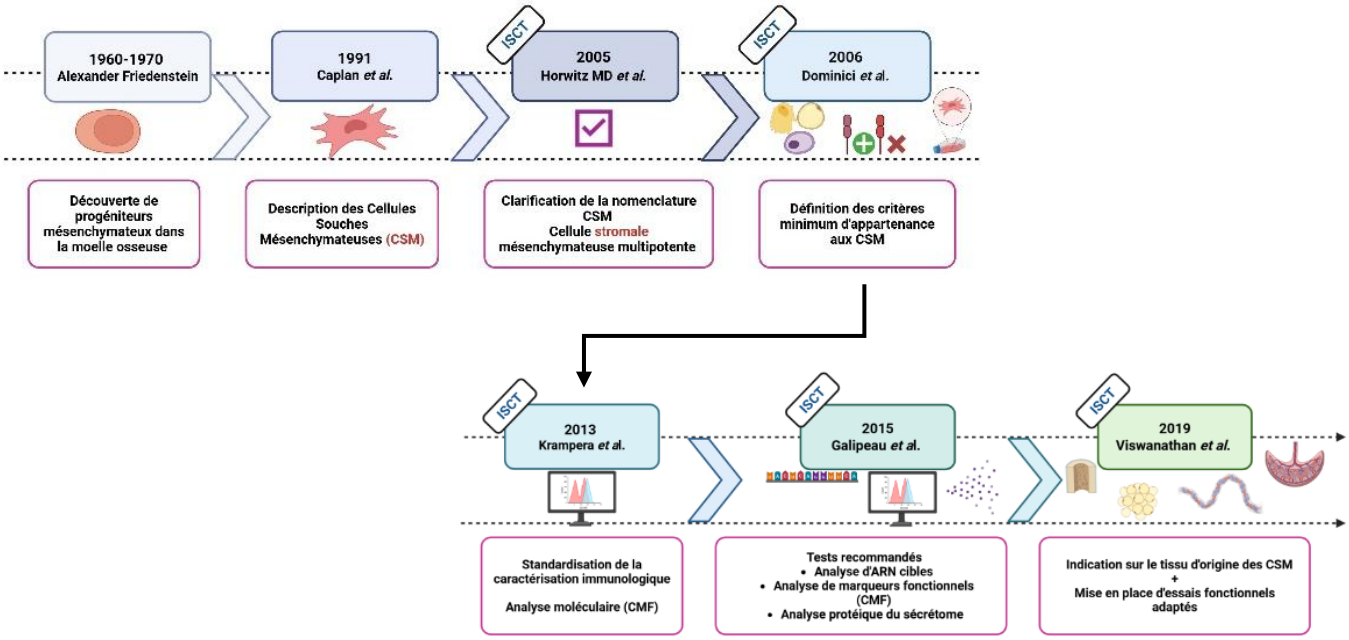


Figure 6 : Frise chronologique de l'histoire des CSM : de leur découverte aux mises à jour actuelles ([5,7,110,114,115,116]).

IV. Phénotype immunitaire des CSM

1) Plasticité immunitaire

Les CSM sont décrites comme des cellules plastiques avec des capacités immunomodulatrices variables en fonction de la concentration en médiateurs inflammatoires au sein de leur microenvironnement[117]. Elles agissent comme des capteurs du contexte inflammatoire et sont capables de s'adapter à leur environnement[118]. Dans des modèles de GvHD, les CSM peuvent inhiber l'action des LT dans un contexte inflammatoire et perdre cette capacité en l'absence de cytokines pro-inflammatoires[119].

Dans un modèle murin d'encéphalomyélite auto-immune chronique, il a été montré que l'injection de CSM(TA) induisait, dans un premier temps, une forte immunomodulation, qui devenait moindre lorsque les CSM(TA) étaient injectées plus tardivement, mettant en évidence l'impact du contexte inflammatoire variable sur la variation des capacités immunosuppressives des CSM[120]. Au début de la maladie, durant la phase aigüe, le contexte inflammatoire est fort avec des concentrations élevées en cytokines pro-inflammatoires, responsables de la progression de la maladie, alors que dans les phases chroniques ou de rémissions, le taux de cytokines est beaucoup plus bas, afin de faciliter la réparation tissulaire.

Cette évolution du microenvironnement pourrait expliquer la variation des capacités immunomodulatrices des CSM[117,121]. Li *et al*. ont vérifié cette hypothèse en démontrant qu'une production trop faible d'IFNγ et de TNFα par les LT empêchait l'induction d'une immunosuppression par les CSM au profit d'une induction de la prolifération des LT. Pour cela des cocultures entre CSM et splénocytes ont été effectuées. Lorsque les CSM étaient cultivées avec de fortes densités de splénocytes (sécréteurs de cytokines pro-inflammatoires), les CSM inhibaient la prolifération des LT, contrairement à celles cultivées avec de faibles densités de splénocytes. Cela a mis en évidence que les capacités inhibitrices ou immunostimulantes des CSM étaient liées à la densité des splénocytes environnants et à leur taux de sécrétion. Les capacités immunostimulantes des CSM envers les LT étaient induites par un taux trop faible de cytokines dans l'environnement mais disparaissaient lorsque les CSM étaient fortement stimulées avec de l'IFNγ et du TNFα[122]. Ren *et al*. ont aussi mis en évidence le rôle de l'environnement cellulaire et du taux de CMN sur le phénotype des CSM. Cette étude a mise en lumière, sur des CSM(MO) murines ainsi que sur des CSM(CO) humaines, l'impact de la densité de cellules immunitaires environnantes sur les capacités immunomodulatrices des CSM. En effet, lorsque les CSM étaient cocultivées avec des CMN à forte densité, celles-ci inhibaient la prolifération des CMN alors qu'une même culture mais en faible densité de CMN permettait aux CSM d'induire la prolifération des CMN activés. De plus, il a été mis en évidence par l'utilisation d'un inhibiteur d'IDO, l'importance de cette enzyme dans les propriétés immunomodulatrices des CSM. En effet lorsque cette enzyme était inhibée, les CSM ne pouvaient qu'induire une prolifération des CMN activées et ce peu importe le nombre de CMN[346].

Les CSM seraient donc à la fois capables de promouvoir une réponse immunitaire mais aussi de l'inhiber en fonction des différents facteurs immunitaires présents dans leur environnement et de leurs concentrations.

2) Description des phénotypes CSM1/CSM2

A l'instar des macrophages, les CSM présentent deux phénotypes immunitaires : l'un pro-inflammatoire dit CSM1 et l'autre anti-inflammatoire dit CSM2. Ces deux phénotypes ont été identifiés par Waterman *et al*. sur des CSM(MO). Cette publication princeps de 2010 a mis en évidence que les CSM1 sécrétaient plus d'IL-6 et d'IL-8 et maintenaient l'activation lymphocytaire. D'autre part, ils ont montré que les CSM2 libéraient davantage de CCL10, de RANTES, de l'IL-1RA et de PGE2, présentaient une moindre sécrétion de TGF-β1/3 et exprimaient plus l'ARNm de l'enzyme IDO. Enfin, ce phénotype décrit comme anti-inflammatoire conduisait à la diminution de l'activation lymphocytaire. Pour obtenir ces deux phénotypes immunitaires, Waterman *et al*. ont mis en place une stimulation moléculaire des CSM *in vitro* appelée préconditionnement cellulaire.

3) Préconditionnement cellulaire *in vitro*

En clinique, ces deux phénotypes immunitaires, décrits au sein des CSM, permettraient de répondre à l'inefficacité ou à l'absence de traitements dans des pathologies où persiste un désordre immunitaire ou une dérégulation immunitaire. Le phénotype CSM2 permettrait d'inhiber une réaction immunitaire excessive alors que le phénotype CSM1 permettrait de stimuler une réaction immunitaire inefficace.

La méthode de préconditionnement cellulaire permettrait ainsi de fonctionnaliser les CSM « naïves » et de les orienter vers le phénotype souhaité *via* l'ensemble des changements *in cellulo* qu'elle engendre. Les cellules seraient alors « prêtes à l'emploi » en vue d'une application en thérapie cellulaire, répondant ainsi à l'urgence thérapeutique.

Afin d'obtenir *in vitro* ces deux phénotypes immunitaires, un préconditionnement cellulaire (appelé priming en anglais) peut être initié sur les CSM « naïves ». Ce préconditionnement se définit comme une stimulation cellulaire capable d'induire un changement fonctionnel au niveau des cellules. En retour, ces dernières vont mettre en place une signalisation adaptée conduisant à des modifications génétiques ou épigénétiques voire un changement morphologique, phénotypiques et/ou fonctionnel[124].

Le stimulus en question peut être de différente nature. Le plus fréquemment utilisé consiste en une stimulation biochimique à l'aide de cytokines, de facteurs pharmacologiques ou encore d'autres molécules comme les ligands des TLR (Toll Like-Receptors)[123]. Le préconditionnement des cellules peut aussi correspondre à un changement des conditions de culture tel qu'une culture cellulaire avec des concentrations en oxygène variables (de 1% à 21%), ou en 3D.

3.1) Préconditionnement par variation de l'environnement biochimique

- **Préconditionnements moléculaires permettant l'obtention de CSM1/CSM2 *via* l'activation des TLR**

Tout d'abord, c'est *via* l'utilisation de ligands des TLR (Toll-Like Receptors) que Waterman *et al*. ont mis en évidence les phénotypes CSM1/CSM2. Les TLR sont des récepteurs exprimés principalement à la surface des cellules immunitaires (cellules dendritiques, monocytes, macrophages, neutrophiles, éosinophiles, basophiles, cellules NK) mais aussi par les cellules épithéliales et les CSM. Ils sont capables de détecter des signaux pathogènes PAMPs (Pathogen-Associated Molecular Patterns) ou des signaux de dangers de type DAMPs (Damage-Associated Molecular Patterns).

Les TLR décrits au niveau des cellules immunitaires innées de type TLR1/2/4/5/6 sont localisés au niveau de la membrane plasmique des cellules afin de détecter des signaux microbiens externes tels que les lipopeptides, la flagelline ou encore le lipopolysaccharide. Les TLR 3/7/8/9 sont localisés dans les compartiments intracellulaires au niveau des endosomes afin de capter des acides nucléiques viraux exogènes. Le TLR4 reste le TLR le plus étudié car en plus d'avoir été identifié en premier chez l'humain, il fixe principalement le LPS bactérien, divers allergènes et polluants de l'air[125]. Cependant l'expression des TLR par les CSM est plus ou moins décrite. Certaines études ont montré une expression protéique des TLR 1/2/3/4/5/6/7 par les CSM(MO)[126] alors que d'autres ont ajouté les TLR 8/9/10 en étudiant les CSM(CO)[127].

Enfin certains ont affirmé l'absence d'expression des TLR7 chez des CSM(MO), (TA) et (CO)[188, 128,129]. Dans la publication princeps de Waterman *et al*. l'obtention de CSM1 s'est faite grâce à une stimulation au LPS provenant de bactéries Gram négatives de type *Escherichia Coli* O55 : B5 alors que le Poly I :C, un ARN synthétique double brin mimant un ARN viral était utilisé pour obtenir des CSM2[126,130].

Plus tard, ces mêmes auteurs ont montré le rôle des CSM1 et des CSM2 sur la croissance tumorale de différentes lignées cancéreuses. Les CSM1 réduiraient le nombre de colonies ainsi que la largeur des sphéroïdes tumoraux alors que les CSM2 augmenteraient le nombre de colonies et la largeur des sphéroïdes. Cependant aucunes données chiffrées ou statistiques n'ont été montrées. Les CSM1 ou CSM2 cocultivées avec la lignée SKOV3 ont permis une analyse de la sécrétion en cytokines. Lorsque les CSM1 étaient cocultivées avec cette lignée, une augmentation des facteurs pro-inflammatoires IL-17, IL-3, MIG, MIP1β et GM-CSF a été montrée[132]. Cependant cette étude cytokinique ne permet pas de définir quelles cellules ont sécrété ces facteurs pro- ou anti-inflammatoires.

Lorsque que les CSM2 ont été cultivées avec la même lignée, une augmentation de l'IL-1RA, de l'IL-10, de CXCL1, de CCL5 et de CXCL10 a été observée[131].

Bien que les CSM2 ont été largement décrites pour leurs propriétés anti-inflammatoires dans l'étude de pathologies inflammatoires comme la GvHD, le lupus ou plus récemment la COVID-19[134,135,136,137] ; les CSM1 auraient, elles aussi, un rôle à jouer, notamment dans des pathologies où réside une anergie immunitaire comme le sepsis ou le choc septique.

En effet, il a été identifié dans un modèle de lymphocytes T rendus anergiques par intoxication au LPS, que les CSM étaient capables de restaurer la viabilité des LT et le nombre de cellules précurseurs bien qu'elles n'aient pas d'impact sur l'index de prolifération de LT. De plus, les CSM exerçaient une activité inhibitrice lorsque qu'elles étaient en contact avec des LT hautement prolifératifs alors qu'elles avaient une activité stimulante en présence de cellules faiblement prolifératives. Les CSM en présence de LT sains étaient capables de diminuer l'expression de l'IFNγ alors qu'en présence de LT anergiques, les CSM augmentaient cette expression[138]. Dans une autre étude, les CSM étaient en capacités de sécréter la chimiokine CCL2, capable de se fixer à son récepteur CCR2 à la surface des cellules NK et ainsi participer à leur stimulation[139]. Par ailleurs, il a été montré que l'injection de CSM1 améliorait la survie de modèles murins présentant une anergie cellulaire, induite par CLP puis injection de LPS mimant une infection secondaire. L'inflammation splénique chez ces souris était réduite grâce à un taux de cytokines/chimiokines pro-inflammatoires sériques (TNFα, CCL2, CCL5, CCL7, CCL12, CXCL12, CXCL10, CRP) diminué. De plus, des cocultures entre CSM1 stimulées au LPS et LT CD8+ ont démontré que les CSM1 diminuaient l'apoptose, induisaient la prolifération et la fonctionnalité de cette sous population de LT *via* une augmentation du marqueur de dégranulation CD107a et de la sécrétion de cytokines/chimiokines pro-inflammatoires (IFNγ, TNFα, CCL4, CCL7, CXCL12, IL-6, CXCL10)[140].

Enfin, une étude récente a montré le rôle des CSM1(GW) dans le cadre du cancer colorectal. Une approche en réseau PPI (Protein-Protein Interaction) des CSM1 a mis en évidence plusieurs clusters de protéines. Ces protéines étaient impliquées dans cinq axes de régulation au sein des CSM1 : (i) l'activation de kinases telles que les MAPK, ERK1/2 et PI3k/Akt, (ii) l'immunomodulation en balance entre signalisation pro- et anti-inflammatoire, (iii) le remodelage de la MEC et la réorganisation du cytosquelette, (iv) la signalisation de survie et de résistance au stress, (v) la reprogrammation métabolique. Les protéines les plus représentées découlant de l'analyse protéique PPI jouaient un rôle dans l'activation immunitaire et le processus pro-inflammatoire[141].

Les auteurs ont, alors, mis en évidence le potentiel des CSM1 à supprimer la tumeur en affectant le métabolisme des cellules tumorales de la lignée RKO, en stabilisant la MEC, et en sécrétant des ligands suppresseurs de tumeurs (TRAIL, TL1A, LIGHT…). L'ensemble de ces actions aboutissait à une diminution significative de la viabilité des cellules RKO dans les cocultures avec des CSM1 par rapport aux coculture avec des CSM naïves.

Un autre préconditionnement testé dans la littérature réside dans l'utilisation de Resiquimod (R848). A l'image du LPS, le R848 permettait d'augmenter la sécrétion d'IL-6 par des CSM(CO) *via* la stimulation des TLR7/8[127]. Une étude a également montré que les CSM préconditionnées avec du R848 voyaient leur expression des molécules de costimulation (CD80/CD86) augmenter stimulant en retour la prolifération des CMN 72h après stimulation. Cependant, ce même préconditionnement entraînait une baisse significative de la sécrétion, par les CSM, de MCP-1/3 et d'IL-6 ainsi qu'une augmentation significative de l'IL-1β, du TGF-β et du VEFG, mettant encore en avant l'ambiguïté des molécules de préconditionnement[142].

- **Préconditionnements moléculaires de types cytokiniques ou pharmaceutiques permettant de moduler les capacités immunitaires des CSM**

Beaucoup de préconditionnements basés sur l'utilisation de cytokines pro-inflammatoires ont été décrits dans la littérature afin d'obtenir des CSM2. De manière privilégiée, la combinaison de l'IFNγ avec du TNFα, mimant un environnement inflammatoire, constitue un préconditionnement efficace des CSM afin augmenter leurs capacités immunomodulatrices (Tableau 2).

Cette action passe par un mécanisme paracrine puisque le surnageant de CSM préconditionnées à l'IFNγTNFα (20ng/ml, pendant 24h) est capable d'induire la polarisation des macrophages vers un phénotype M2 anti-inflammatoire tout en augmentant leur activité phagocytaire en comparaison à des surnageants de CSM contrôles. L'efficacité des CSM traitées à l'IFNγ et au TNFα a été confirmée dans un modèle murin de plaies cutanées où les CSM traitées ont été capables d'induire la migration des macrophages vers la zone de blessures et d'augmenter la polarisation des macrophages vers un profil M2 *via* la sécrétion de CCL2 et d'IL-6[143].

Lors de résultats antérieurs au sein de l'équipe, l'efficacité de la combinaison IFNγ et TNFα avait aussi été prouvée montrant une expression augmentée de la molécule immunomodulatrice PD-L1 dans ces conditions ainsi qu'une sécrétion de PGE2, d'HGF, du TFG-β1, de l'IL-6 et de PD-L1 soluble[146].

Une autre molécule, à savoir l'IL-1β, s'est révélée être une molécule de préconditionnement efficace sur des CSM(MO) de rat dans un modèle de choc hémorragique. La stimulation des CSM avec de l'IL-1β (5ng/ml) pendant 24h a permis aux CSM préconditionnées de sécréter plus de PGE2, d'IL-6 et de CCL2 et de diminuer le taux de sécrétion du TNFα par les macrophages, en comparaison aux CSM non stimulées. Cependant, bien que le préconditionnement des CSM à l'IL-1β ait permis d'améliorer les fonctions rénales et hépatiques, par une diminution de la créatinine et des transaminases, il n'y avait pas de différences significatives avec les CSM non stimulées. De même, les CSM non préconditionnées ou préconditionnées réduisaient de manière similaire l'IL-6 et l'IL-1α plasmatiques ainsi que l'expression de la molécule de costimulation CD86 en surface des granulocytes[147].

Parfois des mélanges cytokiniques plus complexes sont utilisés pour activer les CSM. Le mélange appelé « cytomix » composé de TNFα (50ng/ml), d'IFNγ (50ng/ml) mais aussi d'IL-1β (50ng/ml) a été utilisé pendant 24h pour activer des CSM(CO). Les auteurs ont observé une meilleure efficacité des CSM activées pour atténuer le pneumosepsis induit dans un modèle de rat adulte par administration de Klebsiella en comparaison aux CSM non stimulées ou exposées à une hypoxie (2% O^2). Ces CSM ont permis d'améliorer l'oxygénation pulmonaire, de réduire le nombre de bactéries, de diminuer le taux de cytokines pro-inflammatoires telles que l'IL-6 et d'augmenter le taux d'IL-4 dans le liquide broncho-alvéolaire permettant de diminuer le nombre de polymorphonucléaires de type neutrophile[144,145].

Certaines de ces stimulations moléculaires sont ainsi à l'origine d'une augmentation des capacités immunomodulatrices des CSM. La stimulation de CSM(CO) par de l'IL-27 permettait d'augmenter l'expression de l'enzyme IDO suite à l'activation de la voie JAK-STAT1. De plus, les CSM traitées avec de l'IL-27 permettaient une meilleure suppression de la prolifération des LT en comparaison aux CSM non traitées et augmentaient la proportion des LT régulateurs[148]. L'impact positif du préconditionnement, sur l'expression d'IDO, avait également été mis en avant lors de la stimulation des CSM(MO) murines à l'aide d'IFNγ et de Poly I :C, permettant une augmentation du taux de LT régulateurs dans un modèle murin de colite[77].

Parfois, l'utilisation d'agents pharmacologiques peut aussi être considérée comme une source de préconditionnement cellulaire. Par exemple des CSM(CO) humaines ont été préconditionnées avec un lipide shingosine-1-phosphate SP1 couplé à un inhibiteur d'histone désacétylase : l'acide valproïque VPA (50nM + 0,5mM) pendant 1 jour. Ce préconditionnement a permis d'augmenter la prolifération et le potentiel clonogénique des CSM alors que leur milieu conditionné a permis de supprimer la sécrétion d'IFNγ par une lignée de macrophages alvéolaires (MH-S)[149].

3.2) Préconditionnement par variation des échanges gazeux

La culture cellulaire des CSM se fait le plus souvent en hypoxie (taux d'O_2 inférieur à 21%) consistant en un préconditionnement gazeux favorisant la prolifération, la migration et l'immunomodulation des cellules[282]. Lorsque des CSM(GW) sont cultivées, pendant 24h, dans une chambre hypoxique à moins de 1% d'O_2, cela entraîne une augmentation du niveau de HIF-1α et des capacités autophagiques. De plus, le milieu conditionné provenant de ces CSM(GW) cultivées en hypoxie augmente la migration des cellules HUVEC. L'hypoxie favorisait aussi le potentiel pro-angiogénique des CSM comme l'attestaient les facteurs de croissance de type angiogénine et VEGF dans le milieu conditionné de ces cellules[150].

Une autre étude a mis en évidence le rôle de l'hypoxie sur les capacités immunomodulatrices de CSM(CO). A l'issue d'une culture avec 2% d'O_2, les CSM(CO) présentaient une augmentation de l'expression des transcrits PGE2, IDO, KYN, CoX2, IL-10, TGF-β1, TSG-6, HLA-G5 et PD-L1 connus pour leurs actions immunomodulatrices. De plus, ces CSM sécrétaient des niveaux plus élevés d'IDO, de PGE2, de TGF-β1 et de TSG-6, favorisant l'inhibition de la prolifération des CMN et des cellules NK[151].

3.3) Préconditionnement par variation du mode de culture

- Culture en 3D

Le préconditionnement basé sur une culture en trois dimensions des CSM a surtout été décrit pour favoriser l'engagement des cellules dans une voie de différenciation bien déterminée comme la chondrogenèse ou l'ostéogénèse. Il a été décrit que la culture de CSM(CO) au sein d'un hydrogel de collagène de type I augmentait leur différenciation en chondrocytes, caractérisée par une augmentation de l'expression du collagène de type II, de l'agrécane, de la protéine COMP (Cartilage Oligomeric Matrix Protein) et du facteur de transcription Sox9. Les auteurs ont montré que l'hydrogel de collagène fournissait un environnement en 3D propice à la chondrogenèse des CSM(CO), utile en ingénierie du cartilage[152].

Comme pour la stimulation biochimique, de nombreux biomatériaux, plus ou moins complexes, sont utilisés pour guider la différenciation des CSM. Ainsi des travaux antérieurs de l'équipe ont développé un biomatériau stratifié composé d'alginate et d'acide hyaluronique permettant de guider, respectivement, la différenciation des CSM(GW) vers la chondrogenèse ou l'ostéogénèse. Sur une culture de 21 jours, il est apparu que le biomatériau jouait un rôle dans le processus de différenciation des CSM sans altérer leur capacité immunomodulatrice[154].

Une autre étude a décrit le rôle de sphéroïdes de CSM humaines dans un modèle murin de péritonite. Une analyse transcriptomique par microarray a mis en évidence une augmentation de gènes anti-inflammatoires comme le gène *TSG-6* mais aussi de gènes codant des protéines antitumorales comme l'IL-24, une protéine suppressive de tumeurs, ou encore TRAIL, une protéine dont l'activité contribue à éliminer les cellules cancéreuses. De plus, les CSM cultivées en sphéroïdes sécrétaient plus de TSG-6, et de STC-1, une protéine anti-inflammatoire et anti-apoptotique, ou encore le facteur LIF (Leukemia Inhibitory Factor) en comparaison à la culture des CSM en monocouche. De plus, les auteurs ont montré que les CSM en sphéroïdes diminuaient la sécrétion de TNFα par les macrophages traités au LPS et que la capacité anti-inflammatoire de ces sphéroïdes était maintenue *in vivo* avec une diminution de facteurs pro-inflammatoires dans le sérum des souris[153].

- **Variation mécanique**

L'environnement mécanique tel que la rigidité du substrat, la nanotopographie de surface ou les forces extracellulaires appliquées au système peuvent également influencer les activités des CSM.

En effet, les connexions mécaniques entre la matrice et le cytosquelette vont entraîner des forces de traction qui seront transmises par un signal intracellulaire. Ce signal sera ensuite traduit en signal biochimique à l'origine du déclenchement de voies de signalisation intracellulaires, pouvant impacter la réponse cellulaire des cellules souches. De surcroît, les CSM se sont avérées être des cellules hautement sensibles aux stimuli mécaniques[155]. Des expériences de culture de CSM(MO) sur des gels de polyacrylamide mimant l'élasticité de tissus tels que la moelle osseuse ou le tissu adipeux ont montré que dans un tel environnement, les CSM ne prolifèraient plus. Cependant, lorsque ces mêmes CSM étaient transférées sur un substrat rigide, les CSM prolifèraient à nouveau. Cela met en évidence que les signaux mécaniques transmis au CSM influenceraient leurs capacités. Cela pourrait expliquer que les signaux liés à l'élasticité de la MEC au sein des niches médullaires permettraient en partie le maintien des CSM comme réservoir[156].

Ce paragraphe non exhaustif (complété dans le Tableau 2) décrit les différents modes de préconditionnements et surtout les différentes molécules de préconditionnements cellulaires utilisées sur des CSM et rend compte de la complexité de ce processus. En effet, les molécules utilisées pour obtenir un même phénotype immunitaire varient d'une étude à une autre, tout comme les concentrations et les temps de préconditionnement choisis.

Cette échelle de possibilités rend complexe l'interprétation des résultats obtenus car les études ne sont pas comparables entre elles.

Si le choix du tissu de prélèvement représentait en soi un obstacle à la comparaison des études, le mode de préconditionnement choisi accentue ce problème. En effet, cette absence de comparaison constitue une des limites à l'utilisation des CSM en thérapie cellulaire.

3.4) Impact du temps et de la concentration des molécules de préconditionnement sur le comportement immunitaire des CSM

Certains préconditionnements restent imprévisibles pour l'obtention d'un phénotype immunitaire au sein des CSM, en raison d'une concentration de stimulation et/ou d'une durée d'exposition moléculaire variable. Un des exemples les plus probants réside dans l'étude de Kurte *et al*. dans laquelle, des CSM(MO) murines avaient été stimulées avec du LPS (500ng/ml) pendant un temps court (1h), induisant un phénotype CSM1, alors qu'après une stimulation des CSM aux mêmes quantités mais pendant un temps long (48h), cela induisait un phénotype CSM2 ; caractérisé par une augmentation de l'expression de iNOS et de leur faculté à diminuer la prolifération des LT. Un temps long de stimulation au LPS avait ainsi permis d'améliorer le score clinique dans un modèle murin d'encéphalite aiguë, en comparaison à la condition CSM non traitées. En revanche, les CSM stimulées au LPS sur un temps court, augmentaient le score cumulatif, mesure d'évolution de cette pathologie[157].

De même, si le Poly I :C, utilisé à une concentration de 1µg/ml pendant 1h, dans l'étude de Waterman *et al*. avait permis d'obtenir des CSM2[126], d'autres publications ont étudié le rôle du Poly I :C en tant que molécule de préconditionnement avec des doses plus faibles et/ou des temps d'exposition plus longs.

Zhao *et al*. ont ainsi montré que le Poly I :C utilisé à forte concentration (10µg/ml) pendant 6 heures augmentait à la fois l'expression de COX2, d'IDO mais aussi de l'IL-6 et de l'IL-8, permettant ainsi d'améliorer la survie d'un modèle de sepsis induit par ligature et ponction du caecum[127].

Cela met en évidence que moduler le préconditionnement cellulaire, directement lié aux concentrations et aux temps de stimulation choisis, peut être une stratégie pour fonctionnaliser ou améliorer les capacités physiologiques des cellules au besoin. Le Tableau 2 et la Figure 7 résument les préconditionnements moléculaires décrits dans la littérature tout en témoignant de la variabilité des concentrations et/ou temps de préconditionnement choisis.

Tableau 2 : Les différents préconditionnements moléculaires appliqués aux CSM.

Sources de CSM	Préconditionnements	Principaux effets des préconditionnements	Références bibliographiques
CSM(MO)/ (CO)/ (TA)/(GW)	IFNγ (200IU/ml, 24h)	Augmentation de IDO après stimulation de la voie JAK-STAT1 Réduction des symptômes de GvHD chez des souris NOD-SCID	327
CSM(MO)	IFNγ (50ng/ml, 48h)	Augmentation de l'expression de IDO et de PGE2 Inhibition de l'activation des cellules NK et de leur sécrétion d'IFNγ	175
CSM(MO)	IFNγ (50ng/ml, 4 jours)	Augmentation de l'activité de IDO Inhibition de la fonction des LT effecteurs, dépendante de PD1	177
CSM(MO)	IFNγ (50ng/ml)	Promotion d'exosomes atténuant la colite dans un modèle murin par augmentation des miR-125a et 125b inhibant la différentiation des LTh17 Diminution du taux de cytokines (IL-6, TNFα, IFNγ) et induction de la différenciation des LT régulateurs	179
CSM(TA)	IFNγ (10ng/ml, 48h)	Augmentation des transcrits IDO, CXCL9, CXCL10, COX2 et diminution du transcrit IL-8 Modulation de l'expression de facteurs impliqués dans le chimiotactisme, la réponse immunitaire et le remodelage de la matrice Augmentation de CXCL10, CXCL9, VCAM1, CCL8, CCL7 et diminution de CXL5, CXCL8, CXCL1 Au sein des exosomes : augmentation du miR protecteur du cartilage (miR-210) et des miR anti-inflammatoires (miR-146b-5p associé au profil M2) et diminution des miR délétères (miR-145) et pro-inflammatoires Dans un modèle *in vitro* d'environnement arthrosique induit par l'IL-1β : diminution de l'expression de VCAM1 (activateur de l'activation chondrocytaire) *via* le sécrétome des CSM(IFNγ)	222
CSM (Membrane amniotique)	IFNγ (200IU/ml, 48h) ou hypoxie (1% O_2)	CSM (hypoxie) : induction d'un phénotype pro-angiogénique, activateur de l'immunité innée et tissu-régénératif *via* une augmentation de la production de VEGF, PDGFRB, ANGPTL4, ENG, GRO-γ/α et de l'IL-8 CSM(IFNγ) : induction d'un profil immunosuppresseur avec une augmentation du niveau de TGF-β/ANXA1/THBS1/HOMER2/GRN/TOLLIP/MCP-1	241
CSM(MO)	TNFα (10ng/ml, 48h)	Le milieu conditionné provenant des CSM (TNFα) améliore les symptômes cliniques dans un modèle murin de conjonctivite allergique Diminution du nombre de cellules inflammatoires, de l'expression de NF-kB p65, de la production de TNFα et d'IL-4. Inhibition de la production d'IgE par les lymphocytes B	183
CSM (Tissu gingival)	TNFα (100ng/ml, pendant 48h)	Augmentation du nombre d'exosomes sécrétés et de l'expression exosomale de CD73 conduisant à la polarisation des M2 Les exosomes dérivant de ces CSM préconditionnées diminuent la résorption osseuse dans un modèle murin de parodontite	185
CSM(CO)	TNFα (1ng/ml, 72h)	Exosomes dérivant de ces CSM : réduction du taux sérique d'ALT, AST et de cytokines pro-inflammatoires et inhibition de l'activation des protéines de la voie NLRP3 Augmentation du miR-299-3p anti-inflammatoire exosomal Amélioration des lésions hépatiques dans un modèle murin	186
CSM(CO)	TNFα (10ng/ml, 24h)	Diminution de l'inflammation et de la fibrose endométriale dans un modèle murin de synéchies utérines Augmentation de l'expression de la galectine-1 au sein des exosomes dérivant de ces CSM, induisant la polarisation des macrophages vers un profil M2 *via* la voie JAK-STAT	338
CSM(CO)	IL-1β (10ng/ml, 12h)	Augmentation du miR146a anti-inflammatoire Polarisation des macrophages vers un profil M2 Amélioration de la survie d'un modèle murin de sepsis (CLP)	161

CSM(MO) rat	**IL-1β (5ng/ml, 24h)**	**Augmentation de la sécrétion de PGE2, d'IL-6 et de CCL2 Diminution de la sécrétion d'IFNγ par les macrophages Amélioration des blessures rénales et hépatiques dans un modèle de rat de choc hémorragique avec lésions d'organes**	147
CSM murines	**IL-1β (10ng/ml, 12h)**	**Exosomes dérivant de ces CSM : Augmentation de la polarisation des M2 *in vitro* et *in vivo* grâce à une augmentation du taux du miR-21 Amélioration des symptômes et de la survie des souris septiques (CLP)**	93
CSM(MO)	**IL-β (25ng/ml, 24h)**	**Exosomes dérivant de ces CSM : Augmentation du taux de miR-147b conduisant à la diminution de l'expression des cytokines pro-inflammatoires (IL-1β, IL-6, MCP-1) et de la voie NF-kB. Augmentation de l'expression de facteurs anti-inflammatoires (SOCS3/SOCS6) Activité anti-inflammatoire dans un modèle *in vitro* de cellules ostéoarthritiques (lignée SW982)**	188
CSM(MO)	**LPS (10ng/ml, 24h)**	**Augmentation de la sécrétion d'IL-6/IL-8/MIF Augmentation du recrutement des Polynucléaires neutrophiles (PNN)**	158
CSM (Pulpe dentaire)	**LPS (100ng/ml, 72h)**	**Exosomes dérivant de ces CSM : Augmentation du miR anti-inflammatoire (miR-320a-3p) régulant la voie NF-kB**	257
CSM(CO)	**LPS (100ng/ml, 48h)**	**Exosomes dérivant de ces CSM : Augmentation de l'expression de cytokines anti-inflammatoires et activation des macrophages M2 Réduction de l'inflammation et amélioration de la cicatrisation des plaies cutanées issues de modèle murin diabétique**	192
CSM(MO)	**LPS (10ng/ml, 1h)**	**CSM1 : Diminution du catabolisme protéique Augmentation du taux de LT CD8+, de leur cytotoxicité et du taux de cytokines/chimiokines pro-inflammatoires *in vitro* Maintien d'une plasticité dans un modèle murin de choc septique (CLP) avec infection secondaire (LPS)**	140
CSM(MO) murines	**LPS (100ng/ml, 24h)**	**Exosomes dérivant de ces CSM : Favorisent la polarisation des macrophages vers un profil M2 Atténuation de l'inflammation post-infarctus et de l'apoptose des cardiomyocytes dans un modèle murin de lésions myocardiques**	194
CSM(MO) rat	**LPS (10ng/ml, 1h)**	**CSM1 : les microvésicules provenant de ces CSM1 augmentent la cytotoxicité des LT contre des cellules tumorales B92**	159
CSM(MO) rat	**LPS (100ng/ml) pendant 6 jours**	**Exosomes provenant de ces CSM : Amélioration de la régénération tissulaire et diminution de la réponse inflammatoire Induction du phénotype M2 et diminution de l'infiltration des neutrophiles et de l'activité MPO dans le tissu pulmonaire *In vivo* : Diminution de l'expression de CXCL1 dans les macrophages alvéolaires**	249
CSM(MO) murines	**LPS (0,1 ou 10µg/ml, 12h/24h/48h/72h/168 h)**	**CSM (LPS 0,1µg/ml) : augmentation de l'expression de ALP et de Runx2 favorisant la différenciation ostéogénique + augmentation du volume osseux. Après 12h de stimulation, les CSM augmentaient l'expression de iNOS et du taux de NO et induisaient l'apoptose des LT activés contrairement aux CSM (LPS 10µg/ml).**	190
CSM (MO) murines	**LPS (500ng/ml, temps court 1h *vs* temps long 48h)**	**CSM (LPS 1h) : CSM1 : expression de faibles niveaux de NO/iNOS et diminution de leurs capacités immunosuppressives CSM (LPS 48h) : CSM2 : augmentation des capacités immunosuppressives envers la prolifération des LT, augmentation du taux de LT régulateurs Effet thérapeutique dans modèle murin de EAE**	157
CSM(GW)	**LPS (10ng/ml, 1h)**	**CSM1 : Diminution de la viabilité des cellules cancéreuses (lors de coculture avec une lignée RKO) Sécrétome de type CSM1 : TRAIL, TL1A, LIGHT**	141

CSM(CO)	**Poly I:C (1µg/ml)**	**Amélioration des manifestations cliniques de la colite dans un modèle murin** **Diminution du taux de cytokines pro-inflammatoires, de l'expansion des LTh1/LTh17 et augmentation de l'IL-10 et de l'action des LT régulateurs** **Inhibition de la prolifération des cellules des ganglions mésentériques activées *via* la surproduction de PGE2 et la régulation positive de Jagged-1**	201
CSM(TA)	**Poly I:C (1/10µg/ml, 1h/3h/24h)**	**CSM (Poly I:C, 10µg/ml, 3h) : augmentation des marqueurs immunomodulateurs et de l'apoptose des cellules Jurkat grâce à une augmentation d'expression des protéines d'adhérence (ICAM-I, Galectine-3)** **Coculture CSM + cellules Jurkat : augmentation de l'IL-10 et diminution de l'IL-2 dans le milieu** **Induction de protéines activant la réponse antivirale**	160
CSM(MO) murines	**IL-23 (20ng/ml, 48h)**	**Exosomes dérivant des CSM : protection contre la dégénérescence des cellules photoréceptrices et des cellules épithéliales pigmentaires de la rétine et restauration des fonctions neuronales de la rétine dans un modèle murin** **Induction de miR anti-inflammatoires favorisant la polarisation des macrophages microgliaux M1 vers un profil M2**	237
CSM(TA)/ CSM(MO)	**LPS (10ng/ml)/ Poly I:C (1µg/ml), 1h**	**CSM(LPS) : 6h après le retrait du stimulus : Augmentation des gènes CCL20/IL-8/CCL5, revenant à un niveau basal à 18h** **Augmentation du taux d'IL-8 mais pas du taux d'IL-6** **CSM (Poly I:C) : 6h après le retrait du stimulus : Augmentation des gènes CXCL10/CXCL11/IDO/TNFSF10/CCL5** **Augmentation plus tardive d'IRF7 et de HLA-DR** **Augmentation de CXCL10/CCL5/IDO mais pas du TGF-β1/IL-10/IL-4**	265
CSM(MO)	**LPS (10ng/ml, 1h) /Poly I:C (1µg/ml, 1h)**	**CSM1 (LPS) : augmentation de la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires** **Activation lymphocytaire constante** **CSM2 (Poly I:C) : augmentation ARN IDO et sécrétion PGE2** **Diminution de la prolifération des LT**	126
CSM(TA)	**LPS (10-250ng/ml)/ Poly I:C (1-25µg/ml) pendant 3h ou 24h**	**CSM (LPS) : Activation du TLR4 et de la voie dépendante de MyD88 conduisant à la production d'IL-6 et d'IL-8** **CSM (Poly I:C) : Augmentation de l'expression d'IDO**	165
CSM(MO) murines	**LPS (500ng/ml, 1h) / Poly I:C (10ng/ml, 1h)**	**CSM (LPS) : Augmentation de la prolifération des LT CD3+, du taux d'IL-6 et induction des profils LTh1/LTh17** **CSM (Poly I:C) : Diminution de la prolifération des LT CD3+, de la sécrétion de NO et de la différentiation des LTh1/LTh17** **Diminution de la sévérité de l'EAE dans un modèle murin**	172
CSM(CO)	**LPS (10ng/ml,1h) / Poly I:C (1µg/ml,1h)**	**CSM (Poly I:C) : Augmentation de l'expression d'IDO et suppression de la prolifération des LT** **Amélioration du score clinique, de la perte de poids et de la sévérité de l'inflammation intestinale dans un modèle murin de colite aiguë** **CSM (LPS) ou CSM (Poly I:C) : Augmentation de l'expression des cytokines pro-inflammatoires (IL-6 et IL-8) avec un avantage pour les CSM(LPS)** **CSM(LPS) : Annulent l'effet bénéfique des CSM non stimulées sur les manifestations cliniques de la colite.**	197
CSM (Thymus)	**LPS (1µg/ml) / Poly I:C (50ng/ml), pendant 24h/48h/72h**	**Au temps 72h : Augmentation de l'expression du facteur de régulation pro-inflammatoire TSP-1** **Exosomes issus de CSM(LPS) : Induction de la polarisation des macrophages M1, de la différentiation des LT CD4+ en LTh1/LTh17 et de la sécrétion d'IL-6 et de TNFα**	198
CSM(CO)	**Poly I:C (10µg/ml) / LPS (1µg/ml) / R848(3µg/ml) / CpG(2µg/ml) pendant 6h/12h ou 24h**	**CSM (Poly I:C) : Augmentation de l'expression de COX2/IDO/IL-6/IL-8** **Amélioration de la survie d'un modèle murin de sepsis (CLP)** **CSM(LPS/R848) : Augmentation du taux d'IL-6**	127

CSM MO (sternum jeunes chevaux)	IL-1β (10/20ng/ml) / TNFα (10/20ng/ml) / IFNγ (50/100ng/ml), 6h/24h	CSM (TNFα, 6h) : Augmentation de p65 et de la sécrétion d'IL-6 CSM(IFNγ/IL-1β) : Augmentation de l'expression de CD40 CSM(IFNγ) : Expression de l'ARN IDO + de la sécrétion de CXCL10 CSM(IL-1β) : Augmentation de la sécrétion de CXCL1/IL-6/CXCL8	322
CSM	TGF-β1 (5ng/ml) / IL-4 (10ng/ml) / IL-10 (50ng/ml), 24h	CSM(TGF-β1) : induction de l'adressage tissulaire ciblé au sein de l'épithélium hépatique *via* une augmentation de l'expression de CXCR3 Augmentation des capacités inhibitrices sur la prolifération des LT CD4+ et de la sécrétion de PGE2 Diminution de l'inflammation et de la nécrose hépatique dans un modèle murin	254
CSM(MO) / CSM(TA) / CSM (Pulpe dentaire) / CSM(CO)	Dexaméthasone (1000ng/ml, 2000ng/ml, 3000ng/ml, pendant 24h/48h)	Augmentation des marqueurs souches (Oct-4, Sox-2, Nanog, Klf-4) Augmentation des molécules immunomodulatrices (PGE2, IDO, HLA-G) CSM(CO) + CSM (Pulpe dentaire) : augmentation des capacités immunomodulatrices en MLR	251
CSM murines	Antagoniste PPARβδ (GSK0660) 0,1/1µM ou agoniste PPARβδ (GW0742) 0,1/1µM pendant 24h	CSM (agoniste PPARβδ 0,1) : Effet anti-apoptotique sur les cardiomyocytes et les cellules endothéliales *via* une augmentation de l'expression de Bcl2 et une résistance au stress oxydatif Après injection de CSM (agoniste PPARβδ 0,1), dans un modèle *ex vivo* d'infarctus du myocarde : même efficacité cardioprotectrice que des CSM non stimulées Effet contraire des CSM (antagoniste PPARβδ)	247
CSM(TA)	LPS (100ng/ml, 24h) / TNFα (10ng/ml, 24h)	Augmentation de la sécrétion d'IL-6, IL-8 et de MCP-1 CSM (LPS) : Augmentation de la survie des rats diabétiques	143
CSM(MO)	Pamidronate (5µM, 16h) / LPS (10ng/ml, 1h) / Pamidronate + LPS	CSM Pamidronate / CSM LPS : Pas d'augmentation de la prolifération des LT CSM Pamidronate + LPS : Augmentation du nombre de LT viables	138
CSM(MO) murines	TNFα + LPS (20ng/ml + 1-20ng/ml, 72h)	Diminution de l'expression des marqueurs M2 (Arg1/CD206) et augmentation des marqueurs M1 (TNFα/IL-1RA) Augmentation des capacités immunomodulatrices envers les macrophages Augmentation de la différenciation ostéogénique	210
CSM(TA)	IFNγ + TNFα (10ng/ml + 15ng/ml, 72h)	Augmentation de RAB27B entraînant une augmentation de la sécrétion de VE contenant deux médiateurs d'immunopotence (A20+TSG-6) VE inhibant la prolifération des LT CD4+	181
CSM(CO)	IFNγTNFα (24h)	Augmentation de l'activité glycolytique des CSM avec une consommation rapide du glucose Activation de la voie PI3K-Akt et augmentation de l'expression de IDO et TSG-6 dépendante de la reprogrammation glycolytique Amélioration thérapeutique d'un modèle murin de colite	202
CSM(CO)	IFNγTNFα (50ng/ml + 20ng/ml, 24h)	Augmentation de l'expression de IDO et de TRAIL résultant en un effet pro-apoptotique Elimination des cellules cancéreuses dans un modèle murin de leucémie aiguë myéloïde	204
CSM(GW)	IFNγ + TNFα (20ng/ml + 30ng/ml, pendant 48h)	Expression de PD-L1 et sécrétion de PGE2, d'HGF, du TFG-β1, de l'IL-6 et de PD-L1 soluble	154
CSM(CO)	IFNγTNFα (20ng/ml + 20ng/ml, 24h)	Augmentation de la polarisation en M2 *via* une augmentation de la sécrétion de CCL2 + IL-6 et de leur phagocytose Augmentation de la migration des M2 vers les zones de lésions cutanées dans un modèle murin	151
CSM(TA)	IFNγ (10ng/ml) + TNFα (15ng/ml), 72h	Milieu conditionné : Augmente le remodelage de la MEC, diminution du taux de collagène I et de fibronectine au niveau de la culture d'explants pulmonaires Augmentation des protéines anti-fibrotiques (DKK1, MMP-1, MMP-3)	263

CSM(TA)	**IFNγ (10ng/ml) + TNFα (15ng/ml), 24h**	**Augmentation de l'expression des molécules immunomodulatrices (COX2, IDO, TSG-6)** ***In vivo*** **dans un modèle murin de lésions pulmonaires aiguë : les VE atténuent le taux de cytokines pro-inflammatoires et le recrutement immunitaire** **Dans des cellules infectées au SARS-CoV-2 : les VE diminuent la réponse inflammatoire notamment *via* le miR-221-3p**	260
CSM(MO) murines	**IFN+ Poly I:C (100ng/ml + 10µg/ml, 24h)**	**Augmentation de l'expression d'IDO, du taux de LT régulateurs** **Diminution de l'infiltration de cellules immunitaires dans les organes lymphoïdes + du taux de cytokines pro-inflammatoires (IL-1β, TNFα, IL-6, MCP-1) dans le tissu colique** **Diminution de l'index d'activité pathologique, de la perte de poids, des dommages tissulaires, et augmentation des cellules de Paneth dans un modèle murin de colite**	77
CSM(CO)	**TGF-β1 + IFNγ (10ng/ml + 1000IU/ml, 72h)**	**Exosomes dérivant de ces CSM : Augmentation de la proportion de LT régulateurs, dépendante de IDO**	211
CSM (sang de CO)	**IL-1β + IFNγ (5ng/ml + 20ng/ml, 24h)**	**Diminution de la prolifération des CMN et de la différenciation des LTh1** **Augmentation de la sécrétion d'IDO et de PGE2** **Augmentation des LT régulateurs**	168
CSM(MO) murines	**IFNγ + IL-1β (30ng/ml + 3ng/ml, 24h)**	**Augmentation de la sécrétion de NO, d'IL-6 et de PGE2** **Diminution de la polarisation en M1 et de la sécrétion d'IFNγ**	206
CSM(CO)	**IFNγ + TNFα (20ng/ml + 10ng/ml, 24h) / 2DG (5mM) / Oligomycine (1µg/ml)**	**CSM (Oligomycine) : induction d'un switch glycolytique augmentant leurs capacités immunosuppressives** **CSM (2DG) : inhibition de la glycolyse entraînant une diminution des capacités immunosuppressives**	304
CSM (muqueuse nasale) + CSM(MO)	**IFNγ (1000U/ml) + TNFα (1000U/ml) ± IL-1β (10ng/ml), 24h**	**Augmentation de l'expression de PD-L1** **Exosomes dérivant de ces CSM : Augmentation des capacités immunosuppressives envers les LT et induction des LT régulateurs de manière PD1 dépendante** **Réduction du score clinique et augmentation de la survie d'un modèle murin de GvHD**	218
CSM(MO) murines	**IL-17 + IFNγ + TNFα (10ng/ml + 10ng/ml + 10ng/ml, 12h)**	**Diminution de l'infiltration et de la prolifération des LT dans les lésions hépatiques dans un modèle murin d'hépatite**	208
CSM(MO) murines	**IL-17 + IFNγ + TNFα**	**Augmentation de l'expression de PD-L1 et des capacités immunosuppressives des CSM, entraînant la progression de la tumeur dans un modèle murin**	213
CSM(CO)	**IFNγ/TNFα/ IFNγ + TNFα/IL-1β/IL-6/GM-CSF/Cytomix (10ng/ml, 48h)**	**Augmentation de IDO et de l'inhibition de la prolifération des LT dans les conditions IFNγ/TNFα/IFNγ + TNFα**	229,242
CSM (TA)	**TNFα (15ng/ml) + IFNγ (10ng/ml) + CTGF (10ng/ml) ± ocytocine (1nM), 72h**	**CSM (cytomix + ocytocine) : Augmentation des gènes à activité immunomodulatrice et régénérative** **Induction de la polarisation des macrophages vers un profil M2**	244
CSM(CO)	**Cytomix : IL-1β (50ng/ml), TNFα (50ng/ml), IFNγ (50ng/ml) pendant 24h**	**Augmentation de l'oxygénation pulmonaire, du taux d'IL-4 dans le LBA** **Diminution du nombre de bactéries, du taux d'IL-6 dans le LBA et du nombre de neutrophiles infiltrants dans un modèle pneumosepsis de rat**	144

Préconditionnement des CSM à partir d'une molécule

Préconditionnement des CSM avec 2 molécules combinées

Préconditionnement des CSM avec au minimum 3 molécules combinées

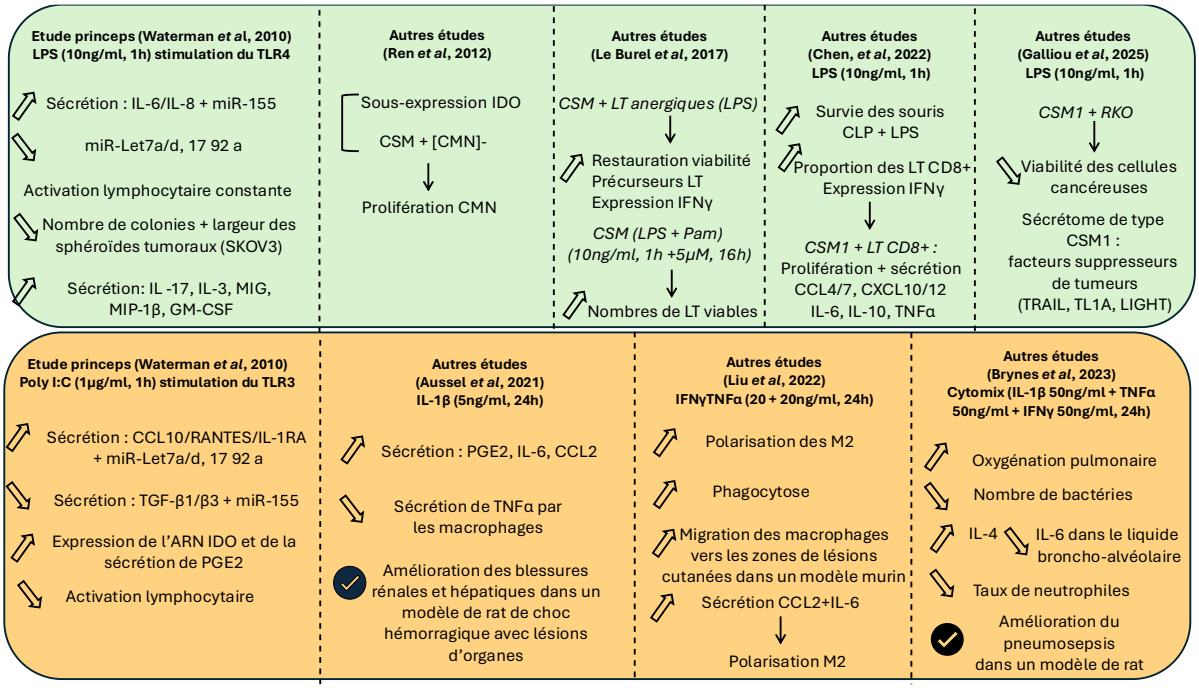


Figure 7 : Synthèse des principales études mettant en avant le rôle pro- ou anti-inflammatoire de CSM préconditionnées ou non.

4) Voies de signalisation à l'origine des différents phénotypes immunitaires des CSM

Les préconditionnements biochimiques décrits ci-dessus vont conduire au déclenchement de voies de signalisation intracellulaires influençant le phénotype immunitaire des CSM.

Certains préconditionnements décrits auparavant consistent en des ligands des récepteurs TLR, appartenant à la famille des PRR (*Pattern Recognition Receptors*) (Tableau 3). Ces récepteurs sont constitués d'un domaine extracellulaire, capable de fixer spécifiquement le ligand, d'un domaine transmembranaire, permettant l'ancrage du récepteur, ainsi qu'un domaine intracellulaire, permettant le recrutement de protéines adaptatrices nécessaires au déclenchement de la voie de signalisation intracellulaire[162] (Tableau 3).

Tableau 3 : Description des différents TLR stimulés dans notre étude[167].

Récepteurs	Adaptateurs	Localisation	Ligands synthétiques utilisés	Ligands naturels	Origine des ligands naturels
TLR3	TRIF	Endosome	Poly I:C	Double brin d'ARN	Virus
TLR4	MyD88+TRIF+MD-2	Membrane plasmique	LPS	Lipopolysaccharide	Bactéries
TLR7/8	MyD88	Endosome	R848	Simple brin d'ARN	Virus

Ces récepteurs après reconnaissance de leur ligand, s'activent et une cascade de signalisation se met en place et active des facteurs de transcription tels que AP-1, IRFs ou NF-kB[164]. Dans cette partie seront décrites uniquement les voies de signalisation découlant des préconditionnements au LPS, au R848, au Poly I :C (Figure 8) et à l'IFNγTNFα, utilisés dans ce projet.

Le LPS peut se fixer aux récepteurs TLR4 situés en surface des cellules. Cette fixation va entraîner un ensemble d'activations protéiques conduisant à une modification du comportement cellulaire. C'est ce que l'on appelle une cascade protéique, le plus souvent dépendante des protéines de type kinases capables de phosphoryler une cible et d'aboutir à l'activation d'un facteur de transcription régulant l'expression de gènes cibles.

Dans le cadre du TLR4, la fixation du LPS est dépendante de la protéine adaptatrice MD-2. Le trimère LPS/TLR4/MD-2 formé va activer deux voies de signalisation, l'une dépendante de la protéine MyD88 et l'autre indépendante de cette protéine. Dans le cas de la voie dépendante de MyD88, la dimérisation des domaines TIR du TLR4 va recruter les protéines adaptatrices MyD88 et TIRAP et phosphoryler les protéines IRAKs. Ces protéines activées vont fixer TAK1 à l'aide de TRAF6 et TAB2/TAB3. TAK1 va activer les MAPKs (JNK, ERK1/2, p38) et le complexe IkB Kinase (IKK) et activer les facteurs de transcription NF-kB ou AP-1 et ainsi promouvoir la production de cytokines pro-inflammatoires. Concernant la voie indépendante de MyD88, le recrutement de TRAM/TRIF va activer la protéine TBK1 permettant la phosphorylation de IRF3, facteur de transcription permettant la production d'IFN de type I[162].

Concernant les TLR3, leur activation par le Poly I :C, va permettre le recrutement de la protéine TRIF. La transduction du signal va être opérée par TRAF3/6 puis par les protéines TANK, TBK1, IKK, RIP-1, NAK, NAP1 et activer les facteurs de transcription IRF3/7, NF-kB et AP-1 conduisant à la production d'IFN de type I et de cytokines/chimiokines pro-inflammatoires.

Il est à noter que la voie du TLR3 est indépendante de MyD88 et peut aussi activer les protéines suivantes : PI3K, MAPK, ERK, JNK[166].

Concernant les TLR7/8, la fixation du R848 déclenche une voie dépendante MyD88 avec le recrutement des kinases IRAK1/4 phosphorylant TRAF3/6 et IKKα qui vont phosphoryler à leur tour le facteur de transcription IRF7 responsable de la production d'IFN de type I et de cytokines pro-inflammatoires (IL-6, IL-12, TNFα)[167,169,170].

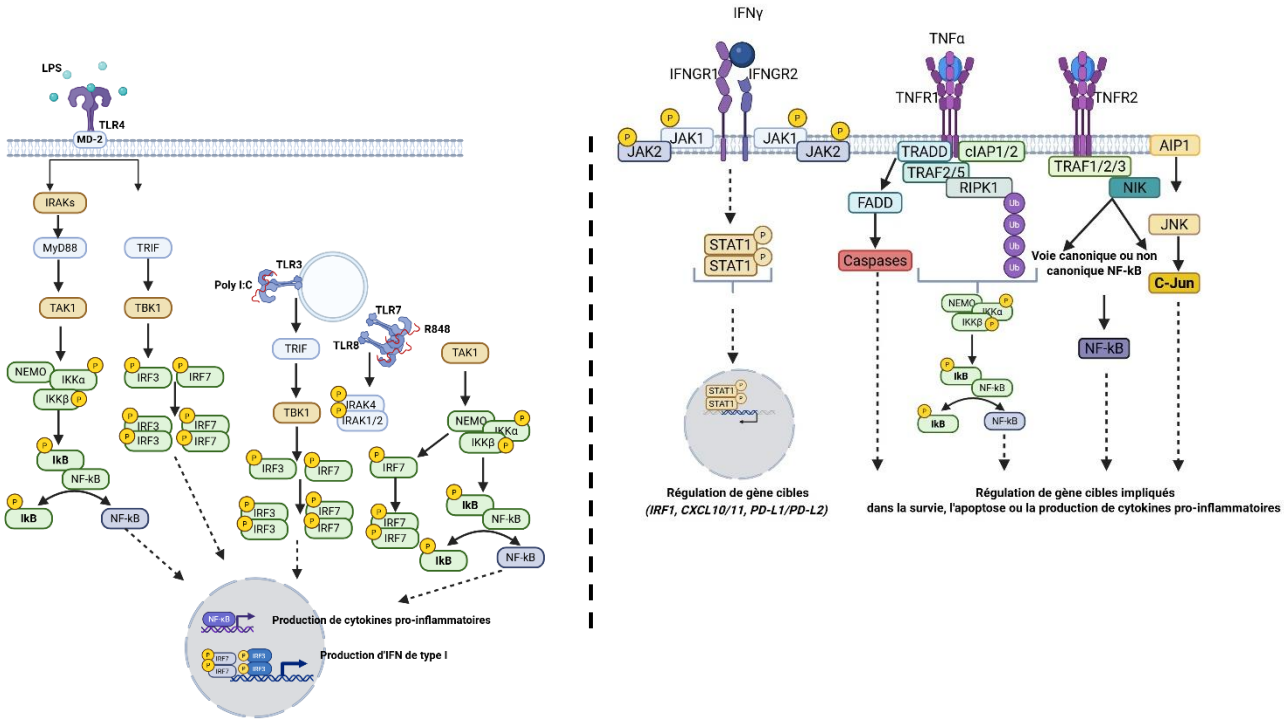


Figure 8 : Différentes voies de signalisation découlant de l'activation des TLR 3/4/7-8 et des récepteurs de type I et II à l'IFNγ et au TNFα ([331]).

Concernant les molécules de préconditionnements IFNγ et TNFα, utilisées dans cette étude, l'IFNγ va se fixer à ses récepteurs de type I et de type II (IFNGR1/IFNGR2) pour former un dimère activant le récepteur en question. Les protéines JAK1/JAK2, associées aux récepteurs, vont alors s'activer *via* une transphosphorylation et recruter puis phosphoryler le dimère STAT1 qui va migrer dans le noyau et agir en tant que facteur de transcription et activer des cibles telles que IRF1, CXCL10/11, PD-L1/PD-L2… [171,173,174,176].

Le TNFα, lui, va se fixer soit sur son récepteur membranaire TNFR1, exprimé de manière ubiquitaire, où sur son récepteur membranaire TNFR2. Le TNFα peut aussi se fixer sur son récepteur intracellulaire, dont l'expression est restreinte aux cellules endothéliales, aux cellules immunitaires, aux cellules neuronales et aux CSM.

Certains auteurs ont mis en évidence que la voie TNFα-TNFR2 constituait un point de contrôle immunitaire (checkpoint immunitaire) indispensable, impliqué dans l'effet immunomodulateur des CSM envers les LT.

Après fixation du TNFα au récepteur trimérique TNFR1, le domaine DD peut recruter la protéine adaptatrice TRADD. Cette dernière sert de support pour le recrutement d'autres protéines de signalisation comme TRAF2/5, RIPK, cIAP1/2, qui forment le complexe de signalisation central. Après une série d'ubiquitinations et le recrutement d'autres facteurs constituant le complexe II, les facteurs de transcription NF-kB, JNK et p38 sont activés permettant la production de cytokines et de facteurs impliqués dans la survie cellulaire ou l'apoptose.

Lorsque le TNFα se fixe au récepteur TNFR2, deux voies de signalisation, l'une canonique et l'autre non-canonique, peuvent se mettre en place avec le recrutement des protéines suivantes : TRAF/cIAP1/2, NIK. L'accumulation de la protéine NIK conduit à l'activation non canonique de la voie NF-kB alors que l'ubiquitination et le recrutement de TAK1 et NEMO mènent à l'activation de la voie canonique de NF-kB[178].

Ces voies de signalisation complexes, déclenchées suite à un stimulus, dans notre cas les molécules de préconditionnement, vont permettre aux CSM d'adapter leur phénotype en fonction de leur environnement inflammatoire.

V. Les CSM de la gelée de Wharton (CSM(GW))

1) Localisation des CSM(GW)

Le cordon ombilical est une structure se développant au 26ème jour de la grossesse établissant un lien entre le placenta et le fœtus. En moyenne un cordon pèse 40g, mesure 30cm avec un diamètre de 1,5 cm. Le cordon ombilical est composé de deux artères ombilicales participant à l'apport d'oxygène et de nutriments indispensables au développement du fœtus et d'une veine ombilicale permettant l'évacuation des déchets métaboliques qui seront ensuite filtrés par le placenta avant d'être évacués par la circulation sanguine de la mère. Autour de ces tissus se localise la gelée de Wharton (GW) (Figure 9)[180].

La gelée de Wharton se définit comme un tissu conjonctif périvasculaire de type mucoïde ou muqueux à la jonction entre l'épithélium amniotique et les vaisseaux ombilicaux. Il a été décrit pour la première fois par Thomas Wharton en 1656 comme étant un tissu protégeant les vaisseaux sanguins ombilicaux de la compression, de la torsion vasculaire et permettant le maintien du flux sanguin entre la mère et le fœtus[182].

La gelée de Wharton est composée de différents stromas, le stroma subamniotique, les fentes, le stroma intervasculaire et le stroma périvasculaire[180]. Ce tissu conjonctif ne contient par d'autres vaisseaux que ceux qu'il entoure et n'est pas innervé.

Comme tout tissu conjonctif, la GW est composée de cellules entourées de MEC qu'elles ont elles-mêmes générée. Cependant, la GW ne comporte qu'un nombre restreint de types cellulaires à savoir des myofibroblastes et leurs précurseurs, des mastocytes et des CSM qui sont retrouvées à hauteur de 45% dans la zone périvasculaire, zone décrite comme étant la plus riche en cellules.

La GW est composée à 95% de MEC contenant des fibres de collagène majoritairement de type I et de type III[184], des protéoglycanes de type chondroïtine sulfate ou dermatane sulfate[187], des glycoprotéines, des glycosaminoglycanes (GAG) dont 70% d'acide hyaluronique et 30% de GAG sulfatés comme de la kératane sulfate, mais aussi des protéines plasmatiques diffuses[189]. Les cellules de la GW ont été isolées pour la première fois par McElreavey *et al*. par la méthode des explants reposant sur une migration spontanée des cellules stromales adhérentes, contenues dans les fragments de GW vers le contenant de culture en plastique utilisé[191].

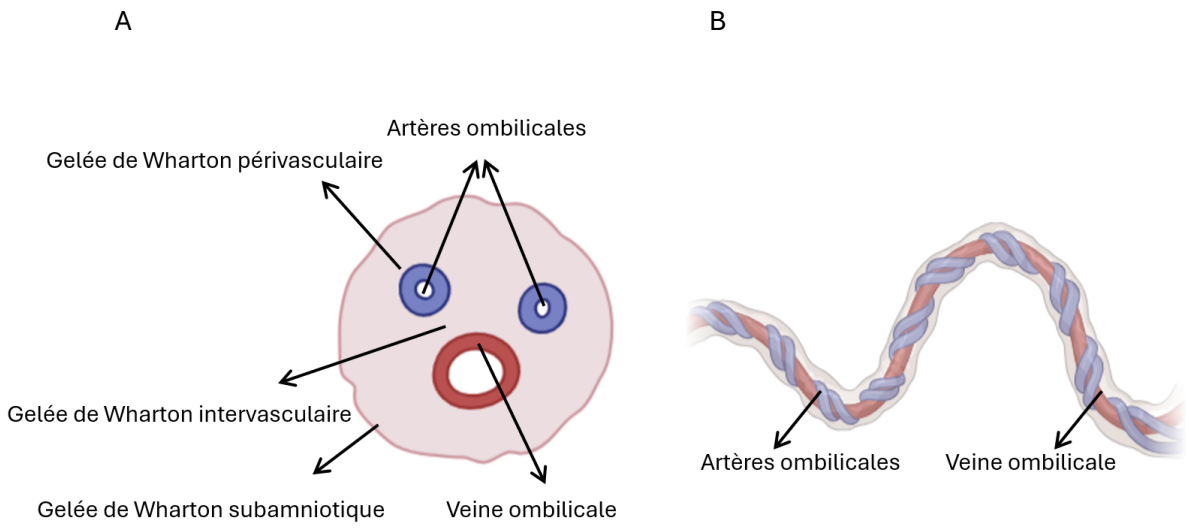


Figure 9 : Organisation du cordon ombilical humain. (A) Coupe transversale mettant en avant les différentes zones de la gelée de Wharton. (B) Aspect général du cordon ombilical mettant en avant les vaisseaux ombilicaux.

2) Propriétés des CSM(GW)

Les CSM(GW) conservent les mêmes caractéristiques que celles des CSM. Si au sein de certains tissus les CSM présentent des marqueurs spécifiques, comme par exemple, les CSM endométriales qui expriment spécifiquement CD140/CD146[20], aucun marqueur n'a été, à l'heure actuelle, décrit comme spécifique aux CSM issues de la gelée de Wharton.

Ces CSM issues de tissus extra-fœtaux présentent de nombreux avantages comme une facilité d'obtention contrairement au CSM de MO dont l'extraction est invasive et douloureuse[193].

Concernant les capacités fonctionnelles des CSM, il est important de noter que celles-ci varieront selon leur tissu d'origine.

Les CSM(GW) présentent des capacités de différenciation adipocytaire et ostéogénique réduites par rapport aux CSM de tissus adultes[195,197], alors que leur capacité à induire des chondrocytes est plus élevée que les CSM(MO) *via* une production plus accrue de GAG et une augmentation des marqueurs ARN chondrogéniques tels que Sox9, COL2a1 et ACAN[199].

Au sein d'un hydrogel, la différenciation chondrogénique des CSM(GW), sur le plan phénotypique et fonctionnel (synthèse de MEC), était supérieure au CSM(MO) notamment sur l'expression de collagène de type II[201]. La source tissulaire des CSM n'influence pas uniquement les capacités de différenciation mais aussi les capacités immunomodulatrices.

Il a été montré que les CSM(GW) présentaient de meilleures capacités immunosuppressives en comparaison aux CSM(MO), aux CSM(TA) ou aux CSM (Pulpe dentaire) en inhibant plus fortement la prolifération des CMN, en favorisant le taux de LT régulateurs et en sécrétant plus de facteurs immunomodulateurs comme PGE2[203,207].

Il a également été montré que les CSM(GW) exprimaient davantage des protéines immunomodulatrices comme HLA-G6, l'enzyme IDO et la PGE2, et ce en comparaison aux CSM(MO) ou aux CSM(TA). Les CSM(GW) peuvent aussi inhiber la prolifération des LT, induire la prolifération des LT régulateurs, diminuer la différenciation des monocytes en cellules dendritiques matures et inhiber l'expression des molécules de costimulation au niveau des CPA afin de diminuer la présentation antigénique. Cela est possible soit par contact direct ou *via* leurs sécrétions[193]. Ces cellules sont aussi capables de sécréter des cytokines anti-inflammatoires comme l'IL-10, le TGF-β ou l'IL-6 ainsi que le facteur de croissance VEGF intervenant dans leurs propriétés immunomodulatrices[11].

Peu de publications ont montré le rôle des CSM(GW) sur les LB mais certaines ont mis en évidence que les CSM(GW) pouvaient diminuer leur prolifération ainsi que leur différenciation en plasmocytes sécréteurs d'anticorps permettant de limiter le taux d'anticorps produits[205]. D'autres études ont montré que les CSM(GW) inhibaient significativement plus la prolifération des CMN en comparaison aux CSM(TA) et aux CSM (Pulpe dentaire)[207].

Par ailleurs, les CSM(GW) sont considérées comme des cellules plus immatures que les CSM de tissus adultes avec une capacité de prolifération plus élevée que celle des CSM adultes et un temps de doublement de population plus court[197]. Contrairement aux CSM d'origine adulte, les propriétés des CSM(GW) maintiennent une origine embryonnaire et ne subissent pas l'impact de l'âge. En effet, il a été montré que l'âge des donneurs influençait les capacités prolifératives des CSM(MO) et que plus l'âge du donneur était élevé, plus la prolifération des CSM était faible (CSM majoritairement en phase S du cycle cellulaire), avec un temps de doublement moyen plus long et une qualité réduite[209,212].

De plus, utiliser des CSM issues de donneurs âgés augmentent le risque qu'elles deviennent sénescentes et qu'elles expriment des gènes associés aux tumeurs, rendant leur utilisation en clinique plus dommageable[214].

Les facteurs obstétricaux relatifs à la parturiente, au travail durant l'accouchement et au nouveau-né ont été décrits comme influençant le comportement des CSM d'origine fœtale. Une étude ciblant 27 paramètres obstétricaux a mis en évidence que certains d'entre eux influençaient la prolifération et la différenciation des CSM(GW). Parmi eux le poids à la naissance, le nombre de semaines d'aménorrhée, le poids du placenta, une absence de prééclampsie peuvent être considérés. Des CSM(GW) issues de nourrissons sains et d'une grossesse à terme présentent des capacités de prolifération augmentées[215]. L'élaboration de facteurs obstétricaux permettant une sélection optimale de donneurs de cordons ombilicaux s'est poursuivie, dans la littérature, mettant en avant que le poids à la naissance ainsi que l'âge gestationnel étaient positivement corrélés au rendement des CSM(GW). Les paramètres suivants, à savoir le nombre d'accouchements antérieurs, le sexe du nouveau-né et la présentation fœtale lors de l'accouchement, n'avaient, quant à eux, aucun impact sur le rendement des CSM(GW)[217]. De surcroît, un âge maternel élevé, un pH plus faible du sang de cordon étaient associés à un accouchement plus précoce, un poids à la naissance plus faible et une expression plus élevée du gène de pluripotence Sox2 dans les CSM(GW)[219]. Au sein de ces deux études l'âge de la mère entrait aussi en jeu dans le comportement des CSM(GW) et un âge relativement jeune permettait une meilleure prolifération et pluripotence des CSM(GW)[219,217].

Bien que l'âge de la mère puisse influencer la qualité des CSM périnatales, ces CSM extra-embryonnaires conservent un avantage considérable avec une sénescence plus tardive en comparaison aux CSM adultes. De plus, au sein de ces CSM adultes, l'expression des gènes de pluripotence Nanog, Oct4 et Sox2 était diminuée. Gao *et al*. ont montré une diminution de l'expression de PD-L1 dans les CSM(MO) en sénescence alors que ce gène était surexprimé dans les CSM issues de tissus périnataux[222].

Enfin, un autre avantage propre aux CSM(GW) réside dans leur statut immunologique envers les autres cellules immunitaires. En effet, les CSM(GW) expriment peu de molécules de classe I du CMH, pas de molécules de classe II du CMH et expriment plus de molécules de tolérance immunitaire comme HLA-G, faisant des CSM(GW) un candidat privilégié dans la greffe allogénique, contrairement à certaines CSM adultes entraînant une réaction anticorps spécifique contre la molécule HLA de classe I à hauteur de 34% chez des patients allogreffés[227,11,224].

Les nombreux avantages fonctionnels des CSM(GW) décrits ci-dessus, expliquent pourquoi ces CSM font l'objet d'une étude accrue depuis ces dernières années. Cependant d'autres critères non négligeables entrent aussi en compte comme (i) un approvisionnement facilité par la récurrence des naissances, (ii) un prélèvement du cordon non invasif en comparaison aux dons de moelles osseuses saines assez rares et invasifs.

Toutefois, il est à noter que les tissus périnataux ne sont plus considérés comme des déchets opératoires pouvant être prélevés sans consentement formel. Depuis la loi de bioéthique datant de 2011, ils peuvent être récoltés, à des fins scientifiques ou thérapeutiques, uniquement après le consentement éclairé de la parturiente. Le Comité d'éthique a également rappelé le caractère anonyme et gratuit du don visant à alimenter des banques publiques à usage allogénique (loi n°2011-814 du 7 juillet 2011).

VI. Utilisation des CSM en thérapie cellulaire

1) Intérêt des CSM en thérapie cellulaire

L'ensemble des caractéristiques des CSM décrites précédemment justifie l'intérêt des CSM en thérapie cellulaire dans le traitement de pathologies résistantes aux traitements conventionnels. Leur faible immunogénicité permet l'utilisation de CSM allogéniques prêtes à l'emploi, utilisables pour plusieurs personnes et réduisant les délais importants de production liés aux produits autologues[229].

Si les stratégies thérapeutiques basées sur l'utilisation de cellules ont vu le jour dans les années 1980, ces thérapies ne cessent de progresser avec une utilisation de cellules souches dans le traitement de pathologies génétiques, neurodégénératives ou inflammatoires mais aussi avec le développement de stratégies antitumorales basées sur l'utilisation de CAR-T, lymphocytes T génétiquement modifiés afin d'exprimer à leur surface un récepteur antigénique chimérique spécifique à un antigène tumoral, permettant de détruire les cellules cancéreuses de manière ciblée[233].

Par la suite, uniquement les thérapies basées sur l'utilisation de CSM seront évoquées.

Le premier essai clinique utilisant des CSM remonte à 1995 par Arnold Caplan et seulement neuf autres essais cliniques ont été recensés dans les 10 années suivantes. La plus forte augmentation a eu lieu dans les années 2006-2022 avec plus de 500 essais cliniques répertoriés.

L'une des raisons à cette hausse des essais cliniques impliquant des CSM a été la pandémie de COVID-19, où de nombreuses études ont souligné l'intérêt des CSM dans le traitement de cette pathologie[12] avec 53 essais cliniques répertoriés sur « ClinicalTrials.gov » en 2025. Toujours d'après « ClinicalTrials.gov », 682 essais cliniques impliquant des CSM ou des VE issues de CSM sont en cours dans le monde en avril 2026.

L'ensemble de ces essais cliniques impliquant les CSM recouvre un large spectre de pathologies telles que : les maladies cardiovasculaires, la COVID-19, les maladies arthritiques, la maladie de Crohn, le sepsis, le choc septique, la maladie du greffon contre l'hôte (GvHD)... (Figure 10).

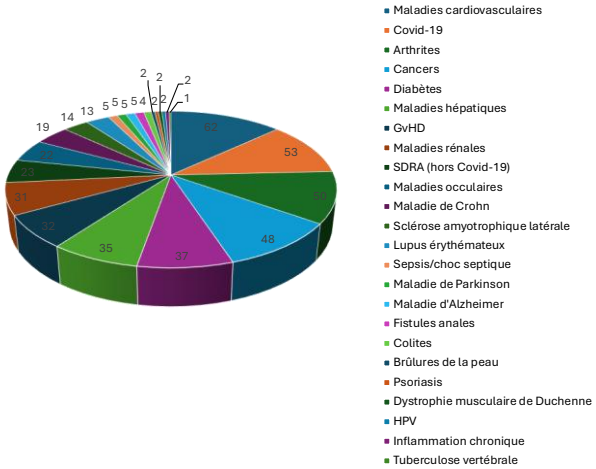


Figure 10 : Répartition de l'utilisation des CSM au sein des essais cliniques par pathologies (répartition en nombre d'essais cliniques répertoriés sur « ClinicalTrials.gov »).

2) Les CSM en tant que médicament de thérapie innovante

Les médicaments de thérapie innovante (MTI) ou ATMP (Advanced Therapy Medicinal Products) sont des produits médicaux, basés sur l'utilisation de gènes, de tissus ou de cellules, proposés comme une nouvelle approche thérapeutique dans le traitement de certaines pathologies.

Selon « European Medicines Agency » (EMA), les ATMP de type « thérapie par cellules somatiques » doivent répondre aux critères suivants (i) les cellules doivent avoir subi une manipulation substantielle, (ii) les cellules ne doivent pas être utilisées dans leurs fonctions initiales, (iii) ces cellules doivent être utilisées pour soigner, diagnostiquer ou prévenir une pathologie, (iv) les propriétés thérapeutiques de ces cellules doivent être liées à une action métabolique, immunologique ou pharmacologique. Selon l'ensemble de ces critères, les CSM peuvent être considérées comme des MTI/ATMP. Les thérapies basées sur l'utilisation de CSM ont été classifiées comme ATMP après la publication de la directive européenne 2003/63/EC (European Medicines Agency)[236].

Actuellement, aucun MTI à base de CSM n'a obtenu d'autorisation de mise sur le marché (AMM) en Europe et seulement une dizaine de produits à base de CSM ont été mis sur le marché entre 2011 et 2025 dans le monde (Tableau 4). Le premier MTI à base de CSM issues de sang de cordons ombilicaux, nommé Cartisem®, a été autorisé en Corée de Sud. Ces CSM allogéniques « prêtes à l'emploi » sont indiquées dans le traitement de lésions arthrosiques de grade IV. Par la suite, les instances réglementaires coréennes ont autorisé la commercialisation d'HeartiCellgram® à base de CSM(MO) autologues pour le traitement post-infarctus du myocarde.

Après utilisation de ce produit de thérapie cellulaire, les patients présentaient une amélioration de 6% de la fraction d'éjection ventriculaire gauche six mois après l'injection. Trois autres produits contenant des CSM ont été autorisés en Corée du Sud, (i) Queencell®, un produit composé d'une fraction de stroma vasculaire incluant un ensemble de type cellulaire dont des CSM(TA) autologues afin de traiter des tissus sous-cutanés endommagés, (ii) NeuroNata-R®, un produit de thérapie basé sur des CSM(MO) autologues afin de diminuer la neuroinflammation et ainsi la progression de la sclérose latérale amyotrophique (SLA) et (iii) Cupistem®, un produit composé de CSM(TA) autologues afin de traiter des fistules chez des patients atteints de la maladie de Crohn. Le traitement Cupistem® a permis, chez 82% des patients traités, une guérison complète de ces fistules après 8 semaines de traitement. Au Japon, deux produits ont été autorisés (i) TEMCELL HS® composé de CSM(MO) allogéniques afin de traiter la GvHD chez l'enfant et Stemirac® un produit conçu avec des CSM(MO) autologues, approuvé sous un statut conditionnel et limité dans le temps pour le traitement des lésions de la moelle épinière.

En 2025, une demande d'approbation complète a été déposée auprès des autorités japonaises. En Inde, le Stempeucel® composé de CSM(MO) allogéniques a été autorisé pour le traitement des ischémies des membres causées par la maladie de Buerger et la maladie artérielle périphérique athérosclérotique afin de rétablir la circulation sanguine dans les tissus[238].

Enfin un produit de thérapie basé sur l'utilisation de CSM allogéniques, nommé Prochymal® a été autorisé au Canada pour le traitement de la GvHD chez des enfants, seulement en l'absence de traitements de premières intentions satisfaisants[241]. De manière surprenante, les Etats-Unis, l'un des pays le plus fournisseur d'essais cliniques, n'autorisent qu'un seul médicament, le Remestemcel-L®, composé de CSM(MO) allogéniques dans le traitement de la GvHD chez des patients pédiatriques.

En Europe, la suspension injectable de CSM(TA) allogéniques Alofisel® a obtenu une AMM en 2018 afin de traiter des fistules périanales chez des adultes atteints de la maladie de Crohn. Cependant ce médicament a fait l'objet d'un retrait du marché de l'Union Européenne en raison de l'absence de bénéfices cliniques suffisants (« médicaments.gouv.fr »).

Tableau 4 : Description des produits de thérapie cellulaire basés sur l'utilisation de CSM et commercialisés.

Nom du Produit	Pays d'autorisation	Tissu d'origine des CSM	Provenance des CSM injectées	Application
Cartistem®	Corée du Sud	CSM (de sang de CO)	Allogénique	Ostéoarthrite
HeartiCellgram®	Corée du Sud	CSM(MO)	Autologue	Infarctus du myocarde
QueenCell®	Corée du Sud	Fraction de stroma vasculaire avec CSM(TA)	Autologue	Dommages des tissus conjonctifs
NeuroNata-R®	Corée du Sud	CSM(MO)	Autologue	SLA
Cupistem®	Corée du Sud	CSM(TA)	Autologue	Fistules (maladie de Crohn)
TEMCELL HS ®	Japon	CSM(MO)	Allogénique	GvHD
Stemirac®	Japon	MSC(MO)	Autologue	Lésions médullaires
Stempeucel®	Inde	CSM(MO)	Allogénique	Ischémie des membres
Prochymal®	Canada	CSM (MO)	Allogénique	GvHD
Remestemcel-L®	USA	CSM(MO)	Allogénique	GvHD

Bien que de nombreuses études cliniques aient montré que l'administration de CSM était sûre et avec peu d'effets secondaires, l'efficacité de ces cellules en thérapie n'a pas été pleinement démontrée notamment en raison de l'hétérogénéité des études (sources de CSM différentes, quantités et nombres d'injections des CSM variables…) et la variabilité de qualité des CSM de la même source, rendant ainsi difficile la comparaison de ces études.

Une autre difficulté réside dans les exigences réglementaires concernant la mise sur le marché de produits de thérapie cellulaire en Europe impliquant entre autres de Bonnes Pratiques de Fabrication (BPF)/ « Good Manufacturing Practices » (GMP), une standardisation, une rigueur des essais cliniques.

Cependant une approche plus flexible basée sur « la balance risque/bénéfice », nommée approche basée sur le risque a été ajoutée à l'Annexe 1, partie IV de la Directive 2001/83/CE telle que modifiée par la Directive 2009/120/CE, permettant ainsi une approche au cas par cas dans le respect des directives scientifiques et réglementaires concernant la qualité, la sécurité et l'efficacité du médicament en question[242,229].

Bien que les CSM en tant que MTI/ATMP soient très prometteuses, le coût d'un tel traitement peut se révéler une limite à leur utilisation. Le traitement Alofisel® coûtait 54 000 euros lors de son AMM et d'autres traitements tels que TEMCELL HS® coûte 104 000 dollars[242,229]. Lors d'une étude de faisabilité clinique de la production de CSM périnatales en grade BPF, le coût et la rentabilité de cette culture ont été calculés. Dans cette étude, le protocole BFP comprenait l'isolation des CSM, le dépistage d'éventuels agents pathogènes, la culture cellulaire et la caractérisation immunophénotypique des CSM conformément aux critères établis par l'ISCT. La modélisation du coût d'une utilisation de CSM en clinique englobait le coût des réactifs, les coûts liés au travail fourni ainsi que le cryo-stockage des CSM. Les résultats de modélisation ont positionné les CSM(CO) comme un bon compromis entre un rendement efficace, une faible contamination au sein de ce tissu et les coûts de process. Le rendement des CSM(CO) s'élevait à 6,5 x 10^6 cellules, soit le plus élevé en comparaison aux autres tissus périnataux avec un coût relativement faible de production de 59,2 dollars[245]. Cependant, le coût de production n'englobe pas l'entièreté du prix d'un tel traitement. En effet, le coût moyen d'un traitement non répété à base de CSM s'étalerait entre 20 000 et 50 000 dollars.

Si la prévalence de maladies chroniques telles que la maladie de Crohn, des désordres cardiovasculaires… risque fortement d'augmenter dans les prochaines années réduisant, de par une production à plus grande échelle des CSM, le coût de ce traitement, cela ne permettra cependant pas à certains pays émergents, avec un système de santé et un budget dédié restreints, de se les procurer[220].

VII. Intérêt des CSM en thérapie

1) Intérêt des CSM dans des pathologies inflammatoires

L'une des pathologies dans laquelle l'intérêt des CSM a été largement étudié est la COVID-19 causée par le coronavirus SARS-CoV-2.

Lors d'un essai clinique de phase I où 5 patients atteints de la COVID-19 ont reçu 3 fois 150 x 10^6 CSM(GW) par injection intra-veineuse avec un suivi sur 14 jours, les auteurs ont montré une diminution du taux des cytokines : VEGF, TGF-β1, IFNγ, IL-6, TNFα ainsi qu'une augmentation de l'IL-10 et de SDF-1 par rapport au groupe contrôle n'ayant pas reçu d'injections de CSM(GW). Cette étude a, notamment, estimé que le moment adéquate pour l'injection de CSM, à savoir lors de la seconde phase de la maladie aussi appelée phase hyper-inflammatoire située entre 7 jours et 15 jours post-infection[136].

Un autre essai clinique randomisé, incluant 41 patients, avait pour but d'évaluer l'efficacité des CSM dans le traitement de la COVID-19 sévère. Pour cela deux groupes avaient été constitués, un groupe contrôle avec un traitement standard et un groupe recevant 2 x 10^6 CSM(CO)/kg en plus du traitement standard. Le traitement standard comprenait (i) une supplémentation en oxygène, (ii) des agents antiviraux, (iii) des antibiotiques, et (iv) des glucocorticoïdes. Cet essai a montré, chez les patients soignés avec des CSM(CO), une amélioration très nette de leur survie à 28 jours post-injection, sans progression de la maladie. Les symptômes cliniques tels que la fatigue, la difficulté à respirer, la saturation faible en oxygène, s'amélioraient 3 jours après l'injection des CSM(CO) avec une significativité à 7 jours par rapport au groupe contrôle. De plus, le taux de CRP et d'IL-6 était significativement diminué également 3 jours post-injection, le taux de lymphocytes revenait à la normal plus rapidement et l'inflammation pulmonaire était réduite en comparaison au groupe contrôle[250].

Enfin, un autre essai clinique randomisé, en double aveugle, de phase I /2a avec 21 participants, impliquant des CSM(CO) dans le traitement du SDRA lié à la COVID-19 a été mené. Les auteurs ont montré que 2 injections de 100 ± 20 x 10^6 CSM permettait de diminuer significativement le taux de cytokines pro-inflammatoires à 6 jours, d'augmenter la survie des patients passant de 42% à 91% ainsi que le temps de récupération[252].

D'autres essais cliniques étudiant le rôle des CSM dans le traitement du SDRA, associé à la COVID-19, ont certes permis de valider la tolérance des CSM injectées aux patients mais sans prouver une réelle efficacité thérapeutique. Un essai clinique de phase II b, STROMA-CoV-2, (enregistré sur « ClinicalTrials.gov » en avril 2020) visait à étudier l'effet des CSM(CO) chez des patients infectés par le SARS-CoV-2 et présentant un SDRA modéré à sévère. Les 45 patients inclus dans cet essai clinique multicentrique, randomisé et en double-aveugle avaient reçu 3 injections intra-veineuses de CSM(CO) à une concentration de 10^6 cellules/kg. Si cette étude a permis de mettre en évidence l'absence d'effets secondaires graves après 28 jours, témoignant de la sûreté des injections de CSM, l'injection de ces cellules n'a pas eu d'effets sur le ratio PaO_2/FiO_2 (Pression partielle d'oxygène/ Fraction inspirée d'oxygène), indicateur de l'amélioration respiratoire, ni sur la mortalité des patients en comparaison au groupe placebo[255]. Une extension de cette étude, à laquelle 19 patients ont participé, a ensuite vu le jour afin de s'assurer de la tolérance de ces CSM injectées sur le long terme. La sureté des CSM a de nouveau été démontré jusqu'à 12 mois post-injection[258].

Les CSM ont aussi fait leur preuve dans d'autres pathologies inflammatoires telles que l'ostéoarthrite. L'efficacité de CSM(CO) (Cellistem®) a été testée dans un essai clinique de phase I (NCT03810521) incluant trois cohortes : des patients recevant une faible dose (2×10^6 cellules), une dose moyenne (20×10^6 cellules) ou une forte dose (80×10^6 cellules) de CSM par injection intra-articulaire. Si la sûreté de l'injection de CSM a, de nouveau, été confirmée, les patients présentaient également une amélioration de leurs symptômes et de leurs douleurs[261].

L'effet thérapeutique des CSM(MO) a aussi été testé lors d'un essai clinique de phase I-II chez 10 patients atteints de la maladie de Crohn. Pour se faire, des CSM(MO) au nombre de 3×10^7 ont été injectées au niveau de la sous-muqueuse de la paroi intestinale sténosée lors d'une iléo-coloscopie. La sureté de l'injection des CSM a été confirmée ainsi que l'efficacité des CSM, à 12 semaines post-injection, capables d'induire la résolution des sténoses chez 7 patients. Cependant aucune amélioration significative des scores cliniques et de l'expression de biomarqueurs inflammatoires (Protéine C-réactive/Calprotectine fécale) n'a été observée[264].

2) Intérêt des CSM dans des pathologies avec une immunoparalysie

Certaines infections sévères peuvent mener à une exhaustion immunitaire des LT, une lymphopénie, une neutropénie ...avec des options thérapeutiques limitées. Un modèle félin d'infection de coronavirus à l'origine d'une péritonite a permis d'évaluer l'efficacité d'un traitement à base de CSM(TA) félines. Après injection des CSM un rétablissement de la réponse immunitaire était observé ainsi qu'une diminution de l'expression de facteurs de transcription impliqués dans l'exhaustion cellulaire[266].

Les CSM ont aussi montré leur intérêt lors d'un déclin des fonctions immunitaires lié à l'âge. En effet, avec l'âge, les cellules immunitaires innées (macrophages, neutrophiles, cellules dendritiques et cellules NK) voient leur nombre et leur fonctions impactés. Cela se manifeste par une augmentation du taux de ces populations malgré leur inefficacité. Le vieillissement de ces cellules entraînerait une réduction de la clairance de pathogènes, de la phagocytose, une altération de la présentation antigénique et de leur cytotoxicité tout en augmentant leurs sécrétions de cytokines pro-inflammatoires. Cette détérioration est encore plus marquée sur les cellules immunitaires adaptatives avec une diminution de la diversité des TCR et des BCR au niveau des LT et des LB, une activation altérée des LT naïfs, la présence de LT mémoires défectueux ainsi qu'une augmentation de la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires[267]. De plus, l'effet des CSM sur la dérégulation de la balance des sous-populations de LT CD8+ a été prouvé dans un modèle de souris âgées avec une faible proportion de LT CD8+ CD28+ prolifératifs au sein de la rate. L'injection de CSM(MO) allogéniques permettait alors d'augmenter le taux de LT CD8+ naïfs et de diminuer le taux de LT CD8+ mémoires (SCM : Stem Cell Memory) notamment *via* une activation de la voie Wnt maintenant le potentiel souche des LT CD8+ naïfs[270,272].

3) Exemple de l'intérêt des CSM dans le sepsis ou le choc septique

Une autre pathologie dans laquelle les CSM pourraient s'avérer essentielles au traitement des patients est le sepsis. Cela explique les 43 essais cliniques répertoriés sur « clinicaltrials.gov » en 2025. De plus, si l'on fait le lien avec notre projet étudiant les phénotypes CSM2/CSM1, ces deux profils pourraient être utiles dans le traitement des différentes phases de cette pathologie.

Si la définition du sepsis ne cesse d'évoluer depuis 1991, la dernière mise à jour en 2021 décrit le sepsis comme une défaillance d'organes causée par une réponse immunitaire excessive face à un agent pathogène[275]. Le forme la plus sévère du sepsis est le choc septique.

Plusieurs critères entrent en jeu dans le diagnostic d'un choc septique : (i) la présence avérée d'un sepsis, (ii) une hypotension nécessitant un apport en vasopresseurs afin de maintenir la pression artérielle supérieure à 65mmHg (afin d'éviter une hypoperfusion tissulaire et une hypoxie), (iii) un taux de lactate sérique supérieur à 2 mmol/L suite à une prise en charge appropriée de l'hypovolémie. Le score SOFA (Sepsis-related Organ Failure Assessment) ou « quick SOFA » permettent d'évaluer rapidement la sévérité de la maladie.

Si le score SOFA est utilisé en première intention, d'autres outils peuvent être utilisés tels que le NEWS (National Early Warning Score) ou le MEWS (Modified Early Warning Score) ayant pour but d'améliorer la qualité de soins des patients.

Ces tests reposent sur plusieurs critères physiologiques tels que : (i) la fréquence respiratoire, (ii) la pression sanguine systolique, (iii) la fréquence cardiaque, (iv) le niveau de conscience, (v) la température corporelle[277].

La pathophysiologie du sepsis est très complexe (Figure 11). En effet, les patients contractant un sepsis présentent des phases concomitantes ou alternées d'hyper-inflammation et d'immunoparalysie. Durant la phase pro-inflammatoire, en réponse à l'agent pathogène, un relargage cytokinique important, aussi appelé « orage cytokinique », se met en place tout comme le relargage de DAMPs (Damage-Associated Molecular Patterns) et des PAMPs (Pathogen-Associated Molecular Patterns) activant les cellules immunitaires[279]. Bien que cette phase hyper-inflammatoire soit dangereuse pour le patient, elle ne conduit pas forcément à son décès.

La phase la plus critique est la phase d'immunoparalysie aussi appelée phase d'immunosuppression ou d'anergie cellulaire. Cette phase découverte en 1996 par Volk *et al*. est caractérisée par l'inefficacité ou la mort des cellules immunitaires effectrices n'assurant pas leur mission de défense de l'organisme[280]. En effet, les cellules de l'immunité peuvent entrer en apoptose créant, notamment, une lymphopénie, caractéristique des chocs septiques, ainsi qu'une diminution des macrophages. Cette phase est aussi caractérisée par la surproduction de cellules immunosuppressives comme les LT régulateurs, les MDSC, les macrophages M2 ainsi que la sécrétion de cytokines anti-inflammatoires dont les plus prédominantes dans le sepsis sont l'IL-4, l'IL-10, l'IL-27, l'IL-37, l'IL-38 et le TGF-β[282]. Une augmentation de l'expression des molécules de « checkpoint » immunitaires telles que PD-1, PD-L1, CTLA-4, TIM-3, LAG3 est typique de cette phase.

Ces molécules sont alors capables d'inhiber le mécanisme de phagocytose des neutrophiles et des macrophages, d'inhiber le relargage de cytokines et de promouvoir l'exhaustion des LT tout en augmentant l'activation des LT régulateurs.

Enfin, une diminution de l'expression d'HLA-DR en surface des cellules immunitaires est observée, faisant d'HLA-DR un biomarqueur d'immunosuppression chez les patients en état de choc septique. En effet, une étude observationnelle sur 30 patients en état de choc septique a montré que l'expression d'HLA-DR au niveau des monocytes était diminuée de 3 fois en comparaison aux patients qui n'étaient pas en état de choc spetique. De plus, un faible pourcentage de monocytes HLA-DR positifs est positivement corrélé à la mortalité des patients septiques[281].

D'autres marqueurs critiques de cette pathologie ont été décrits dans cette étude ; comme une augmentation de l'expression de PD-1 en surface des LT et de CD64 en surface des neutrophiles. Le taux de monocytes HLA-DR+, de LT PD1+ et de neutrophiles CD64+ constitue ainsi une combinaison efficace dans le diagnostic du sepsis[69,285].

L'ensemble de ces mécanismes va augmenter la vulnérabilité des patients aux infections secondaires qui peuvent être létales pour eux. Les patients nécessitant des soins intensifs sur des périodes prolongées développent le plus souvent un PICS (Persistent Inflammation, Immunosuppression and Catabolism Syndrome). Le PICS, participant à la complexité de la pathophysiologie du sepsis, et plus particulièrement les phases anergiques, dénuées de traitements efficaces, font de cette pathologie l'une des causes premières de décès dans les unités de soins intensifs[286]. A l'échelle mondiale, le sepsis, considéré comme l'une des causes principales de mortalité, a touché 48,9 millions de personnes et causé 11 millions de décès soit un taux de 22,5% de mortalité, en 2017[288].

Les traitements conventionnels du sepsis sont purement symptomatiques visant à soulager au mieux les patients. Les traitements utilisés en première intention sont des antibiotiques, des antiviraux ou des antifongiques en fonction de la nature microbienne du sepsis et d'une thérapie fluidique à base de cristalloïdes dans le cadre d'une réanimation. Pour le maintien d'une pression artérielle normale notamment chez les patients en choc septique, des vasopresseurs de type norépinephrine sont utilisés. Un apport en oxygène par ventilation mécanique est appliqué au besoin (de manière non invasive ou invasive dans les cas sévères de sepsis avec SDRA) et des glucocorticoïdes de type IV peuvent être administrés aux patients en choc septique afin de contrôler la surproduction de cytokines pro-inflammatoires et de réduire les doses de vasopresseurs[275].

C'est pourquoi le questionnement sur l'utilisation de CSM en thérapie cellulaire dans le traitement du sepsis/choc septique reste d'actualité. Tout d'abord, il est essentiel de vérifier la sûreté d'un tel traitement dans une pathologie aussi complexe que le sepsis.

Un essai clinique de phase I (escalade de dose) a utilisé des CSM(MO) allogéniques, administrées une fois à une concentration de 0,3 x 10^6 cellules/kg, 1 x 10^6 cellules/kg ou 3 x 10^6 cellules/kg. Les résultats de cet essai ont montré que l'administration de 3 x 10^6 cellules/kg de CSM n'augmentait pas de manière exacerbée le niveau de cytokines dans le plasma des patients en choc septique rendant leur réponse à l'injection sûre et tolérée[290, 293].

Bien que plusieurs essais cliniques de phase I aient été menés, peu d'essais cliniques de phase II sont mentionnés.

Parmi ce faible nombre, un essai clinique randomisé de phase II (CHOCMSC/NCT02883803) mené au centre hospitalier de Nancy avait pour but d'évaluer l'effet de CSM, injectées en intra-veineuse à une concentration de 1 x 10^6 cellules/kg, sur la défaillance d'organes chez des patients en choc septique sévère avec un score SOFA supérieur à 2. Cependant aucun résultat de cette étude n'a été communiqué, ceci s'expliquant par un nombre d'inclusions trop faible à l'heure actuelle.

Au Canada, un essai clinique (NCT03369275 CISS2) utilisant des CSM(MO) dans le traitement du choc septique avait été initié en 2018 sans mise à jour sur « ClinicalTrials.gov ». Cependant, un second essai clinique de type multicentrique, en double-aveugle et randomisé de phase II est en cours au Canada sur des CSM(CO) dans le traitement du choc septique (UC-CISSII NCT05969275), sans conclusion à l'heure actuelle[294].

Les phénotypes CSM1/CSM2, étudiés dans notre projet, permettraient de traiter les différentes phases du sepsis/choc septique (Figure 11). En effet, dans les phases d'hyper-inflammation, les CSM2, classiquement décrites comme des cellules immunosuppressives, pourraient inhiber la réaction immunitaire excessive alors que dans les phases d'immunoparalysie, les CSM1 classiquement décrites comme immunostimulantes, pourraient stimuler le système immunitaire du patient afin de lutter contre les infections secondaires potentiellement léthales pour eux.

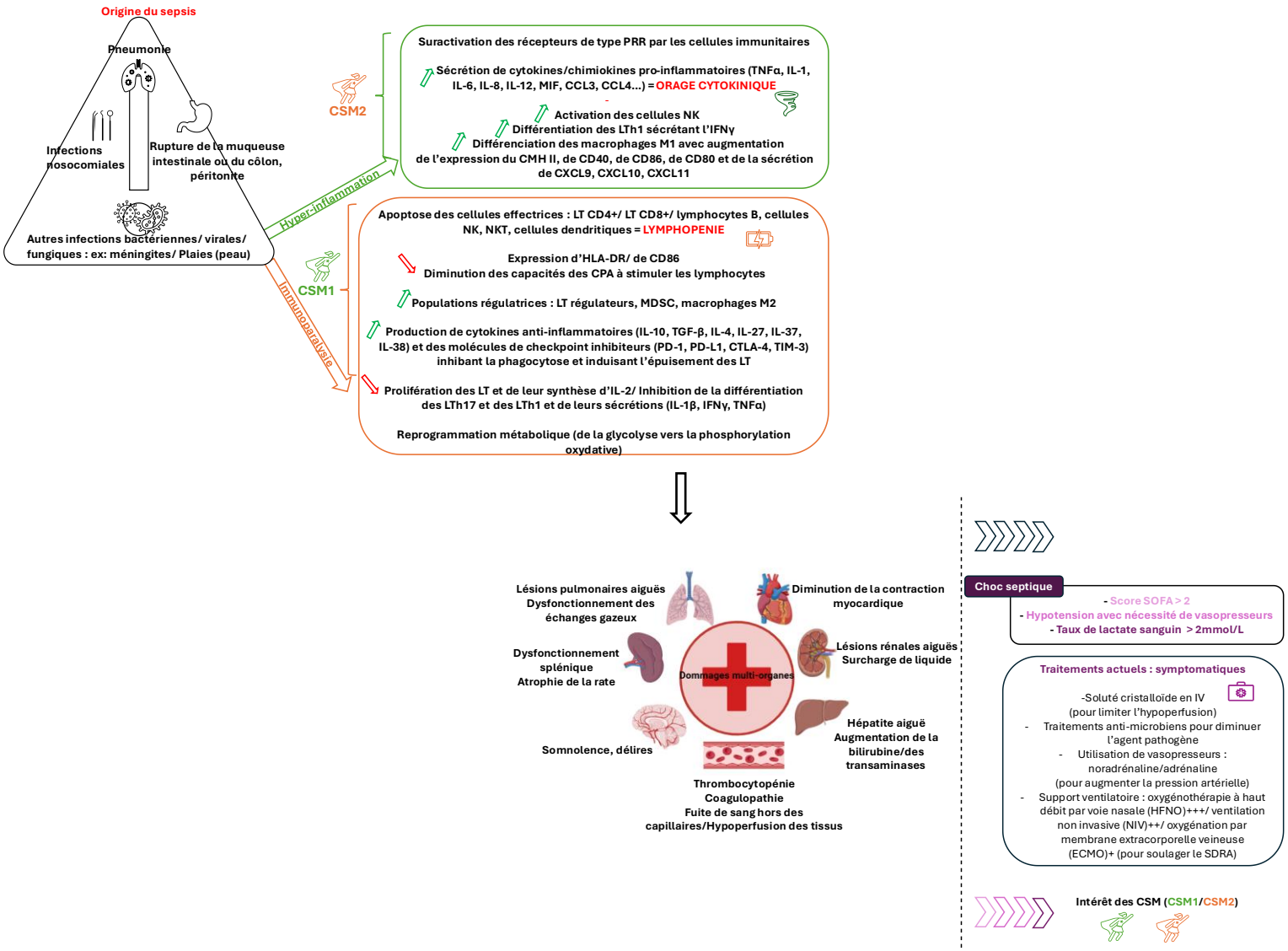


Figure 11 : Pathologie du sepsis et de son évolution : De sa source de départ aux manifestations physiopathologiques ou comment valoriser l'utilisation de CSM au sein de cette pathologie ?

Cependant, des questions relatives à l'utilisation des CSM en thérapie cellulaire dans le traitement du sepsis ou d'autres pathologies restent encore en suspens, à savoir : (i) quelle dose de CSM doit être utilisée ? (ii) Quel est le nombre d'injections optimal ? (iii) Quelle est la voie d'administration à favoriser ? (iv) Quelle est la meilleure source de CSM pour chaque pathologie ? Ces questions représentent un frein à l'utilisation des CSM en clinique tout comme le manque de standardisation dans la méthode de production/congélation des CSM.

VIII. Limites majeures de l'utilisation des CSM en thérapie cellulaire

Si de nombreux obstacles peuvent freiner l'avancée des CSM en thérapie cellulaire, l'un d'entre eux réside dans l'hétérogénéité des CSM.

En effet, comme évoqué précédemment, le tissu d'origine des CSM peut entrer en jeu dans l'hétérogénéité fonctionnelle des CSM au sein de leur capacité de différenciation ou d'immunomodulation. C'est pourquoi, dès 2019, l'ISCT a recommandé de préciser au sein des études le tissu d'origine des CSM[116,296]. Si la spécificité fonctionnelle des CSM dépend en partie de leur origine tissulaire, cela dépend aussi des caractéristiques intrinsèques du donneur. Précédemment il a été évoqué l'impact de l'âge sur les propriétés prolifératives et immunomodulatrices des CSM, d'autres paramètres peuvent entrer en jeu comme le sexe, l'existence de comorbidités, ou encore le mode de vie (tabac, alcool…)[295]. Afin de limiter leurs impacts, certaines études se sont intéressées à la culture de CSM issues de différents donneurs au sein d'une même flasque de culture, communément appelée « culture en pool ». La première étude à avoir réalisé une culture mixte de deux à trois souches de CSM(MO) a montré l'efficacité de cette méthode dans l'augmentation et la stabilisation des capacités immunosuppressives des CSM (en Réaction Lymphocytaire Mixte, MLR) et ce comparativement aux cellules cultivées individuellement[297].

Par ailleurs, Kuçi *et al*. ont mis en évidence l'efficacité d'un pool constitué de 8 souches de CSM(MO) issues de donneurs différents permettant l'homogénéisation de leurs capacités immunosuppressives. En effet, les auteurs ont montré que les 8 souches individuelles étaient en mesure d'inhiber entre 20% à 80% la prolifération des CMN au sein de MLR, tandis que le pool de CSM(MO) présentait un pourcentage d'inhibition similaire au pourcentage moyen des 8 souches utilisées[317].

Plus récemment, une étude a montré que l'hétérogénéité des souches individuelles de CSM(MO) couvrait plusieurs aspects fonctionnels des CSM, à savoir leur cinétique de prolifération, leur capacité immunosuppressive et leur potentiel sécrétoire de facteurs angiogéniques. Le pool réalisé à partir de 3 souches différentes, avait montré un profil immunosuppresseur plus stable avec des capacités immunosuppressives et des sécrétions globalement plus élevées que certaines cellules individuelles. De plus le pool n'augmentait pas les paramètres associés à une transformation maligne (pas de colonies formées sur agar) ni ceux liés à la sénescence[300].

Enfin, une étude sur souche individuelle de CSM(CO) a permis d'identifier des CSM fortement, modérément ou faiblement immunosuppressives envers la prolifération des LT. Le pool de CSM(CO) constitué d'une souche de chaque profil, a permis d'améliorer les capacités immunosuppressives des CSM à faible potentiel immunosuppresseur[298].

Ainsi, l'intérêt de rassembler plusieurs souches de CSM au sein d'une même culture permettrait de lisser les variabilités inter-donneurs.

IX. Objectifs du projet de Thèse

Ce projet réside sur deux objectifs principaux :

1) L'obtention et la caractérisation des CSM1 pro-inflammatoires à partir de CSM(GW)

Cette étude a pour vocation d'obtenir des CSM1, initialement décrites par Waterman et son équipe en 2010, mais encore très mal documentées à l'heure actuelle, à partir de CSM(GW). Pour obtenir des CSM1, un préconditionnement *via* des agonistes des TLR4 (LPS) et des TLR7/8 (R848) a été utilisé afin d'induire des CSM1. L'IFNγ couplé à du TNFα et le Poly I :C, agoniste du TLR3, ont été utilisés pour obtenir des CSM2. Le choix des molécules de préconditionnement s'est basé sur les travaux antérieurs au laboratoire ainsi que sur la littérature portant sur le préconditionnement des CSM et des macrophages. Les CSM obtenues suite aux préconditionnements moléculaires ont été par la suite caractérisées phénotypiquement et fonctionnellement.

2) La réalisation d'un pool de CSM(GW)

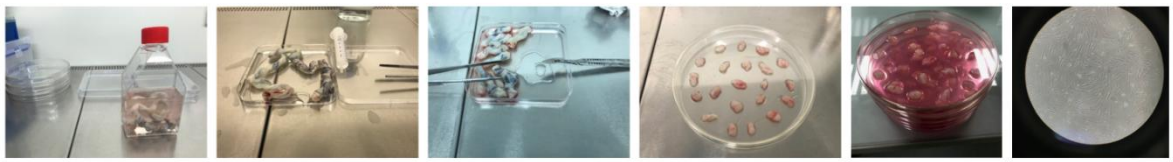
Les propriétés des CSM sont fortement impactées par les caractéristiques des donneurs, donnant lieu à une hétérogénéité importante entre les souches de CSM. C'est pourquoi en se basant sur la publication de 2016 de Kuçi et son équipe[317], des CSM(GW) issues de 7 cordons ombilicaux différents ont été cultivées ensemble afin de constituer un pool et de diminuer l'impact du donneur sur les caractéristiques des CSM(GW).

Matériel et Méthodes

I. Production d'une banque de CSM(GW) à partir de cordons ombilicaux

1) Isolement des CSM(GW)

Les cordons ombilicaux ont été obtenus en partenariat avec la maternité du CHRU de Nancy à l'issue d'accouchement par voie basse, sans complications et avec le consentement des donneuses grâce à l'autorisation de recherche provenant de l'UTCT (Unité de Thérapie Cellulaire et banque de Tissus) (AC-2021-4733). Par la suite, les CSM(GW) ont été isolées par la méthode des explants, une technique mécanique basée sur la fragmentation des explants et la migration des cellules vers le fond de la boîte de Pétri. Tout d'abord, comme décrit sur la Figure 12, les vaisseaux du cordon ombilical ont été rincés à l'aide de PBS (Phosphate-Buffered Saline) ou tampon phosphate salin, puis une fine entaille de chaque côté du cordon a été réalisée. A l'aide d'un scalpel, des morceaux d'environ 3cm ont été découpés afin de faciliter la coupe transversale en fine tranche des fragments de cordons. Chaque morceau a ensuite été déposé sur une boîte de Pétri, côté face, afin de faciliter la migration des CSM vers le contenant plastique. Après ajout de milieu de culture αMEM (alpha Minimum Media, 15-012-CV, Corning) supplémenté en antibiotiques, en antifongique, en L-Glutamine et en lysat plaquettaire (1Cell Culture-Human Platelet Lysate, Multi'PL 100, BC0190030, macopharma), les morceaux de cordons ont été incubés 10 jours à l'incubateur en condition hypoxique (2% O_2). Après 10 jours de culture, les explants ont été éliminés et la culture s'est poursuivie.



1) Cordon ombilical humain dans une flasque de PBS (récupéré dans les 24h à la maternité du CHRU, Nancy)

2) Lavages des vaisseaux avec du PBS à l'aide d'une seringue

3) Fine entaille à l'aide d'un scalpel et découpe en fragments d'environ 3cm de longueur

4) Découpe transversale des fragments en fines tranches (de l'ordre du mm) et dépôt à l'horizontal dans une boîte de Pétri (30min d'attente, à température ambiante)

6) Ajout du milieu de culture αMEM (+ L-Glu/PS/F et LP 100PL jusqu'à recouvrement des morceaux

7) Au bout de 10 jours à l'incubateur hypoxie, retrait des morceaux Observation au microscope

L-Glu = L-Glutamine
PS = Pénicille/Streptomycine
F = Fungizone
LP = Lysat Plaquettaire

Figure 12 : Différentes étapes d'isolement des CSM(GW) en culture in vitro.

2) Culture des CSM(GW)

Les CSM(GW) ont été ensemencées dans des boîtes de culture à une densité de 1000 cellules/cm^2 dans du milieu αMEM supplémenté avec de la pénicilline/streptomycine (P0781, Sigma-Merck) (1%, v/v), de la Fungizone (15290-026, Gibco) (1%, v/v), de la L-Glutamine (G7513, Sigma-Merck), acide aminé essentiel à la prolifération des cellules (1%, v/v).

Afin de se rapprocher des conditions cliniques, aucun sérum d'origine animal n'a été utilisé, mais du lysat plaquettaire (LP) (100 PL à 3%, v/v) a été privilégié. Lorsque les CSM(GW) ont atteint 80% de confluence, elles ont été décrochées de manière enzymatique *via* l'utilisation de trypsine (Trypsin-EDTA Solution, T3924, Sigma-Merck) et réensemencées. Brièvement, après lavage des boîtes de culture contenant les CSM avec du PBS, de la trypsine, diluée au ½ dans du PBS, a été ajoutée et laissée à incuber 5min à 37°C. Après décrochement des CSM, une centrifugation à 300g pendant 5min a permis de culotter les cellules pour permettre leur réensemencement. Les CSM(GW) ont été cultivées ainsi jusqu'au passage P3. La culture a été réalisée en condition hypoxique (teneur en oxygène inférieure à 2%) selon des études antérieures au laboratoire.

3) Préconditionnement cellulaire

Au passage P3, les CSM(GW) ont été préconditionnées ou non par le LPS (L6529, Sigma-Merck), le R848 (130-109-376, Miltenyi Biotec), le Poly I :C (L1530, Sigma-Merck) et l'IFNγTNFα (130-096-484,130-094-024, Miltenyi Biotec) dont les concentrations et les temps de stimulation sont définis dans le tableau 5. Une partie des CSM(GW) n'a pas été soumise à une stimulation biomoléculaire afin de constituer un contrôle négatif. D'autres préconditionnements ont été testés afin de vérifier leur impact sur l'obtention de CSM1 ; comme le 2-désoxyglucose (2-DG, D6134-1G, Sigma-Merck) ou encore le TNFα couplé à de la prostaglandine (50 165 6984, Sigma-Merck). Enfin, des associations de préconditionnements ont été testées afin d'augmenter l'effet des molécules seules. Les combinaisons retenues ont été les suivantes : LPS couplé à du Poly I :C, du LPS couplé à du R848 et du R848 couplé à du Poly I:C. En raison de la divergence des molécules mais surtout des temps et des concentrations de préconditionnement décrits dans la littérature, plusieurs conditions de préconditionnement ont été testées, à savoir des temps courts (1h) *versus* des temps longs (24h ou 48h) et des faibles concentrations *versus* des fortes concentrations de préconditionnement (Tableau 5). Les molécules de préconditionnement utilisées ont directement été ajoutées dans du milieu de culture neuf et mises en contact avec les CSM.

Tableau 5 : Liste des différents types de préconditionnements testés en fonction de la concentration et du temps utilisé, afin d'obtenir un phénotype CSM1 ou CSM2.

Préconditionnement testé	Temps de préconditionnnement	Concentration moléculaire	Phénotype attendu	Référence du produit
LPS O55 : B5 (*E.Coli*)	1h/24h	1µg/ml, 10ng/ml	CSM1	L6529 (Sigma-Merck)
LPS O26 : B6 (*E.Coli*)	3h	250ng/ml	CSM1	L2654 (Sigma-Merck)
LPS O111 : B4 (*E.Coli*)	24h	100ng/ml	CSM1	L4391 (Sigma-Merck)
LPS *Salmonella enterica* serotype enteritidis	1h	10ng/ml	CSM1	L7770 (Sigma-Merck)
R848	24h	5µM	CSM1	130-109-376 (Miltenyi Biotec)
LPS + R848	1h + 24h	10ng/ml + 5µM	CSM1	L6529 (Sigma-Merck) + 130-109-376 (Miltenyi Biotec)
LPS + Poly I:C	1h	10ng/ml + 1µg/ml	CSM1	L6529 + L1530 (Sigma-Merck)
2-DG	24h	5mM	CSM1	D6134-1G (Sigma-Merck)
R848 + Poly I :C	24h + 1h	5µM + 1µg/ml	CSM1	130-109-376 (Miltenyi Biotec) + L1530 (Sigma-Merck)
TNFαPGE2	24h	100ng/ml + 1µg/ml	CSM1	130-094-024 (Miltenyi Biotec) + 50 165 6984 (Sigma-Merck)
Poly I:C	1h/24h	1µg/ml	CSM2	L1530 (Sigma-Merck)
IFNγTNFα	48h	20ng/ml + 30ng/ml	CSM2	130-096-484 + 130-094-024 (Miltenyi Biotec)

4) Cryoconservation

Après préconditionnement, les cellules ont été décrochées par l'action de la trypsine telle que définie dans le paragraphe I. 1) et congelées dans un milieu cryoprotectant SVF (Sérum de Veau Fœtal : SV30160.03, Cytiva) / DMSO (Diméthylsulfoxyde, 14849, Fisher BioReagents) (10%, v/v) à raison de 1 million de cellules/ml, par cryotube. Après une descente progressive en température, les cellules ont été placées à l'azote liquide afin de permettre une meilleure cryoconservation.

5) Réalisation d'un pool de CSM(GW)

Les CSM conservées à l'azote liquide ont été décongelées en P1 et reensemencées en P2 afin de favoriser la reprise cellulaire. Lorsque les cellules atteignaient 80% de confluence, celles-ci étaient trypsinées et comptées à l'aide de bleu de trypan pour mettre en évidence les cellules mortes. Les CSM ont ensuite été rassemblées en même quantité et réensemencées en P3 à hauteur de 1000 cellules/cm^2. Sept souches de CSM différentes ont été utilisées pour réaliser ce pool. La culture en pool s'est déroulée pendant tout un passage cellulaire et lorsque les cellules atteignaient 80% de confluence, elles ont été préconditionnées à l'aide de LPS (10ng/ml, 1h), de R848 (5µM, 24h), de Poly I :C (1µg/ml, 1h) ou d'IFNγTNFα (20ng/ml + 30ng/ml, 48h) puis décrochées par l'action de la trypsine.

Une partie de ce pool a été utilisée directement pour des tests fonctionnels (coculture CSM et LT et coculture CSM-CMN) tandis que le reste a été congelé dans une solution de cryopréservation SVF/DMSO (10%) et placé à l'azote liquide pour une meilleure cryopréservation.

II. Cytométrie en flux

L'analyse des différents marqueurs (i) exprimés ou non par les CSM (ii) exprimés ou non par les cellules de l'immunité, a été réalisée par la technique de cytométrie en flux afin de discriminer ces populations.

Pour cela les cellules d'intérêt ont été marquées en surface avec 1µL d'anticorps spécifiques à la cible d'intérêt (Tableau 6) dans 100µL de suspension cellulaire, contenue dans du tampon PBS-BSA (Bovine Serum Albumin) (0,5%).

Une incubation de 30min à 4°C a été réalisée puis un lavage avec 1ml de ce tampon et une centrifugation à 300g pendant 5min ont été effectués. Lors d'un marquage intracellulaire, une étape supplémentaire a été réalisée en utilisant un kit de perméabilisation (eBioscience Foxp3 Staining ,11500597, Fisher Scientific). Cette étape consistait en une fixation des cellules par une solution de fixation diluée au quart dans un tampon de fixation, les cellules ont été incubées pendant 20min à 4°C.

Après lavage avec du tampon PBS-BSA (0,5%) et centrifugation à 300g pendant 5min, les cellules ont été marquées selon le processus décrit ci-dessus au sein d'une solution de perméabilisation diluée au dixième dans de l'eau distillée. Le reste des étapes était similaire au marquage membranaire. Un marqueur de viabilité pouvait aussi être ajouté, pour cela 0,5µL de Fixable Viability Stain 780 (565388, BD Biosciences) ou de Fixable Viability Stain 575V (565694, BD Horizon), ont été ajoutés dans la suspension cellulaire constituée de 1ml de tampon PBS-BSA (0,5%). Après incubation de 10min à température ambiante et à l'obscurité, un lavage avec 1ml de tampon PBS-BSA (0,5%) et une centrifugation à 300g pendant 5min ont été réalisés permettant par la suite le marquage membranaire et/ou intracellulaire des cellules.

Avant passage en cytométrie en flux, les cellules marquées ont été resuspendues dans 300µL de tampon PBS-BSA (0,5%). Les cytomètres utilisés et disponibles sur la plateforme, UMS IBS-Université de Lorraine, ont été le Celesta Sorp (BD Biosciences) et le Symphony A3 (BD Biosciences) en fonction des lasers souhaités. L'analyse des données générées a été réalisée sur le logiciel Kaluza Analysis 2.1 ou sur le logiciel FlowJo_v10.9.0 en fonction des paramètres d'étude.

Tableau 6 : Liste des anticorps utilisés lors de ce projet.

Anticorps utilisé	Référence	Fournisseur
PE-CD105	B92442	Beckman Coulter
FITC-CD90	IM1839U	Beckman Coulter
PE-CD73	550257	BD Pharmingen
FITC-CD45	F0861	Dako
PE-CD34	555822	BD Pharmingen
FITC-HLA-DR	IM0463U	Beckman Coulter
Alexa Fluor 488-IDO	IC 60306	R&D Systems
FITC-HLA-G5/G6	1F-432-C100	Exbio
APC-PD-L1	15578166	Fisher Scientific
PE-CD80	130-123-253	Miltenyi Biotec
FITC-CD86	130-116-159	Miltenyi Biotec
PE-CD40	130-123-714	Miltenyi Biotec
FITC-HLA-DR/DP/DQ	2408530	Sony
PE-CD3	2324030	Sony
PE-Cy7-CD4	2187070	Sony
BUV496-CD4	612936	BD Horizon
PerCP-Cy 5.5-CD8	341050	BD Biosciences
BUV563-CD19	612917	BD Horizon
PE-Cy7-CD14	562698	BD Pharmingen
PE-CXCR4	12-9999-42	Invitrogen
APC-CXCR7	391406	Biolegend
PE-TLR3	130-096-887	Miltenyi Biotec
APC-TLR4	130-096-236	Miltenyi Biotec
FITC-TLR7	PA523127	Invitrogen
PE-TLR8	MA516194	Invitrogen
Fixable Viability Stain 780 (APC-Cy7)	565388	BD Biosciences
Fixable Viability Stain 575V	565694	BD Horizon
Mitotracker Deep Red FM Dye (APC)	M6753	Thermo Fisher Scientific

III. Test ELISA

Une partie des milieux de culture (environ 3ml) des CSM(GW) préconditionnées a été récupérée lorsque 80% de confluence était observée dans les flasques contenant les cellules, puis une centrifugation à 300g pendant 5 min a permis d'éliminer les débris cellulaires.

Les échantillons ont ensuite été conservés à -80°C. Les kits DuoSet ELISA (DY008 R&D) ont été utilisés pour analyser les sécrétions des CSM(GW). Brièvement après incubation (toute la nuit à température ambiante) de l'anticorps de capture, spécifique de la cytokine à détecter, au sein d'une plaque 96 puits, l'ensemble des puits ont été lavés à 3 reprises par du tampon de lavage. La plaque a ensuite été saturée afin d'éviter toutes réactions aspécifiques *via* du tampon « Reagent Diluent » dilué au dixième dans de l'eau distillée. Après incubation 1h à température ambiante, les puits ont été à nouveau lavés puis les échantillons dilués ou non ont été déposés. Après incubation et lavages des puits, l'anticorps de détection a été ajouté et incubé 2h à température ambiante. Après incubation et lavages, l'enzyme HRP (Horse-Radish Peroxydase) couplée à la streptavidine a été ajoutée pendant 20min à température ambiante. Après lavages des puits, une solution de substrats de l'enzyme, composée de H_2O_2 et de tétraméthylbenzidine, a été ajoutée avec un temps d'incubation de 20 min à température ambiante et à l'obscurité. Une solution d'arrêt de la réaction enzymatique a ensuite été ajoutée et la densité optique à 450nm a été révélée *via* le spectrophotomètre Varioskan Flash (Thermo Fisher). Les cytokines ciblées ont été les suivantes : IL-6 (DY206), IL-8 (DY-208), CCL3 (DY270), RANTES (DY278, R&D), IL-4 (DY204), PD-L1s (DY156).

IV. Analyse des exosomes par NTA et MACSPlex

La mesure de la taille et de la concentration des particules sécrétées, par les CSM(GW), dans le surnageant de milieu de culture a été mesurée par NTA (NanoSight, SCMOS ; Malvern Panalytical, Worcestershire, UK) et analysée par le logiciel NTA associé, version 3.1.

L'identification de la nature de ces particules et des biomarqueurs associés a été réalisée par MACSPlex. Les vésicules extra-cellulaires (VE) ont été immunophénotypées par cytométrie en flux en utilisant un kit MACSPlex VE pour les CSM (MACSPlex EV Kit MSC, human, 130-136-851, Miltenyi Biotec). Les échantillons ont été dilués à une concentration de 10^9 particules/ml dans un tampon MACSPlex et 120µL ont été déposés dans une plaque 96 puits en triplicat. Un contrôle constitué uniquement de tampon MACSPlex a été utilisé en triplicat pour évaluer le bruit de fond. Par la suite, 15µL de billes de capture des exosomes ont été ajoutés et le tout a été incubé toute la nuit à température ambiante, à l'obscurité et sous agitation orbitale (650rpm).

Après incubation, un lavage avec 200µL de tampon a été réalisé suivi d'une centrifugation à 300g pendant 3min.

Pour la détection des marqueurs de VE, 15µL d'anticorps CD9, CD63 et CD81 ont été ajoutés. Pour les marqueurs positifs CD73, CD44, CD49e, CD105, CD90 et négatifs CD34, CD14, HLA-DR, CD45 des CSM, 15µL d'anticorps ont été ajoutés dans chaque puits contenant 135µL de tampon. Après une incubation de 1h à température ambiante, à l'obscurité et sous agitation, un lavage a été effectué puis une incubation de 15min dans du tampon a été réalisée avant de déposer le contenu dans des tubes de cytométrie en flux.

Les Intensités Médianes de Fluorescence (IMF) ont été corrigées par soustraction des valeurs issues du contrôle tampon correspondant au bruit de fond. Un ratio des valeurs obtenues par rapport à l'autofluorescence générée par les VE a été réalisé.

V. Coculture CSM-LT

Des prélèvements sanguins sur tube citrate, réalisés par l'Etablissement Français du Sang (EFS) à partir de donneurs sains sous l'autorisation (AC-2025-7816), ont été utilisés dans le cadre de la convention L20DIV0856/2024. Les CMN ont été isolées grâce à un milieu de séparation lymphocytaire (Eurobio Scientific, CMSMSL01-01) contenu dans un tube Leucosep™ (Greiner Bio-One, 163290). Après centrifugation à 1000g pendant 10min, l'anneau de CMN a pu être isolé et lavé 3 fois avec du PBS. Les LT ont été triés à l'aide d'un kit d'isolation (PanT Cell Isolation Kit human, Miltenyi Biotec, 130-096-535), qui grâce à un cocktail d'anticorps (anti CD14, CD15, CD16, CD19, CD34, CD36, CD56, CD123, CD235a) et de billes magnétiques permet de retenir dans une colonne LS aimantée toutes les cellules CD3- (Miltenyi biotec, 130-042-401). Ce tri magnétique négatif permet de récupérer de manière plus douce les cellules d'intérêt à savoir les LT.

Ces cellules ont ensuite été marquées grâce à du Cell Trace Violet (CTV, Thermo Fisher, C34571) à une concentration de 5µM dans du PBS pendant 20min à température ambiante, suivi d'un lavage dans du milieu RPMI (Roswell Park Memorial Institute Medium, Gibco, 11875093). Le CTV est une molécule fluorescente permettant de marquer les amines intracellulaires, et ainsi de suivre le nombre de génération de LT. Après 20 minutes d'incubation à température ambiante et un lavage au PBS, une partie des LT a été activée à l'aide de billes d'activation CD3/CD28 (CD3/CD28 Dynabeads, Gibco, 11132D). Ces billes magnétiques couplées à des anticorps anti CD3/CD28 vont mimer les deux signaux nécessaires à l'activation des LT *in vivo*.

Les LT ont ensuite été mis en coculture (dans des plaques 96 puits à fond rond : 163320 Thermo Scientific) avec des CSM non stimulées ou préconditionnées à un ratio CSM : LT de 1 : 1 et ce pendant 5 jours en condition normoxique (21% O_2). Après 5 jours, les LT ont été marqués à l'aide d'anticorps primaires, couplés à des fluorochromes, pendant 30 minutes à 4°C et à l'obscurité comme décrit précédemment (II).

Les anticorps utilisés ont été les suivants : PE-Cy7-CD4 (Sony, 2187070), PerCP-Cy5.5-CD8 (BD Biosciences, 341050) et APC-Cy7-Fixable Viability Stain 780 (BD Biosciences, 565388). Le cytomètre Celesta Sorp (BD Biosciences) a été utilisé pour cette analyse. Un minimum de 10 000 évènements par échantillon a été acquis pour l'analyse. La prolifération des LT a été suivie grâce au marquage CTV, en cytométrie en flux. La diminution progressive de l'intensité de fluorescence du CTV au fil des divisions cellulaires successives permet de suivre la prolifération cellulaire. Le logiciel Kaluza Analysis 2.1 a été utilisé pour analyser les données.

VI. Mise en place d'une anergie lymphocytaire

Des tests d'anergie ont été mis en place afin d'évaluer les capacités des CSM en contexte d'immunoparalysie. Pour cela, les prélèvements sanguins issus de donneurs sains ont été soumis à 3 traitements différents :

- Le sang total contenu dans des tubes citrates a été intoxiqué pendant 24h à l'aide d'une forte dose de LPS (1µg/ml de sang).
- Le sang total contenu dans des tubes citrates a été traité pendant 24h à l'aide de méthylprednisolone, un puissant immunosuppresseur (2µg/ml de sang).
- Le sang total contenu dans des tubes citrates a été traité à l'aide de la combinaison méthylprednisolone + LPS (1µg/ml + 2µg/ml de sang).

Une condition correspondant à du sang non traité a été utilisée comme contrôle. La coculture entre LT rendus anergiques et les CSM non stimulées ou préconditionnées a été réalisée selon les mêmes conditions que décrite ci-dessus (V) ; tout comme le marquage à l'aide d'anticorps primaires couplés à des fluorochromes et l'analyse par cytométrie en flux.

VII. Transfert mitochondrial : des CSM vers les CMN

Afin de visualiser le transfert mitochondrial, les CSM non stimulées ou préconditionnées ont été marquées à l'aide d'un mitotracker DeepRed FM Dye (Thermo Fisher Scientific, M6753), qui diffuse passivement à travers la membrane des cellules, afin de marquer spécifiquement les mitochondries actives.

Les CSM ont été rincées à l'aide de PBS puis marquées au mitotracker DeepRed à une concentration de 200mM dans du milieu dépourvu de lysat plaquettaire pendant 30 minutes à 37°C. Par la suite les CSM ont été trypsinées comme décrit précédemment puis mis en coculture avec des CMN pendant 5 jours en normoxie.

Les CMN ont été isolées telles que décrit dans le paragraphe V, à partir de sang de donneurs sains récoltés dans des tubes citrates, par l'EFS. Les CMN ont été marquées à l'aide de CTV pendant 20min à température ambiante, lavées avec du PBS, avant que 70% des CMN ne soient activées. Cette proportion correspondant à la proportion de LT présents dans la fraction de CMN. L'activation a été réalisée *via* des billes magnétiques d'activation CD3/CD28 puis les CMN ont été mis en contact (dans une plaque 96 puits à fond rond) avec les CSM non stimulées ou préconditionnées à un ratio CSM : CMN de 1 : 1 et de 2 : 1 (correspondant à un ratio CSM : LT de 1 :1) pendant 5 jours en condition normoxique (21% O_2). Après 5 jours, les CMN ont été marqués à l'aide d'anticorps primaires, couplés à des fluorochromes, pendant 30 minutes à 4°C et à l'obscurité comme décrit précédemment (II).

Les anticorps utilisés ont été les suivants : PE-CD3 (2324030, Sony), BUV496-CD4 (612936, BD Horizon), PerCP-Cy 5.5-CD8 (341050, BD Biosciences), BUV563-CD19 (612917, BD Horizon), PE-Cy7 CD14 (562698, BD Pharmingen), Fixable Viability Stain 575V (565694, BD Horizon). Le cytomètre Symphony A3 (BD Biosciences) a été utilisé pour cette analyse. Un minimum de 10 000 évènements par échantillon a été acquis pour l'analyse. La prolifération des LT a été suivie grâce au marquage CTV, en cytométrie en flux. Le logiciel FlowJo_v10.9.0 a été utilisé pour analyser les données.

VIII. Migration

Afin d'évaluer les capacités migratoires des CSM, trois tests fonctionnels de migration ont été mis en place : un test en chambre de Boyden, un test en chambre de Boyden supplémenté en MEC et un test de blessures.

1) Chambre de Boyden

Un kit de migration CytoSelect 24-Well Cell Migration Assay (8µm) (Cell Biolabs, INC, CBA-101) a été utilisé (Figure 13). Pour cela 500µl de milieu contenant un chimioattractant ont été déposés au fond des puits de la plaque. Dans notre cas, suite aux travaux réalisés au cours de la thèse de Charlotte Voisin, le lysat plaquettaire a été défini comme chimioattractant[146]. Les inserts, composés d'une membrane en nitrocellulose de 8µm de diamètre, ont ensuite été déposés dans les puits.

A l'intérieur de ces inserts, une solution contenant 100 000 CSM préconditionnées ou non dans du milieu de culture sans LP a été déposée. Le test de migration s'est effectué sur 24h en condition normoxique (21% O_2).

A l'issue des 24h d'incubation, les inserts ont été incubés dans une solution de détachement cellulaire pendant 30 min à 37°C puis retirés, avant que ne soit ajouté dans les puits un colorant CyQuant GR Dye pendant 20min à température ambiante pour mettre en évidence les cellules ayant migrées. La lecture a été effectuée à l'aide du spectrophotomètre Varioskan Flash (Thermo Fisher) à une longueur d'onde de 480/520nm.

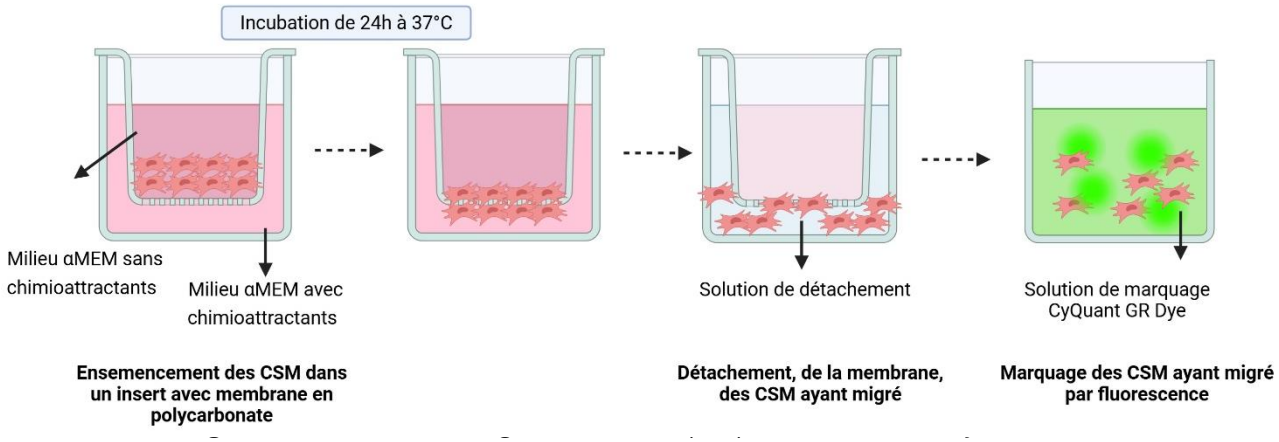


Figure 13 : Processus de migration de CSM(GW) en chambre de Boyden

2) Test d'invasion

Le test d'invasion se distingue du test de migration en chambre de Boyden par la présence d'une matrice extracellulaire reproduisant de manière plus réelle la transmigration observée dépendante des métalloprotéases. La méthodologie est exactement la même que pour le test de migration décrit auparavant, cependant avant dépôt des cellules dans les inserts, une matrice extra-cellulaire synthétique a préalablement été déposée pendant 2h à 37°C afin de favoriser sa polymérisation.

Le gel de MEC utilisé contenait de la laminine, du collagène de type IV, du protéoglycane de type sulfate d'héparine, de l'entactine à une concentration variant de 8mg/ml à 12mg/ml (Gel MEC issu de sarcome d'Engelbreth-Holm-Swarm murin, Merck Sigma-Aldrich, E6909). Les capacités migratoires des CSM ont été évaluées par lecture au spectrophotomètre Varioskan Flash (Thermo Fisher) à 480/520nm.

3) Test de blessure

Les cellules ont été cultivées et préconditionnées en plaque 24 puits comme décrit dans le paragraphe I 2). Lorsqu'elles ont atteint 100% de confluence et qu'elles formaient un tapis cellulaire, une zone de blessure automatisée et reproductible a été effectuée pour chaque condition, à l'aide d'un appareil spécialisé (BioTek AutoScratch, Agilent). La plaque a ensuite été incubée pendant 24h à 37°C en normoxie dans un lecteur d'images combiné à un microscope automatisé afin de pouvoir suivre le recouvrement cellulaire (Cytation 5, Agilent).

Au bout de 24h les images ont été traitées à l'aide du logiciel ImageJ afin d'évaluer le taux de recouvrement des CSM après délimitation de la zone acellulaire. La formule suivante a été utilisée : Taux de recouvrement (%) = $\frac{A0-At}{A0}$ x 100. Le terme A0 correspondant à l'aire de blessure initiale au temps 0 et le terme At correspondant à l'aire de blessure au temps t 24h. A0 et At étaient exprimées en mm^2.

IX. Détection protéique

1) Dosage protéique

Les cellules ont été lysées à l'aide d'un tampon RIPA (50mM Tris-HCl, 150mM NaCl, 1mM EDTA, 1% Nonidet P40, Eau) (100µl pour 1 000 000 cellules) pendant 30 min à 4°C avec un supplément d'une solution riche en inhibiteurs de protéases et de phosphatases à une concentration de 10µL/ml de tampon de lyse. Les inhibiteurs ont permis d'éviter une dégradation des protéines phosphorylées d'intérêt (Halt, Protease and Phosphatse Inhibitor Cocktail, Thermofisher, 78440) (Tableau 7). Une centrifugation à 14 000 g pendant 5min a permis de culotter les débris cellulaires et de récupérer les surnageants riches en protéines. La quantité de protéines a été dosée à l'aide du kit de dosage protéique BCA (Thermo Fisher Pierce™, 23227) grâce à une gamme étalon de BSA couvrant une concentration protéique allant de 2000µg/ml de protéines à 25µg/ml de protéines.

Après dilution du réactif BCA B (au 1/50ème dans le réactif BCA A), 100µL ont été déposés dans les puits contenant les points de gamme ou les échantillons à doser et laissés à incuber 30min à 37°C. Cette technique de dosage repose sur la réduction de Cu^{2+} en Cu^{1+} rendue possible par un environnement alcalin riche en tartrate de sodium et en potassium fourni par le réactif A. Dans un second temps, le Cu^{1+} va réagir avec l'acide bicinchoninique (BCA) conduisant à un produit de réaction de couleur pourpre dont la Densité Optique (DO) peut être lue à 562nm à l'aide du spectrophotomètre Varioskan Flash (Thermo Fisher). L'entièreté de la solution de protéines a été congelée à -20°C afin de préserver leur intégrité.

Tableau 7 : Liste des inhibiteurs de protéases/phosphatases utilisés.

Inhibiteur	Protéases/Phosphatases ciblées
Aprotinine	Serine Protéases
Bestatine	Aminopeptidase Protéases
E-64	Cystéine Protéases
Leupeptine	Sérine et Cystéine Protéases
Sodium Fluoride	Sérine et Thréonine Phosphatases
Sodium Orthovanadate	Tyrosine Phosphatases
Sodium Pyrophosphate	Sérine et Thréonine Phosphatases
B-glycérophosphate	Sérine et Thréonine Phosphatases

2) Détection protéique sur membrane

Afin de cibler de manière large les différentes voies de signalisation qui pourraient être activées à l'issue du préconditionnement cellulaire, un kit spécifique a été utilisé (Proteome Profiler Array, Human Phospho-Kinase Array Kit, R&D Systems, ARY003B). Pour cela, les CSM(GW) non stimulées ou préconditionnées ont été décongelées dans du milieu de culture αMEM, centrifugées puis lysées grâce au tampon de lyse RIPA, supplémenté en inhibiteurs de protéases et de phosphates à une densité de 1ml pour 1 x 10^7cellules (Aprotinin 4139, Leupeptin hemisulfate 1167, Pepstatin A1190, Tocris), pendant 30min à 4°C. Après centrifugation, à 14 000g à 4°C pendant 5 minutes, visant à culotter les débris et organelles cellulaires, le surnageant contenant les protéines a été récupéré et un dosage protéique BCA a été réalisé selon le protocole décrit dans le paragraphe IX 1).

La plaque 8 puits fournie par le kit a été bloquée à l'aide d'un tampon de blocage et les membranes revêtues avec des anticorps d'intérêt ciblant 43 kinases (Tableau 8) ont été déposées dans ces puits pendant 1h sous agitation.

A l'issue de cette phase d'incubation, la solution de blocage a été retirée et les échantillons contenant 200µg de protéines ainsi que du tampon fourni par le kit ont été ajoutés à hauteur de 1ml par puits. Le tout a été incubé toute la nuit, à 4°C, sous agitation. Les membranes ont ensuite été lavées 3 fois pendant 10min à l'aide d'un tampon de lavage fourni par le kit. Puis, 20µL de cocktail d'anticorps ont été déposés dans 1 ml de tampon sur les membranes. Une incubation de 2h sous agitation a été réalisée.

Après répétition des mêmes lavages, 1ml de l'enzyme HRP, couplée à la streptavidine, diluée dans du tampon, a été déposée dans chaque puits. Une incubation de 30min sous agitation a été réalisée.

Après lavages, 1 ml de Chemi Reagent Mix, correspondant à une solution de substrats HRP, a été déposé dans chaque puits pendant 1min. Les membranes ont été révélées grâce à l'imageur ChemiDoc™(Bio-Rad) avec un temps d'exposition de 10min.

Tableau 8 : Liste des kinases et autres protéines ciblées par le kit de détection protéique.

Kinases/ autres protéines	Sites de phosphorylation (Voies de signalisation associées)	Kinases/ autres protéines	Sites de phosphorylation (Voies de signalisation associées)
p38α	T180/Y182 (p38 MAPK)	**STAT5a/b**	Y694/ Y699 (JAK/STAT)
ERK1/2	T202/Y204, T185/Y187 (Ras/Raf/MEK/ERK)	**RSK1/2/3**	S380/S386/S377 (MAPK-ERK)
JNK 1/2/3	T183/Y185, T221/Y223 (JNK MAPK)	**eNOS**	S1177 (PI3K/Akt/NO)
GSK-3α/β	S21/S9 (PI3K/Akt et Wnt)	**STAT1**	Y701 (JAK-STAT)
p53	S392/ S46/ S15 (Voie p53)	**Yes**	Y426 (Voie Src)
EGF R	Y1086 (RTK-MAPK/PI3K)	**Fgr**	Y412 (Voie Src)
MSK1/2	S376/S360 (MAPK)	**STAT6**	Y641 (JAK/STAT)
Akt 1/2/3	S473/T308 (PI3K/Akt)	**STAT3**	Y705/S727 (JAK/STAT)
CREB	S133 (MAPK/PKA/Akt)	**PLC-γ1**	Y783 (RTK/Ca^{2+})
HSP27	S78/S82 (P38 MAPK)	**c-Jun**	S63 (JNK)
β-Caténine	(Wnt)	**Chk-2**	T68 (Voie des dommages de l'ADN)
p70 S6 Kinase	T389/ T421/S424 (mTORC1)	**PDGF Rβ**	Y751 (RTK)
Src	Y419 (Voie Src/RTK)	**WNK1**	T60 (Voie d'homéostasie ionique)
Lyn	Y397 (Voie Src)	**PYK2**	Y402 (Voie dépendante de FAK)
Lck	Y394 (Voie TCR)	**PRAS40**	T246 (PI3K/Akt/mTOR)
STAT2	Y689 (JAK/STAT)	**HSP60**	(Impliquée dans la voie de stress mitochondrial)

3) Western Blots

Les CSM(GW) non stimulées ou préconditionnées ont été décongelées et immédiatement lysées à l'aide de tampon RIPA, supplémenté en inhibiteurs de protéases/phosphatases (Halt, Protease and Phosphatse Inhibitor Cocktail, Thermo Fisher, 78440), puis un dosage protéique BCA a été réalisé tel que décrit dans le paragraphe IX 1). Les échantillons ont été préparés de manière à déposer 20µL de suspension protéique, contenant 30µg de protéines, par puits du gel d'électrophorèse.

Pour cela x volumes d'échantillon ont été prélevés puis x volumes d'eau distillée et de tampon de Laemmli ont été ajoutés. Le bleu de Laemmli aussi appelé « bleu de dépôt » permet de suivre la migration des protéines au sein du gel. Il a été dilué au quart dans la solution, contenant les protéines, et supplémentée en β-mercaptoéthanol, afin de favoriser le dépôt des échantillons au fond des puits.

Les échantillons préparés ont ensuite été dénaturés à 95°C pendant 5min, avant d'être déposés sur un gel d'électrophorèse SDS-PAGE 4-20% (Precast Midi Protein Gel, Bio-Rad, 5671094) permettant la migration des protéines en fonction de leur taille tout en couvrant un spectre de poids moléculaire protéique large, à partir du deuxième puits.

Un marqueur de taille (Precision Plus Protein Standards All Blue, Bio-Rad, 1610373) contenant plusieurs protéines de références, avec des poids moléculaires définis, et couplées à un colorant, a été déposé dans le premier puits du gel afin de pouvoir détecter les protéines ayant migré en fonction de leur taille. La migration des protéines a été lancée grâce à un générateur à 120 Volt pendant environ 1h dans une cuve Criterion™(Bio-Rad, 1656001) remplie de tampon de migration 1X. Après migration, le gel a été récupéré et les protéines ont été transférées sur une membrane en nitrocellulose (Trans-Blot Turbo Midi 0.2µm Nitrocellulose Transfer Packs, Bio-Rad, 1704159) par un système de Trans-blot (Trans-blot Turbo Transfer System, Bio-Rad). Le programme choisi (mixed) sur cet appareil de Trans-blot permet le transfert des protéines de poids moléculaires moyens pendant 7min. Une solution de coloration rouge ponceau a ensuite été utilisée pour colorer temporairement les protéines sur les membranes de transfert permettant ainsi de vérifier l'efficacité et l'uniformité du transfert, avant d'envisager la poursuite des étapes ultérieures. De nombreuses étapes de lavages de la membrane ont été réalisées après chaque dépôt d'anticorps. Ces lavages réalisés au nombre de 4 pendant 10min avec un tampon TBST 1X permettaient de laver la membrane et d'éliminer l'excédent de solution de marquage. Bien qu'ils persistent tout au long de l'expérimentation, ils ne seront plus indiqués par la suite. Après lavages, les membranes ont été bloquées à l'aide de BSA (5%)-TBST 1X pendant 1h. Puis, les anticorps primaires de lapin, dilués au millième dans du tampon BSA (5%) -TBST 1X ont été déposés pour une incubation toute la nuit, sous agitation, à 4°C. Le lendemain l'anticorps secondaire (anti-lapin), dilué au cinq-millième dans du tampon BSA (5%)-TBST 1X et couplé à l'enzyme HRP, a été déposé.

Après 1h d'incubation, une solution de révélation constituée des substrats de l'enzyme HRP (Clarity™ Western ECL : Peroxide solution, Bio-Rad, 102032187 et Luminol/enhancer solution, Bio-Rad, 102032188 et) mélangés à part égale, a été déposée sur les membranes et laissée incuber pendant 5min à l'obscurité. La chimioluminescence liée à l'expression des protéines a été détectée par un imageur ChemiDoc™(Bio-Rad).

Pour pouvoir déterminer si le signal émis par une protéine phosphorylée est significatif, un contrôle correspondant à la protéine sous sa forme non phosphorylée est nécessaire. Un « stripping » équivalent à un décapage membranaire peut être réalisé afin de décrocher les anticorps primaires et secondaires, utilisés auparavant, pour détecter la forme phosphorylée de la protéine, sans décrocher les protéines de la membrane.

Une solution de « stripping » douce composée de glycine, de SDS, et d'eau distillée à un pH 2.2 a été déposée à hauteur de 10ml par membrane pendant 10min à 2 reprises. Une vérification de l'absence de signal protéique au sein de la membrane après « stripping » a été réalisée afin de ne pas biaiser la quantification de la protéine phosphorylée. Pour cela les mêmes étapes que décrites précédemment, allant de la saturation de la membrane à la lecture de la chimioluminescence ont été effectuées. Aucun signal significatif n'était ressorti validant l'efficacité de notre solution de « stripping ». Les différentes étapes réalisées lors de la détection de la forme non phosphorylée de la protéine ont été réalisées afin de détecter la forme phosphorylée de la protéine. Le processus de « stripping » n'a pas été réalisé plus de deux fois afin de préserver l'intégrité des membranes.

Les anticorps primaires, de lapin, utilisés ont été les suivants : c-Jun (60A8) Rabbit mAb (9165), Phospho-c-Jun (Ser63) (54B3) Rabbit mAb (2361), p44/42 MAPK (Erk1/2) Rabbit mAb (137F5), Phospho-p44/42 MAPK(Erk1/2) (Thr202/Try204) (D13.14.4E) XP Rabbit mAb (4370), Vinculin (E1E9V) XP Rabbit mAb (13901), Phospho-HSP27 (Ser82) (D1H2F6) XP Rabbit mAb (9709), HSP27 (D6W5V) (95357), Phospho-HSP27 (Ser78), IR7-7 (4920),Phospho-IRF-7 (Ser477) (D7E1W) Rabbit mAb (12390), IRF-3 (D6I4C) XP Rabbit mAb (11904), Phospho-IRF-3 (Ser386) (E7J8G) XP Rabbit mAb (37829), Phospho-IRF-3 (Ser396) (4D4G) (4947) Rabbit mAb, IkBα (9242),Phospho-IkBα (Ser32) (14D4) Rabbit mAb (2859), IKKα (2682), IKKβ (L570) (2678), Phospho-IKKα/β (Ser176/180) (16A6) Rabbit mAb (2697), Twist (E7E2G) Rabbit mAb (69366). L'anticorps secondaire utilisé a été le suivant : Anti-rabbit IgG, HRP-linked (7074). L'ensemble des anticorps utilisés provient du fournisseur Cell Signaling Technology.

L'analyse des images de gels et la quantification semi-quantitative des protéines ont été réalisées à l'aide du logiciel Image Lab (Bio-Rad).

La quantité des protéines non phosphorylées a été exprimée en ratio de pixels après normalisation par la protéine rapportrice vinculine alors que la quantité des protéines phosphorylées a été normalisée par rapport à la forme non phosphorylée de la protéine correspondante.

X. Détection des microARN (miR)

Les ARN ont été purifiés à partir d'1 million de CSM, préconditionnées ou non, décongelées et lysées dans 350µL de TRizol™. L'extraction a été réalisée *via* le kit Direct-zol™ RNA Microprep (Zymo Research). Pour cela, un volume égal d'éthanol (95-100%) a été ajouté et l'ensemble a été déposé sur une colonne Zymo-Spin™IC puis centrifugé 30sec à 14 000g.

Après lavage avec 400µL de tampon RNA Wash, les acides nucléiques fixés sur la colonne Zymo-Spin™IC ont été traités à la DNase I pendant 15min à température ambiante selon les recommandations du fournisseur. Ensuite 2 lavages ont été réalisés à l'aide des tampons Direct-zol™ RNA PreWash et RNA Wash. Enfin, les ARN ont été élués dans 15µL d'eau DNase/RNase-Free. La concentration en ARN a été estimée par spectrophotométrie *via* la mesure d'absorbance à 260nm à l'aide d'un Nanodrop 2000 c (Thermo Fisher Scientific). La pureté des échantillons a été évaluée à partir des rapports d'absorbance 260nm/280nm (indiquant une éventuelle contamination protéique) et 260nm/230nm (révélant la présence possible de contaminants tels que le TRizol résiduel ou des sels). Des ARN de bonne qualité présentent généralement des rapports 260nm/280nm et 260nm/230nm d'une valeur supérieure à 1,70.

La méthode TaqMan (TaqMan Advanced miRNA Assays, Thermofisher Scientific, A28007) a été utilisée afin de détecter la forme mature de microARN cibles. Cette technique repose sur 5 étapes principales, brièvement décrites ci-dessous (Figure 14).

La première étape consiste en l'ajout d'une queue poly(A). En raison de leur petite taille les microARN nécessitent l'ajout d'une queue poly(A) à l'extrémité 3'OH, catalysé par une poly(A) polymérase, en présence d'ATP. Cette réaction a été réalisée par incubation dans un thermocycleur (voir Tableau 9, partie 1).

La deuxième étape correspond à la ligation d'un adaptateur à l'extrémité 5' du microARN afin de créer un site de liaison de l'amorce pour la réaction d'amplification. Cette réaction, dépendante d'une ARN ligase, a également été réalisée par incubation dans un thermocycleur (voir Tableau 9, partie 2).

La troisième étape consistait en une réaction de transcription inverse. Une amorce universelle, complémentaire de la queue poly(A), a était utilisée conjointement avec une transcriptase inverse afin de synthétiser de l'ADNc à partir des microARN. Cette étape suivait un programme spécifique en thermocycleur (voir Tableau 9, partie 3).

La quatrième étape correspond à une amplification par PCR, réalisée à l'aide d'amorces universelles s'hybridant. Cette étape d'amplification a été réalisée en thermocycleur (voir Tableau 9, partie 4).

Enfin, une réaction de PCR (Polymerase Chain Reaction) en temps réel nous a permis de détecter l'expression des microARN d'intérêts. Pour cela 2 composants ont été ajoutés au produit d'amplification, à savoir un mix TaqMan Fast Advanced + TaqMan Advanced miR Assay. Une réaction en thermocycleur a été réalisée (thermocycleur Viia7) (voir Tableau 9, partie 5).

Tableau 9 : Description des différentes étapes de PCR aux températures, temps et cycles d'amplification recommandés par le fournisseur.

	Etapes	Température	Temps	Nombre de cycles
Partie 1	Polyadénylation	37°C	45 minutes	
	Réaction d'arrêt	65°C	10 minutes	
	Maintien	4°C		
Partie 2	Ligation	16°C	60 minutes	
	Maintien	4°C		
Partie 3	Rétrotranscription	45°C	15 minutes	
	Réaction d'arrêt	85°C	5 minutes	
Partie 4	Activation enzymatique	95°C	5 minutes	1
	Dénaturation	95°C	3 secondes	14
	Hybridation/Extension	60°C	30 secondes	1
	Réaction d'arrêt	99°C	10 minutes	1
	Maintien	4°C		
Partie 5	Activation enzymatique	95°C	20 secondes	1
	Dénaturation	95°C	1 seconde	40
	Extension	60°C	20 secondes	

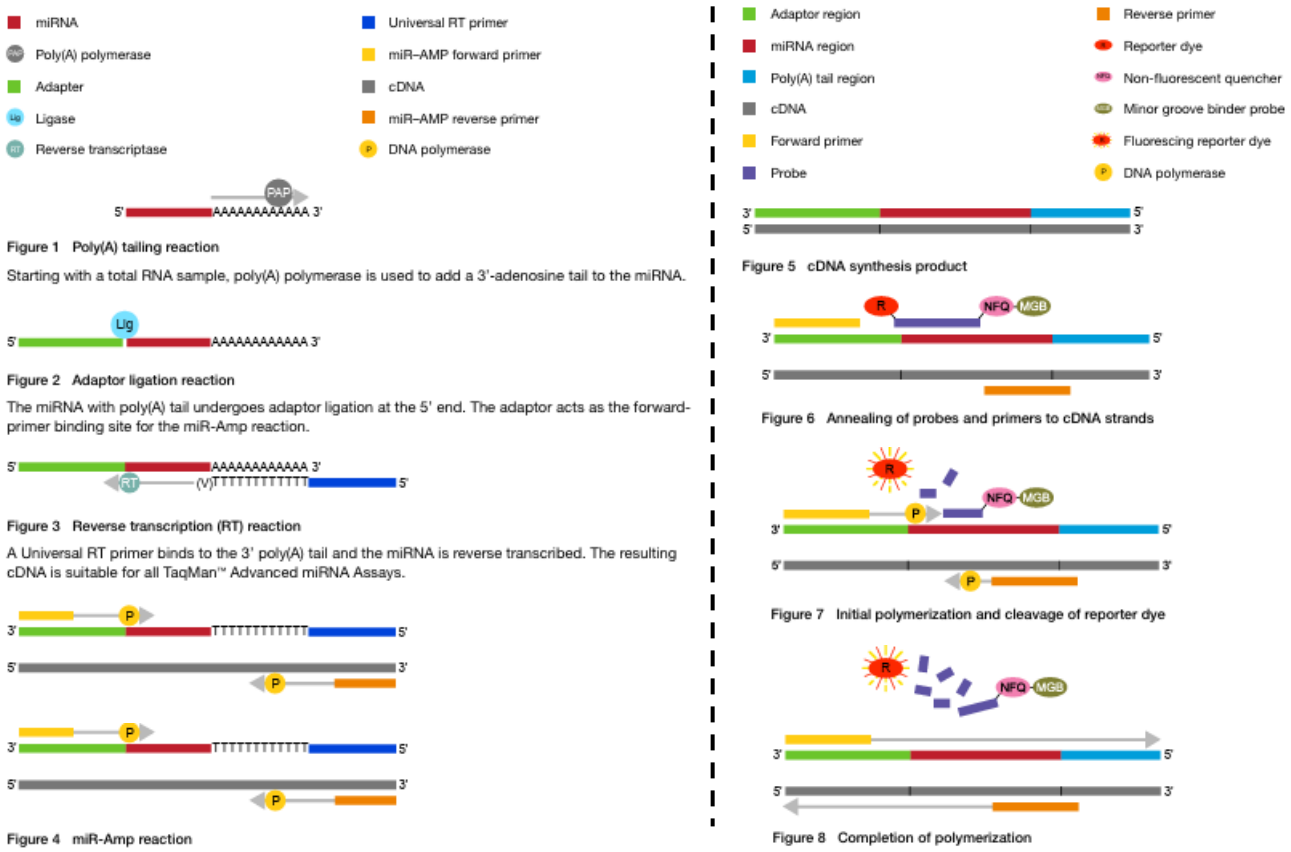


Figure 14 : Principe de la méthode TaqMan selon le protocole fourni par ThermoFisher Scientific(A28007).

XI. Analyses statistiques

Les données ont été analysées grâce au logiciel GraphPad Prism v9.00 et ont été présentées en moyenne ± SD (Standard Deviation). La normalité et l'homogénéité des variances, pour chaque paramètre, ont été vérifiées. Des tests statistiques t-tests entre échantillons non appariés ont été réalisés pour l'analyse des marqueurs membranaires et intracellulaires alors que des t-tests entre échantillons appariés ont été réalisés pour l'analyse de la sécrétion, des exosomes et des capacités fonctionnelles. Les t-test ont permis la comparaison, deux à deux, entre les conditions d'études à l'aide du test de Tukey. Des tests statistiques ANOVA à deux facteurs (Two-Way ANOVA), suivis de comparaisons multiples Tukey ont été réalisés pour l'analyse des expérimentations d'anergie. La significativité statistique est indiquée sur les graphiques selon les conventions standards : *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001, ****p<0.0001.

L'ensemble des schémas a été réalisé sur le logiciel Biorender.com.

Résultats

I. Mise en place du protocole expérimental

1) Choix du préconditionnement cellulaire à appliquer aux CSM(GW) : impact du temps et de la concentration de stimulation

Comme décrit précédemment, la littérature présente un nombre important de molécules de préconditionnement utilisées pour fonctionnaliser les CSM. De plus les temps et les concentrations de préconditionnements varient d'une étude à une autre rendant complexe la comparaison des résultats obtenus. Dans notre étude, plusieurs molécules de préconditionnement ont été testées afin d'obtenir les phénotypes CSM1 et CSM2. Ce choix s'est basé sur la littérature des CSM et notamment des études princeps favorisant le LPS pour obtenir des CSM1 et du Poly I :C pour obtenir des CSM2 ; mais aussi sur la littérature des macrophages pour cibler le R848 et obtenir des CSM1 ainsi que sur des études préliminaires de notre équipe montrant l'efficacité de l'IFNγTNFα pour obtenir des CSM2.

Tout d'abord, afin d'optimiser l'effet du LPS pour induire le phénotype CSM1, plusieurs LPS provenant de différents types de bactéries ont été testés. En se basant sur la littérature le LPS O55 : B5 provenant d'*Escherichia Coli* à une concentration de 10ng/ml pendant 1h, le LPS O26 : B6 (*E. coli*) à une concentration de 250ng/ml pendant 3h, le LPS O111 : B4 (*E. coli*) à une concentration de 100ng/ml pendant 24h et le LPS provenant de la *Salmonelle* à une concentration de 10ng/ml pendant 1h ont été choisis. Le choix des concentrations et des temps de préconditionnements s'appuie sur des études décrites dans la littérature[3,4,5,165,7]. Plusieurs paramètres ont été étudiés suite au préconditionnement des CSM par ces LPS, mais seront présentés ici seulement l'analyse des molécules de costimulation.

Aucune différence d'expression des molécules de costimulation CD80 et CD40 n'a été observée sur les CSM(GW) préconditionnées par les différents types de LPS (Figure 15). Ainsi, le LPS O55 : B5 (*E. coli*) initialement utilisé dans l'étude princeps de Waterman sur les CSM1 a été conservé dans la suite des expérimentations.

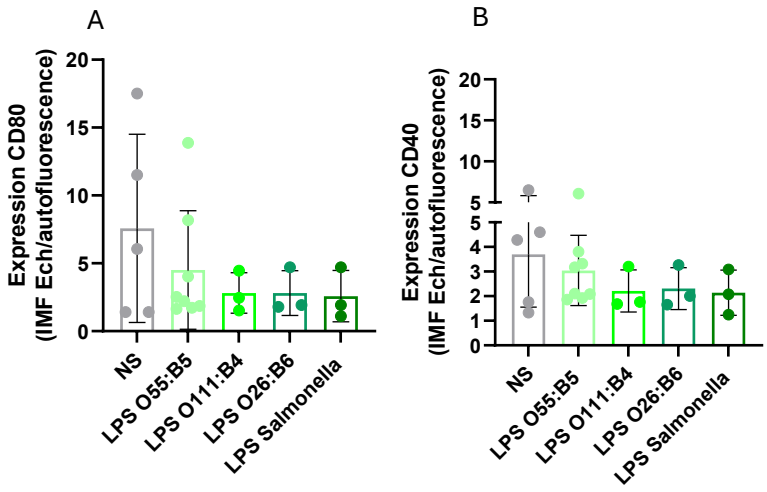


Figure 15 : Expression de molécules de costimulation par des CSM(GW) non stimulées ou préconditionnées avec différentes souches de LPS telles que le LPS O55 : B5 (*E. coli*), le LPS O111 : B4 (*E. coli*), le LPS O26 : B6 (*E. coli*) et le LPS *Salmonella enterica*. Expression de CD80 (A). Expression de CD40 (B). Résultats obtenus par cytométrie en flux et exprimés en moyenne ± SD de ratio d'Intensité Médiane de Fluorescence (IMF) de l'échantillon (Ech) en comparaison à l'autofluorescence générée par ces cellules, n=3-8.

La littérature a également orienté notre choix de préconditionnement vers d'autres molécules permettant d'obtenir le phénotype CSM1 comme :

- le 2-DG (2-désoxy-D-Glucose), un inhibiteur de la glycolyse connu pour diminuer les effets immunorégulateurs des CSM (5 mM pendant 24h)[304].
- une association de TNFα et de PGE2, à une concentration de 5µM+1µg/ml pendant 24h, afin de reproduire un environnement immunomodulateur favorisant l'obtention d'un phénotype pro-inflammatoire par activation de STAT1 à l'origine de la maturation des cellules dendritiques humaines[306].

L'efficacité de ces préconditionnements a été testée sur l'expression de molécules de costimulation CD80 et CD40, exprimées par les cellules pro-inflammatoires (Figure 16).

L'absence de différences d'expression de ces molécules de costimulation, entre les conditions 2-DG et TNFαPGE2 testées, et les molécules classiquement décrites pour obtenir un phénotype pro-inflammatoire, a orienté notre choix de conserver uniquement les préconditionnements LPS et R848 (voir encadrés rouges).

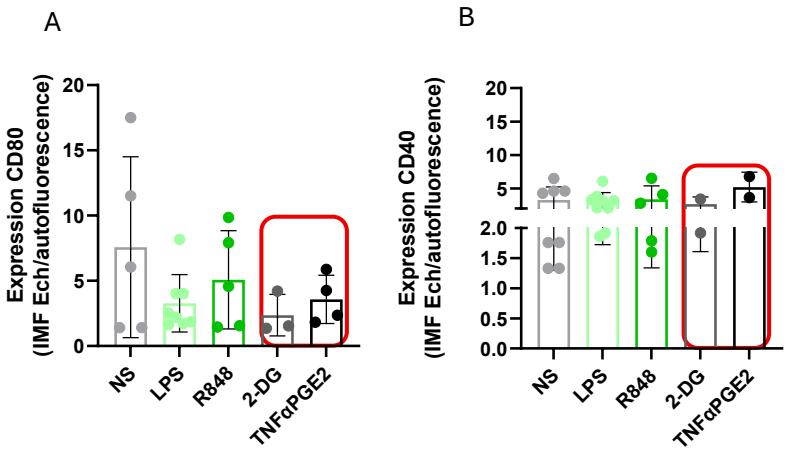


Figure 16 : Expression de molécules de costimulation par les CSM(GW) non stimulées ou préconditionnées avec du LPS, du R848, du 2-DG ou du TNFαPGE2. Expression de CD80 (A). Expression de CD40 (B). Résultats obtenus par cytométrie en flux et exprimés en moyenne ± SD de ratio d'Intensité Médiane de Fluorescence (IMF) en comparaison à l'autofluorescence générée par ces cellules, n=2-9.

Un autre paramètre à prendre en compte lors du préconditionnement moléculaire réside dans le choix du temps et des concentrations de stimulation les plus adéquates à l'obtention des phénotypes immunitaires. Si la littérature est plutôt constante sur le temps et les concentrations de préconditionnements des cellules au R848 (5µM, 24h), et que l'optimisation de ces variantes pour la combinaison IFNγTNFα a déjà été réalisée au sein de travaux antérieurs de l'équipe, ayant montré un bénéfice optimal de ces molécules à une concentration de 20ng/ml + 30ng/ml pendant 48h ; l'utilisation de LPS ou de Poly I :C reste plus sujette aux variations de concentrations et de temps de stimulation. C'est pourquoi deux concentrations à savoir 1µg/ml et 10ng/ml et deux temps de stimulation à savoir un temps court 1h ou un temps long 24h ont été testés pour le préconditionnement au LPS. Concernant le Poly I :C une seule concentration de 1µg/ml a été testée mais sur deux temps de préconditionnement différents, à savoir 1h ou 24h (Figure 17).

En l'absence de marqueurs descriptifs du phénotype CSM1, nous avons choisi d'étudier la sécrétion d'une cytokine pro-inflammatoire : l'IL-8, mais aussi la variation d'une molécule immunomodulatrice exprimée par les CSM2 : PD-L1 ainsi que le potentiel de migration en fonction des préconditionnements. Nous avons pu constater que, l'expression de PD-L1 était la plus élevée au sein des CSM préconditionnées avec du LPS 1µg/ml pendant 24h et ce de manière significative par rapport à l'ensemble des autres conditions (*p<0.05-**p<0.01). Les temps courts de préconditionnement ainsi que l'utilisation de Poly I :C semblaient, en revanche, limiter l'expression de cette molécule immunomodulatrice (Figure 17A).

Par ailleurs, nous avons observé une augmentation significative de la sécrétion de la cytokine pro-inflammatoire IL-8, pour la condition LPS 10ng/ml pendant 24h comparativement à la condition non stimulée et les conditions Poly I:C (*p<0.05-**p<0.01) (Figure 17B).

Enfin, une différence significative a été observée, concernant la capacité de migration des CSM, avec une diminution de la migration des CSM préconditionnées avec du LPS 10ng/ml pendant 1h, en comparaison à la condition CSM préconditionnées avec du LPS 1µg/ml pendant 24h, bien que celle-ci reste possible (**p<0.01) (Figure 17C).

Ainsi, le temps et la concentration de préconditionnement peuvent avoir un impact sur certaines fonctionnalités des CSM. En raison des résultats d'expression de PD-L1 seule la condition LPS 10ng/ml pendant 1h a été conservée. Concernant le Poly I :C, aucune différence significative sur les tests n'a été mise en évidence, c'est pourquoi un temps court d'une heure a été conservé.

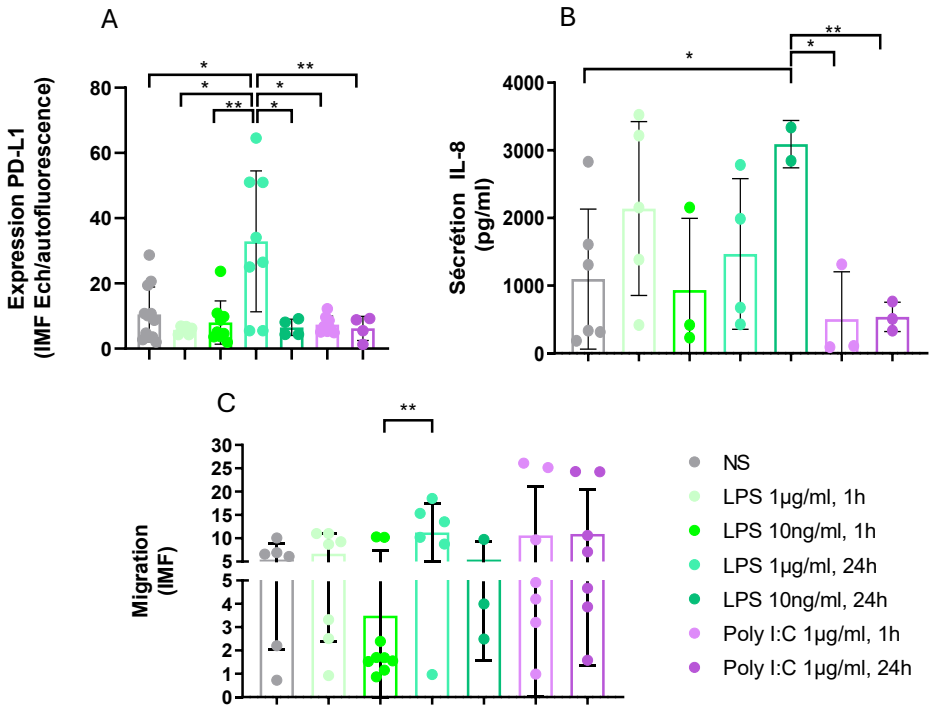


Figure 17 : Impact de la concentration et/ou du temps de préconditionnement des CSM(GW) d'un point de vue phénotypique, sécrétoire ou fonctionnel. Expression de PD-L1 par les CSM non stimulées ou préconditionnées avec (i) du LPS à une concentration de 1µg/ml ou 10ng/ml, pendant 1h ou 24h ; (ii) du Poly I :C à une concentration de 1µg/ml pendant 1h ou 24h. Résultats obtenus par cytométrie en flux et exprimés en moyenne ± SD de ratio d'Intensité Médiane de Fluorescence (IMF) en comparaison à l'autofluorescence générée par ces cellules, n= 4-12, *p<0.05, **p<0.01 (A). Sécrétion de l'IL-8 par les CSM NS ou préconditionnées. Résultats obtenus par cytométrie en flux et exprimés en moyenne de pg/ml ± SD, n=3-6, *p<0.05, **p<0.01 (B). Migration en chambre de Boyden des CSM NS ou préconditionnées. Migration exprimée en moyenne d'Intensité Médiane de Fluorescence (IMF) ± SD, n=3-9, **p<0.01 (C).

Ces différentes optimisations ont permis de conserver les molécules de préconditionnements suivantes, aux temps et concentrations décrits dans le Tableau 10 :

Tableau 10 : Choix des molécules de préconditionnement ainsi que des temps et des concentrations adéquates de stimulations, afin d'obtenir un phénotype immunitaire CSM1ou CSM2.

Molécule de préconditionnement	Concentration de préconditionnement	Temps de préconditionnement	Phénotype immunitaire ciblé
LPS O55 : B5 (E. coli)	10ng/ml	1h	CSM1
R848	5µM	24h	CSM1
Poly I :C	1µg/ml	1h	CSM2
IFNγ + TNFα	20ng/ml + 30ng/ml	48h	CSM2

Une expérience préliminaire combinant les molécules de préconditionnements conservées, a été réalisée afin d'étudier les synergies entre molécules. Les associations suivantes ont ainsi été testées : LPS + Poly I :C (10ng/ml + 1µg/ml, 1h), LPS + R848 (10ng/ml + 5µM, 1h et 24h) et Poly I:C + R848 (1µg/ml + 5µM,1h et 24h) (Figure 18).

Concernant l'expression des molécules de costimulation CD40 et CD80, aucune différence significative entre les molécules utilisées seules et les combinaisons moléculaires testées n'a été observée (Figure 18A, 18B).

Concernant la molécule immunomodulatrice PD-L1, son expression augmentait de manière significative après préconditionnement des CSM avec la combinaison LPS + R848 (*p<0.05 avec la condition LPS) et Poly I :C + R848 (*p<0.05 avec les conditions NS et Poly I :C, **p<0.01 avec la condition LPS) (Figure 18C). En revanche, si la sécrétion d'IL-8 semblait similaire entre les préconditionnements testés, cette sécrétion diminuait par rapport aux CSM NS (Figure 18D).

Cela a permis d'exclure ces combinaisons moléculaires augmentant l'expression d'une molécule immunomodulatrice typiquement exprimée par les CSM2 et de conserver les préconditionnement au LPS, R848, Poly I :C et IFNγTNFα dans la suite des expérimentations.

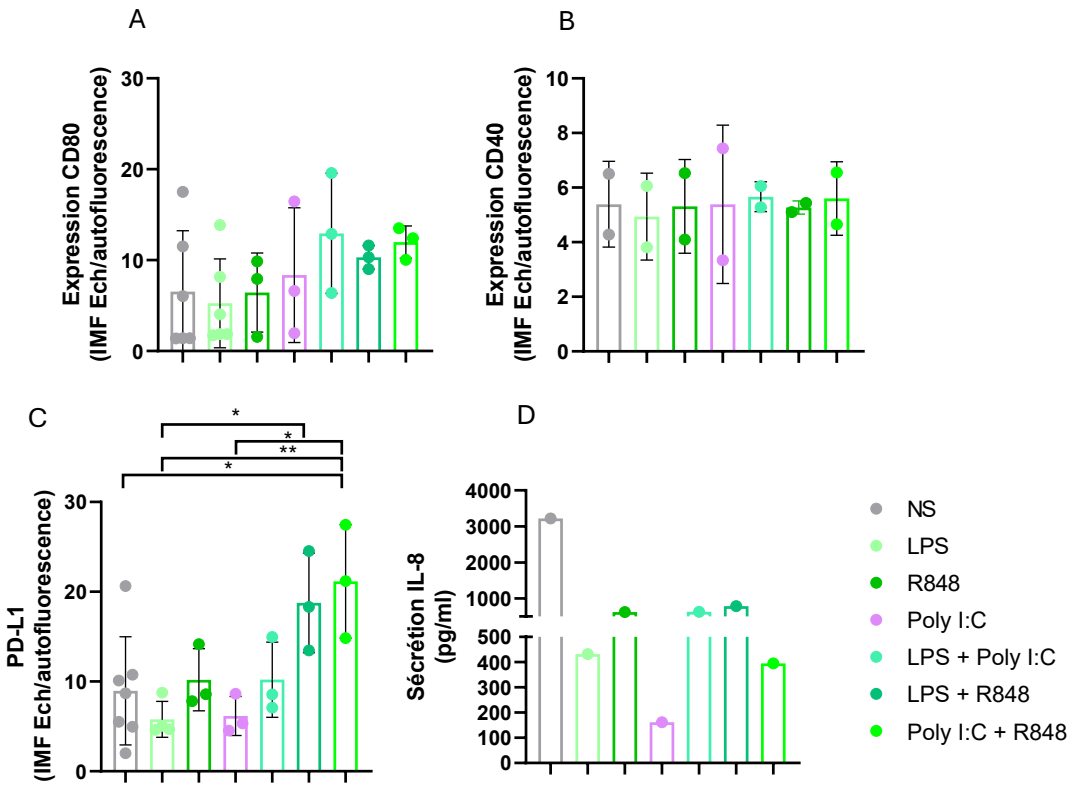


Figure 18 : Expression de marqueurs et sécrétion cytokinique par les CSM(GW) non stimulées ou préconditionnées avec du LPS, du R848, du Poly I :C ou avec des combinaisons de ces molécules. Expression de CD80 (A). Expression de la molécule CD40 (B). Expression de PD-L1 (C). Résultats obtenus par cytométrie en flux et exprimés en moyenne ± SD de ratio d'Intensité Médiane de Fluorescence (IMF) en comparaison à l'autofluorescence générée par ces cellules, n=2-7, *p<0.05, **p<0.01. Sécrétion de l'IL-8 (D). Résultats obtenus par ELISA et exprimés en pg/ml, n=1.

Après avoir défini quelles conditions de préconditionnements seraient utilisées pour obtenir des CSM1 (LPS/R848) ou des CSM2 (Poly I :C et IFNγTNFα), le phénotypage classique des CSM selon les critères définis par l'ISCT (CD105+, CD90+, CD73+ et CD45-, CD34-, HLA-DR-), a été réalisé (Figure 19).

Il apparaît que, quels que soit les préconditionnements, les CSM maintiennent l'expression des marqueurs CD105, CD90 et CD73 (expressions supérieures à 95%) et n'expriment pas les marqueurs hématopoïétiques CD45, CD34 et HLA-DR (expressions inférieures à 2%) sans différences significatives entre les CSM préconditionnées ou non (Figure 19A-C).

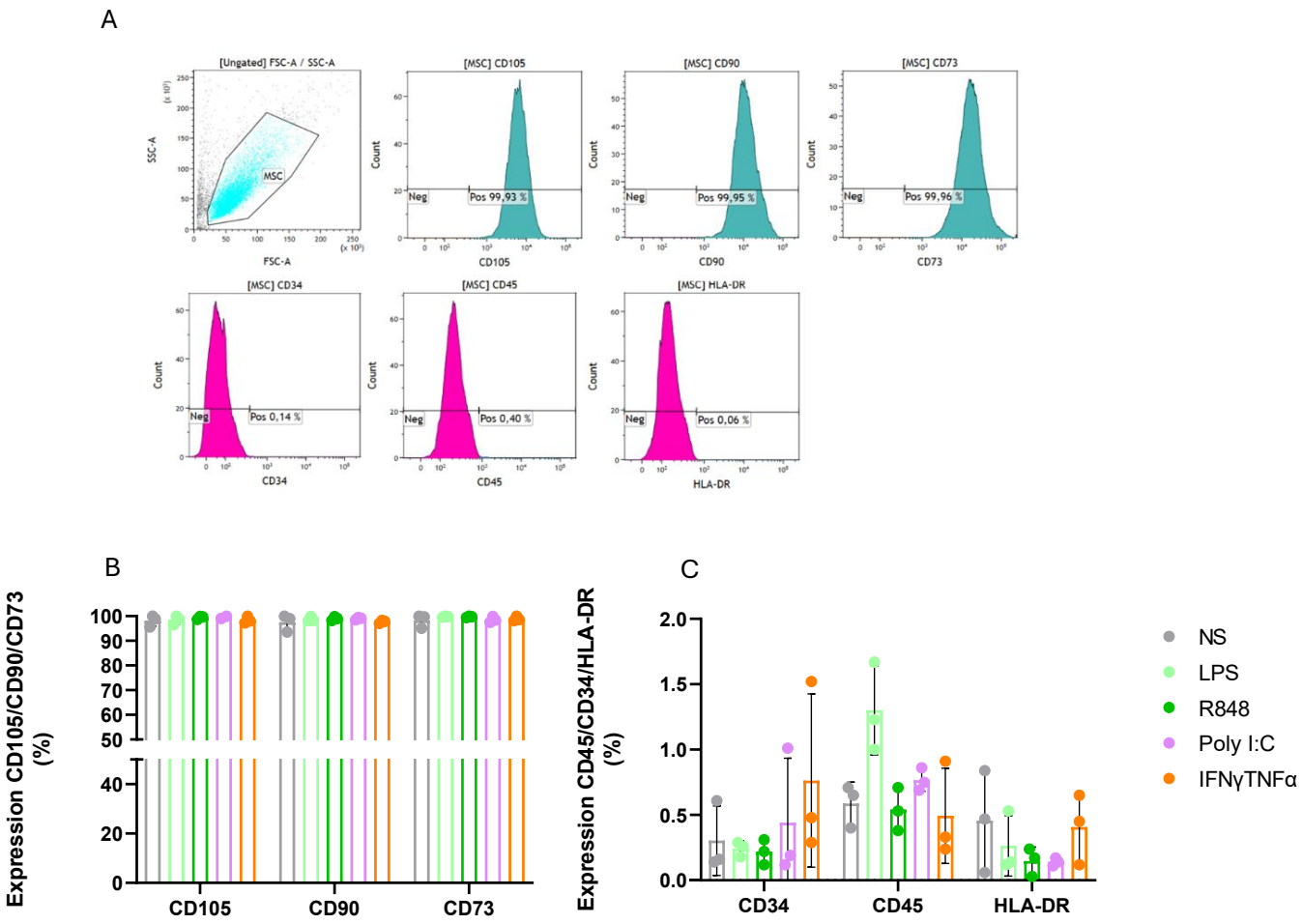


Figure 19 : Phénotypage des CSM(GW) non stimulées ou préconditionnées avec du LPS, du R848, du Poly I :C ou de l'IFNγTNFα, selon les critères établis par l'ISCT. Stratégie de « gating » des marqueurs exprimés ou non par les CSM non stimulées (A). Expression des marqueurs mésenchymateux : CD105, CD90 et CD73 (B). Expression des marqueurs hématopoïétiques : CD34, CD45 et HLA-DR (C). Résultats obtenus par cytométrie en flux et exprimés en pourcentage (%) moyen ± SD, n=3.

2) Impact de la congélation sur les phénotypes immunitaires

Afin de se rapprocher d'une approche clinique pour de futures applications en thérapie cellulaire, le préconditionnement des CSM avant leur congélation est une nécessité afin que celles-ci soient prêtes à l'emploi.

C'est pourquoi dans ce projet, des CSM ont été préconditionnées, cryoconservées et utilisées après décongélation. Mais cela pose la question de l'impact de ce processus sur le comportement cellulaire. En effet, plusieurs études ont montré un impact de la congélation notamment sur les propriétés fonctionnelles des CSM.

Ces CSM cryoconservées présentaient après décongélation immédiate, des propriétés immunomodulatrices et hémorégulatrices réduites et une élimination plus rapide *in vivo via* une forte activation du complément[8].

Cependant, lorsque les CSM étaient préconditionnées à l'IFNγ, elles préservaient, en partie, leur intégrité notamment au niveau de la propriété d'adressage tissulaire[9]. C'est pourquoi des analyses fonctionnelles ont été menées entre CSM(GW) fraîches et décongelées.

Grâce à des cocultures entre les CSM(GW) et des LT, il a été mis en évidence que seules les CSM(GW) fraîches étaient en capacité de diminuer significativement la prolifération des LT CD3+ (****p<0.0001 par rapport à la condition LT CD3+ activés, seuls). Il a également été mis en évidence une différence significative dans la capacité des CSM fraîches et non stimulées à diminuer la prolifération des LT activés en comparaison à leurs homologues décongelées (**p<0.01). Si cette information pouvait désavantager la congélation/décongélation des CSM dans leur capacité de régulation immunitaire, nous avons pu montrer que l'utilisation de CSM, préconditionnées ou non et décongelées en coculture semblait prometteuse. En effet, nous avons observé que les CSM préconditionnées au LPS ou au R848 entraînaient une moindre inhibition de la prolifération des LT lorsqu'elles étaient congelées au préalable (**p<0.01). Cette perte des capacités immunosuppressives des CSM envers les LT CD3+ résultant de la congélation des CSM favoriserait les préconditionnements de type CSM1.

En revanche, il est à noter que si l'ensemble des CSM préconditionnées au LPS, au R848 ou au Poly I:C et décongelées permettait une prolifération des LT CD3+ à plus de 90%, les CSM préconditionnées avec de l'IFNγTNFα conservaient leurs capacités immunomodulatrices envers cette population immunitaire, comme en témoigne l'absence de différence significative entre le statut frais ou décongelé et une prolifération des LT CD3+ de 44,5 % seulement après coculture avec ces CSM (Figure 20).

Au vu de ces résultats et afin d'envisager une utilisation clinique future, des CSM décongelées ont été utilisées pour l'ensemble des expérimentations à l'exception des tests fonctionnels d'immunomodulation afin de ne pas masquer les propriétés immunosuppressives des CSM non stimulées et préconditionnées avec du LPS, du R848 et du Poly I:C.

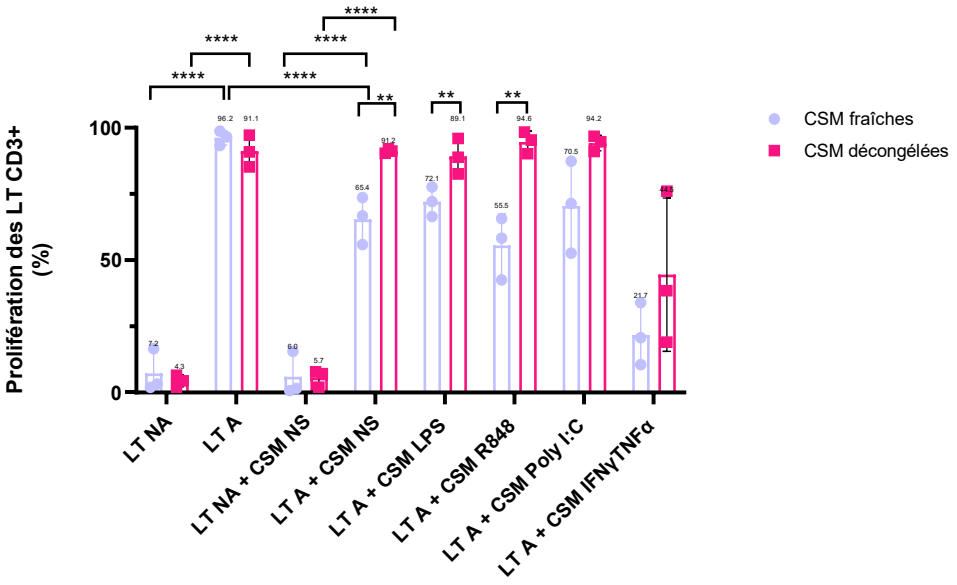


Figure 20 : Capacité d'immunomodulation des CSM(GW), sur la prolifération des lymphocytes T, selon leur statut frais ou décongelé. Prolifération des LT non activés ou activés et cocultivés avec des CSM non stimulées ou préconditionnées avec du LPS, du R848, du Poly I :C ou de l'IFNγTNFα. Résultats obtenus par cytométrie en flux et exprimés en pourcentage (%) moyen de prolifération ± SD, n=3, $^{**}p<0.01$, $^{****}p<0.0001$.

II. Etude phénotypique des CSM(GW) préconditionnées *in vitro* : à la recherche de biomarqueurs

1) Analyse des marqueurs immunomodulateurs et de costimulation

La caractérisation des CSM1, issues des préconditionnements au LPS ou au R848, des CSM2, issues des préconditionnements au Poly I :C ou à l'IFNγTNFα, ainsi que des CSM non stimulées (CSM NS) a, tout d'abord, été réalisée par une analyse phénotypique des cellules (Figure 21).

Nous avons étudié, en premier lieu, l'expression des molécules de costimulation CD80, CD86, CD40 et de la molécule de classe II du CMH HLA-DR/DP/DQ, exprimées par des molécules présentatrices d'antigènes (Figure 21A-D). L'objectif était de savoir si les préconditionnements en faveur du phénotype CSM1 pourraient augmenter l'expression de ces molécules classiquement absentes à la surface des CSM.

Il a été observé, sur la Figure 21, que les CSM exprimaient de manière très hétérogène la molécule CD80 et qu'une tendance à l'augmentation de son expression été constatée après préconditionnement par l'IFNγTNFα. A l'inverse, la molécule CD86 n'était pas exprimée par les CSM non stimulées ou préconditionnées (ratio IMF < 2). Concernant la molécule CD40, son expression était relativement faible au sein des CSM NS ou préconditionnées avec du LPS, du R848 ou du Poly I :C (ratio IMF < 5) mais significativement augmentée au sein des CSM préconditionnées avec de l'IFNγTNFα ($^{*}p<0.05$).

Enfin, aucun impact du préconditionnement sur l'expression des molécules de classe II du CMH n'a été observé, avec une expression de cette molécule n'excédant pas un ratio d'intensité médiane de fluorescence de 2.

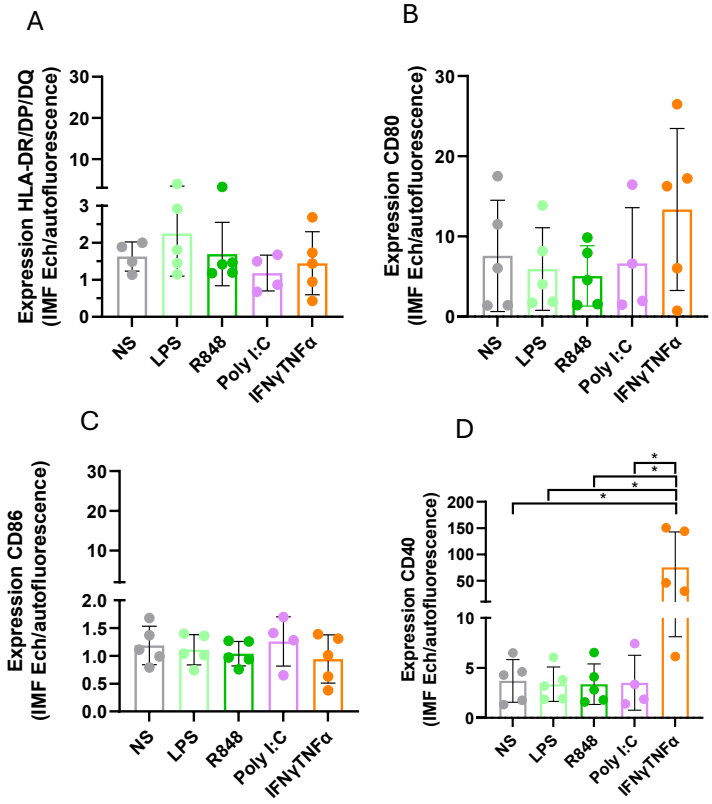


Figure 21 : Expression des molécules de costimulation par des CSM(GW) non stimulées ou préconditionnées avec du LPS, du R848, du Poly I :C ou de l'IFNγTNFα. Expression de la molécule HLA-DR/DP/DQ (A). Expression de la molécule CD80 (B). Expression la molécule CD86 (C). Expression de la molécule CD40 (D). Résultats obtenus par cytométrie en flux et exprimés en moyenne ± SD de ratio d'Intensité Médiane de Fluorescence (IMF) en comparaison à l'autofluorescence générée par ces cellules, n=4-5, *p<0.05.

Ensuite, trois molécules immunomodulatrices ont été ciblées : l'enzyme IDO, la molécule de « checkpoint » immunitaire PD-L1 et la molécule de classe II du CMH impliquée dans la tolérance materno-fœtale, à savoir HLA-G5/G6 (Figure 22A-C).

Il a été mis évidence, que les CSM non stimulées tout comme les CSM préconditionnées exprimaient les molécules IDO, PD-L1 et HLA-G5/G6. Aucune différence concernant l'expression de ces molécules n'a été observée, à l'exception de la molécule PD-L1 largement exprimée par les CSM préconditionnées avec de l'IFNγTNFα et ce de manière significative par rapport aux CSM contrôles non stimulées et aux autres conditions de préconditionnements testées (****p<0.0001).

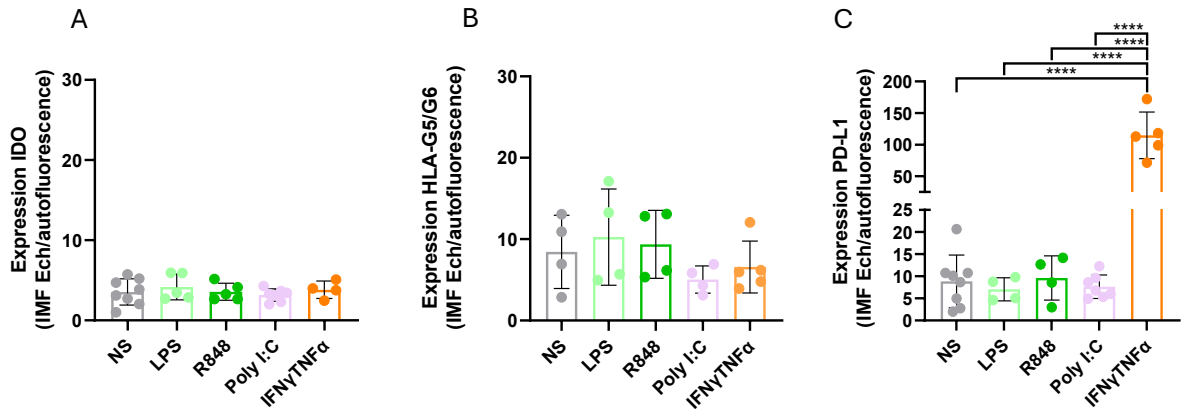


Figure 22 : Expression des principales molécules immunomodulatrices, par des CSM(GW) non stimulées ou préconditionnées avec du LPS, du R848, du Poly I :C ou de l'IFNγTNFα. Expression de l'enzyme IDO (A). Expression de la molécule HLA-G5/G6 (B). Expression de la molécule PD-L1 (C). Résultats obtenus par cytométrie en flux et exprimés en moyenne ± SD de ratio d'Intensité Médiane de Fluorescence (IMF) en comparaison à l'autofluorescence générée par ces cellules, n=4-8, ****p<0.0001.

2) Analyse du sécrétome

2.1) Sécrétions cytokiniques et de facteurs immunomodulateurs

Les cytokines et chimiokines pro-inflammatoires IL-6, IL-8, CCL3, RANTES ont été étudiées ainsi que la cytokine anti-inflammatoire IL-4 et la forme soluble de PD-L1 (PD-L1s).

Nous avons pu observer, sur la Figure 23, que les CSM préconditionnées avec de l'IFNγTNFα sécrétaient un taux de cytokines et chimiokines pro-inflammatoires plus élevé comparativement aux CSM non stimulées ou préconditionnées avec du LPS, du R848 ou du Poly I :C (*p<0.05 concernant la sécrétion de l'IL-6 et de RANTES, *p<0.05-**p<0.01 concernant la sécrétion de CCL3, *p<0.05-**p<0.01 concernant la sécrétion de l'IL-8, en comparaison aux conditions LPS, R848 et Poly I :C uniquement) (Figure 23A-D).

Aucune différence significative n'a été observée entre les autres préconditionnements à l'exception de l'IL-6, dont la sécrétion était significativement diminuée dans la condition LPS (**p<0.01 en comparaison aux conditions NS et R848) et Poly I :C (*p<0.05 en comparaison à la condition R848 et **p<0.01 en comparaison à la condition NS) (Figure 23A).

Aucune différence significative n'a été observée entre les conditions concernant les taux d'IL-4 et de PD-L1s.

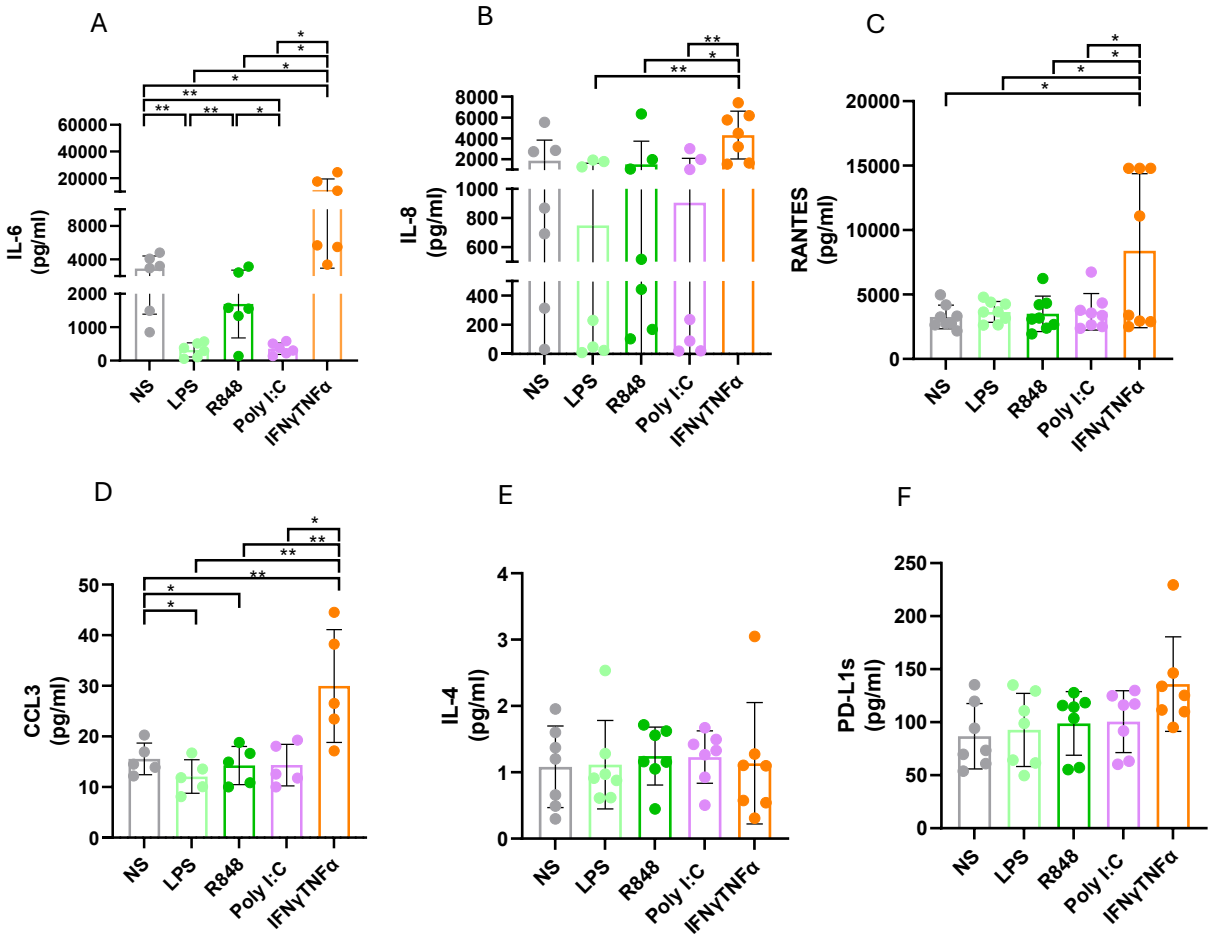


Figure 23 : Analyse du sécrétome des CSM(GW) non stimulées ou préconditionnées avec du LPS, du R848, du Poly I:C ou de l'IFNγTNFα. Sécrétion de l'IL-6 (A). Sécrétion de l'IL-8 (B). Sécrétion de RANTES (C). Sécrétion de CCL3 (D). Sécrétion de l'IL-4 (E). Sécrétion de PD-L1s (F). Résultats obtenus par ELISA et exprimés en moyenne de pg/ml ± SD, n=5-8, *p<0.05, **p<0.01.

2.2) Sécrétions d'exosomes

D'autre part, une analyse des particules sécrétées par ces CSM a été menée (en collaboration avec le LRGP (Laboratoire Réactions et Génie des Procédés) afin d'évaluer l'impact du préconditionnement sur la sécrétion de vésicules extra-cellulaires (VE) (Figure 24).

Les résultats de cette analyse ont montré que les CSM sécrétaient, dans le surnageant de culture, des particules à une concentration supérieure à 1,5 x 10^9 particules/ml et que ces particules présentaient une taille comprise entre 151 et 167nm (Figure 24A, 24B).

La caractérisation de ces particules a mis en évidence que celles-ci dérivaient de CSM grâce à une expression positive, à la surface de ces vésicules, des marqueurs CD73, CD44, CD49e, CD105 et CD90, et une absence d'expression des molécules CD19, CD34, CD14, CD45 et HLA-DR (Figure 24C1).

Les particules sécrétées par les CSM exprimaient également les marqueurs spécifiques des VE à savoir CD63, CD9 et CD81 confirmant leur nature (Figure 24C2). Cependant aucune différence significative n'a été observée entre les différentes conditions d'étude.

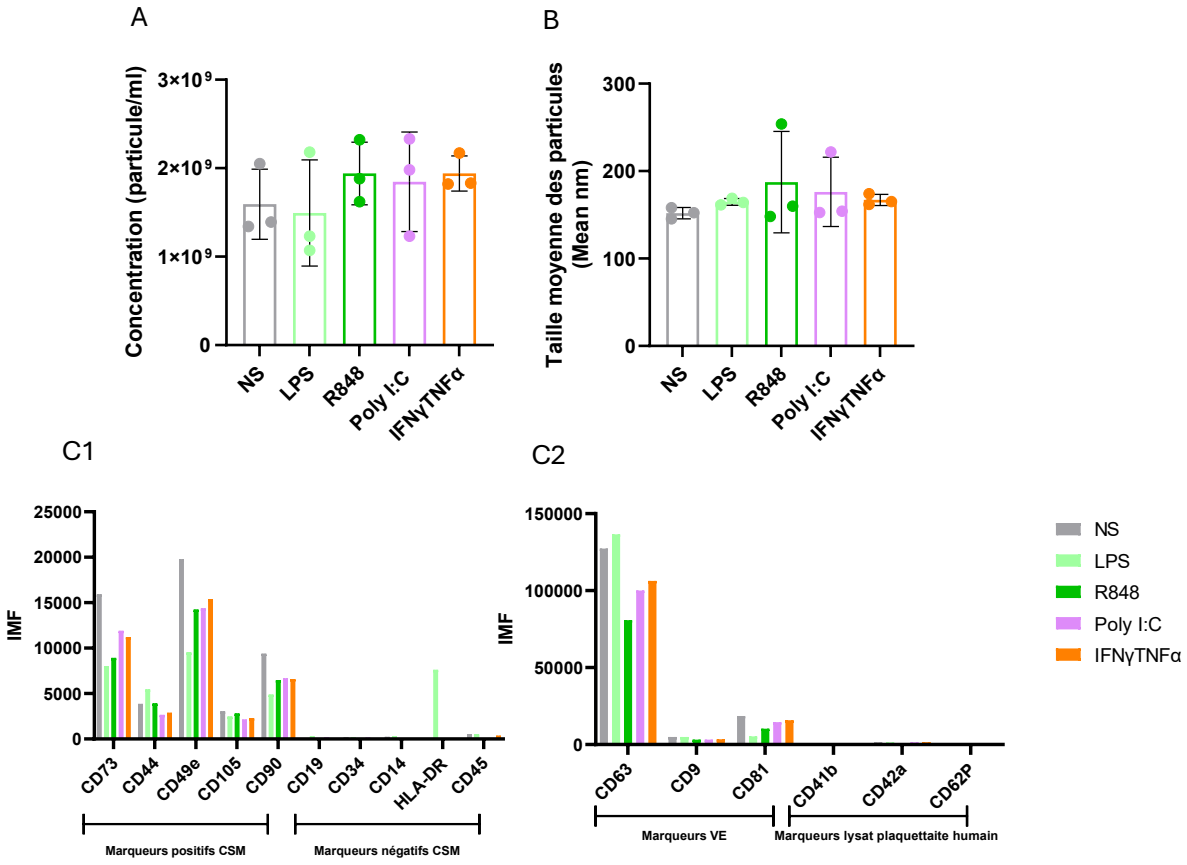


Figure 24 : Analyse des particules sécrétées par les CSM(GW) non stimulées ou préconditionnées avec du LPS, du R848, du Poly I :C ou de l'IFNγTNFα, au sein du surnageant de culture. Concentration des particules sécrétées, exprimée en moyenne de particules/ml ± SD (A). Taille des particules sécrétées, exprimée en moyenne nm ± SD (B). Résultats obtenus par NTA, n=3. Caractérisation des particules sécrétées (C). Expression des marqueurs spécifiques aux CSM, au sein des particules sécrétées (C1). Expression des marqueurs spécifiques aux VE, au sein des particules sécrétées (C2). Résultats obtenus par analyse MACSPlex et exprimés en Intensité Médiane de Fluorescence (IMF), n=1 constitué de 3 souches de CSM(GW).

3) Analyse de précurseurs plus précoces : exemple des microARN

Une recherche de marqueurs précoces a également été menée, toujours dans un souci de discrimination des différents phénotypes immunitaires, obtenus à l'issue des préconditionnements.

Pour cela, les microARN (miR), molécules précoces aux fonctions pro- ou anti-inflammatoires ont été analysés. Deux miR ont spécifiquement été ciblés, le miR-146a décrit comme anti-inflammatoire et le miR-155 décrit comme pro-inflammatoire au sein de la littérature[315].

La Figure 25 montre que l'expression du miR-146a n'a pas été modifié par le préconditionnement contrairement à l'expression du miR-155 significativement augmentée au sein des CSM préconditionnées avec de l'IFNγTNFα et ce en comparaison aux autres conditions de préconditionnement (*p<0.05) (Figure 25A, 25B).

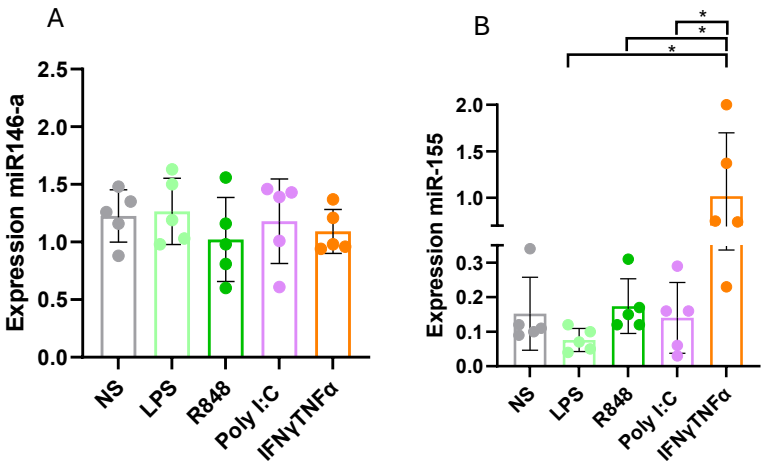


Figure 25 : Expression des microARN au sein des CSM(GW) non stimulées ou préconditionnées avec du LPS, du R848, du Poly I :C ou de l'IFNγTNFα. Expression du miR-146a (A). Expression du miR-155 (B). Résultats obtenus par la méthode TaqMan miRNA Advanced Assay et exprimés en moyenne de CT ± SD, après normalisation avec le miR-39 issu de C.elegans, n=5, *p<0.05.

III. Etudes fonctionnelles des CSM(GW) préconditionnées *in vitro*

L'analyse fonctionnelle s'est portée, d'une part, sur les capacités immunomodulatrices des CSM mais aussi sur leurs capacités migratoires post-préconditionnement.

1) Etude des capacités immunomodulatrices

1.1) Envers la prolifération des lymphocytes T

Action immunomodulatrice des CSM préconditionnées ou non :

Les CSM non stimulées ou préconditionnées ont été cultivées avec des LT activés. Il apparaît, sur la Figure 26, que les CSM NS ou préconditionnées (fraîches) étaient toutes capables de diminuer de façon significative la prolifération des LT CD3+ activés (***p*<0.01-*****p*<0.0001).

En revanche, il est à noter que les CSM préconditionnées avec de l'IFNγTNFα diminuaient de manière significativement plus élevée la prolifération des LT CD3+ en comparaison aux LT activés seuls (*****p*<0.0001) et aux autres conditions de culture des CSM (**p*<0.05-***p*<0.01) (Figure 26A).

Il a été observé les mêmes résultats pour les sous-populations LT CD4+ et LT CD8+ avec également des différences entre les conditions de préconditionnements. Le préconditionnement du Poly I :C induisait, en effet, une capacité d'inhibition de la prolifération des LT réduite par rapport aux autres conditions (**p*<0.05 par rapport à la condition CSM NS pour les LT CD3+, **p*<0.05 par rapport à la condition CSM R848 et ***p*<0.01 par rapport à la condition IFNγTNFα, pour les LT CD4+ et les LT CD8+). Les CSM préconditionnées avec du R848 présentaient, quant à elles, une capacité inhibitrice de la prolifération des LT CD4+ et des LT CD8+ plus élevée en comparaison aux CSM LPS et Poly I :C (**p*<0.05) (Figure 26B, 26C).

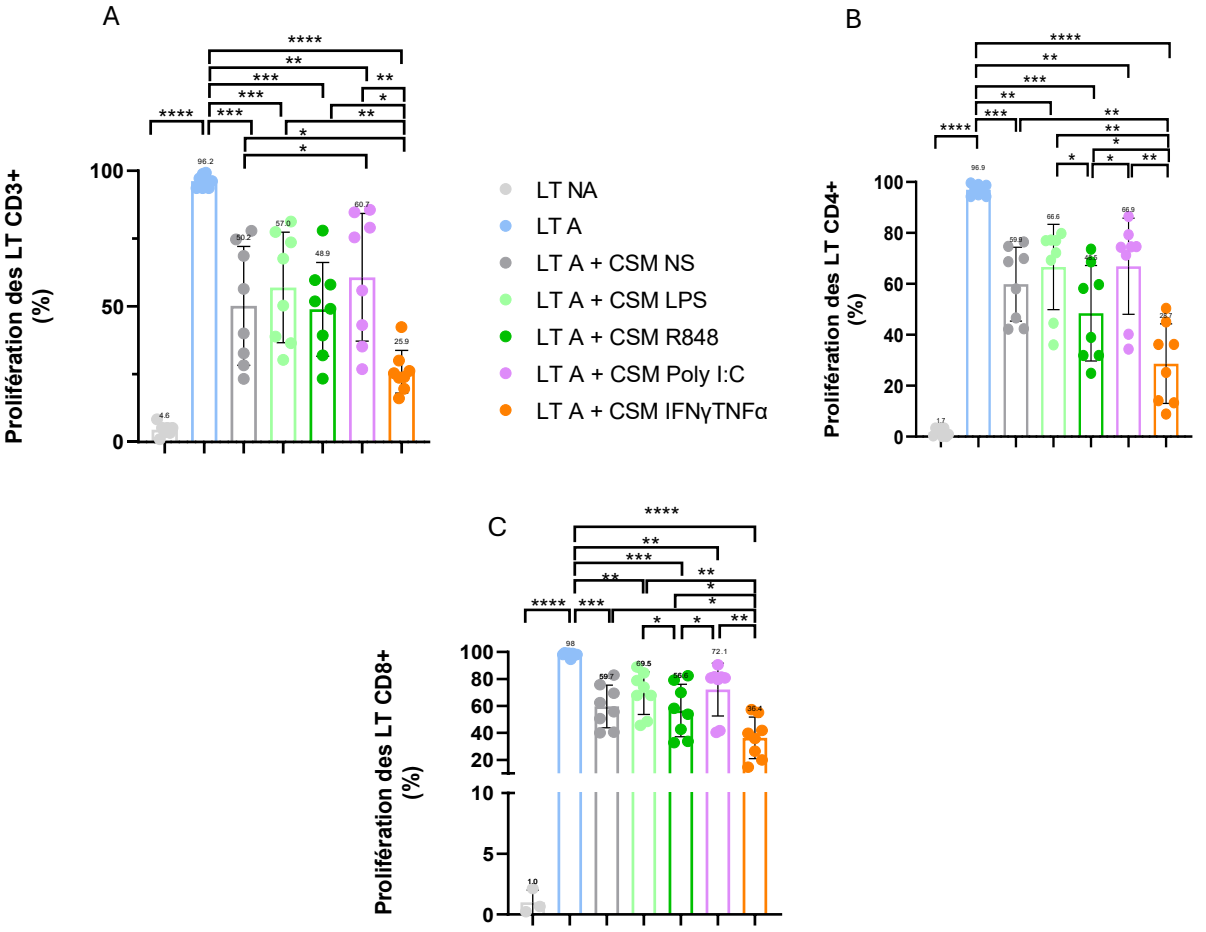


Figure 26 : Capacités immunomodulatrices des CSM(GW) cocultivées avec des lymphocytes T. Prolifération des LT CD3+ activés ou non et cocultivés avec des CSM non stimulées ou préconditionnées avec du LPS, du R848, du Poly I :C ou de l'IFNγTNFα (A). Prolifération des LT CD4+ activés ou non et cocultivés avec des CSM NS ou préconditionnées (B). Prolifération des LT CD8+ activés ou non et cocultivés avec des CSM NS ou préconditionnées (C). Coculture des CSM et des LT à un ratio 1 : 1. Résultats obtenus par cytométrie en flux et exprimés en pourcentage (%) moyen ± SD, n=8, **p*<0.05, ***p*<0.01, ****p*<0.001, *****p*<0.0001.

Action immunostimulante des CSM préconditionnées ou non :

Afin d'étudier l'action immunostimulante des CSM1, un contexte d'anergie immunitaire a été mis en place. Pour cela des CMN totales issues de donneurs sains ont été intoxiquées à de fortes doses de LPS, afin de mimer une infection bactérienne sévère, et/ou traitées avec un puissant immunosuppresseur à savoir, la méthylprednisolone.

L'utilisation de CMN totale, dans ce test fonctionnel, était requise en raison de l'implication de différents partenaires immunitaires dans la mise en place d'un contexte anergique. Cependant les LT CD3+ ont ensuite été triés afin de se mettre dans les mêmes conditions que précédemment.

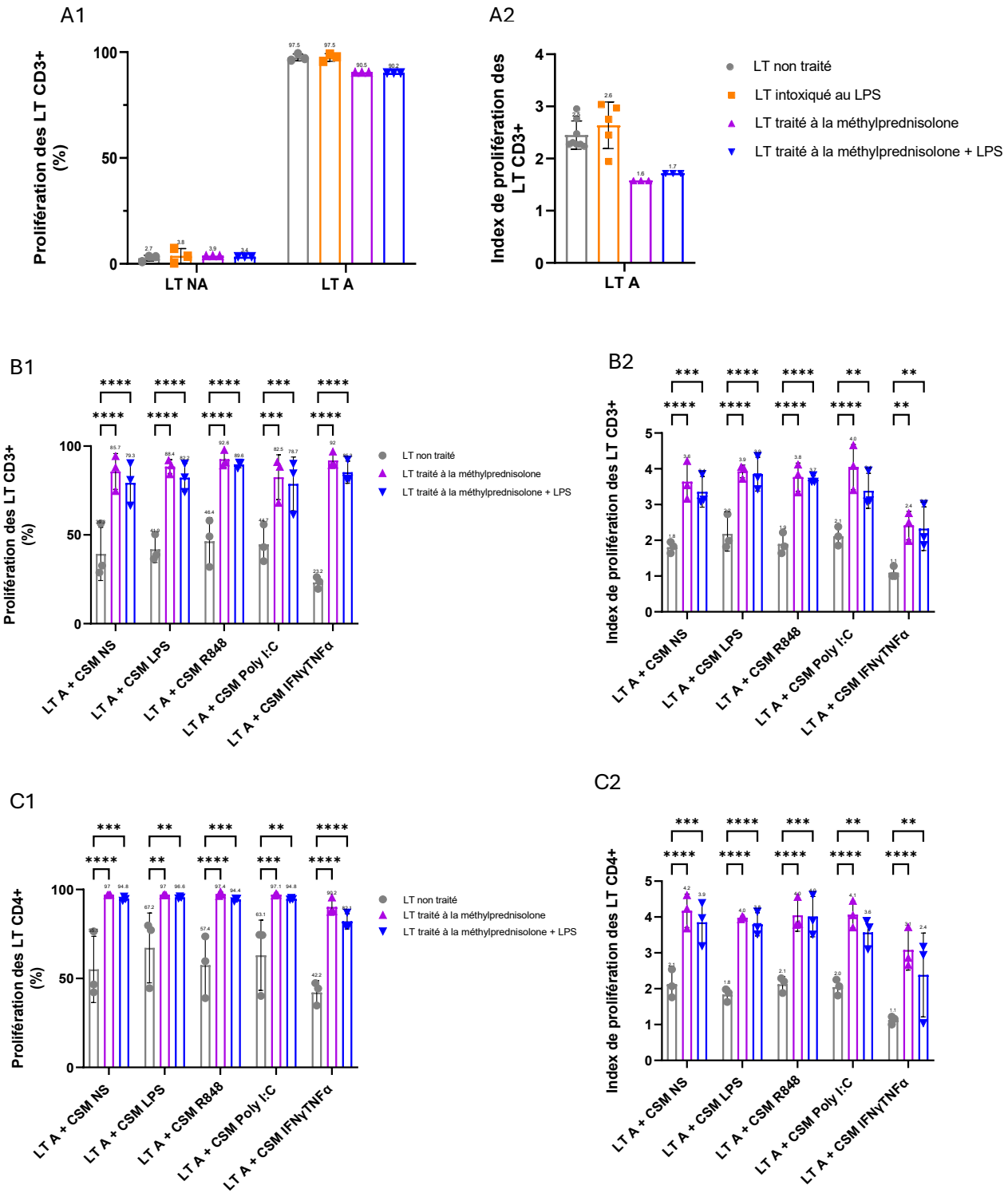
Nos résultats, présentés sur la Figure 27, ont mis en évidence que seule l'utilisation de la méthylprednisolone couplée ou non à du LPS, diminuait la prolifération des LT d'environ 7% par rapport aux LT non traités et aux LT intoxiqués au LPS (Figure 27A1).

L'index de prolifération, correspondant au nombre moyen de division par cellules parmi les cellules proliférantes, a ensuite permis une analyse plus fine de l'efficacité des traitements, dans l'induction de l'anergie cellulaire (Figure 27A2). Cet index a également mis en évidence, après traitement des LT à la méthylprednisolone seule ou couplée à du LPS, une diminution de la prolifération de ces cellules (Figure 2A2). L'absence de significativité provient certainement de l'utilisation de CMN issues d'un même individu. Par la suite, seule l'anergie induite à l'aide de la méthylprednisolone +/- LPS a été testée avec les CSM.

Nous avons pu observer que la prolifération des LT (LT CD3+, LT CD4+ et LT CD8+) rendus anergiques par l'utilisation de méthylprednisolone seule ou combinée avec du LPS était significativement moins diminuée par l'ensemble des CSM, préconditionnées ou non comparativement à la prolifération des LT non anergiques issus d'une coculture avec des CSM (*p<0.05-****p<0.0001) (Figure 27B1, 27C1, 27D1). Les mêmes résultats ont été observés pour l'index de prolifération (**p<0.01-****p<0.0001) (Figure 27B2-D2) montrant la perte des capacités immunosuppressives des CSM dans un contexte immunosuppressif.

Etonnamment, les CSM préconditionnées avec de l'IFNγTNFα perdaient elles aussi leurs propriétés immunosuppressives envers la prolifération des LT traités à la méthylprednisolone contrairement à ce qui avait été observé au niveau des LT non anergiques (LT CD3+ non anergiques 23.2% de prolifération après coculture avec des CSM IFNγTNFα, LT CD3+ traités à la méthylprednisolone 92% de prolifération, LT CD3+ traités à la méthylprednisolone + LPS 85.3% de prolifération (****p<0.0001 entre les deux conditions d'anergie à la méthylprednisolone et la condition non anergique)). Cependant, l'index de prolifération des LT semblait montrer que les capacités immunomodulatrices des CSM préconditionnées à l'IFNγTNFα étaient conservées.

En effet, cet index était élevé après coculture de ces CSM avec des LT traités à la méthylprednisolone +/- LPS, par rapport à la condition non anergique (**p<0.01), mais restait deux fois moins élevé que pour les autres conditions d'étude (index de prolifération 2,4/2,3) au sein des LT CD3+ (Figure 27B2). Cela met en évidence que le mode d'analyse de la prolifération des LT est essentiel pour la compréhension du comportement immunitaire des CSM préconditionnées.



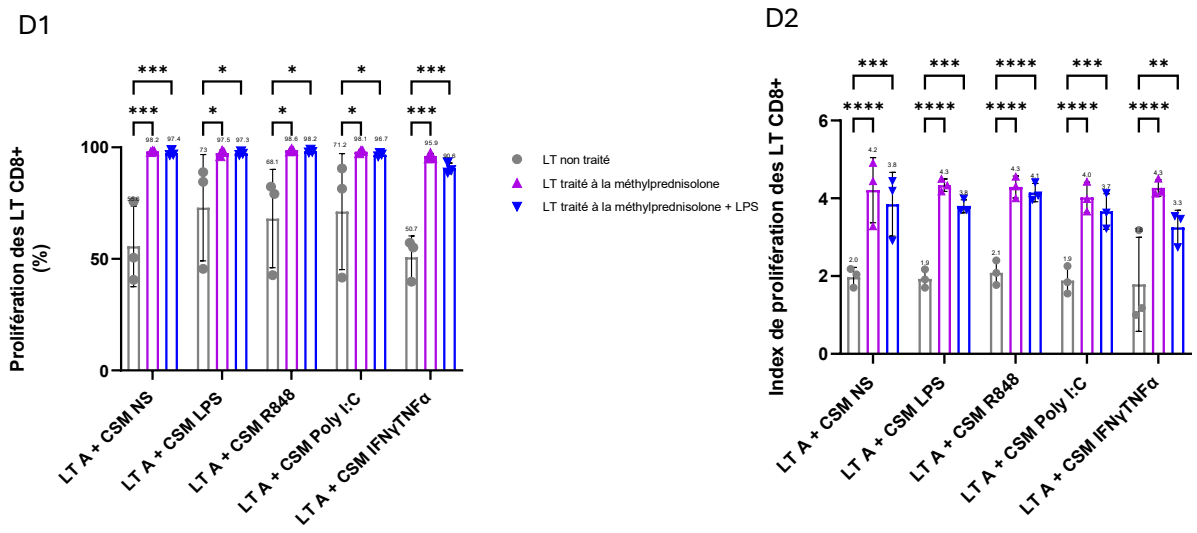
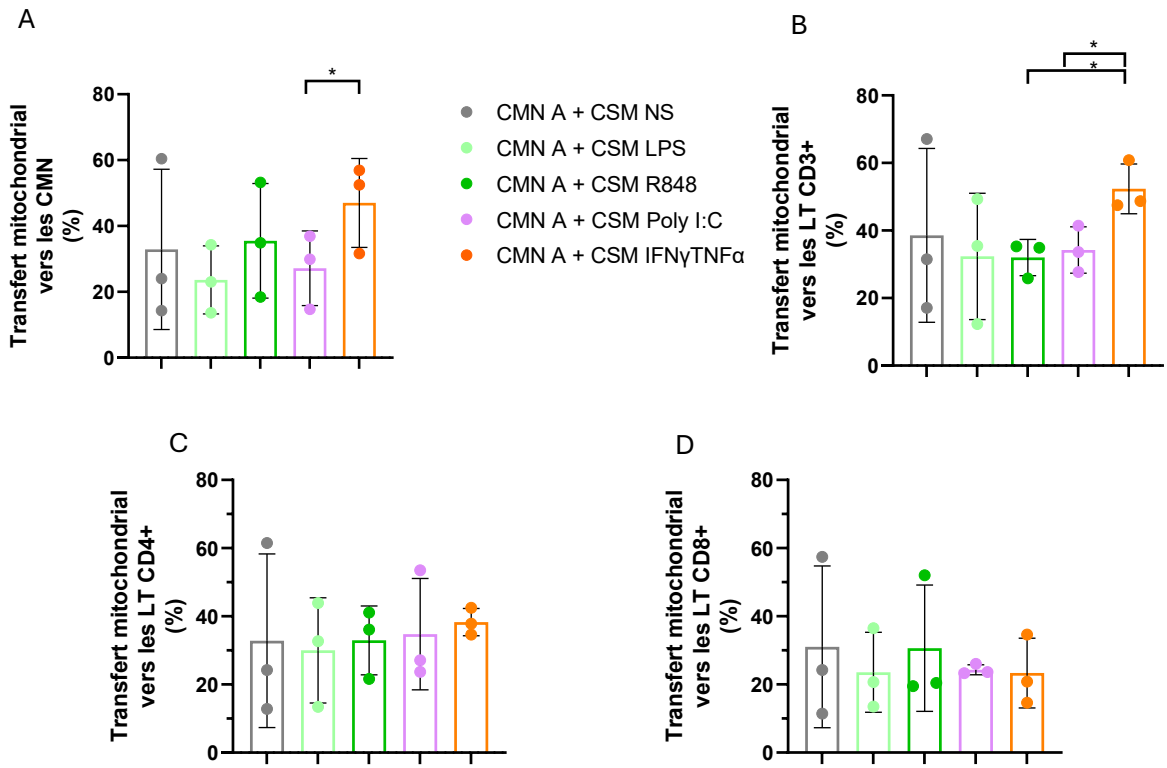


Figure 27 : Capacités immunomodulatrices des CSM(GW) cocultivées avec des LT rendus anergiques. Prolifération des LT CD3+ non activés ou activés, non anergiques ou rendus anergiques par intoxication au LPS (1µg/ml, 24h) ou traitement à la méthylprednisolone (2µg/ml, 24h) ou par un mélange méthylprednisolone + LPS (2µg/ml + 1µg/ml) dérivant de CMN issues de multiples donneurs (condition non anergique et condition LPS) ou d'un seul donneur (conditions méthylprednisolones) (A). En pourcentage (%), n=3 (A1). En index de prolifération, n=3-8 (A2). Prolifération des LT CD3+ non anergiques ou rendus anergiques suite au traitement par la méthylprednisolone ou par la méthylprednisolone + LPS, activés et cocultivés avec des CSM non stimulées ou préconditionnées avec du LPS, du R848, du Poly I :C ou de l'IFNγTNFα (B). En pourcentage (%) (B1). En index de prolifération (B2). Prolifération des LT CD4+ non anergiques ou rendus anergiques, activés et cocultivés avec des CSM NS ou préconditionnées (C). En pourcentage (%) (C1). En index de prolifération (C2). Prolifération des LT CD8+ non anergiques ou rendus anergiques, activés et cocultivés avec des CSM NS ou préconditionnées (D). En pourcentage (%) (D1). En index de prolifération (D2). Coculture des CSM et les lymphocytes T à un ratio 1 : 1. Résultats obtenus par cytométrie en flux et exprimés en moyenne ± SD, n=3, *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001, ****p<0.0001.

1.2) Médiées par le transfert mitochondrial

Comme évoqué précédemment, il a été décrit que les CSM pouvaient moduler l'activité des cellules immunitaires par transfert mitochondrial. L'impact du préconditionnement sur ce transfert mitochondrial a été évalué en réalisant des cocultures entre CSM, non stimulées ou préconditionnées, et des CMN. Pour cela, les mitochondries des CSM ont été marquées grâce à une sonde fluorescente (Mitotracker DeepRed) avant coculture avec les CMN. A l'issue de la coculture, les CMN ont été récupérées et chaque population de cellule immunitaire a été analysées par cytométrie en flux (Figure 28, 29).

Nous avons pu mettre en évidence que l'ensemble des CSM préconditionnées ou non était en capacité de transférer leurs mitochondries aux CMN totales, aux LT CD3+, aux LT CD4+, aux LT CD8+, aux LB et aux monocytes, avec une augmentation significative du transfert lorsque les CSM étaient préconditionnées à l'IFNγTNFα et ce envers les CMN totales (*p<0.05 par rapport aux CSM Poly I :C) et les LT CD3+ (*p<0.05 par rapport aux CSM Poly I :C et R848) (Figure 28A-F). Cependant le faible échantillonnage et la forte hétérogénéité inter-souches n'ont pas permis de mettre en évidence d'autres variations significatives.



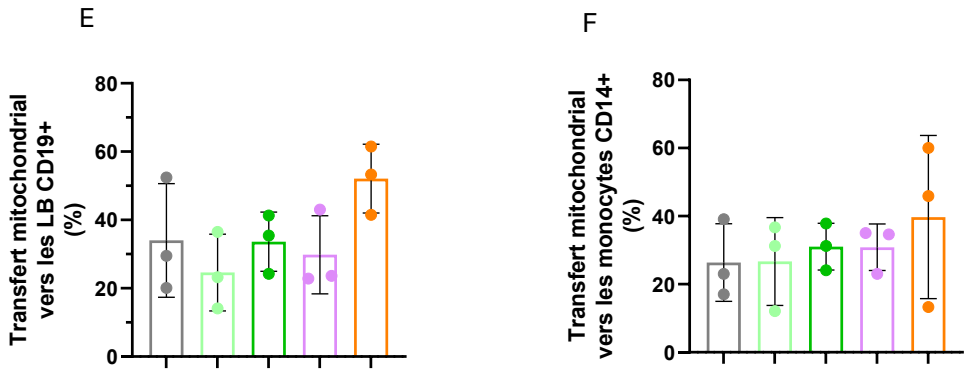


Figure 28 : Transfert mitochondrial des CSM(GW) non stimulées ou préconditionnées avec du LPS, du R848, du Poly I :C ou de l'IFNγTNFα, vers les sous-populations immunitaires. Transfert mitochondrial vers les CMN totales (A). Vers les LT CD3+ (B). Vers les LT CD4+ (C). Vers les LT CD8+ (D). Vers les LB (E). Vers les monocytes (F). Résultats obtenus par cytométrie en flux et exprimés en pourcentage moyen (%) ± SD, n=3, *p<0.05.

Ce transfert mitochondrial était négativement corrélé avec la prolifération de l'ensemble des populations immunitaires étudiées. Cela signifie que, plus le transfert de mitochondries était élevé, plus la prolifération des cellules immunitaires diminuait (Figure 29A-F). Le coefficient de corrélation, compris entre 0,7 et 0,9, ainsi que la significativité (**p<0.01-****p<0.0001), observés entre ces deux paramètres renforçaient ce lien.

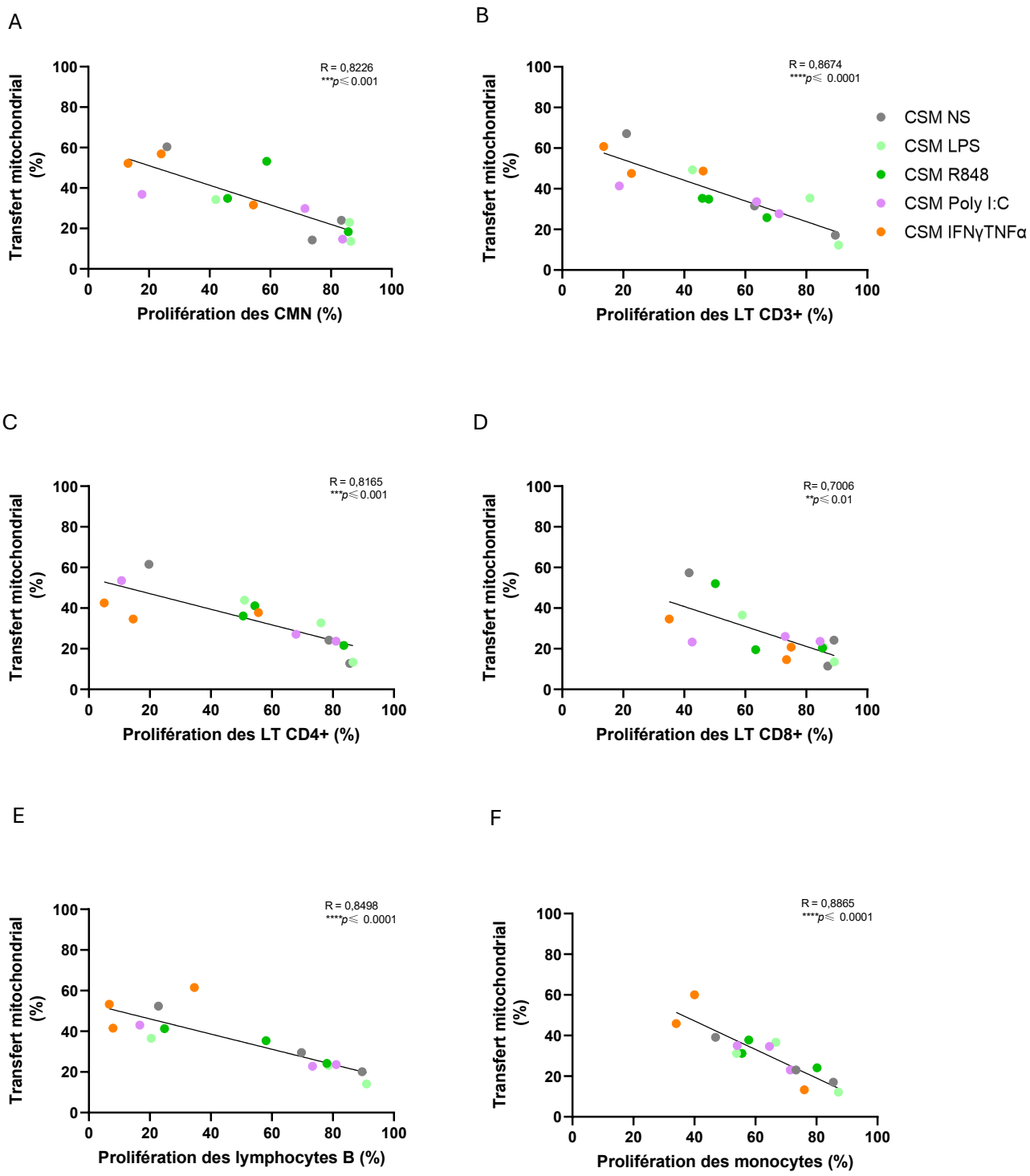


Figure 29 : Corrélation entre le transfert mitochondrial des CSM(GW) non stimulées ou préconditionnées avec du LPS, du R848, du Poly I :C ou de l'IFNγTNFα et la prolifération des sous-populations immunitaires. Corrélation entre le transfert mitochondrial des CSM et la prolifération des CMN (A). Des LT CD3+ (B). Des LT CD4+ (C). Des LT CD8+(D). Des lymphocytes B (E). Des monocytes (F). Coculture des CSM et des CMN à un ratio 1 : 2. Résultats obtenus par cytométrie en flux et exprimés en pourcentage (%), n=3. Analyse linéaire de la régression, coefficient de corrélation R=0,7-0,9, **p<0.01, ***p<0.001, ****p<0.0001.

2) Etudes des capacités de migration

2.1) Etude des récepteurs de migration

Les capacités de migration des CSM(GW) ont été un paramètre étudié pour évaluer l'impact du préconditionnement sur les CSM. Pour cela, plusieurs approches ont été menées.

Tout d'abord, une analyse des récepteurs CXCR4 et CXCR7, impliqués dans le chimiotactisme, a été réalisée sur les CSM préconditionnées ou non (Figure 30).

Les résultats ont montré que l'expression membranaire des récepteurs CXCR4 et CXCR7 restait relativement faible, quel que soit le préconditionnement appliqué aux CSM. En revanche, l'expression du récepteur CXCR4 était plus élevée dans le compartiment intracellulaire en comparaison à l'expression membranaire et ce pour toutes les conditions d'étude, avec une significativité dans les conditions LPS (*p<0.05) et R848 (**p<0.01) (Figure 30A). En ce qui concerne le récepteur CXCR7, son expression était, aussi, significativement plus élevée dans le compartiment intracellulaire et ce dans l'ensemble des conditions étudiées (*p<0.05) à l'exception de la condition IFNγTNFα où une hétérogénéité des résultats d'expression a été observée. Aucune différence n'a été observée en fonction des préconditionnements, que ce soit pour CXCR4 ou CXCR7 (Figure 30B).

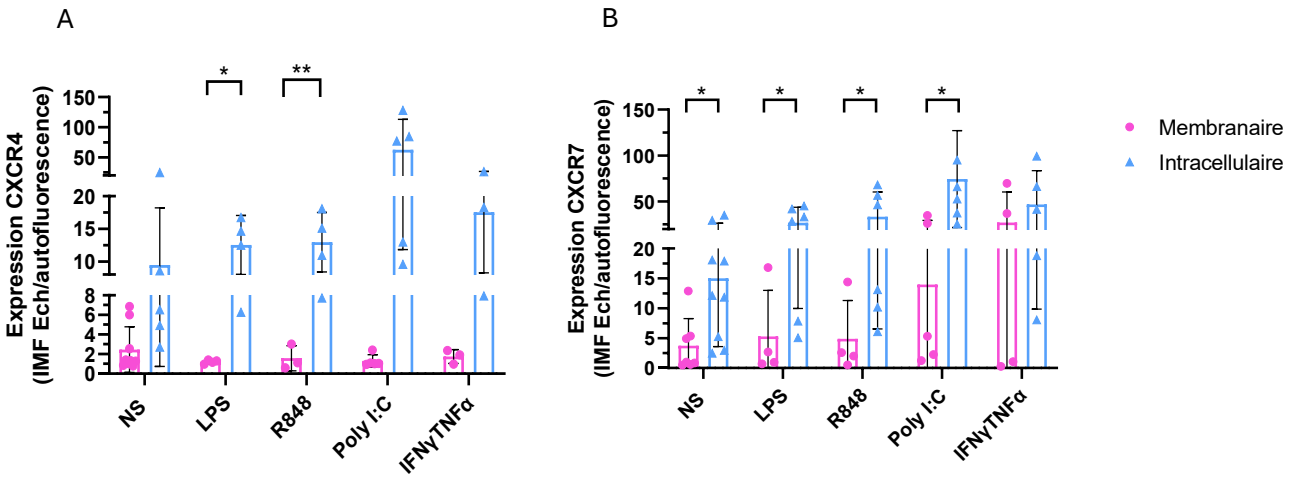


Figure 30 : Expression des récepteurs de migration au sein des CSM(GW) non stimulées ou préconditionnées avec du LPS, du R848, du Poly I :C ou de l'IFNγTNFα. Expression membranaire ou intracellulaire de CXCR4 (A). Expression membranaire ou intracellulaire de CXCR7 (B). Résultats obtenus par cytométrie en flux et exprimés en moyenne ± SD de ratio d'Intensité Médiane de Fluorescence (IMF) en comparaison à l'autofluorescence générée par ces cellules, n=3-9, *p<0.05, **p<0.01.

2.2) Etude fonctionnelle de la migration

Bien que les CSM expriment les récepteurs de migration CXCR4 et CXCR7, et que les préconditionnements ne semblent pas impacter négativement leur expression, il est important de s'assurer de la fonctionnalité de ces récepteurs au sein des CSM. C'est pourquoi plusieurs tests fonctionnels ont été réalisés, (i) l'un basé sur leur capacité de migration par chimiotactisme au sein d'une chambre de Boyden, (ii) le deuxième basé sur leur capacité à franchir en chambre de Boyden une MEC synthétique, permettant de se rapprocher du processus *in vivo* (correspondant au test d'invasion) ; (iii) le troisième basé sur leur capacité de motilité *via* un test de blessure aussi appelé « injury test/scratch assay ».

Le premier test a montré que les préconditionnements par le R848 et l'IFNγTNFα diminuaient la capacité migratoire, par chimiotactisme, des CSM (*p<0.05 par rapport à la condition non stimulée) (Figure 31A). Le deuxième test a permis de montrer que malgré la présence d'une MEC de substitution, les CSM non stimulées ou préconditionnées étaient capable de maintenir leur migration par chimiotactisme (Figure 31B). Enfin le test de blessure, basé sur les capacités des CSM à recouvrir une zone acellulaire, a mis en évidence que les CSM non stimulées ou préconditionnées au LPS, au R848 ou au Poly I :C pouvaient recouvrir une zone vierge avec un taux de recouvrement supérieur à 70% après 24h. Comme pour le test de migration, les CSM préconditionnées avec de l'IFNγTNFα voyaient, quant à elles, cette capacité diminuer avec un taux de recouvrement significativement réduit (44%) en comparaison aux CSM préconditionnées avec du R848 (*p<0.05) (Figure 31C).

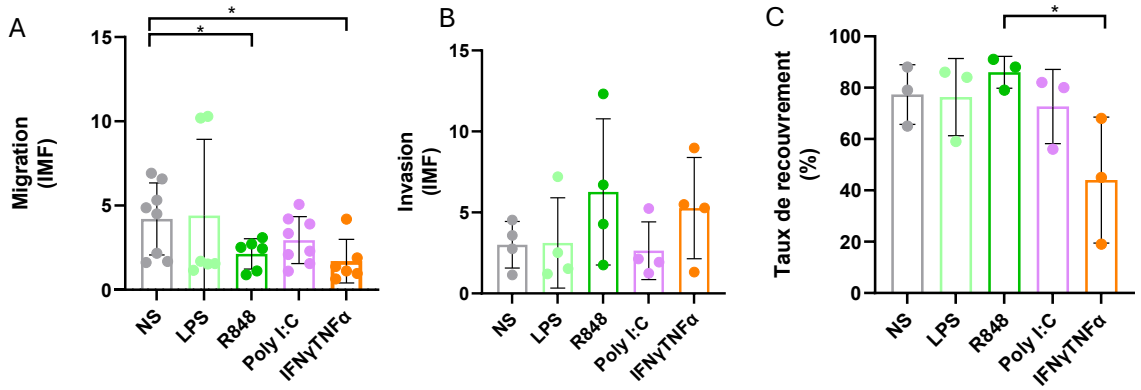


Figure 31 : Capacité migratoire des CSM(GW) non stimulées ou préconditionnées avec du LPS, du R848, du Poly I :C ou de l'IFNγTNFα. Migration suivie pendant 24h en chambre de Boyden (A). Invasion suivie pendant 24h, en chambre de Boyden supplémentée en MEC synthétique (B). Résultats obtenus par lecture d'absorbance au spectrophotomètre et exprimés en moyenne d'Intensité Médiane de Fluorescence (IMF) ± SD, n=4-8, *p<0.05. Taux de recouvrement par les CSM NS ou préconditionnées d'une zone acellulaire, suivi pendant 24h par microscopie en temps réel (Cytation 5) (C). Résultats exprimés en pourcentage moyen (%) ± SD, calculés via le logiciel d'analyse ImageJ, n=3, *p<0.05.

IV. Etude des voies de signalisation post-préconditionnement

Les résultats obtenus suite aux préconditionnements des CSM, avec du LPS, du R848 ou du Poly I :C ne montraient pas un effet très marqué des molécules utilisées au niveau de la réponse cellulaire. Il nous est donc apparu indispensable d'investiguer les principales voies de signalisation, issues de la stimulation des CSM, afin de comprendre comment le signal parvenait aux cellules. Pour cela, des études mécanistiques préliminaires ont été menées.

Dans la transduction du signal, la fixation du ligand à son récepteur spécifique est la première étape nécessaire au déclenchement d'une voie de signalisation intracellulaire, ayant pour objectif la régulation de gènes cibles afin de moduler le comportement cellulaire.

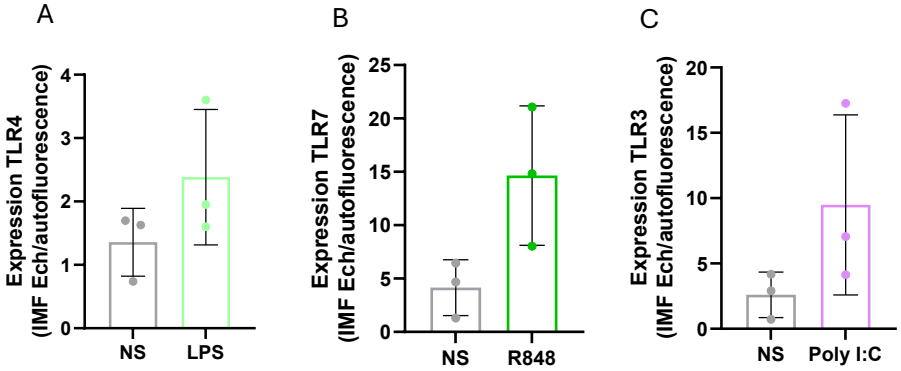
C'est pourquoi, l'expression des TLR4, TLR7 et TLR3 par les CSM, non stimulées ou préconditionnées avec leurs ligands respectifs à savoir, le LPS, le R848 ou le Poly I :C, a été vérifiée.

Les résultats présentés sur la Figure 32, ont montré que les TLR7 et les TLR3 étaient faiblement exprimés par les CSM non stimulées (ratio IMF>2), avec une tendance à l'augmentation en présence de leur ligand respectif.

En revanche, l'expression du TLR4 restait, quant à elle, relativement faible que ce soit sur les cellules préconditionnées ou non. Le TLR4 étant le seul récepteur à être exprimé au niveau membranaire, il peut être impacté par l'action de la trypsine lors du décollement cellulaire (Figure 32A-C).

Pour cela un grattage mécanique des cellules fraîches en culture a été réalisé afin de préserver l'intégrité des récepteurs membranaires (Figure 32D). Chez les cellules NS, ce récepteur restait non exprimé, même après décollement des cellules par grattage.

Lorsque les cellules étaient préconditionnées avec du LPS, même si l'expression du TLR4 membranaire tendait à augmenter, aucune différence significative n'a été observée de par le faible échantillonnage de CSM à notre disposition ainsi que la forte hétérogénéité entre les souches.



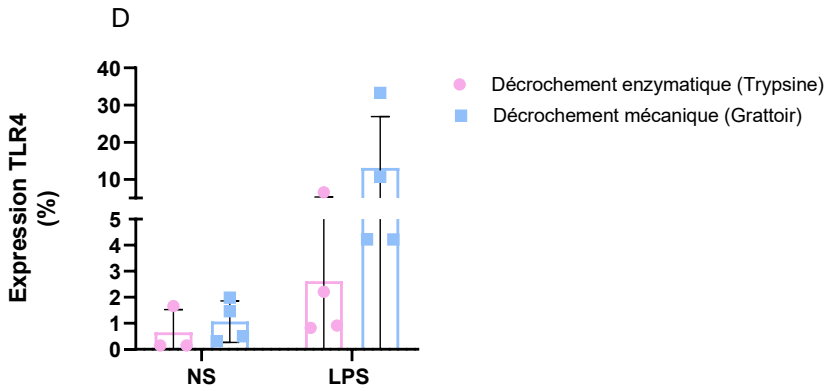


Figure 32 : Expression des récepteurs TLR au sein des CSM(GW) non stimulées ou préconditionnées. Expression membranaire du TLR4 par les CSM non stimulées ou préconditionnées avec du LPS (A). Expression intracellulaire du TLR7 par les CSM NS ou préconditionnées avec du R848 (B). Expression intracellulaire du TLR3 par les CSM NS ou préconditionnées avec du Poly I:C (C). Résultats obtenus par cytométrie en flux et exprimés en moyenne ± SD de ratio d'Intensité Médiane de Fluorescence (IMF) en comparaison à l'autofluorescence générée par ces cellules, n=3. Expression membranaire du TLR4 par les CSM NS ou préconditionnées avec du LPS après décrochement enzymatique ou mécanique des CSM en culture (D). Résultats obtenus par cytométrie en flux et exprimés en pourcentage (%) moyen ± SD, n=3-4.

Par la suite, nous avons ciblé la voie principale, NF-kB, découlant de l'activation des TLR4 par le LPS et impliquée dans les réponses immunitaires. Pour cela plusieurs cibles ont été choisies telles que IkBα, IKKα et IKKβ, des protéines centrales dans la voie canonique NF-kB.

Pour rappel, IkBα est un inhibiteur négatif du facteur de transcription NF-kB (p65/p50) qui en se liant à lui empêche sa translocation dans le noyau où il régule l'expression de gènes cibles.

IKKα et IKKβ sont des kinases, la kinase IKKα a la capacité de phosphoryler IkBα afin d'entraîner sa dégradation protésomale conduisant à la libération du facteur de transcription NF-kB. IKKβ a un rôle secondaire mais souvent complémentaire de IKKα.

L'expression de ces protéines au sein des CSM non stimulées ou préconditionnées au LPS, R848, Poly I :C ou IFNγTNFα a été observée par la technique de Western-Blot après lyse cellulaire.

Il est important de préciser que seulement la phosphorylation des protéines d'intérêt témoignera d'une fonctionnalité protéique et de l'activation des voies concernées. Ici l'expression des protéines non phosphorylées a été rapportée à une protéine stable au sein des CSM à savoir la vinculine (une protéine du cytosquelette qui ne sera pas influencée par le préconditionnement inflammatoire).

L'expression des protéines phosphorylées a été, quant à elle, rapportée à la forme non phosphorylée de la protéine en question. L'expression relative de chacune est considérée comme semi-quantitative.

Tout d'abord, il était important de vérifier que les préconditionnements ne faisaient pas varier la quantité de vinculine. Ici l'ensemble des CSM préconditionnées exprimaient de manière identique cette protéine du cytosquelette, pouvant donc être utilisée comme protéine rapportrice (Figure 33).

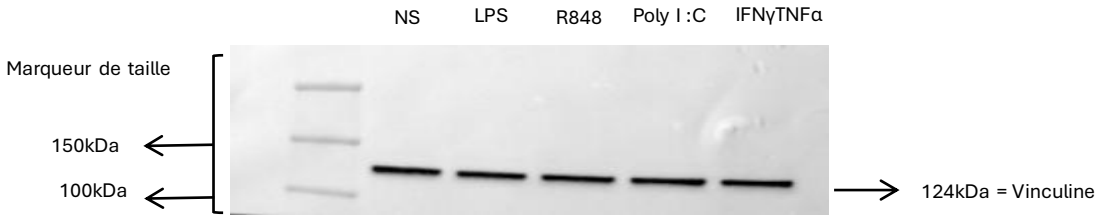


Figure 33 : Expression de la protéine rapportrice au sein des CSM(GW) non stimulées ou préconditionnées. Expression de la vinculine par les CSM non stimulées ou préconditionnées avec du LPS, du R848, du Poly I :C ou de l'IFNγTNFα. Expression détectée par chimioluminescence grâce à un marqueur de taille.

Concernant l'expression relative des protéines d'intérêt, et notamment le facteur inhibiteur IkBα, il a pu être observé que son expression était quasi nulle sous forme non phosphorylée en comparaison à la forme phosphorylée. L'expression moyenne semblait augmenter lorsque les CSM étaient préalablement préconditionnées avec du LPS ou du R848. Cependant le faible échantillonnage et la forte hétérogénéité inter-souches ne permettaient pas d'induire une significativité (Figure 34A1 et 34A2).

Les enzymes IKKβ et IKKα, ayant pour cible IkBα, étaient faiblement exprimées sous leurs formes phosphorylées ou non, bien que l'expression relative de IKKα soit plus élevée dans la condition R848 en comparaison à la condition LPS (**p<0.01). Une tendance à l'augmentation de IKKα-IKKβ phosphorylées était à souligner pour les conditions LPS et R848 (Figure 34B1-B3).

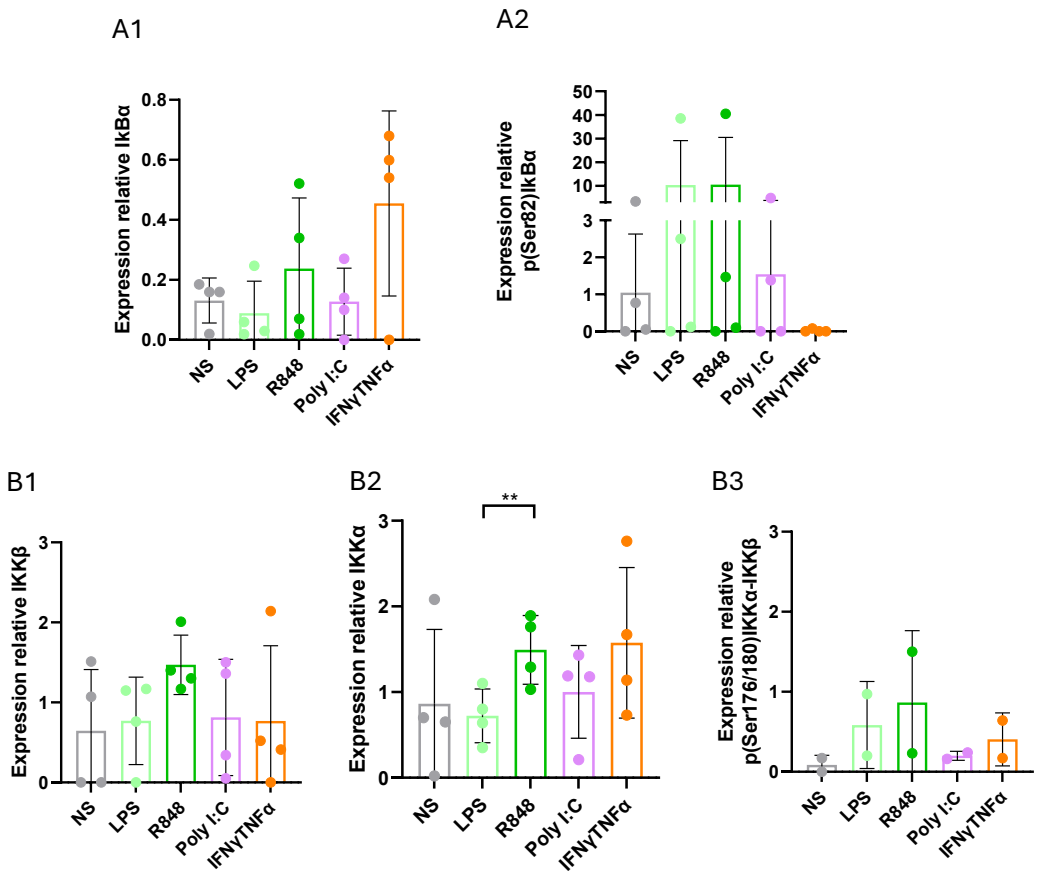


Figure 34 : Expression relative des protéines impliquées dans la voie de signalisation NF-kB au sein des CSM(GW) non stimulées ou préconditionnées avec du LPS, du R848, du Poly I :C ou de l'IFNγTNFα. Expression relative de IkBα (A1). Expression relative de IkBα phosphorylée sur la Sérine 82 (A2). Expression relative de IKKβ (B1). Expression relative de IKKα (B2). Expression conjointe de IKKα-IKKβ phosphorylées sur la Sérine 176 et la Sérine 180 respectivement (B3). Expression relative en densité de pixel normalisée par rapport à la protéine rapportrice vinculine, pour les formes protéiques non phosphorylées, ou par rapport à la forme non phosphorylée de la protéine correspondante. Résultats obtenus par Western Blot et exprimés en moyenne ± SD, n=2-4, $^{**}p<0.01$.

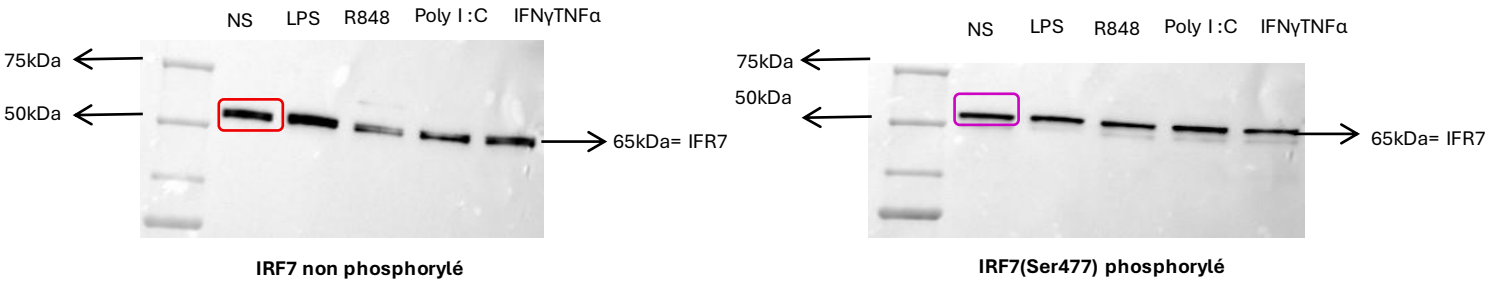
Par la suite, d'autres protéines impliquées dans l'immunité ont été étudiées tels que les facteurs de transcription IRF3 et IRF7 (Interferon Regulatory Factor 3/7) qui sont étroitement liés aux voies découlant des TLR comme expliqué auparavant (Figure 8).

La Figure 35 montre que IFR3, sous forme phosphorylée ou non, était exprimé de manière similaire entre les préconditionnements testés à l'exception des CSM IFNγTNFα. Chez ces dernières, l'expression d'IRF3 était significativement augmentée en comparaison aux CSM non stimulées ($^{*}p<0.05$) (Figure 35B1, 35B2). Concernant le facteur IRF7, sa forme phosphorylée semblait augmenter lorsque les CSM étaient préconditionnées avec du R848 ou du Poly I:C (Figure 35C1, 35C2). Cela semble cohérent avec la stimulation de leur récepteurs respectifs, TLR7/8 et TLR3 permettant leur activation.

IRF3 activé par la voie dépendante de TRIF, découlant du TLR3 et du TLR4, va jouer un rôle crucial dans la réponse antivirale et IRF7 activé par les TLR7 et 8 et les TLR 3 et 4 va permettre, comme IRF3, de produire des interférons de type I. Les Galectines, constituent également une autre catégorie de protéines impliquées dans l'immunité et décrites au sein des CSM, notamment les Galectines-1 et -3. Ces lectines liant les β-galactosides peuvent moduler la réponse immunitaire. Par exemple, la galectine-1, décrite comme anti-inflammatoire va plutôt agir comme un frein immunitaire après activation des TLR, alors que la galectine-3, décrite comme pro-inflammatoire va plutôt se comporter comme un amplificateur inflammatoire.

Nos travaux ont montré que si la Galectine-1 était exprimée de manière semblable en fonction du préconditionnement, l'exception de la Galectine-3 était significativement augmentée dans la condition Poly I :C en comparaison aux CSM non stimulées (*p<0.05) (Figure 35D, 35E).

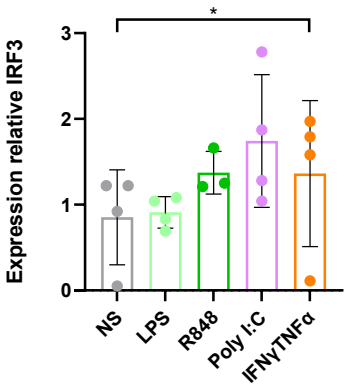
A



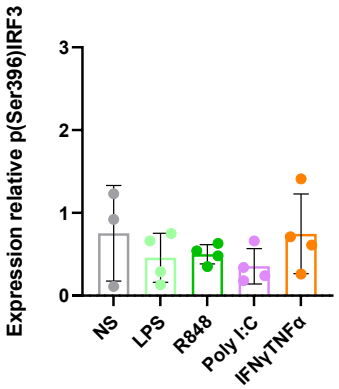
Expression relative = Ratio d'intensité :

Forme protéique phosphorylée / Forme protéique non-phosphorylée

B1



B2



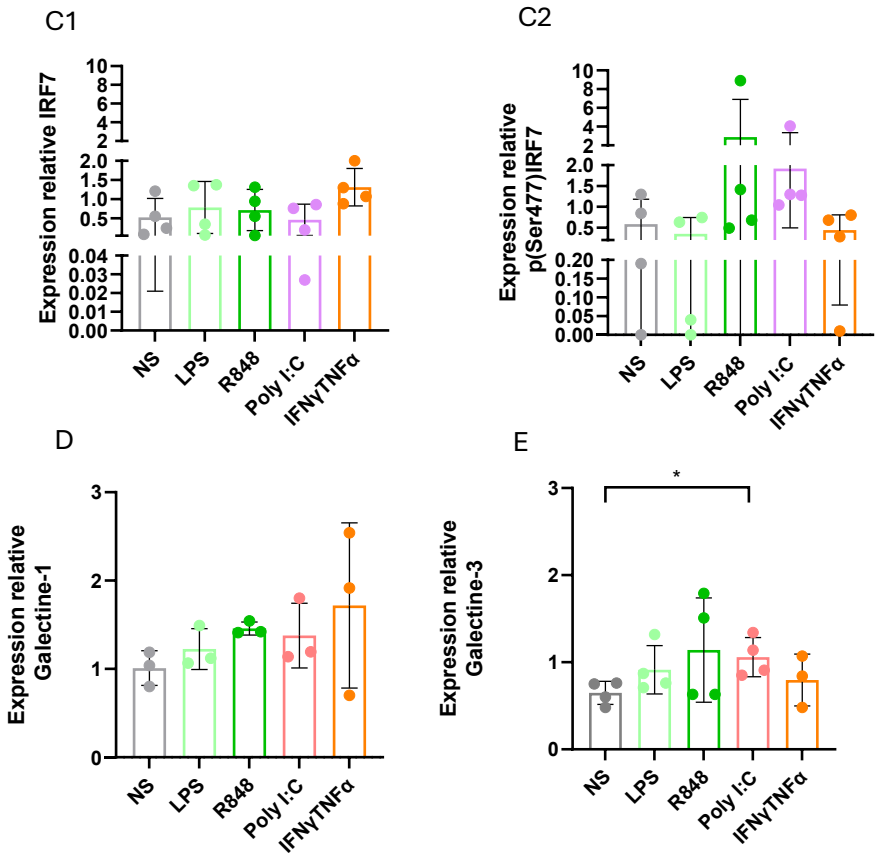


Figure 35 : Expression relative des facteurs de transcription impliqués dans la production d'IFN de type I par des CSM non stimulées ou préconditionnées avec du LPS, du R848, du Poly I :C ou de l'IFNγTNFα. Détection du facteur IRF7 non phosphorylé ou phosphorylé au sein d'une souche de CSM non stimulée ou préconditionnée. Représentation visuelle obtenue par chimioluminescence (A). Expression relative du facteur IRF3 (B1). Expression relative du facteur IRF3 phosphorylé sur la Sérine 396 (B2). Expression du facteur IRF7 (C1). Expression du facteur IRF7 phosphorylé sur la Sérine 477 (C2). Expression relative de la galectine-1 (D). Expression relative de la galectine-3 (E). Expression relative en densité de pixel normalisée par rapport à la protéine rapportrice vinculine, pour les formes protéiques non phosphorylées, ou par rapport à la forme non phosphorylée de la protéine correspondante. Données exprimées en moyenne ± SD, n=3-4, *p<0.05.

Après avoir étudié les voies classiquement décrites après activation des TLR3, des TLR4 et des TLR7/8, un « screening » plus large d'autres voies de signalisation a été réalisé grâce à la méthode « proteome profiler » (R&D systems). Sur la « Heat map » présentée en Figure 36, l'ensemble des protéines étudiées y est représenté. L'expression faible d'une protéine apparaîtra en vert, l'expression moyenne d'une protéine en noir alors que l'expression forte de la protéine sera assimilée à la couleur rouge (Figure 36A1).

Sur les 28 protéines phosphorylées ciblées, seules 11 étaient exprimées par les CSM dans nos conditions d'études (Figure 36A2) avec une prédominance pour la protéine chaperon HSP27 et le facteur de transcription c-Jun souvent associé à ERK1/2.

Après analyse sur plusieurs souches, seule HSP27 phosphorylée était exprimée par l'ensemble des souches avec une augmentation significative de son expression lorsque les CSM étaient préconditionnées avec de l'IFNγTNFα (*p<0.05 avec les conditions NS, R848 et Poly I :C) (Figure 36B).

L'expression de la protéine HSP27 a été confirmée par la technique, plus spécifique et précise, du Western Blot, montrant une augmentation significative de la protéine HSP27 phosphorylée lorsque les CSM étaient préconditionnées avec de l'IFNγTNFα et ce par rapport à l'ensemble des conditions d'étude (*p<0.05).

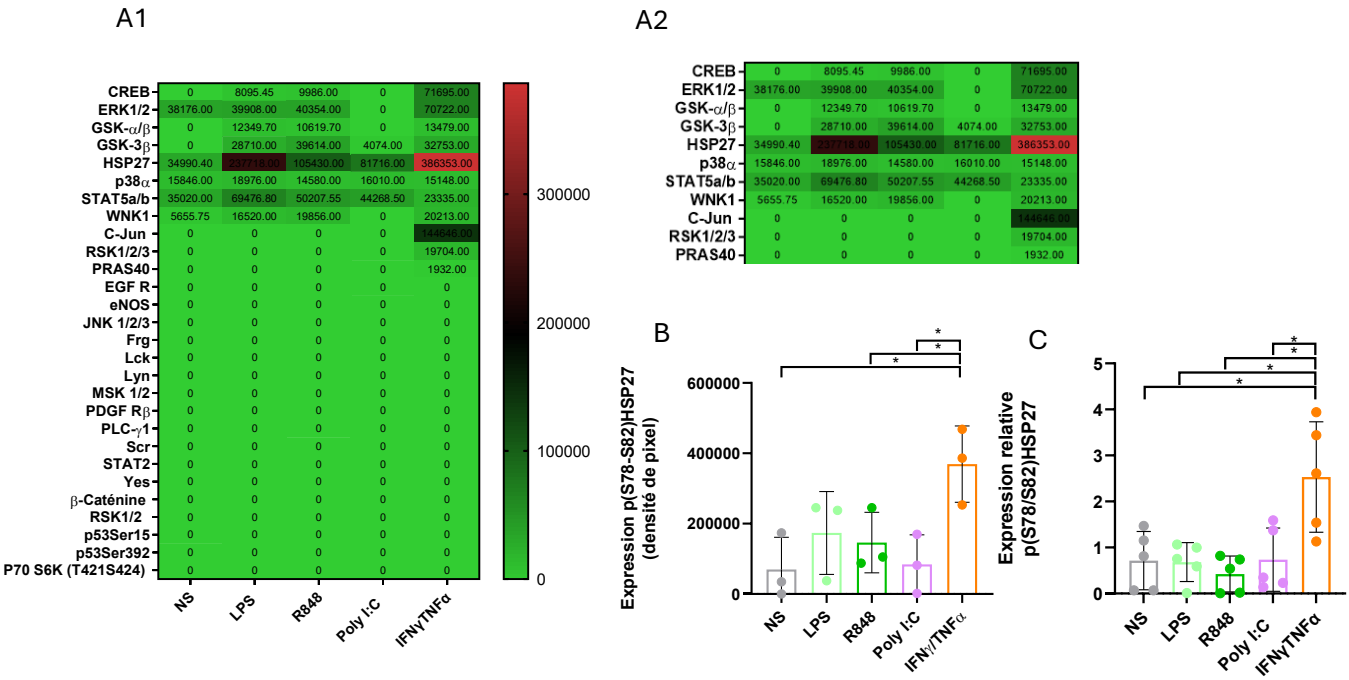


Figure 36 : Analyse des protéines exprimées par des CSM(GW) non stimulées ou préconditionnées avec du LPS, du R848, du Poly I :C ou de l'IFNγTNFα. « Heat map » semi-quantitative de l'ensemble des protéines phosphorylées étudiées (A1). « Heat map » des protéines phosphorylées uniquement exprimées par les CSM NS ou préconditionnées (A2). Expression de la protéine HSP27 phosphorylée sur la Sérine 78 et 82 (B). Résultats obtenus via la méthode « proteome profiler » et exprimés en densité moyenne de pixel ± SD, n=3, *p<0.05. Expression relative en densité de pixel de la protéine HSP27 phosphorylée sur la Sérine 78 et 82, après normalisation par rapport à la forme phosphorylée de la protéine (C). Résultats obtenus par Western Blot et exprimés en moyenne ± SD, n=5, *p<0.05.

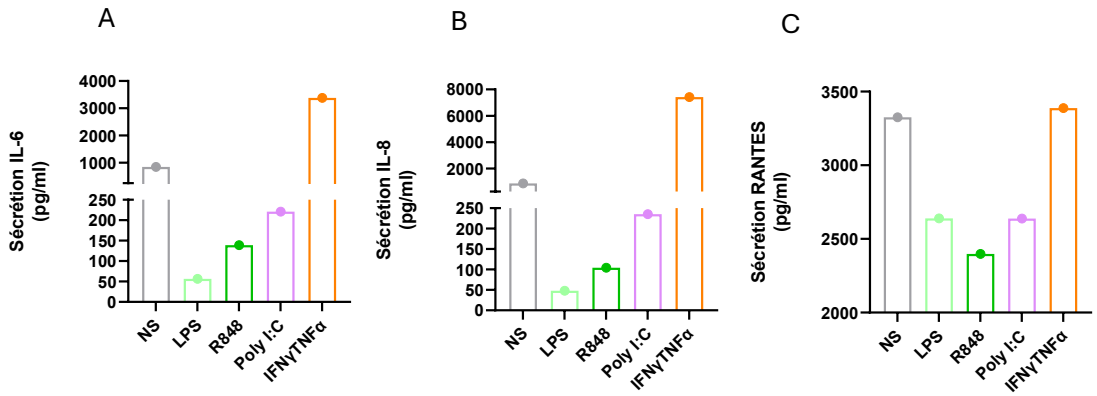
Une des difficultés rencontrées au sein de ces expérimentations résidait dans la détection de la forme phosphorylée des protéines d'intérêt. En effet, malgré l'utilisation d'inhibiteurs de protéases et de phosphatases, maintenant l'intégrité des protéines d'intérêt, la phosphorylation persiste comme un phénomène furtif dont la cinétique rend difficile la visualisation des phosphorylations. Il serait intéressant de réaliser une cinétique afin d'évaluer le moment opportun pour quantifier la phosphorylation de ces protéines cibles.

V. Comment lisser la variabilité inter-donneur ?

1) Sélectionner des souches immunostimulantes ?

Une forte hétérogénéité inter-souche a été souligné lors des différentes expérimentations montrant que les CSM ont des capacités immunitaires variables et répondent différemment aux préconditionnements. Une manière de mieux appréhender les propriétés immunitaires des CSM post-préconditionnement serait de suivre les capacités immunitaires au sein d'une même souche sensible aux stimulations. Pour cela une souche nommée T8 (correspondant au cordon ombilical 8) a été analysée sur divers paramètres et ce de manière isolée.

L'analyse du sécrétome sur cette souche isolée a confirmé la prédominance de la condition IFNγTNFa dans la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires (IL-6, IL-8, RANTES et CCL3) mais aussi dans la sécrétion du facteur immunomodulateur PD-L1 soluble, masquée par la moyenne des autres souches de CSM étudiées. Des différences nettes de sécrétions entre les autres préconditionnements ont été soulignées au sein de cette souche (Figure 37A-E).



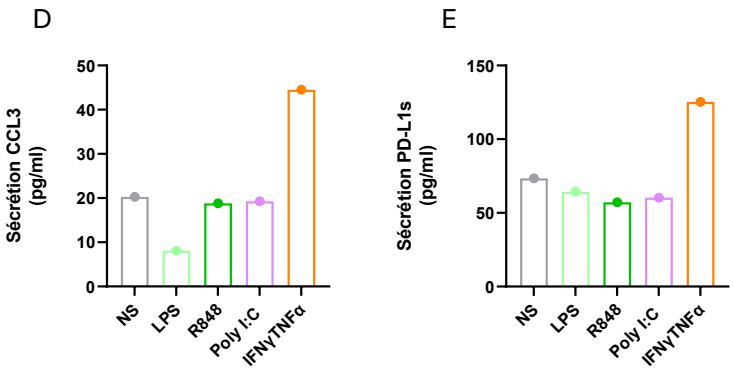
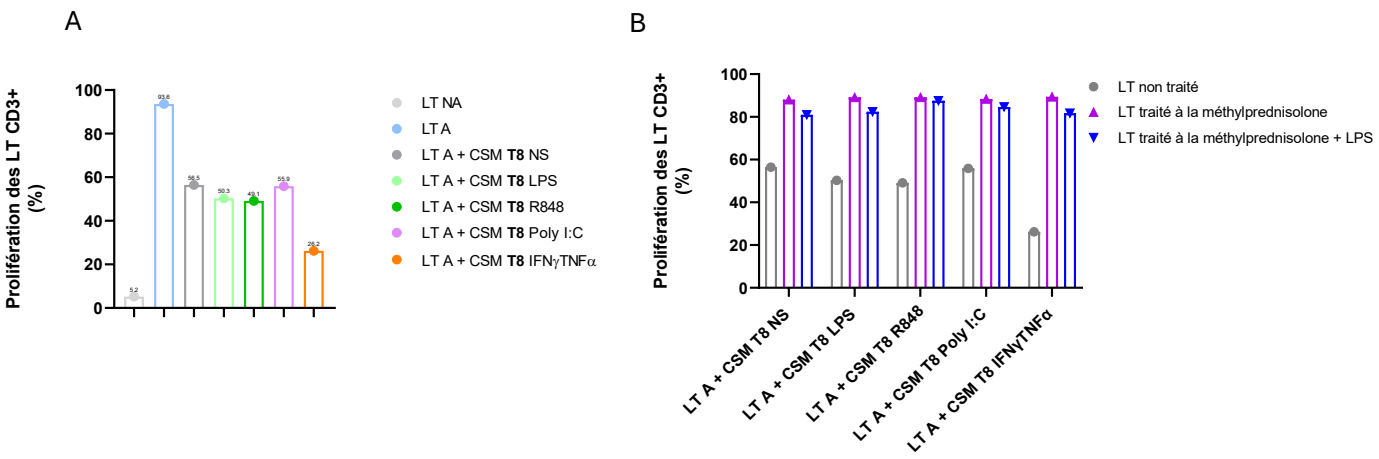


Figure 37 : Analyse du sécrétome de la souche de CSM(GW) T8 non stimulée ou préconditionnée avec du LPS, du R848, du Poly I:C ou de l'IFNγTNFα. Sécrétion de l'IL-6 (A). Sécrétion de l'IL-8 (B). Sécrétion de RANTES (C). Sécrétion de CCL3 (D). Sécrétion de PD-L1s (E). Résultats obtenus par ELISA et exprimés en pg/ml, n=1.

Concernant les capacités immunomodulatrices de cette souche de CSM, les différents tests fonctionnels réalisés présentaient des résultats cohérents, avec une capacité immunomodulatrice, caractérisée par une diminution de la prolifération des LT CD3+, une augmentation du transfert mitochondrial et une diminution de la prolifération des CMN, plus élevées dans la condition IFNγTNFα en comparaison aux autres conditions. Cependant, l'ensemble des préconditionnements, appliqué à cette souche de CSM, inhibait les capacités immunosuppressives des CSM envers la prolifération des LT CD3+ anergiques. L'analyse du transfert mitochondrial sur souche individuelle T8 a permis d'encercler d'une part le préconditionnement IFNγTNFα et d'autre part les préconditionnements LPS, R848 et Poly I :C agissant de la même manière que le contrôle non stimulé. La condition Poly I:C semblait impacter le plus ce transfert en comparaison aux autres conditions d'étude (Figure 38A-D).



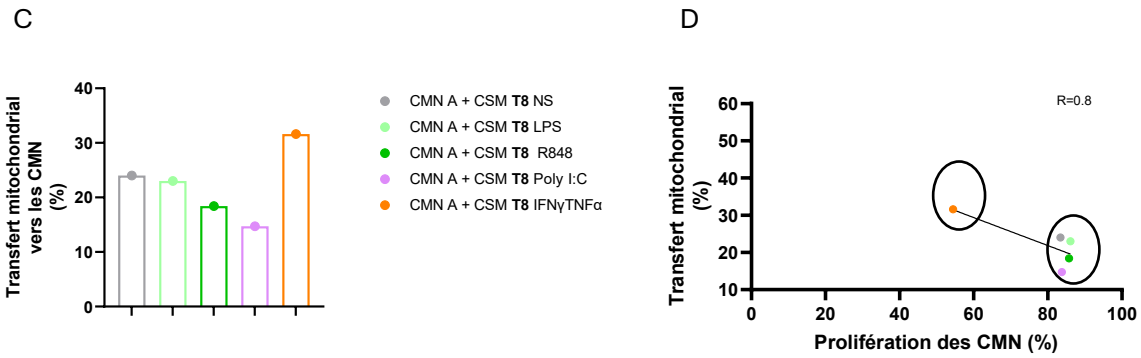


Figure 38 : Capacités immunomodulatrices de la souche de CSM(GW) T8 non stimulée ou préconditionnée avec du LPS, du R848, du Poly I:C ou de l'IFNγTNFα. Prolifération des LT CD3+ non activés ou activés et cocultivés avec la souche de CSM T8 (A). Prolifération des LT CD3+ activés, non anergiques ou rendus anergiques par traitement à la méthylprednisolone couplée ou non à du LPS et cocultivés avec la souche de CSM T8 (B). Transfert mitochondrial des CSM de la souche T8 vers les CMN (C). Corrélation entre le transfert mitochondrial des CSM de la souche T8 et la prolifération des CMN (D). Analyse linéaire de la régression, coefficient de corrélation R=0.8. Résultats obtenus par cytométrie en flux et exprimés en pourcentage (%), n=1.

Cette analyse sur souche individuelle, nous a permis de faire ressortir des différences entre préconditionnements testés ouvrant sur une possibilité de sélectionner une souche idéale, une autre possibilité serait de réaliser une culture de plusieurs souches de CSM, issues de prélèvements différents, afin de lisser l'hétérogénéité observée.

2) Constituer un pool de plusieurs souches de CSM ?

2.1) D'un point de vue phénotypique

Tout au long de ce travail, l'interprétation des résultats s'est avérée complexe en raison de l'hétérogénéité des réponses entre les souches de CSM provenant de donneurs différents. Cette variabilité s'est retrouvée, aussi bien, dans l'expression des marqueurs phénotypiques que dans la sécrétion de facteurs solubles ou encore dans les capacités fonctionnelles des cellules. C'est pourquoi en s'appuyant sur la littérature, une des solutions choisies, afin de lisser les variabilités inter-individuelles, a été de réaliser un pool constitué de 7 souches de CSM(GW) provenant de 7 cordons ombilicaux différents. Ces 7 souches ont été cultivées ensemble, lors du dernier passage et ont été préconditionnées au LPS, R848, Poly I :C, ou IFNγTNFα, avant d'être cryopréservées.

L'ensemble des expérimentations décrites auparavant sur souches individuelles a été réalisé sur le pool de CSM(GW).

Dans cette partie seuls les résultats les plus pertinents seront présentés et certaines variables étudiées sur souches individuelles seront présentées, sous forme de moyenne, afin de montrer la forte hétérogénéité qui en émane, de manière à comparer l'effet du pool par rapport à la moyenne des souches de CSM(GW).

Premièrement, un phénotypage selon les critères définis par l'ISCT (étude des marqueurs CD105, CD90, CD73, CD34, CD45 et HLA-DR), a été réalisé.

Tout comme pour les souches individuelles, l'expression des marqueurs CD105, CD90 et CD73 était supérieure à 90% et l'expression des marqueurs CD34, CD45 et HLA-DR était inférieure à 5%, mettant en évidence un maintien du phénotype des CSM après culture de plusieurs souches ensemble (Figure 39).

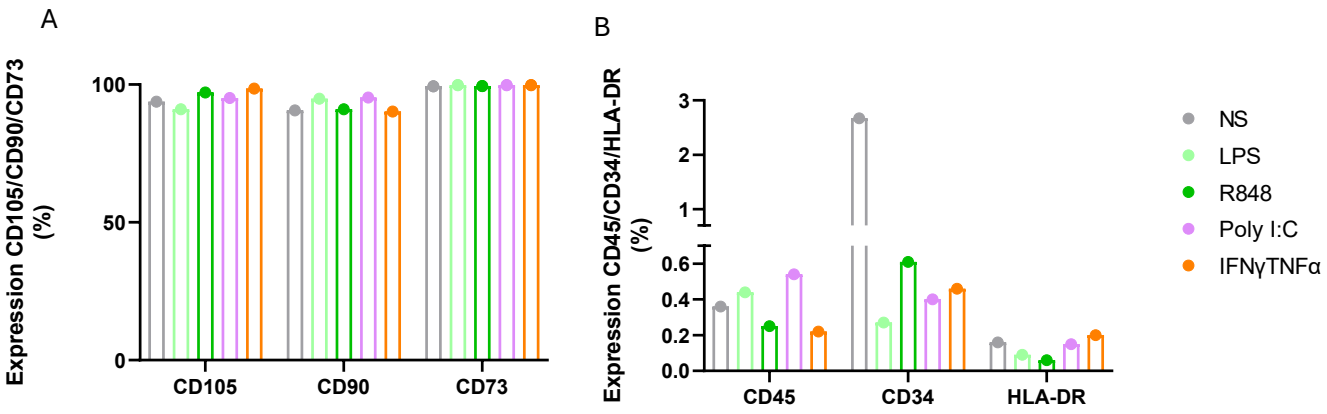
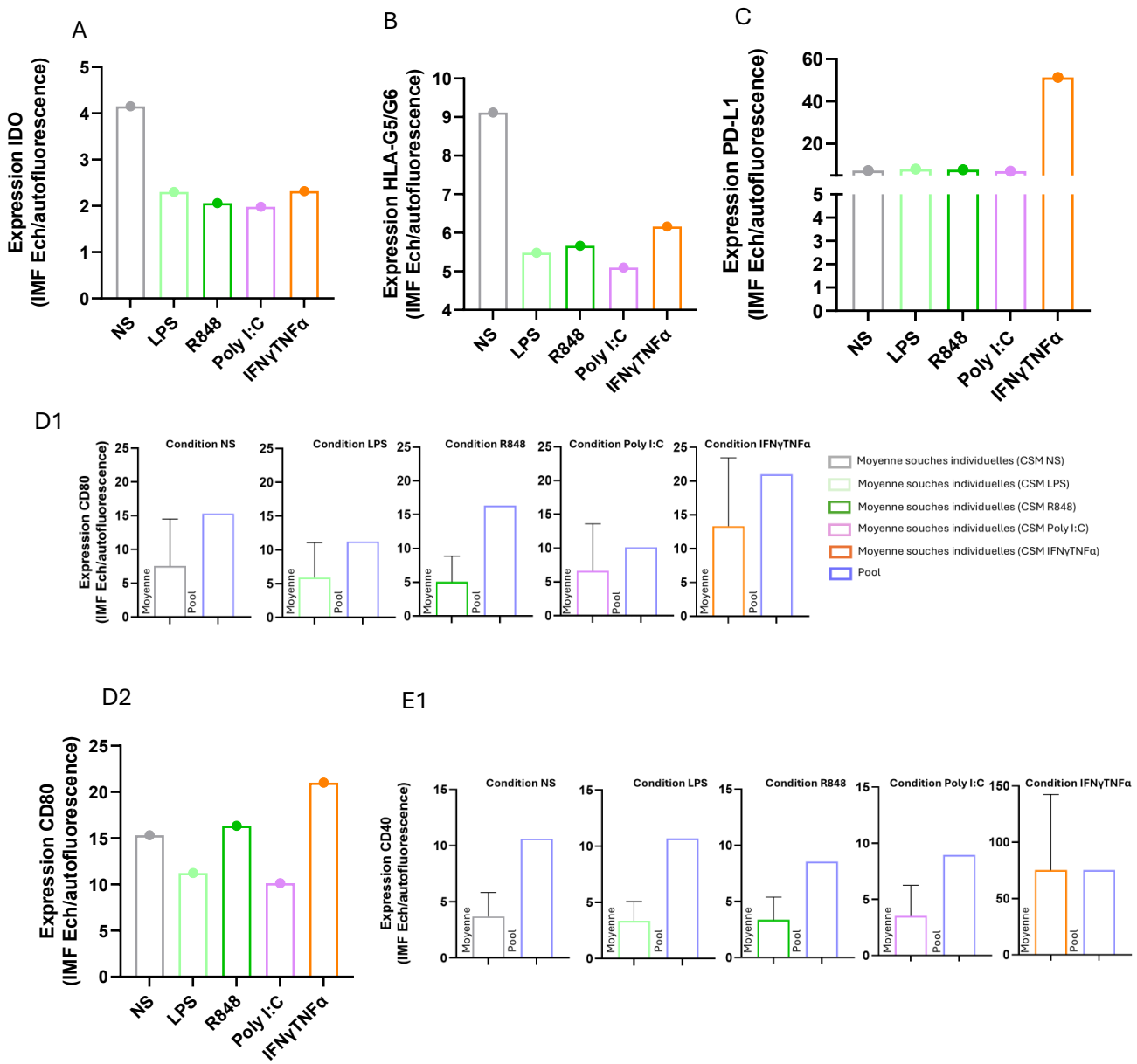


Figure 39 : Phénotypage du pool de CSM(GW) non stimulé ou préconditionné avec du LPS, du R848, du Poly I:C ou de l'IFNγTNFα, selon les critères établis par l'ISCT. Expression des marqueurs mésenchymateux : CD105, CD90 et CD73 par le pool (A). Expression des marqueurs hématopoïétiques : CD34, CD45 et HLA-DR par le pool (B). Résultats obtenus par cytométrie en flux et exprimés en pourcentage (%), n=1 (pool de 7 souches de CSM(GW)).

Analyse des marqueurs immunomodulateurs et de costimulation, exprimés par le pool de CSM(GW)

L'étude phénotypique des marqueurs immunomodulateurs IDO, HLA-G5/G6 et PD-L1 au sein du pool a montré une tendance identique à ce qui avait pu être observé sur souches individuelles avec une augmentation de l'expression de PD-L1 au niveau du pool de CSM préconditionné avec de l'IFNγTNFα (40A-C).

La molécule de costimulation CD86 et la molécule du CMH de classe II, HLA-DR/DP/DQ, n'ayant pas été détectées à la surface des CSM constituant le pool (ratio IMF<2) ne seront pas présentées ici. Concernant l'expression de CD80 et de CD40, le pool de CSM semblait augmenter leurs expressions en comparaison à la moyenne d'expression des souches individuelles (à l'exception de l'expression de CD40 dans la condition IFNγTNFα) (Figure 40D1, 40E1). Au sein du pool de CSM, l'expression de CD80 et de CD40 semblait augmenter après préconditionnement avec de l'IFNγTNFα (Figure 40D2, 40E2).



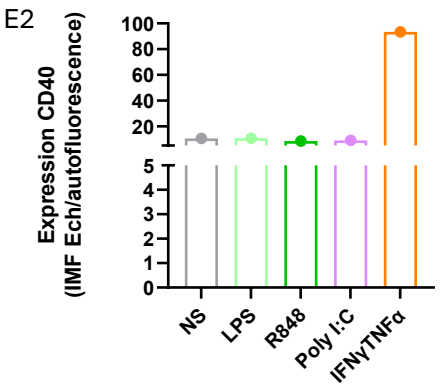


Figure 40 : Expression des molécules immunomodulatrices et de costimulation par le pool de CSM(GW) non stimulé ou préconditionné avec du LPS, du R848, du Poly I :C ou de l'IFNγTNFα. Expression de la molécule IDO par le pool (A). Expression de la molécule HLA-G5/G6 par le pool (B). Expression de la molécule PD-L1 par le pool (C). Expression de la molécule CD80 par les CSM NS ou préconditionnées, issues des souches individuelles (moyenne) ou du pool. (D1). Expression de la molécule CD80 par le pool (D2). Expression de la molécule CD40 par les CSM NS ou préconditionnées, issues des souches individuelles (moyenne) ou du pool (E1). Expression de la molécule CD40 par le pool (E2). Résultats obtenus par cytométrie en flux et exprimés en ratio d'Intensité Médiane de Fluorescence (IMF) en comparaison à l'autofluorescence générée par ces cellules, n=1 (pool de 7 souches de CSM(GW)).

Analyse des particules sécrétées par le pool de CSM(GW)

Bien que l'analyse des particules sécrétées (concentration et taille des particules au sein du surnageant de culture), sur les souches individuelles de CSM n'ait pas montré de différences significatives entre les conditions de préconditionnements, l'analyse de ces mêmes paramètres sur le pool de CSM, semblait montrer une augmentation du taux de particules sécrétées par le pool préconditionné avec du Poly I :C et une taille moyenne des particules sécrétées plus élevée lorsque que le pool était préconditionné avec du R848 (41A,41B).

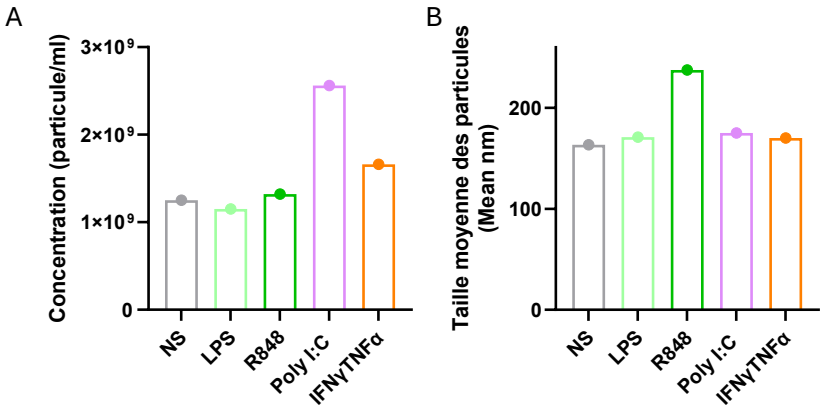


Figure 41: Analyse des particules sécrétées par le pool de CSM(GW) non stimulé ou préconditionné avec du LPS, du R848, du Poly I :C ou de l'IFNγTNFα, au sein du surnageant de culture. Concentration des particules sécrétées par le pool et exprimée en particule/ml (A). Taille des particules sécrétées par le pool et exprimée en moyenne nm (B). Résultats obtenus par NTA, n=1 (pool de 7 souches de CSM(GW)).

Analyse des microARN exprimés par le pool de CSM(GW)

L'analyse du miR-155 pro-inflammatoire au sein du pool de CSM a suggéré une expression augmentée de ce miR dans la condition IFNγTNFα, comme montré au sein des souches individuelles (Figure 42A). Concernant l'expression du miR-146 anti-inflammatoire, le pool semble mettre en évidence une expression plus élevée de ce miR après préconditionnement des CSM avec du Poly I :C ou de l'IFNγTNFα, tandis que l'expression moyenne de ce miR était similaire entre les différentes conditions d'étude sur souches individuelles (Figure 42B1,42B2).

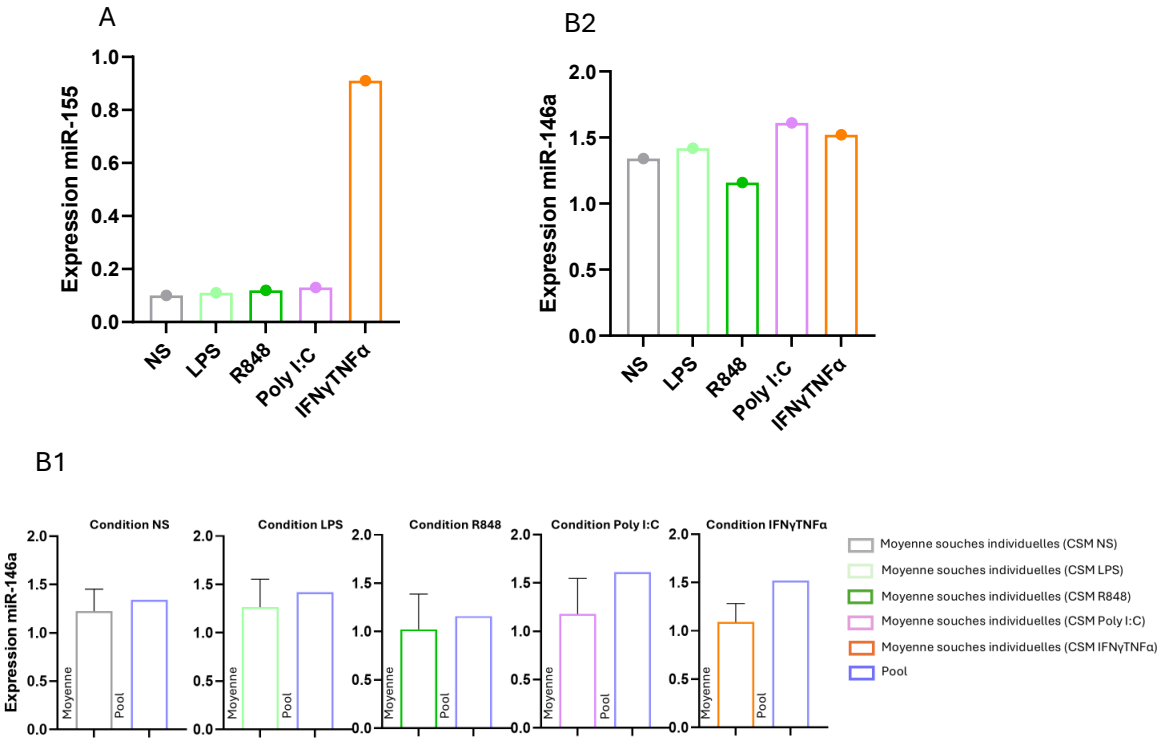


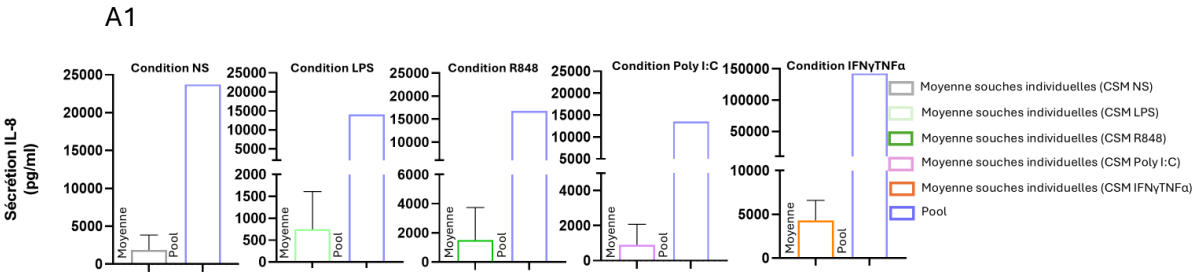
Figure 42 : Expression des microARN au sein du pool de CSM(GW) non stimulé ou préconditionné avec du LPS, du R848, du Poly I :C ou de l'IFNγTNFα. Expression du miR-155 par le pool (A). Expression du miR-146 par les CSM NS ou préconditionnées, issues des souches individuelles (moyenne) ou du pool (B1). Expression du miR-146 par le pool (B2). Résultats obtenus par la méthode TaqMan miRNA Advanced Assay et exprimés en CT après normalisation avec le miR-39 issu de C.elegans, n=1 (pool de 7 souches de CSM(GW)).

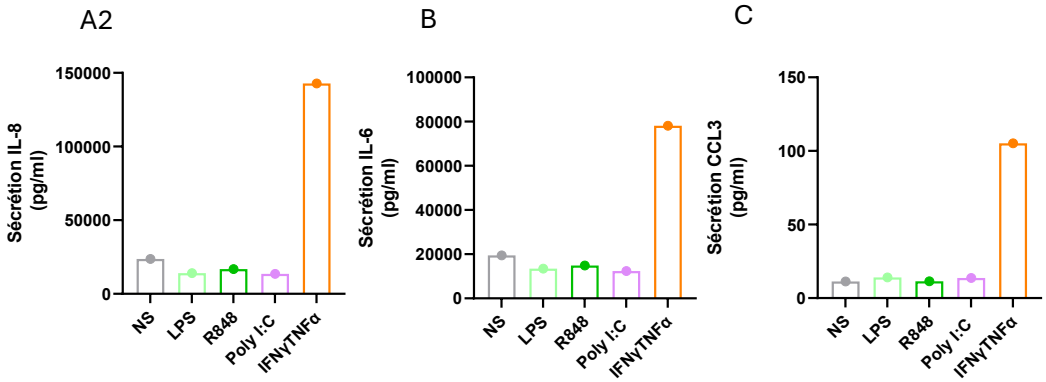
Analyse sécrétoire du pool de CSM(GW)

Lors de l'analyse du sécrétome sur souches individuelles de CSM, le profil de sécrétion, des cytokines/chimiokines notamment pour l'IL-8, variait fortement d'une souche à une autre (Figure 43A1).

Le pool de CSM montre une homogénéité de cette sécrétion en l'augmentant fortement dans la condition CSM préconditionnées à l'IFNγTNFα et ce en comparaison à la moyenne des souches, ce qui pose la question de la communication entre les différentes souches de CSM au sein du pool (Figure 43A1,41A2).

Pour l'ensemble des cytokines/chimiokines pro-inflammatoires étudiées, le pool de CSM préconditionné avec de l'IFNγTNFα les sécrétait fortement, comme démontré auparavant sur culture isolée des souches de CSM (Figure 43B-D). Les sécrétions, par le pool, de la cytokine IL-4 et du facteur soluble PD-L1s restaient faibles. Comme pour PD-L1 membranaire, PD-L1s semblait être bien davantage sécrété par le pool de CSM préconditionné à l'IFNγTNFα (Figure 43E, 43F).





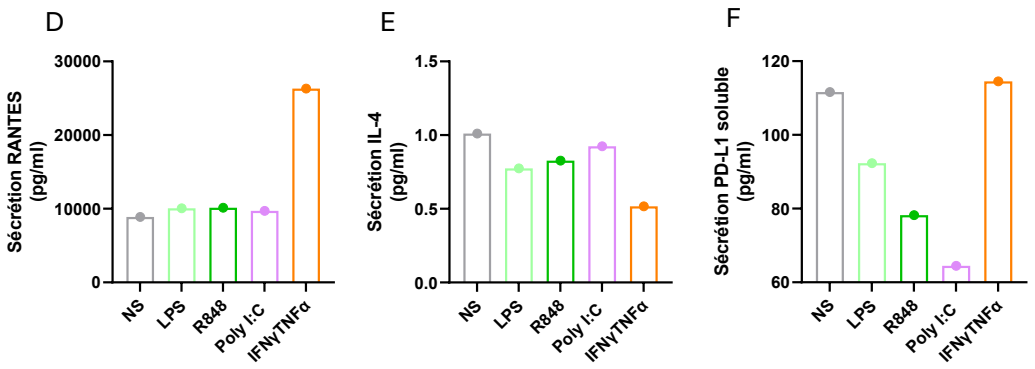


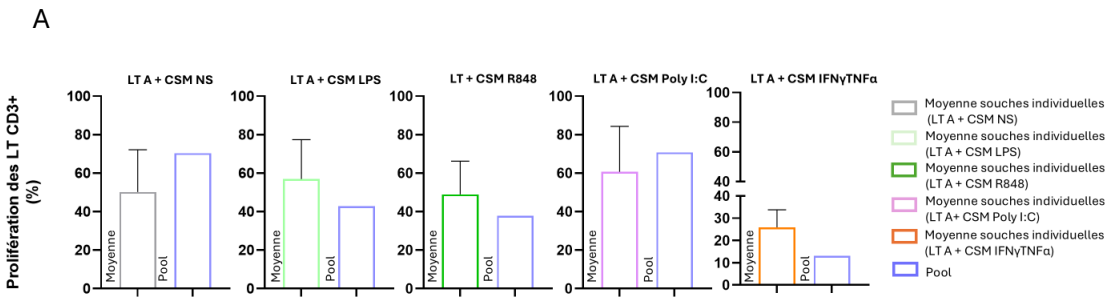
Figure 43 : Analyse du sécrétome du pool des CSM(GW) non stimulé ou préconditionné avec du LPS, du R848, du Poly I:C ou de l'IFNγTNFα. Sécrétion de l'IL-8 par les CSM NS ou préconditionnées, issues des souches individuelles (moyenne) ou du pool (A1). Sécrétion de l'IL-8 par le pool (A2). Sécrétion de l'IL-6 par le pool (B). Sécrétion de RANTES par le pool (C). Sécrétion de CCL3 par le pool (D). Sécrétion de l'IL-4 par le pool (E). Sécrétion de PD-L1s par le pool (F). Résultats obtenus par ELISA et exprimés en pg/ml, n=1 (pool de 7 souches de CSM(GW)).

2.2) D'un point de vue fonctionnel

Capacités immunomodulatrices du pool de CSM(GW)

i) Sur la prolifération des lymphocytes T

En comparaison aux capacités immunomodulatrices des CSM envers la prolifération des LT CD3+, étudiées sur souches individuelles, le pool de CSM non stimulé ou préconditionné conservait ses capacités immunosuppressives mais avec (i) une inhibition de la prolifération des LT par le pool de CSM non stimulé relativement faible en comparaison à la moyenne des souches individuelles et (ii) une forte immunosuppression de la prolifération des LT CD3+ par le pool de CSM préconditionné avec de l'IFNγTNFα. De plus, le pool mettait en avant l'impact similaire de la condition non stimulée et de la condition Poly I :C sur la prolifération des LT CD3+ (Figure 44A). Les tendances observées sur LT CD3+ étaient similaires à celles observées sur les sous-populations LT CD4+ et LT CD8+ (Figure 44B-D).



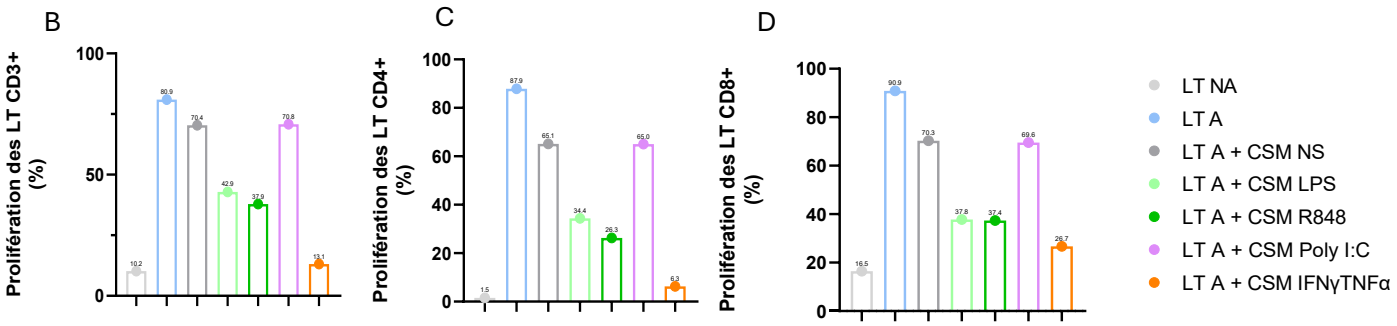


Figure 44 : Capacités immunomodulatrices du pool de CSM(GW) non stimulé ou préconditionné avec du LPS, du R848, du Poly I :C ou de l'IFNγTNFα, et cocultivé avec des lymphocytes T. Prolifération des LT CD3+ activés cocultivés avec des souches individuelles de CSM (moyenne) ou avec le pool (A1). Prolifération des LT CD3+ activés ou non et cocultivés avec le pool (A2). Prolifération des LT CD4+ activés ou non et cocultivés avec le pool (B). Prolifération des LT CD8+ activés ou non et cocultivés avec le pool (C). Coculture du pool de CSM et des lymphocytes T à un ratio 1:1. Résultats obtenus par cytométrie en flux et exprimés en pourcentage (%), n=1 (pool de 7 souches de CSM(GW)).

Les mêmes tests d'anergie que ceux décrits précédemment ont été menés sur les LT mis en contact avec le pool non stimulé ou préconditionné avec du LPS, du R848, du Poly I :C ou de l'IFNγTNFα, afin d'estimer de manière plus évidente le rôle des préconditionnements « CSM1 » sur la stimulation des LT.

Par la suite seule l'anergie fonctionnelle des LT par l'utilisation de méthylprednisolone a été conservée dans les différentes expérimentations impliquant des CSM (Figure 45A). Quel que soit le préconditionnement, il apparaissait que le pool de CSM, au même titre que la moyenne des souches individuelles, perdait sa capacité à inhiber la prolifération des LT rendus anergiques.

Le pool de CSM préconditionné avec de l'IFNγTNFα semblait maintenir l'effet de ce préconditionnement au sein d'un contexte anergique, avec une prolifération des LT anergiques nettement inférieure aux autres conditions d'étude et parfois très faible notamment au niveau des LT CD4+ (prolifération des LT CD4+ traités à la méthylprednisolone, après coculture avec le pool de CSM IFNγTNFα : 13,6 % *vs* moyenne de prolifération des LT CD4+ traités à la méthylprednisolone après coculture avec des CSM IFNγTNFα : 90,2 %) (Figure 45B-D). Cette différence de presque 9 fois souligne de manière prometteuse l'impact du pool avec une fonctionnalité propre et suggère de manière intéressante que l'absence de réponse du préconditionnement IFNγTNFα dans un contexte anergique sur souches individuelles est abolie lorsque que ces souches sont cultivées ensemble.

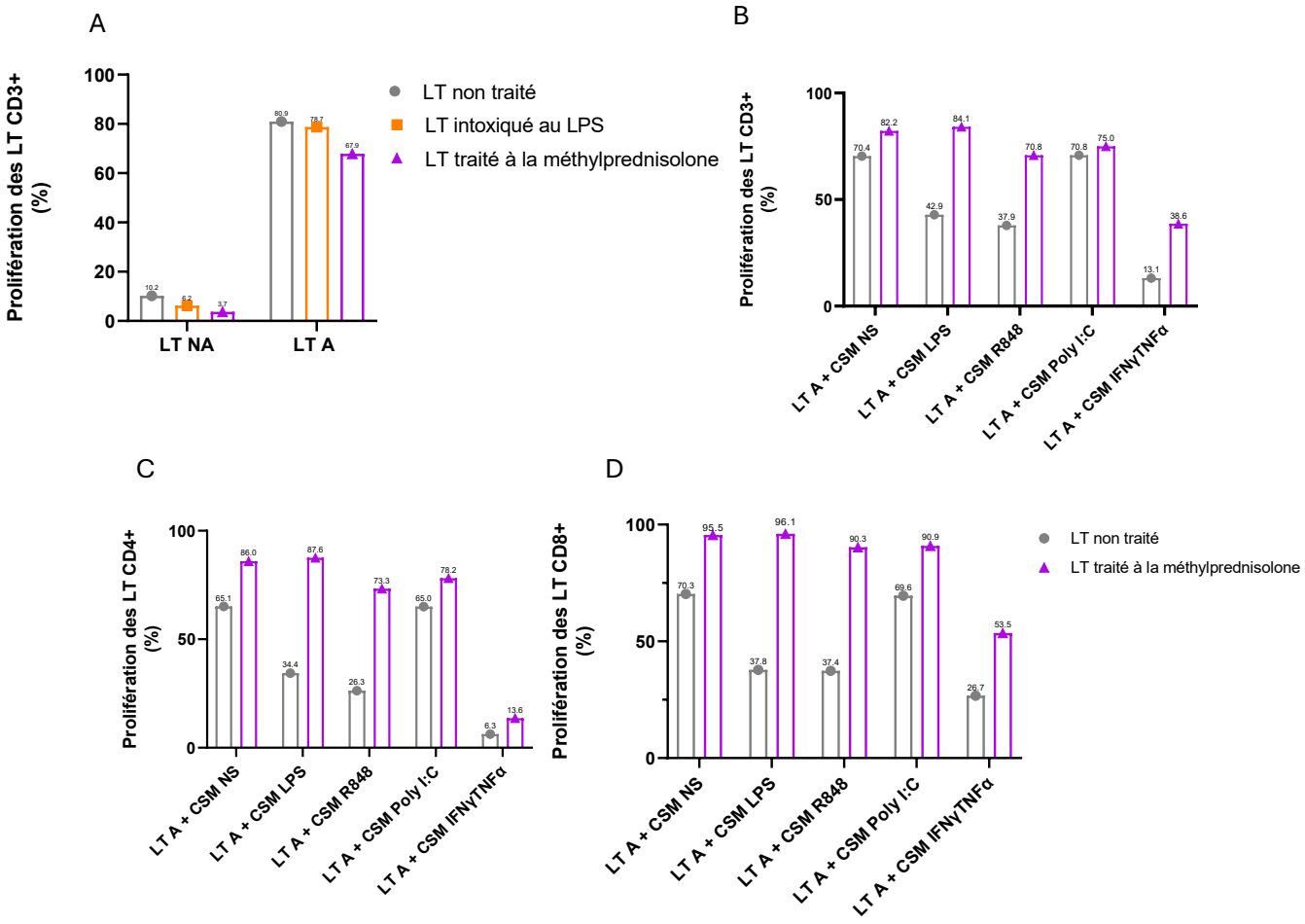


Figure 45 : Capacités immunomodulatrices du pool de CSM(GW) cocultivé avec des LT rendus anergiques. Prolifération des LT activés ou non, intoxiqués au LPS (1µg/ml, 24h) ou traités à la méthylprednisolone (2µg/ml, 24h) (A). Prolifération des LT CD3+ activés, non anergiques ou rendus anergiques par le traitement à la méthylprednisolone et cocultivés avec le pool de CSM non stimulé ou préconditionné avec du LPS, du R848, du Poly I :C ou de l'IFNγTNFα (B). Prolifération des LT CD4+ activés, non anergiques ou anergiques et cocultivés avec le pool de CSM NS ou préconditionné (C). Prolifération des LT CD8+ activés, non anergiques ou anergiques et cocultivés avec le pool de CSM NS ou préconditionné (D). Coculture du pool de CSM et des LT à un ratio 1:1. Résultats obtenus par cytométrie en flux et exprimés en pourcentage (%), n=1 (pool de 7 souches de CSM(GW)).

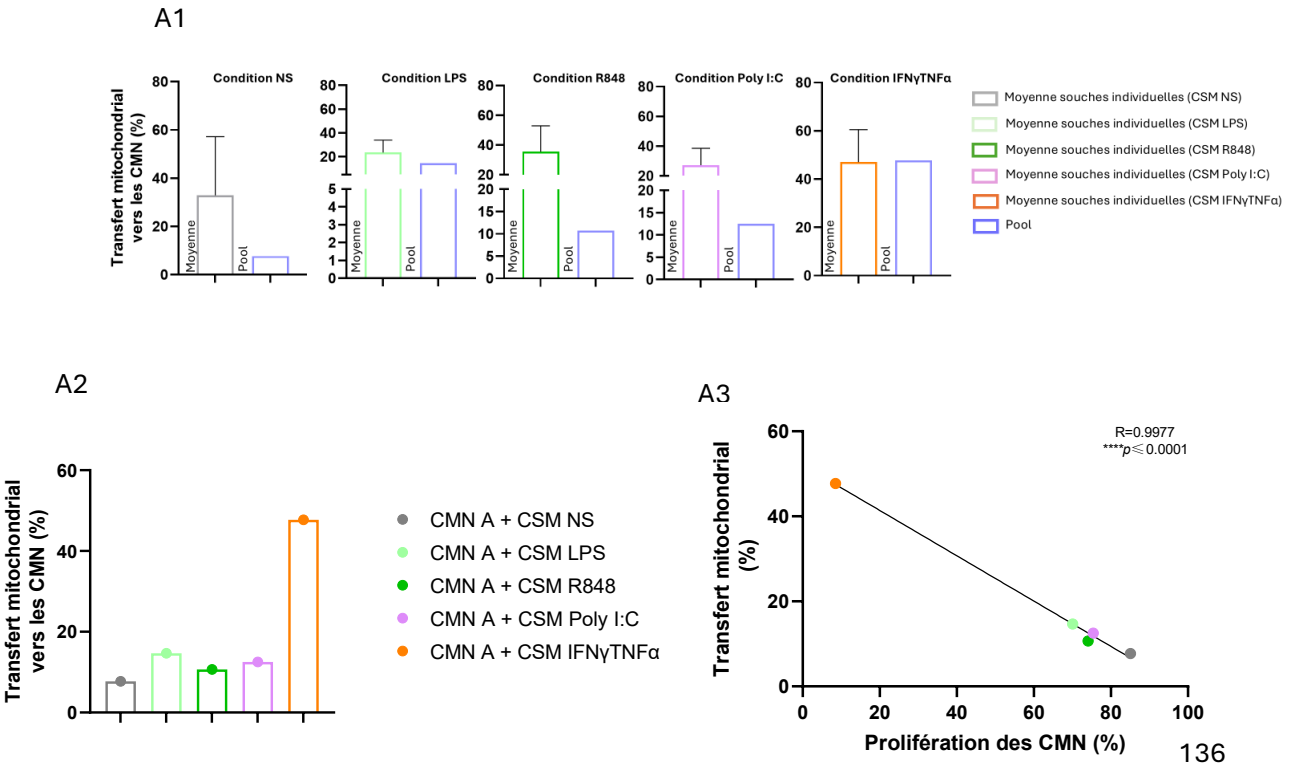
ii) Sur le transfert mitochondrial

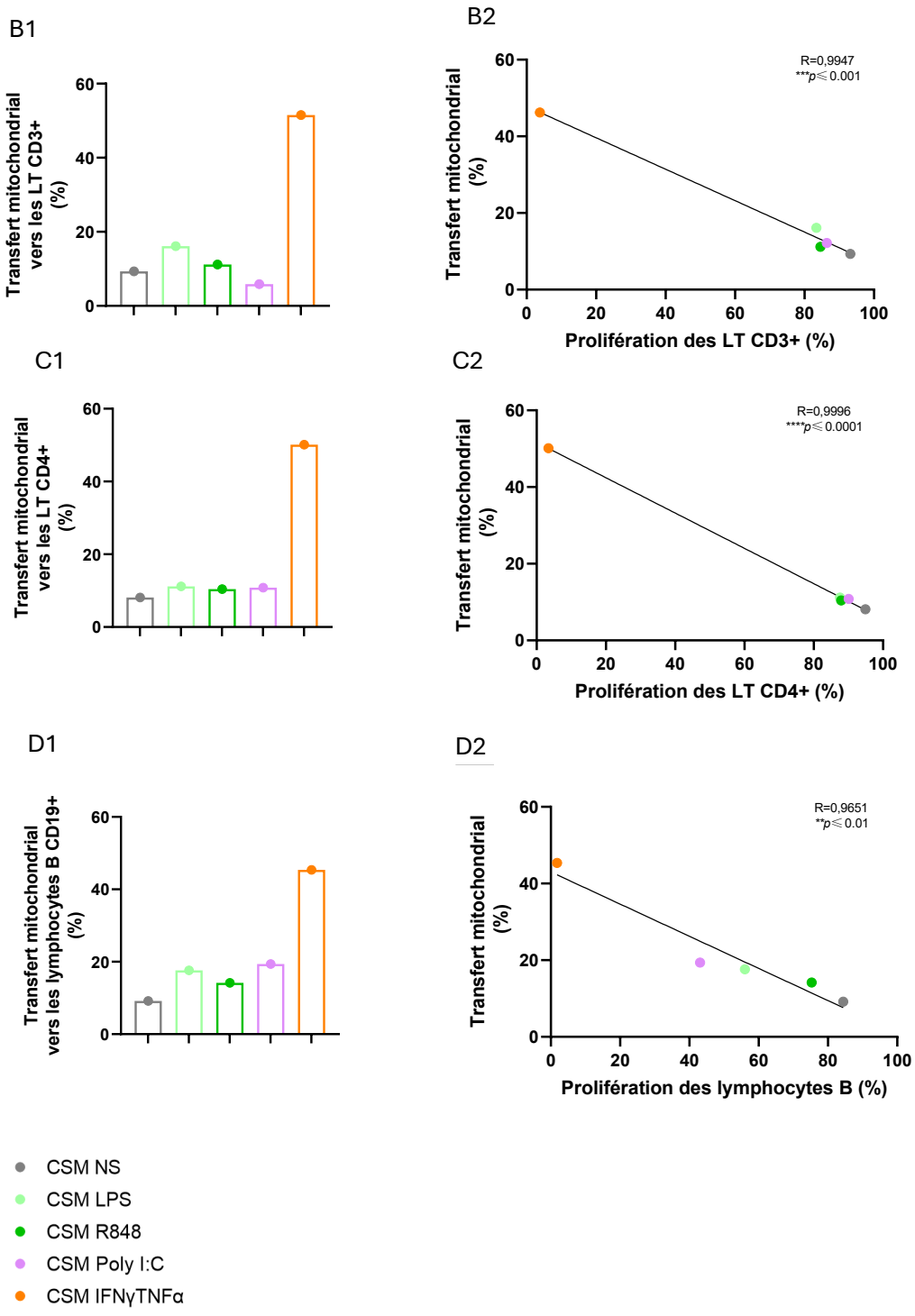
L'une des remarques soulevées lors de l'analyse sur souches individuelles résidait dans la forte hétérogénéité des CSM à transférer des mitochondries vers les populations immunitaires étudiées, empêchant de visualiser l'impact du préconditionnement cellulaire.

Grâce à une comparaison du pool avec la moyenne des souches individuelles, il a été montré que le pool de CSM préconditionné avec de l'IFNγTNFα transférait plus de mitochondries non pas uniquement aux CMN et aux LT CD3+, comme observé sur souches individuelles, mais à l'ensemble des populations immunitaires étudiées.

Ce transfert de mitochondries des CSM issues du pool, préconditionné avec de l'IFNγTNFα, vers les cellules immunitaires était augmenté en comparaison à l'ensemble des autres conditions d'étude (Figure 46A, 46B1-F1). Cela reflète la tendance auparavant observée sur souches individuelles mais amplifiée grâce au pool de CSM.

La corrélation négative entre le transfert mitochondrial et la prolifération des cellules immunitaires restait maintenue et permettait de mettre en avant le rôle de l'IFNγTNFα sur l'augmentation du transfert de mitochondries (aux alentours de 50%) et par conséquence la diminution de la prolifération des cellules immunitaires (quasi nulle) avec un coefficient de corrélation d'environ 0,9 et une significativité comprise entre $**p<0.01$ et $****p<0.0001$ (Figure 46 B2-F2). Cependant le pool semblait réduire le transfert de mitochondries dans les autres conditions de préconditionnements et dans les CSM non stimulées.




B1
Transfert mitochondrial vers les LT CD3+ (%)
60
40
20
0
B2
R=0,9947
***p≤ 0.001
Transfert mitochondrial (%)
60
40
20
0
0
20
40
60
80
100
Prolifération des LT CD3+ (%)
C1
Transfert mitochondrial vers les LT CD4+ (%)
60
40
20
0
C2
R=0,9996
****p≤ 0.0001
Transfert mitochondrial (%)
60
40
20
0
0
20
40
60
80
100
Prolifération des LT CD4+ (%)
D1
Transfert mitochondrial vers les lymphocytes B CD19+ (%)
60
40
20
0
D2
R=0,9651
**p≤ 0.01
Transfert mitochondrial (%)
60
40
20
0
0
20
40
60
80
100
Prolifération des lymphocytes B (%)
CSM NS
CSM LPS
CSM R848
CSM Poly I:C
CSM IFNγTNFα

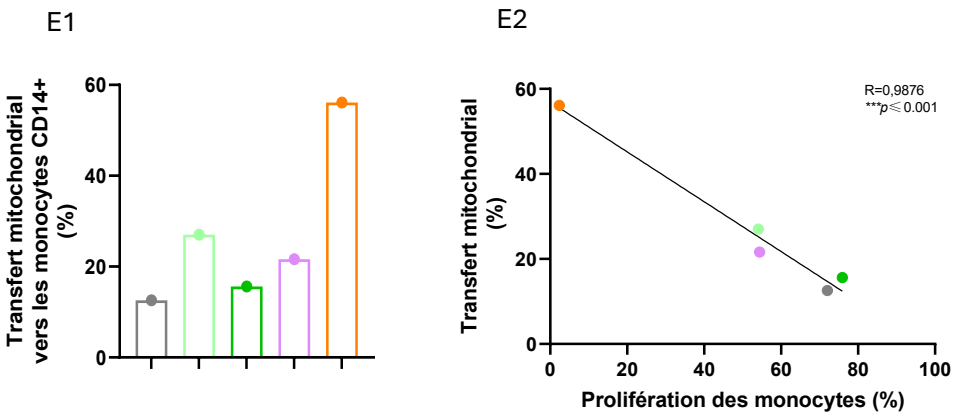
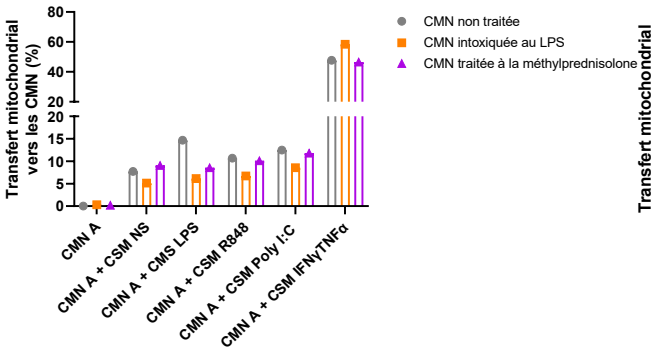


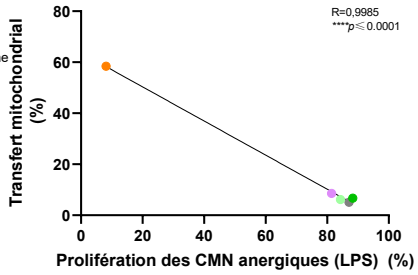
Figure 46 : Capacités immunomodulatrices du pool de CSM(GW) non stimulé ou préconditionné avec du LPS, du R848, du Poly I :C ou de l'FNγTNFα, médiées par le transfert mitochondrial vers les sous-populations immunitaires. Transfert mitochondrial des CSM non stimulées ou préconditionnées, issues des souches individuelles (moyenne), ou du pool (A1). Transfert mitochondrial du pool vers les CMN totaux (A2). Corrélation entre le transfert mitochondrial et la prolifération des CMN (A3). Transfert mitochondrial du pool vers les LT CD3+ (B1). Corrélation entre le transfert mitochondrial et la prolifération des LT CD3+ (B2). Transfert mitochondrial du pool vers les LT CD4+ (C1). Corrélation entre le transfert mitochondrial et la prolifération des LT CD4+ (C2). Transfert mitochondrial du pool vers les lymphocytes B (D1). Corrélation entre le transfert mitochondrial et la prolifération des lymphocytes B (D2). Transfert mitochondrial du pool vers les monocytes (E1). Corrélation entre le transfert mitochondrial et la prolifération des monocytes (E2). Coculture du pool de CSM et des CMN à un ratio 1 : 2. Résultats obtenus par cytométrie en flux et exprimés en pourcentage (%), n=1 (pool de 7 souches de CSM(GW)). Analyse linéaire de la régression, coefficient de corrélation R=0.99, $^{**}p<0.01$, $^{***}p<0.001$, $^{****}p<0.0001$.

Une autre analyse sur les capacités du pool de CSM à transférer des mitochondries vers différentes populations immunitaires a été réalisée, de la même manière que précédemment mais en utilisant des cellules immunitaires rendues anergiques par l'utilisation de LPS (1µg/ml pendant 24h) ou de la méthylprednisolone (2µg/ml pendant 24h). L'utilisation de ces cellules rendues anergiques entraînait des différences dans la capacité du pool de CSM à transférer des mitochondries aux populations immunitaires étudiées (Figure 47A1-E1). Une tendance à la diminution de cette capacité a été observée au niveau des populations immunitaires intoxiquées au LPS ou traitées à la méthylprednisolone surtout visible au niveau des monocytes intoxiqués au LPS. La corrélation entre le transfert de mitochondries et la prolifération des populations étudiées, rendues anergiques, restait similaire à ce qui a pu être montré sur des cellules non anergiques avec un coefficient de corrélation d'environ 0,9 et une significativité comprise entre $^{*}p<0.05$ et $^{****}p<0.0001$ (Figure 47A2/A3-E2/E3).

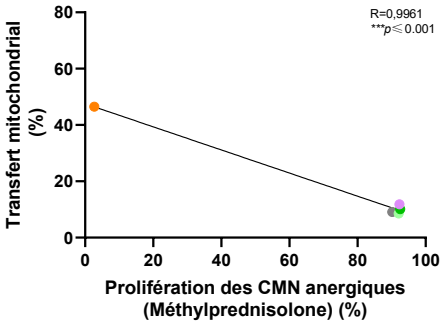
A1



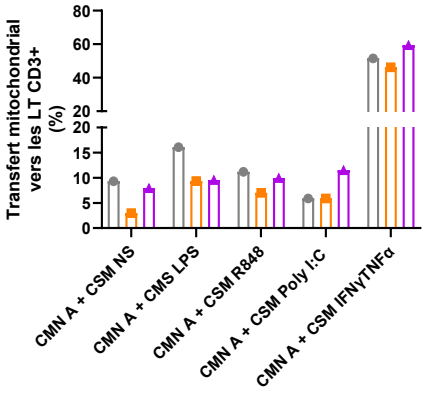
A2



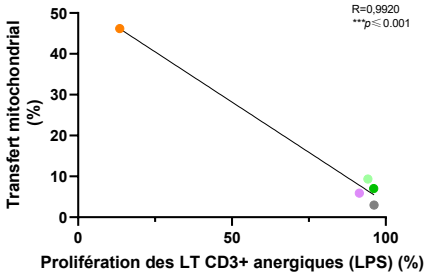
A3



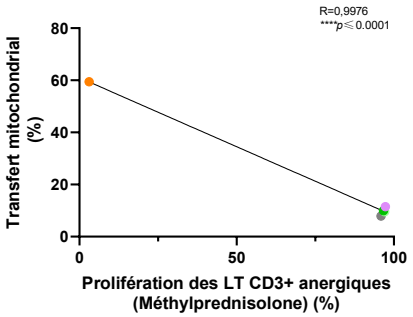
B1



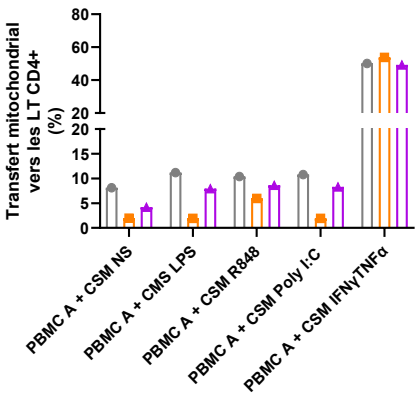
B2



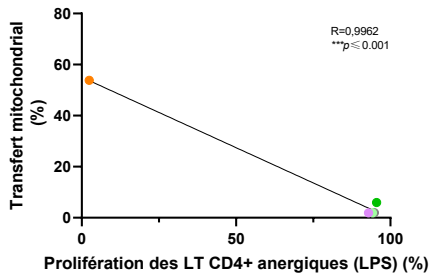
B3



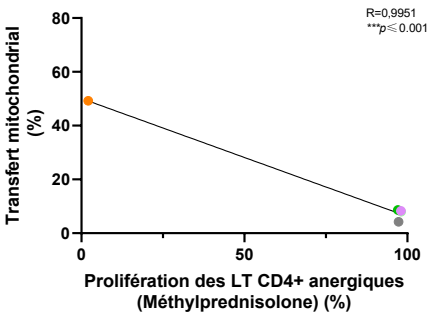
C1



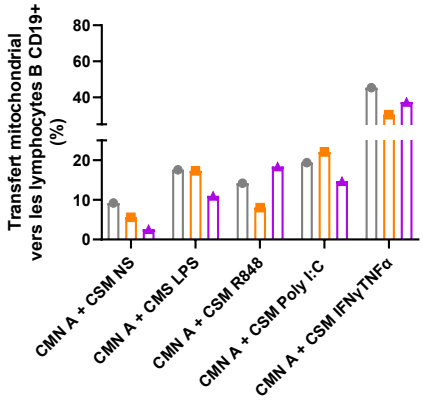
C2



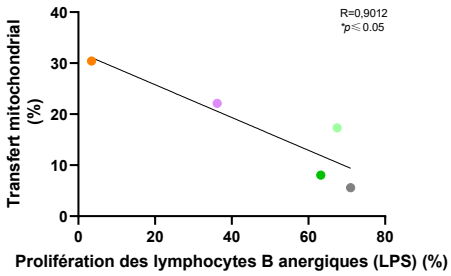
C3



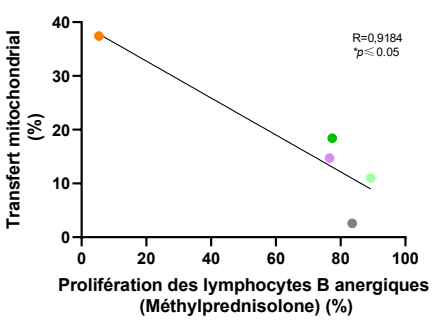
D1



D2



D3



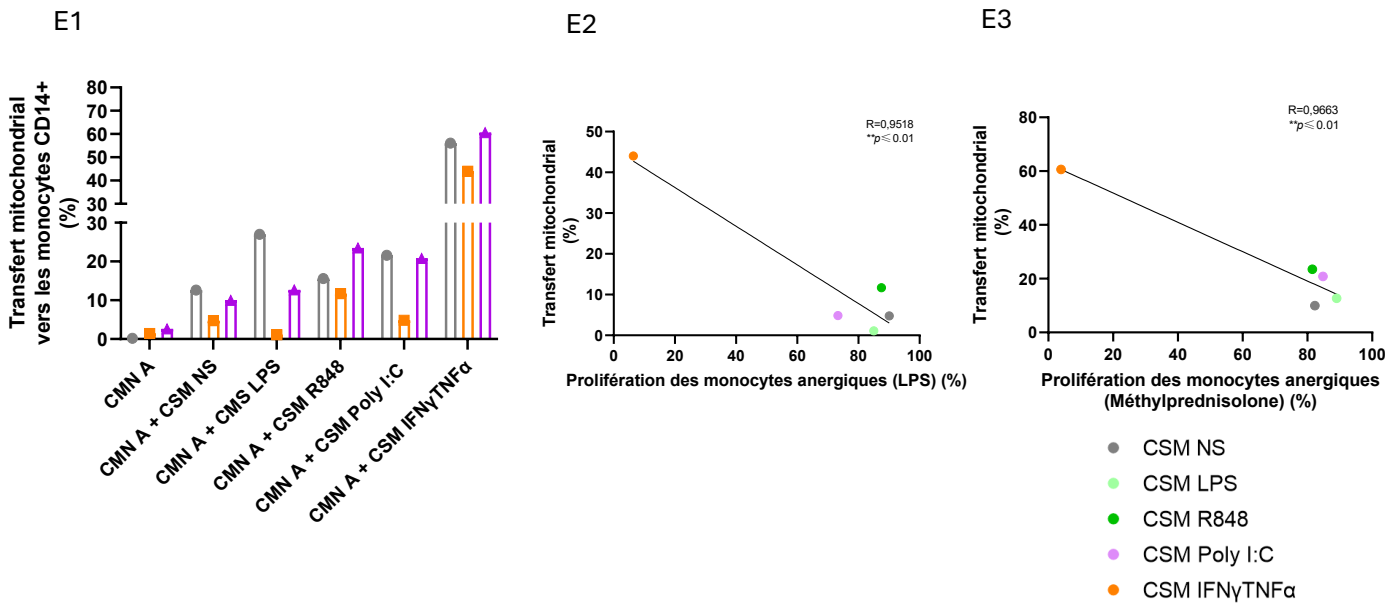


Figure 47 : Capacités immunomodulatrices du pool de CSM(GW) médiées par le transfert mitochondrial vers les sous-populations immunitaires rendues anergiques. Transfert mitochondrial du pool de CSM non stimulé ou préconditionné avec du LPS, du R848, du Poly I :C ou de l'FNγTNFα vers les CMN totales non anergiques ou rendues anergiques par intoxication au LPS ou traitement à la méthylprednisolone (A1). Vers les LT CD3+ (B1). Vers les LT CD4+ (C1). Vers les lymphocytes B (D1). Vers les monocytes (E1). Corrélation entre le transfert mitochondrial du pool de CSM et la prolifération des cellules immunitaires rendues anergiques par le LPS ou la méthylprednisolone, telles que les CMN (A2/A3). Les LT CD3+ (B2/B3). Les LT CD4+ (C2/C3). Les lymphocytes B (D2/D3). Les monocytes (F2/F3). Coculture du pool de CSM et des CMN à un ratio 1 : 2. Résultats obtenus par cytométrie en flux et exprimés en pourcentage (%), n=1(pool de 7 souches (CSM(GW)). Analyse linéaire de la régression, coefficient de corrélation R=0,9, *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001, ****p<0.0001.

Capacités migratoires du pool de CSM(GW)

Concernant l'expression des récepteurs de migration CXCR précédemment étudiée sur les souches individuelles de CSM, le pool a permis ici de souligner davantage d'expression de ces récepteurs dans le compartiment intracellulaire (ratio IMF>10) (Figure 48A, 48B).

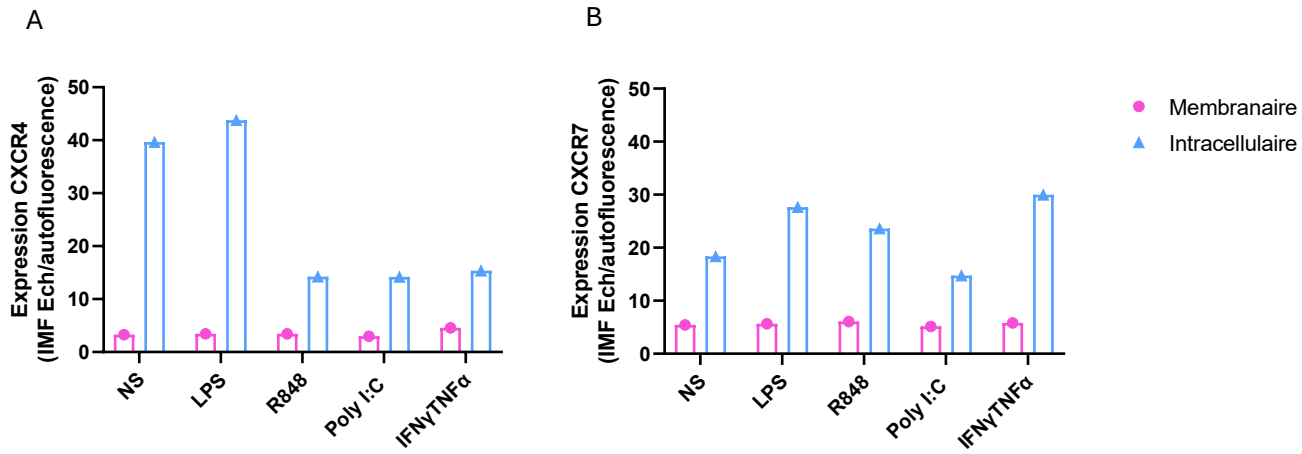


Figure 48 : Expression des récepteurs de migration au sein du pool de CSM(GW) non stimulé ou préconditionné avec du LPS, du R848, du Poly I :C ou de l'IFNγTNFα. Expression membranaire ou intracellulaire du récepteur CXCR4 par le pool de CSM (A). Expression membranaire ou intracellulaire du récepteur CXCR7 par le pool de CSM (B). Données exprimées en ratio d'Intensité Médiane de Fluorescence (IMF) en comparaison à l'autofluorescence générée par ces cellules, n=1 (pool de 7 souches de CSM(GW)).

Les capacités migratoires des CSM décrites comme variables au sein des souches individuelles, notamment dans la condition CSM préconditionnées avec du LPS, ont été homogénéisées grâce au pool cellulaire avec des résultats similaires à la moyenne des souches (Figure 49A1), confirmant l'impact négatif du préconditionnement à l'IFNγTNFα (Figure 49A2 et 49B).

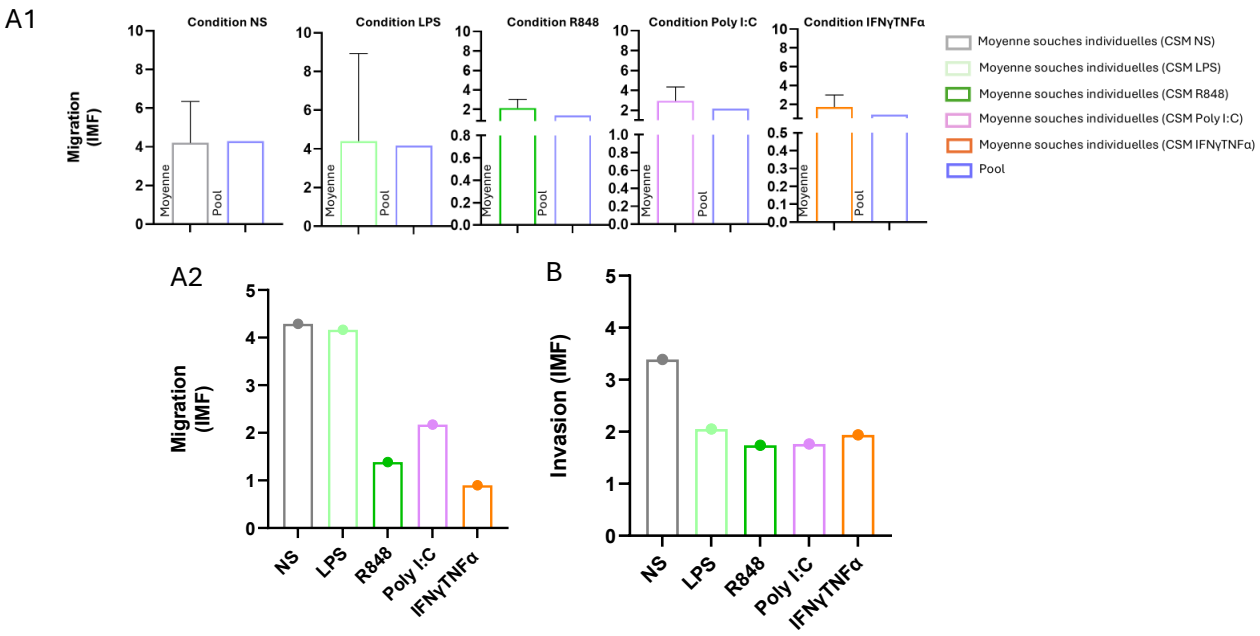


Figure 49 : Capacité migratoire de pool de CSM(GW) non stimulé ou préconditionné avec du LPS, du R848, du Poly I :C ou de l'IFNγTNFα. Migration des CSM NS ou préconditionnées, issues des souches individuelles (moyenne), ou du pool, suivie pendant 24h en chambre de Boyden. (A1). Migration du pool suivie pendant 24h en chambre de Boyden (A2). Invasion du pool suivie pendant 24h en chambre de Boyden supplémentée en MEC synthétique (B). Résultats exprimés en Intensité Médiane de Fluorescence (IMF), n=1 (pool de 7 souches de CSM(GW)).

Discussion

CONTEXTE

Les CSM sont reconnues comme étant des cellules immunomodulatrices présentant un fort intérêt dans le traitement de pathologies inflammatoires. Cependant, il a été décrit qu'en raison de leur plasticité, elles étaient capables de s'adapter à l'environnement inflammatoire dans lequel elles se trouvent[1]. Ainsi, elles présentent un potentiel pro-inflammatoire dont l'intérêt a été mis en avant dans certains essais cliniques et notamment, dans l'indication d'infections sévères à SARS-CoV-2. Dans ces essais, l'injection de CSM(GW) réduisait, certes, le niveau de l'inflammation avec une baisse d'expression de la protéine C-réactive (CRP), des cytokines pro-inflammatoires[259] ainsi que le taux de NETs (Neutrophil Extracellular Traps), mais de façon plus surprenante, ces CSM augmentaient aussi le taux des sous-populations lymphocytaires CD4+ et CD8+[136]. Les CSM peuvent également stimuler l'activité d'autres cellules de l'immunité, comme les macrophages grâce au transfert de leurs mitochondries par la formation de nanotubes[225] permettant ainsi d'augmenter les capacités de phagocytose de ces cellules[97]. De façon contraire, il a aussi été montré que ce transfert mitochondrial par des CSM(MO) vers des LT CD8+ diminuait leur prolifération, leur production d'IFNγ et des facteurs clés responsables de la différenciation en CTL (Cytotoxic T Lymphocyte)[109]. Le contrôle de cette plasticité cellulaire *in vitro, via* un préconditionnement durant la phase d'expansion, permettrait d'augmenter l'efficacité thérapeutique des CSM en les fonctionnalisant, en vue d'une utilisation clinique dans des pathologies combinant des états pro- et anti-inflammatoires comme le sepsis, le choc septique, ou encore les infections sévères à la COVID-19…Bien que le bénéfice de certaines molécules de stimulation sur l'induction d'un phénotype CSM2 ait déjà été démontré, très peu de publications se sont intéressées à l'induction d'un phénotype CSM1. Notre travail s'est focalisé sur l'obtention et la caractérisation de ce phénotype en comparaison à des CSM non stimulées ou des CSM2. L'objectif a donc été de comprendre l'impact de plusieurs molécules de préconditionnement, décrites comme favorisant le phénotype CSM1 (LPS, R848) ou CSM2 (Poly I :C, IFNγTNFα), sur des CSM(GW) par une approche plurifactorielle. Après optimisation des temps et des concentrations de préconditionnement au LPS et au Poly I :C, des temps courts et de faibles concentrations ont été privilégiés. Au sein de cette discussion, plusieurs aspects seront évoqués tels que l'impact des molécules de préconditionnement sur les CSM (PARTIE I), l'avantage d'un pool de CSM sur l'hétérogénéité inter-individuelle (PARTIE II), l'impact du préconditionnement sur les capacités migratoires des CSM (PARTIE III) et le rôle du LPS/ du Poly I :C et de l'IFNγTNFα dans l'obtention d'un phénotype précis (PARTIE IV). Enfin, la classification des CSM en phénotype CSM1/CSM2 sera discutée (PARTIE V).

PARTIE I : Quel est l'impact des molécules de préconditionnement sur les CSM ?

Dans cette première partie, visant à comprendre l'impact des molécules de préconditionnement sur les CSM(GW), nous avons montré que les cellules non stimulées tout comme celles préconditionnées maintenaient leurs capacités immunosuppressives. En effet, quelle que soit la condition, les CSM exprimaient des molécules classiquement décrites comme immunomodulatrices, à savoir :

- (i) HLA-G5/G6, une molécule non classique du CMH de classe I exprimée par les tissus fœtaux et impliquée dans les processus de tolérance embryonnaire. Cette molécule, capable d'inhiber la fonctionnalité des LT, des LB, des cellules NK et des cellules présentatrices d'antigène[6] voit son expression augmenter sur les CSM de cordons ombilicaux[231].
- (ii) la molécule inhibitrice PD-L1, considérée comme un point de contrôle négatif, aussi appelée « checkpoint immunitaire », régulant la prolifération des LT. Cette molécule décrite au sein de cellules cancéreuses interagit avec le récepteur PD-1 exprimé à la surface des LT entraînant l'inhibition de leur activation, l'induction de leur apoptose conduisant ainsi à une diminution de l'activité antitumorale lymphocytaire LT [234,222].
- (iii) IDO, une enzyme impliquée dans le métabolisme de la kynurénine et du tryptophane et décrite comme capable d'inhiber la prolifération des LT par déplétion de l'acide aminé tryptophane, essentiel à leur prolifération[228].

L'expression de ces marqueurs immunomodulateurs plutôt en faveur de propriétés « CSM2-like » n'était donc pas suffisante pour discriminer un phénotype immunitaire. Par ailleurs, quelles que soient les conditions de stimulation, les CSM n'exprimaient pas à leur surface la molécule de classe II du CMH HLA-DR/DP/DQ, première molécule impliquée dans l'activation du TCR des LT[239]. Cette absence d'expression d'HLA-DR/DP/DQ, tout comme l'absence de prolifération des LT non activés par les CSM en coculture, souligne un point positif : les préconditionnements utilisés n'induisent pas une immunogénicité des CSM qui limiterait leur utilisation clinique. Les propriétés immunomodulatrices de ces CSM ont été confirmées par des tests fonctionnels qui ont mis en évidence leur capacité à diminuer la prolifération des LT activés.

En effet, aucune différence significative n'a été mise en évidence entre les CSM non stimulées et les CSM préconditionnées CSM1 lors des tests fonctionnels d'immunomodulation : toutes ont permis de diminuer la prolifération des LT activés, témoignant d'un maintien des propriétés immunosuppressives malgré le préconditionnement.

Par ailleurs, une corrélation négative entre le transfert mitochondrial et la prolifération des populations immunitaires étudiées, à savoir les CMN, les LT CD3+, les LT CD4+, les LT CD8+, les LB et les monocytes, a été démontrée avec un coefficient de corrélation et une significativité forte. Ces résultats sont en accord avec certaines études ayant montré que le taux de transfert de mitochondries des CSM vers des CMN CD45+ était d'environ 40%. Dans ces études, le transfert artificiel de mitochondries de CSM vers des cellules lymphoïdes, par mitoception, augmentait le taux de LT régulateurs et diminuait l'infiltration lymphocytaire au niveau de tissus inflammés[107]. De plus, il a été montré que le transfert de mitochondries vers les LT CD4+ diminuait la prolifération et la production d'IFNγ par les LT et augmentait le facteur de transcription T-bet, à l'origine de leur différenciation en lymphocyte T helper 1 (LTh1)[106].

Bien que toutes les CSM, préconditionnées ou non maintiennent des propriétés immunomodulatrices, nous avons mis en évidence des différences significatives sur certains paramètres témoignant d'un impact du préconditionnement. A titre d'exemple, le LPS, le R848 mais aussi le Poly I :C induisaient une diminution de la sécrétion d'IL-6 comparativement aux CSM non stimulées et ce de manière significative pour le LPS et le Poly I:C.

C'est pourquoi, afin d'étudier la plasticité des CSM1 dans un contexte immunosuppressif, des modèles de LT anergiques ont été mis en place sur la base des travaux de LeBurel *et al*. ayant montré qu'une intoxication des LT au LPS diminuait leur prolifération et que cette diminution était limitée en cas de coculture avec des CSM[138].

De même, il a décrit que des CSM placées dans un contexte inflammatoire favorisaient la survie des LT quiescents[256]. De même, il été montré, que des CSM(MO) préconditionnées avec du LPS augmentaient, *in vitro,* le taux de LT CD8+ sécrétant de l'IFNγ[140], inhibaient leur apoptose et induisaient la production de cytokines et de chimiokines pro-inflammatoires. Cependant, *in vivo* les CSM semblent maintenir une plasticité même après le préconditionnement au LPS. En effet, dans un modèle murin PIICS d'endo-toxémie, responsable d'une inflammation aggravée, d'une forte immunosuppression et d'un état catabolique, il a été mis en évidence que les CSM stimulées par le LPS, diminuaient le taux de TNFα, de chimiokines et de la protéine CRP, atténuant ainsi le niveau d'inflammation *in vivo*. De surcroît, elles permettaient d'augmenter le taux de LT CD8+ fonctionnels en comparaison aux CSM contrôles, mettant en avant les capacités immunostimulantes des CSM1.

Ces résultats sont concordants avec notre étude, où les CSM stimulées ou non, perdaient leurs propriétés immunosuppressives lorsqu'elles étaient cocultivées avec des LT préalablement traités avec de la méthylprednisolone couplée ou non à du LPS.

La difficulté à caractériser et identifier ce phénotype pro-inflammatoire pourrait résider dans certaines questions soulevées par cette étude et limites que nous avons observées :

(i) Quels biomarqueurs pour définir les CSM1 ?

Il y a actuellement un manque important de données dans la littérature sur ce phénotype pro-inflammatoire des CSM et une absence de définition de biomarqueurs permettant de le caractériser. Une première étude a mis en évidence l'impact de l'axe Twist-TSG6 sur les fonctions des CSM. Les auteurs ont montré que le profilage transcriptionnel de CSM(MO) avait permis d'identifier des CSM « TWIST1^{High}TSG6^{low} » et des CSM « TWIST1^{low}TSG6^{high} » avec des fonctionnalités différentes. Les CSM « TWIST1^{low}TSG6^{high} » en comparaison aux CSM « TWIST1^{High}TSG6^{low} » présentaient un profil fortement anti-inflammatoire avec un sécrétion plus importante de TGF-β2 et une capacité à inhiber les médiateurs inflammatoires TNFα, CXCL1 et CXCL2 dans un modèle murin. Bien que les CSM « TWIST1^{High}TSG6^{low} » n'aient pas été décrites comme des CSM1, ce profil pourrait correspondre à des CSM1, tout comme les CSM « TWIST1^{low}TSG6^{high} » décrites comme fortement anti-inflammatoires pourraient correspondre à des CSM2[48].

Plus récemment, des approches ont été mises en place permettant d'identifier des ensembles de protéines exprimées dans des CSM après préconditionnement. Une approche intégrative de biologie des systèmes combinant l'analyse des réseaux d'interactions protéine-protéine (PPI), le profilage transcriptionnel et des analyses d'enrichissement fonctionnel a été élaborée afin de comprendre comment les CSM1 préconditionnées avec du LPS exerçaient une fonction antitumorale dans le cancer colorectal. Cette approche a mis en évidence six hubs protéiques majeurs, dont un hub central composé d'Akt1, SRC, ITGB1 et NF-kB1. L'ensemble de ces protéines était impliqué dans l'activité antitumorale des CSM1, ouvrant les portes à de nouvelles stratégies d'identification de biomarqueurs CSM1[141]. Une des conclusions intéressantes au sein de cette étude était que les CSM(GW) préconditionnées et cocultivées avec une lignée cancéreuse RKO en présence de LPS augmentaient la suppression des cellules RKO. Le LPS présent durant la coculture semblait alors maintenir la polarisation des CSM1 ou repolarisait les CSM nouvellement prolifératives[141]. Cela pose la question de la re-stimulation des CSM en vue d'un maintien de leur phénotype cellulaire. Autrement dit, faudrait-il stimuler plusieurs fois les CSM pour conserver et/ou augmenter leur efficacité lors d'un préconditionnement ?

(ii) Une seule stimulation moléculaire est-elle suffisante pour induire des CSM1 ?

L'équipe de Feng *et al*. s'est intéressée à la question de stimulations multiples des CSM issues de la pulpe dentaire, au LPS. Pour cela, les CSM (Pulpe dentaire), ont été (i) stimulées une fois avec du LPS pendant 6h, (ii) 3 fois avec du LPS pendant 6h toutes les 48h, (iii) 6 fois avec du LPS pendant 6h, toutes les 24h. Les auteurs ont observé qu'une exposition répétée des CSM au LPS augmentait la sénescence et le taux des protéines TLR4 et MyD88 conduisant à une augmentation de l'activation de NF-kB[287]. Ainsi, ils ont mis en évidence l'apparition au sein de CSM sénescentes d'un phénotype SASP (Senescence-Associated Secretory Phenotype) pro-inflammatoire. En effet, il a été montré que le phénotype SASP conduisait à une augmentation du taux d'IL-1β, d'IL-6, d'IL-8, de CXCL1/5/6 dans des CSM issues de cartilage ostéo-arthritique[291]. Ce caractère pro-inflammatoire des CSM présentant un phénotype SASP[269] a également été décrit au niveau des CSM(MO) tardives/âgées. Il se caractérise par un relargage de cytokines pro-inflammatoires mais contribue également à la mise en place de la sénescence des CSM précoces/jeunes lors de l'expansion, pouvant altérer à terme leur prolifération et leur fonctionnalité[268].

Les facteurs SASP sécrétés par les CSM âgées et sénescentes favorisaient un microenvironnement inflammatoire et les débris provenant des CSM sénescentes représentaient un signal DAMP induisant une activation des macrophages et favorisant leur polarisation vers un phénotype M1. Ces cellules sénescentes étaient également capables de recruter des monocytes et voyaient leurs capacités inhibitrices envers la prolifération des LT diminuer[276]. Bien que les CSM avec un phénotype SASP peuvent être identifiées comme des CSM1 pro-inflammatoires, certaines analyses de signalisation cellulaire ont montré que ce statut sénescent était associé à des altérations de protéines impliquées dans la glycolyse, la réponse immunitaire, l'homéostasie, la régulation de la mort cellulaire et du cycle cellulaire[271]. C'est pourquoi une utilisation en clinique de CSM avec un phénotype SASP ne semble pas envisageable. En effet, bien que l'agence européenne du médicament n'exclue pas clairement l'utilisation de cellules sénescentes en thérapie, leur instabilité génomique constituerait un obstacle lors des contrôles qualités analysant la stabilité caryotypique[274].

Une solution alternative aux CSM présentant un phénotype SAPS serait de moduler l'effet immunomodulateur des CSM. Si l'utilisation de CSM sénescentes peut présenter des limites, des approches basées sur l'utilisation de CSM inactivées et apoptotiques ont montré une diminution de leur propriété immunitaire, et pourraient être envisagées. En effet, ces CSM n'étaient plus en capacité de supprimer la prolifération des LT ni d'induire la formation de cellules régulatrices mais conservaient des capacités de modulation des monocytes[278,301].

Ces CSM restaient intègres mais incapables de répondre à un signal inflammatoire ou de sécréter des facteurs immunomodulateurs ce qui empêcherait une plasticité immunitaire.

(iii) Quels contrôles fonctionnels utiliser ?

Les CSM préconditionnées ont vocation à servir comme MTI. Pour cela, des tests fonctionnels sont nécessaires pour valider l'efficacité du lot produit et garantir sa conformité. Une limite du projet réside donc dans la définition du ou des tests à mettre en place post-culture afin d'évaluer les capacités immunitaires des CSM préconditionnées. Si les tests de type MLR sont reconnus pour valider les propriétés immunomodulatrices et immunosuppressives des CSM2, il n'existe pas de consensus concernant les tests permettant d'attester des propriétés pro-inflammatoires des CSM. Ils pourraient cependant être basés sur des cocultures de CSM avec des LT anergiques suivis d'une analyse de la prolifération, de l'activité cytotoxique et de la sécrétion cytokinique des LT cocultivés. Une étude a notamment cherché à évaluer la capacité des CSM(MO) à induire une lyse médiée par les LT CD8+. Les LT CD8+ cocultivés avec les CSM présentaient une capacité de lyse augmentée notamment après coculture avec des CSM(MO) préconditionnées à l'IFNγ. Ce type d'analyse serait intéressant afin d'évaluer les capacités immunitaires des CSM préconditionnées en « CSM1-like »[289].

Un des impacts des CSM sur les cellules NK lors de coculture a déjà été montré. Les auteurs ont mis en évidence qu'en l'absence de cytokines exogènes, la sécrétion de faibles quantités d'IFNγ par les cellules NK permettait de préconditionner les CSM sécrétant en retour des quantités accrues de CCL2. Ces CSM permettaient alors d'augmenter les capacités de production d'IFNγ par les cellules NK. Cette activation des cellules NK par les CSM était indépendante du contact, mais dépendante de l'axe CCL2-CCR2. Cet effet des CSM a également été observé sur des cellules NK provenant de patients fortement immunodéprimés. Cette boucle de rétrocontrôle positive impliquant (i) l'IFNγ dérivé des cellules NK et (ii) de CCL2 produit par les CSM, permettait d'augmenter la réponse inflammatoire des cellules NK, montrant tout l'intérêt d'élargir le spectre de cellules sensibles aux CSM préconditionnées[139].

(iv) Quel impact de l'hétérogénéité des CSM sur leur réponse au préconditionnement ?

Dans ce travail, l'efficacité des préconditionnements utilisés est relative, en raison notamment d'une hétérogénéité dans la réponse des CSM. Trois facteurs peuvent être incriminés :

- la source tissulaire des CSM, reconnue, par l'ISCT, comme générant des réponses cellulaires différentes selon les contextes d'utilisation. L'ISCT a ainsi proposé une nomenclature précisant l'origine tissulaire des CSM[5].
- les caractéristiques intrinsèques à la mère et au fœtus.
- la manière de préparer et de cultiver les cellules *in vitro* (digestion enzymatique *vs* mécanique, milieu de culture utilisé, nombre de passages appliqué…).

L'ensemble de ces points est applicable à notre projet. Tout d'abord, notre stratégie de préparation et de culture s'est toujours restreinte à notre protocole établi. Pourtant, il a été montré que le mode de culture des CSM pouvait influencer leurs capacités immunorégulatrices, en particulier le niveau de confluence du tapis cellulaire lors d'une expansion en 2D. En effet, il a été montré que des CSM(MO) cultivées à forte confluence augmentaient leur expression de gènes immunomodulateurs tels que *TRIM29, BPIFB4, MMP3* et *SPP1* diminuant ainsi la prolifération des LT CD3+ activés ainsi que la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires, même sans préconditionnement cytokinique. De plus, ces CSM augmentaient leur métabolisme glycolytique ainsi que leur sécrétion de lactate reliés à leur capacité d'inhibition de la prolifération des LT, permettant ainsi une réduction de l'inflammation dans un modèle murin de GvHD et ce en comparaison aux CSM « faiblement confluentes »[307].

De surcroît, notre stratégie de préconditionnement a été testée uniquement sur des CSM issues de la gelée de Wharton et non sur des tissus adultes. L'origine des CSM pourrait conduire à un impact variable des molécules de préconditionnements. De même, si l'ensemble des cordons ombilicaux de notre étude provenait d'un accouchement par voie basse, sans complications majeures et sans contaminations microbiennes, ils n'ont pas été sélectionnés selon les caractéristiques des donneuses ou des nouveau-nés, conduisant à une des limites les plus impactantes dans notre étude, à savoir : l'hétérogénéité inter-individuelle entre chaque prélèvement de CSM. Pour des CSM issues de sources adultes, cette hétérogénéité inter-donneurs dépend du statut du donneur en question et notamment de son genre, de ses conditions de santé, de l'existence de comorbidités, d'antécédents génétiques mais aussi de son âge. En revanche, l'utilisation de CSM issues de tissus fœtaux inclut non seulement des facteurs liés à la mère mais aussi des facteurs obstétriques ou liés au nouveau-né.

Des travaux antérieurs au laboratoire ont montré que la prolifération des CSM(GW) était meilleure lorsque la grossesse était parvenue jusqu'au terme et que l'accouchement s'était déroulé sans complications. De plus, l'apport d'ocytocine pendant le travail semblait augmenter la résistance des cellules à la cryoconservation et améliorer leur prolifération après décongélation.

De même, Bienko *et al*. ont montré une corrélation négative entre l'expression du VEGFA par les CSM(CO) et le poids du nouveau-né ainsi qu'une corrélation négative entre l'expression du VEGFB et les semaines d'aménorrhée tandis que Léger *et al*. ont montré le rôle des facteurs obstétricaux sur la différenciation de CSM(CO) en chondrocytes[40,215]. Ainsi, les facteurs les plus influents semblent être l'âge maternel, l'âge gestationnel et le poids de naissance, augmentant le rendement des CSM(GW)[38]. Les pathologies maternelles (obésité, diabète ou prééclampsie) entrent aussi en jeu. En effet, il a été montré que des CSM(GW) issues d'une césarienne programmée avaient un doublement de population plus lent et une activité immunosuppressive plus forte[248]. L'environnement *in utero* semble ainsi modifier les propriétés immunomodulatrices des CSM notamment en impactant l'activité métabolique des cellules.

PARTIE II : Une manière de lutter contre l'hétérogénéité inter-individuelle : le pool

Dans notre étude, aucune sélection de cordon n'a été réalisée en fonction des facteurs obstétriques pouvant pour partie expliquer l'importante hétérogénéité inter-souche et la variabilité de réponse au préconditionnement selon les cordons. Ainsi, en l'absence de préconditionnement, certaines souches de CSM sont apparues comme ayant d'emblée un profil plus ou moins pro- ou anti-inflammatoire ou étant plus ou moins sensibles aux préconditionnements. A titre d'exemple, l'activité sécrétoire des CSM issues de la souche T8, dans la condition IFNγTNFα, était plus importante que les autres souches, en particulier pour la sécrétion des cytokines pro-inflammatoires (IL-6, IL-8, RANTES et CCL3). Hu *et al*. ont également décrit cette hétérogénéité retrouvée aussi bien au niveau moléculaire (par analyses transcriptomiques, protéomiques, sécrétomiques et épigénomiques) qu'au niveau fonctionnel (potentiel de différenciation, capacités immunomodulatrices, et capacités régénératives), mettant en évidence une réaction différente des CSM à un préconditionnement inflammatoire donné[313].

Les stratégies possibles pour lisser ces hétérogénéités sont soit de recueillir des prélèvements incluant uniquement certains paramètres spécifiques liés au donneur, soit de cultiver, ensemble, des CSM issues de différents cordons ombilicaux. Cette technique utilisée afin d'obtenir des lots de CSM est appelée « pool »[295]. Dans notre étude, un pool de 7 cordons a été constitué et préconditionné avant analyse.

Ce pool a permis de mieux différencier l'action de chaque molécule de préconditionnement tout en renforçant l'impact prédominant du préconditionnement à l'IFNγTNFα, notamment à augmenter le transfert mitochondrial diminuant la prolifération des CMN.

L'une des premières études utilisant cette stratégie de culture a démontré que le pool de CSM(MO) augmentait les capacités immunosuppressives individuelles des CSM sur les lymphocytes[297] tout en réduisait leur hétérogénéité. Si la capacité des CSM à inhiber la prolifération des CMN variait fortement en fonction de la souche de CSM utilisée avec une inhibition de la prolifération des CMN par les CSM s'étalant de 20% à 80%, celle-ci était nettement lissée par l'effet de groupe[317].

Une étude récente a également montré l'intérêt de l'association de CSM issues de 3 cordons ombilicaux, préalablement caractérisées comme faiblement, moyennement, ou fortement immunomodulatrices par MLR. Le pool de 3 souches a permis de réduire la variabilité inter-donneurs et à l'instar des CSM adultes, d'augmenter les fonctions immunomodulatrices, notamment des CSM considérées comme faiblement immunomodulatrices. Après préconditionnement par des cytokines pro-inflammatoires (IFNγ ou IFNγ + TNFα), l'inhibition de l'expansion des LT par le pool était significativement plus élevée que celle issue du cordon le moins immunomodulateur et que la moyenne des cordons individuels. Ce pool a aussi permis d'augmenter l'expression de molécules immunomodulatrices comme IDO en comparaison aux CSM faiblement immunomodulatrices, sans provoquer un effet immunogène cumulatif. En effet, l'analyse de l'expression de la molécule HLA-DR ainsi que des molécules de costimulation entre les CSM issues du cordon fortement immunomodulateur et celles issues du pool était similaire. Une augmentation était quand même à noter lors des préconditionnements pro-inflammatoires mais n'entraînait pas de différences entre le pool et la moyenne des souches individuelles[298]. Ces résultats vont dans le sens de notre étude, où nous avons observé que l'expression de la molécule HLA-DR-DP-DQ au sein du pool n'était pas augmentée, comparativement aux souches individuelles et ce pour l'ensemble des conditions de préconditionnement testées.

Si le pool s'avère être intéressant dans l'homogénéisation du comportement des CSM, plusieurs questions se posent. La première réside sur le moment de constitution du pool lors de la culture. Deux alternatives sont décrites dans la littérature : 1) l'élaboration du pool à la fin de l'expansion, sans culture des cellules ensemble, 2) la composition du pool de CSM avec une phase de culture des cellules ensemble. L'étude de Samuelsson *et al*. s'inscrit dans la première possibilité.

Les CSM(MO) ont été cultivées de manière isolée puis congelées et décongelées pour être poolées[297]. Dans ce modèle, les CSM n'ayant donc pas été cultivées ensemble, il n'y eu aucune influence de chaque souche de CSM sur les autres lots au cours de la culture cellulaire. Ce pool pourrait facilement se comparer à la moyenne des souches individuelles.

Dans l'étude de Merbarki *et al.,* 10 souches de CSM(CO) ont été expandues séparément puis congelées, décongelées et remises en culture séparément. L'objectif des auteurs a été de caractériser le statut immunomodulateur de chaque souche afin de pouvoir distinguer des souches faiblement, moyennement, ou fortement immunomodulatrices. Puis, un pool de 3 souches de CSM(CO) a été constitué de manière à rassembler chaque profil immunomodulateur au sein du pool[298]. En revanche, Kuçi *et al*. ont opté pour la seconde alternative. Huit souches de CSM(MO) de donneurs différents ont été congelées puis décongelées pour être cultivées ensemble pendant 14 jours[317]. Cela a permis de constituer une lignée stable (nommée MSC-140) administrée à des patients atteints de GvHD. Ils ont ainsi observé une augmentation du taux de survie à deux ans des patients traités. Sur les tests fonctionnels réalisés *in vitro*, ils ont comparé les deux alternatives de composition du pool, décrites précédemment et ont montré que le produit clinique résultant d'une culture commune des 8 souches de CSM(MO) s'était avéré plus efficace que le pool composé des 8 souches individuelles de CSM(MO) rassemblées après expansion individuelle.

Pour notre projet, nous avons souhaité promouvoir l'influence des CSM entre elles au sein du pool, c'est pourquoi chaque souche de CSM(GW) a été expandue de manière individuelle jusqu'au passage P1 puis congelée en vue de la formation d'une cryobanque. Chaque souche décongelée a ensuite été cultivée sur un passage, de manière isolée afin de favoriser la reprise cellulaire post-congélation. Puis, lorsque les cellules ont atteint 80% de confluence, l'ensemble des cultures issues de souches individuelles, a été rassemblé pour une culture sur un passage d'une durée d'environ 7 à 10 jours.

Cette culture sur un passage a permis aux CSM issues de prélèvements différents de s'influencer afin de produire un pool homogène. Une culture sur plusieurs passages risquerait fortement de modifier la proportion de chaque souche (au départ identique) au sein du pool. En effet, on pourrait imaginer qu'une souche prenne le dessus sur les autres de part une forte capacité prolifération *in vitro*, la rendant ainsi majoritaire au sein du pool, ce qui pourrait inhiber l'effet d'un pool multi-souches.

La seconde question réside dans le nombre de souches à incorporer au sein du pool. Bien que Merbarki *et al*. aient montré que l'utilisation de 3 souches de CSM suffisait à induire une amélioration des capacités immunitaires des CSM, les souches rassemblées avaient été sélectionnées en fonction de leurs profils immunitaires[298]. Une telle approche pourrait désavantager l'utilisation du pool ; en effet, pourquoi ne pas conserver uniquement la souche la plus immunomodulatrice comme produit final après amplification et cryoconservation ?

De plus, une telle caractérisation est chronophage et coûteuse sans compter le nombre de cordons à tester pour obtenir « la souche idéale ». Une des perspectives importantes de notre projet serait de constituer deux autres pools de CSM(GW) composés de 7 souches issues de cordons ombilicaux différents afin de pouvoir renforcer nos observations de manière significative.

PARTIE III : La capacité migratoire des CSM préconditionnées est-elle impactée ?

Lorsque les CSM sont utilisées comme MTI et sont injectées par IV dans la circulation sanguine, ces dernières sont rapidement piégées dans les poumons et moins de 3% parviennent à atteindre le site lésionnel. Le contrôle du potentiel de migration des cellules doit alors être pris en compte dans les tests fonctionnels. Dans notre projet, nous avons vérifié si le préconditionnement cellulaire altérait ou non les capacités migratoires des CSM.

La capacité de migration et d'invasion des CSM(GW) préconditionnées a tout d'abord été investiguée. Il s'agissait d'étudier leur capacité à être attirées par un chimioattractant (ici le lysat plaquettaire), ainsi qu'à envahir et dégrader une MEC. Nos résultats ont montré que les cellules étaient capables non seulement de migrer (bien que la migration soit faible) mais aussi de dégrader la MEC dans les tests d'invasion. Même si aucune différence significative entre les préconditionnements n'a été mise en évidence, une légère tendance à l'augmentation de l'invasion a été observée sur les cellules préconditionnées au R848 par rapport à la condition non stimulée. Nous avons également pu montrer la présence des récepteurs de migration CXCR4 et CXCR7 dans le compartiment intracellulaire, ce qui pourrait expliquer la faible migration des CSM. Cette internalisation des récepteurs serait due à leur recyclage ou à leur dégradation au sein d'endosomes. En effet, il a été montré que seulement 4% des récepteurs CXCR4 étaient exprimés à la surface des CSM issues des annexes fœtales. Ces récepteurs étaient localisés au sein d'endosomes précoces, d'endosomes de recyclage et de lysosomes en vue d'une dégradation. Lors de travaux antérieurs au laboratoire, il a été mis en évidence l'impact de l'expansion cellulaire et du nombre de passages sur la localisation de ces deux récepteurs de migration. En effet, les CSM(GW) exprimaient ces récepteurs en surface au passage P1, mais ne les exprimaient plus aux passages P2 et P3.

Certaines études ont également mis en évidence l'impact de l'expansion des CSM sur la localisation des CXCR. Cheng *et al*. ont rapporté que seulement 1% des CSM de rats cultivées jusqu'au passage 4 en culture exprimait des CXCR en surface[273].

Par ailleurs, Wynn *et al*. ont mis en évidence la faible expression de CXCR4 en surface et une forte quantité intracellulaire de ce récepteur au sein de CSM(MO). Les auteurs évoquaient que l'internalisation de CXCR4 avait lieu suite au relargage de cytokines/chimiokines par les CSM, et que sa faible présence en surface n'empêchait pas leur migration[243,34].

En effet, les tests fonctionnels de migration, effectués dans le cadre de notre projet, ont montré que, malgré une expression majoritaire des récepteurs CXCR4 et CXCR7 dans le compartiment intracellulaire, la migration, l'invasion et la motilité des CSM restaient possibles, avec cependant une diminution de ces capacités après préconditionnement des CSM à l'IFNγTNFα.

Les capacités migratoires des CSM pourraient certainement être amplifiées par surexpression des récepteurs CXCR mais également par d'autres préconditionnements que ceux testés dans notre étude. Najafi *et al*. ont mis en évidence que le traitement de CSM(MO) de rats par des chélateurs de fer (déféroxamine) permettait d'augmenter l'expression de CXCR4 mais aussi des métalloprotéases MMP2/9, essentielles à la dégradation de la MEC lors de l'invasion cellulaire[246].

PARTIE IV : Le LPS, le R848, le Poly I :C et l'IFNγTNFα sont-ils uniquement des préconditionnements à visée pro- ou anti-inflammatoire ?

Dans notre étude, il a été observé que les CSM préconditionnées avec du LPS, du R848 ou du Poly I :C maintenaient une activité immunosuppressive dans un contexte inflammatoire. Cela remet en question l'utilisation de ces molécules dans l'induction d'un phénotype « CSM1 » ou « CSM2 » stable, comme décrit dans la publication princeps de Waterman *et al*.[126].

Si certaines études décrivent le LPS ou le Poly I :C comme des molécules permettant d'induire strictement un phénotype pro-inflammatoire ou anti-inflammatoire, beaucoup se contredisent montrant une réalité plus contrastée.

Qu'en est-il du préconditionnement au LPS ?

Concernant le préconditionnement au LPS, classiquement décrit comme inducteur d'un phénotype pro-inflammatoire, Zhang *et al*. ont montré que des exosomes dérivant de CSM(MO) prétraitées avec du LPS diminuaient l'infiltration immunitaire de macrophages M1 et favorisaient la polarisation des macrophages vers un phénotype M2 en inhibant, par l'intermédiaire du miR-222-3p, les voies de signalisation inflammatoires NLRP3 et NF-kB ; le tout conduisant à une réduction de l'inflammation dans un modèle murin[311]. De ce point de vue, Kurte *et al*. ont montré que le LPS utilisé à des temps différents de stimulation pouvait induire des phénotypes immunitaires de CSM(MO) murines opposés. Un préconditionnement au LPS des CSM pendant un temps court induisait un phénotype CSM1 alors qu'une stimulation des CSM pendant un temps long induisait un phénotype CSM2[157]. Lors de l'optimisation du préconditionnement au sein de notre étude, l'utilisation du LPS à 1µg/ml pendant 24h augmentait l'expression de la molécule PD-L1 en comparaison à une utilisation restreinte à 1h.

Qu'en est-il du préconditionnement au R848 ?

Dans notre étude, le préconditionnement au R848 ne permettait pas d'induire des changements comportementaux des CSM(GW) en comparaison au CSM contrôles non stimulées. Cette molécule se comportait de la même manière que le LPS ou le Poly I :C avec un effet moindre.

Cette similarité d'action du R848 et du Poly I :C a été montrée dans la littérature, où un préconditionnement combinant ces 2 molécules générait des cellules dendritiques immunostimulantes capables d'augmenter leurs sécrétions d'IFNα, d'IL-12p70 et l'expression des molécules CD80, CD40 ainsi que du récepteur CCR7. De surcroît, cette combinaison sur un temps long, permettait d'augmenter la prolifération des LT, l'activation des cellules NK et leur sécrétion d'IFNγ, en comparaison aux cellules dendritiques non stimulées[305]. Une autre étude a montré que l'impact du R848 dépendait du statut de différenciation des cellules ; par exemple, le R848 pouvait augmenter l'expression de IDO au sein de monocytes mais non au sein de monocytes programmés pour se différencier en cellules dendritiques [253].

Qu'en est-il du préconditionnement au Poly I :C ?

Concernant le préconditionnement au Poly I :C, de nombreuses études le décrivent comme inducteur d'un phénotype anti-inflammatoire en montrant son efficacité dans les capacités des CSM à réduire la prolifération des LT CD3+ et le taux de LTh17, en comparaison aux CSM prétraitées avec du LPS[299].

Abbaspour *et al*. ont aussi mis en évidence que les exosomes de CSM(GW) traitées avec du Poly I :C exprimaient plus de galectines-1/3/9 et d'HGF, améliorant leur capacité immunosuppressive[302]. Un impact du temps et de la concentration d'exposition au Poly I :C a été mis en évidence sur les capacités immunosuppressives des CSM où une exposition à des doses de 10µg/ml pendant 3 heures était optimal pour augmenter l'expression de marqueurs immunosuppresseurs et diminuer la prolifération des LT[160].

Cependant d'autres études, à l'image de la nôtre, rapportent l'absence d'effet de ce préconditionnement sur les propriétés immunomodulatrices des CSM. Huang *et al*. ont montré que des CSM(CO) traitées avec du Poly I:C présentaient des capacités d'inhibition de la prolifération des LT comparables aux CSM non traitées ainsi qu'une altération de leurs facteurs immunorégulateurs. Ces auteurs soulignaient leur inefficacité thérapeutique dans un modèle murin de lupus[303]. Zhao *et al*. ont, quant à eux, montré des résultats similaires à ceux obtenus dans notre projet mettant en avant le rôle ambigu du Poly I:C. Des CSM(CO) préconditionnées avec du Poly I :C présentaient une augmentation de leur taux d'ARNm COX-2, et de l'enzyme IDO mais aussi une augmentation des ARNm IL-6 et IL-8[127].

Une action semblable entre les ligands des TLR ?

Si certaines études opposent les effets du LPS et du Poly I :C sur l'induction d'un phénotype immunitaire des CSM, d'autres au contraire montrent une similarité d'action comme inducteur des propriétés immunosuppressives des CSM. En effet, la stimulation des CSM avec les ligands des TLR 3 et 4 augmentait l'expression de IDO et ce de manière significative par rapport aux CSM non traitées[308] et favorisait l'induction de LT régulateurs *via* la voie de signalisation Notch[310]. Une troisième catégorie de publications annonce des effets similaires du LPS et du Poly I :C sur l'induction d'actions pro-inflammatoires. Liotta *et al*. ont, en effet, montré que le préconditionnement de CSM(MO) au LPS ou au Poly I :C conduisait, après activation respective du TLR4 et du TLR3, à restaurer la prolifération des LT CD4+ en comparaison au R848 (ligand des TLR7/8)[128]. Dans notre étude, la similarité d'action des ligands des TLR ressort notamment au niveau de l'expression des marqueurs, des microARN, de la sécrétion des exosomes ou encore au niveau fonctionnel sur le transfert mitochondrial.

Au-delà d'une similarité d'action, les TLR4 et les TLR3 agiraient de manière conjointe dans des réponses multiples aux pathogènes bactériens et viraux. Pan *et al*. ont montré par l'intermédiaire des monocytes la reconnaissance conjointe d'antigènes de nature différente.

En effet, malgré la très faible expression du TLR3 par les monocytes, une augmentation de la production de TNFα, d'IFNγ, et de NF-kB était visible après traitement des monocytes au LPS ou au LPS + Poly I:C. Cela soulignait que la voie de signalisation TLR4/MyD88/IRAK/TRAF5/NF-kB, déclenchée par le LPS, était requise pour induire une expression conséquente du TLR3 chez les monocytes humains, conduisant à l'activation de gènes antiviraux. Autrement dit, il a été montré que le LPS bactérien pouvait induire une réponse antivirale par l'intermédiaire d'une augmentation du TLR3 chez des monocytes humains dans le cas d'une infection virale[312].

Monguió-Tortajada *et al*. ont souligné que les agonistes des TLR interagissaient entre eux afin de moduler leurs réponses inflammatoires respectives et que cette synergie avait pour objectif d'amplifier la réponse immunitaire ou de favoriser une hétéro-tolérance limitant l'inflammation. Pour cela, des monocytes avaient été stimulés pendant 24h avec du LPS, du Poly I :C ou du R848 puis restimulés par de faibles doses de LPS. Les monocytes stimulés au Poly I :C exprimaient davantage la molécule CD86 et déclenchaient, après stimulation secondaire au LPS, une réponse inflammatoire élevée, associée à une baisse de leur viabilité, qui n'était pas visible chez ces mêmes monocytes initialement préconditionnés au LPS ou au R848. Ainsi l'activation préalable du TLR3, suivie d'une stimulation par de faibles concentrations de LPS induisait une production élevée de TNFα et d'IL-6 et rendait les monocytes sensibles à l'apoptose[314].

Ces études menées sur l'activation des TLR pourraient expliquer, dans notre étude, l'effet modéré et similaire du LPS, du R848 et du Poly I:C.

Que peut-on en conclure sur la stimulation des TLR ?

L'une des difficultés à comparer les études entre elles réside dans la diversité des temps et des concentrations de préconditionnements utilisés, pouvant varier de 0,02ng/ml à 50µg/ml pendant 1h jusqu'à 48h. Cela représente, d'un point de vue moléculaire, des différences non négligeables jouant un rôle sur le comportement immunitaire des CSM.

Certaines études remettent cependant en question la présence et/ou l'efficacité des TLR au sein de certains tissus. Peu d'études se sont intéressées à l'expression des TLR au sein des CSM(GW), cependant il a été montré une faible voire une absence d'expression du TLR4 ainsi qu'une non-fonctionnalité du TLR3 au niveau de ces cellules, les qualifiant de résistantes aux ligands des TLR et de moins réactives à un contexte infectieux bactérien ou viral[343,345,342]. Si cela pourrait expliquer l'absence d'efficacité de certains préconditionnements dans notre étude ; d'autres études ont montré (i) une expression de ces TLR bien que relativement faible (ii) ainsi qu'une augmentation de l'expression du TLR4 après stimulation des CSM(GW) au LPS ou après coculture avec des neutrophiles, constituant un déclencheur inflammatoire [343,344,141,345,309].

Lors de notre analyse des TLR, il avait été montré, certes, une faible expression des TLR4, bien qu'amplifiée par une méthode de décrochage cellulaire mécanique, mais des différences sécrétoires avaient été notées entre CSM non stimulées et CSM préconditionnées au LPS, montrant une implication de ce récepteur.

Qu'en est-il du préconditionnement à l'IFNγTNFα ?

Au sein de notre étude, le préconditionnement IFNγTNFα s'est révélé comme celui impactant le plus le comportement des CSM(GW) en comparaison à la condition non stimulée ou aux autres préconditionnements testés.

Si le choix de l'IFNγTNFα était basé sur la littérature et des travaux antérieurs au laboratoire afin d'induire un puissant phénotype immunosuppresseur au sein des CSM, notre étude a montré que les CSM préconditionnées à l'IFNγTNFα exerçaient des actions à la fois anti-inflammatoires et pro-inflammatoires.

En effet, elles présentaient, à la fois, une expression augmentée de la molécule inhibitrice PD-L1, mais aussi de la molécule de costimulation CD40, du miR-155 pro-inflammatoire ainsi que de la sécrétion de cytokines/chimiokines pro-inflammatoires (IL-6, IL8, CCL3 et RANTES), et ce en comparaison aux autres conditions.

Cette double expression de facteurs immunomodulateurs et de molécules immunostimulantes a été décrite dans la littérature où des CSM d'amygdale préconditionnées avec de l'IFNγ et du TNFα exprimaient fortement l'enzyme IDO et la molécule CD40[318]. D'un point de vue fonctionnel, notre étude a montré que les CSM préconditionnées avec de l'IFNγ et du TNFα présentaient une capacité d'inhibition de la prolifération des LT CD3+, des LT CD4+ et des LT CD8+ augmentée en comparaison à l'ensemble des autres conditions d'étude. De surcroît, l'étude mécanistique a mis en évidence une surexpression de la protéine HSP27 dans la condition IFNγTNFα. Si le rôle immunitaire d'HSP27, protéine de stress, est peu décrit, son activité anti-apoptotique a été rapportée par Son *et al*.[319]. Une autre étude a souligné que le déclenchement d'une voie de signalisation inflammatoire comme NF-kB, par l'intermédiaire d'HSP27, entretenait les capacités anti-apoptotiques et angiogéniques des cellules[326]. De plus, il a été décrit que la sécrétion d'HSP27 dans le milieu extracellulaire pouvait déclencher, par fixation à des TLR ou à des molécules telles que CD40, une voie de signalisation inflammatoire NF-kB au niveau des macrophages, mettant en avant une activité pro-inflammatoire de cette protéine. HSP27 relarguée pourrait être perçue comme un signal de danger (type DAMP) capable d'activer des CPA et d'initier une réponse immunitaire[320,321].

L'expression augmentée de la protéine HSP27 au sein des CSM préconditionnées à l'IFNγTNFα, pourrait témoigner d'une action pro-inflammatoire de ces cellules dans le microenvironnement.

Par ailleurs, les CSM préconditionnées avec de l'IFNγTNFα augmentaient leur transfert mitochondrial envers les CMN et les LT CD3+, avec une tendance plus visible au sein du pool de CSM(GW). De plus, ce transfert était négativement corrélé à la prolifération des sous-populations étudiées mettant en évidence que le préconditionnement IFNγTNFα augmentait les capacités immunosuppressives des CSM.

Cependant, lorsque les CSM préconditionnées à l'IFNγTNFα se trouvaient dans un contexte immunosuppresseur, celles-ci diminuaient fortement leur capacité immunosuppressive envers les LT, mettant en avant l'importance du contexte inflammatoire dans leur réponse ainsi que leur capacité à répondre à un contexte anergique délétère.

Ce comportement bivalent des CSM préconditionnées à l'IFNγTNFα est relativement peu décrit dans la littérature car elles sont utilisées en tant que « CSM2 », et l'analyse de marqueurs pro-inflammatoires n'est donc quasiment pas réalisée.

Cependant, certaines études ont montré indirectement cette bivalence. Kim *et al*. ont mis en évidence qu'un préconditionnement des CSM à l'IFNγ augmentait l'expression de l'enzyme IDO, directement impliquée dans les propriétés immunosuppressives des CSM, tout en augmentant la sécrétion de chimiokines pro-inflammatoires (CXCL9, CXCL10, CCL8) essentielles au recrutement leucocytaire et à l'induction d'une réponse immunitaire[327]. De même, Jammes *et al*. ont mis en évidence que le préconditionnement à l'IFNγ augmentait le taux d'ARNm IDO mais aussi la sécrétion de la chimiokine CXCL10 ; et que la combinaison de l'IFNγ avec de l'IL-1β entraînait une augmentation de l'expression de la molécule de costimulation CD40[322].

In vivo, dans un modèle murin de colite, l'injection de CSM stimulées par de l'IFNγTNFα, s'avérait délétère en raison d'une sécrétion élevée de facteurs pro-inflammatoires (IL-17, IL-8, IL-12…)[341]. De même, un préconditionnement fortement inducteur des capacités immunomodulatrices des CSM, à savoir une culture en hypoxie, couplé à une stimulation avec de l'IL-1β, de l'IFNγ et du TNFα, permettait aux CSM(CO) d'inhiber la cytotoxicité des cellules NK mais aussi d'augmenter le taux de CMN et de cellules NK dans le sang périphérique, afin d'exercer une action immunomodulatrice modérée[151]. Li *et al*. ont également souligné que des CSM(CO) préconditionnées avec de l'IFNγTNFα augmentaient la sécrétion de cytokines/chimiokines telles que l'IL-6 et CCL2, conduisant à une augmentation de la polarisation des macrophages vers un phénotype M2 anti-inflammatoire mais amélioraient également les capacités phagocytaires des macrophages[338].

Un autre paramètre illustrant la bivalence de ce préconditionnement réside dans la capacité des CSM après stimulation à l'IFNγ à augmenter l'expression des molécules du CMH à leur surface[227]. Shen *et al*. ont mis en évidence qu'une exposition à des doses croissantes d'IFNγ (2-200ng/ml) conduisait à une expression accrue des molécules du CMH de classe II à la surface des CSM, à l'origine d'une augmentation de leur immunogénicité[339]. Chan *et al*. ont aussi mis en évidence qu'une exposition de CSM(MO) à une forte concentration en IFNγ pouvait déclencher l'activation et la prolifération de LT allogéniques dans des MLR[340]. Une communication de l'ISCT a mis en évidence que l'IFNγ, décrit comme une molécule clé dans l'induction de fonctions immunosuppressives chez les CSM, permettait aux CSM de conserver un comportement de cellules présentatrices d'antigènes capables de présentations croisées *via* leur expression des molécules de classe I et de classe II du CMH. Aux concentrations et temps de préconditionnement des CSM à l'IFNγTNFα, utilisés dans notre étude, l'augmentation de la molécule HLA-DR/DP/DQ, n'a pas été observée.

Les auteurs suggéraient ainsi d'utiliser un préconditionnement à l'IFNγ, suffisant pour induire une fonctionnalité immunitaire, couplé à du TNFα pour augmenter l'efficacité de ce préconditionnement tout en mimant un contexte pathophysiologique plus stable que l'activation des TLR, dépendante du ligand utilisé, de la cinétique et de la force de stimulation. Cette recommandation souligne que les caractéristiques immunologiques observables au niveau des CSM après préconditionnement, dépendent de leur état d'activation au moment de l'interaction avec des cellules effectrices[114].

Dans notre étude, les CSM préconditionnées ou non maintenaient une plasticité immunitaire dictée par le contexte inflammatoire dans lequel elles se trouvaient. Cette bivalence immunitaire a été évoquée dans une étude où les auteurs injectaient dans un modèle félin d'infections sévères aux coronavirus, des CSM(TA). Ces cellules permettaient de réduire l'exhaustion des LT CD8+ et d'augmenter le taux de LT mémoires favorisant ainsi le rétablissement immunitaire, mais aussi d'augmenter le taux de LT régulateurs et de diminuer les sous-populations de lymphocytes hyperprolifératifs[316]. De plus, il a été montré que les capacités immunosuppressives des CSM étaient inhibées lors de l'utilisation d'immunosuppresseurs tels que la cyclosporine A ou la dexaméthasone, par inhibition de l'expression de l'enzyme IDO, ce qui permettait de favoriser le processus inflammatoire par une infiltration des LT CD4+ IFNγ+ et des LT CD4+ IL-17A+ [329, 323,117].

Il a été décrit que le lien entre les CSM et le microenvironnement inflammatoire était bidirectionnel, avec une influence provenant des deux côtés. La dynamique du contexte inflammatoire pourrait être à l'origine des propriétés immunorégulatrices instables des CSM, capables d'exercer une immunosuppression plus ou moins forte ou une immunostimulation. Pour cela, Wang *et al*. ont stimulé des CSM(MO) murines par des quantités variables d'IFNγTNFα afin de reproduire une variation du taux de cytokines pro-inflammatoires dans un contexte physiopathologique. Les CSM soumises à une forte concentration d'IFNγTNFα induisaient une immunosuppression des LT alors que les CSM soumises à une très faible concentration d'IFNγTNFα induisaient une activation et une prolifération des LT[118]. L'effet immunostimulant des CSM survenait lorsque le niveau de cytokines pro-inflammatoires était insuffisant pour induire une production adéquate de l'enzyme IDO.

En résumé, les CSM seraient à la fois capables de promouvoir une réponse immunitaire mais aussi de l'inhiber en fonction de la dynamique de l'inflammation, du degré d'activation du système immunitaire, du type de cytokines inflammatoires et des effets de molécules immunosuppressives dans l'environnement[117].

Le maintien de cette plasticité permettrait aux CSM de conserver une capacité de réaction aux contextes variables de certaines pathologies, comme le sepsis et représenterait un avantage en thérapie cellulaire, rendant l'injection de ces CSM fonctionnalisées plus sécuritaire.

PARTIE V : Peut-on encore parler de classification CSM1/CSM2 ?

A l'issue de ce projet, il a été observé que le préconditionnement moléculaire ne permettait pas une induction stricte des phénotypes CSM1 et CSM2 et que le contexte inflammatoire était le facteur déterminant de leurs actions ; le meilleur exemple résidant dans les CSM préconditionnées avec de l'IFNγTNFα conservant des actions pro- et anti-inflammatoires notables, en fonction du contexte inflammatoire. L'efficacité d'un préconditionnement cellulaire peut être jugée comme significative si cette stimulation confère aux cellules préconditionnées une capacité amplifiée par rapport aux CSM non stimulées. Si, dans ce projet, le préconditionnement à l'IFNγTNFα apportait une modification significative du comportement des CSM par rapport aux CSM contrôles, ces modifications n'étaient pas tranchées en faveur d'un profil CSM1 ou CSM2. Le maintien d'une bivalence phénotypique remet donc en question la classification initiale des CSM en phénotypes CSM1 et CSM2.

Les CSM peuvent être comparées à un autre type de cellules plastiques, elles aussi classifiées en profils pro- ou anti-inflammatoires, à savoir les macrophages, subdivisés en macrophages M1 pro-inflammatoires et en macrophages M2 anti-inflammatoires, et dont la polarisation est médiée par les stimuli inflammatoires qu'ils côtoient. Les macrophages M1 sont décrits comme des macrophages au pouvoir antimicrobien et antitumoral responsables de nombreux dommages tissulaires. Ils relarguent des cytokines pro-inflammatoires avec une large proportion d'IFNγ et de TNFα et sont capables de supprimer les neutrophiles et de favoriser la réponse LTh1. Les macrophages M2 vont, quant à eux, promouvoir une tolérance immunitaire, une réponse LTh2 et sécréter des cytokines anti-inflammatoires comme le TGF-β[330]. Si les macrophages M1/M2 peuvent ainsi être comparés aux CSM1/CSM2, une différence majeure persiste.

En effet, contrairement aux CSM, des biomarqueurs ont été identifiés dans les sous-types M1/M2. En effet, les macrophages M1 CD80+/CD86+/HLA-DR+ et les macrophages M2 CD163+/CD206+/Arginase1+, respectivement issus d'une stimulation au LPS +/- IFNγ ou d'une stimulation à l'IL-4, constituent une classification plus robuste[324]. Cependant, il est important de garder en mémoire que lors de la première description des deux phénotypes M1/M2 par Mills *et al*. au début des années 2000, les auteurs avaient souligné l'existence de 2 profils métaboliquement distincts, capables d'induire des réponses inflammatoires opposées, qu'ils nommèrent respectivement macrophages M1 et M2. Mais ils rappelaient que cette classification était une sur-simplification de ce qu'il existait en réalité, impliquant une complexité sous-jacente. A la fin de leur étude, les auteurs ne proposaient pas une classification distincte stricte des macrophages M1/M2, comme au sein des clones lymphocytaires helper 1 et 2 (LTh1 et LTh2) et suggéraient l'existence d'un continuum de phénotypes entre ces deux profils M1/M2[325]. Cela pourrait s'appliquer aux CSM et validerait l'hypothèse de CSM au comportement bivalent.

Récemment, différentes sous-populations ont été identifiées au sein des CSM montrant que la classification des CSM ne se contraint pas uniquement aux CSM1/CSM2 et que d'autres sous-populations existent. Il a été démontré, grâce à du « mapping » ou cartographie cellulaire de CSM(MO) par séquençage d'ARN cellule par cellule (« single-cell »), que les CSM pouvaient être classifiées en 3 sous-populations majeures, nommées respectivement « sous-population à haut potentiel d'auto-renouvellement », « sous-population fonctionnelle » et « sous-population proliférative », exprimant des gènes spécifiques leur permettant d'amplifier une capacité clé des CSM[332]. Une autre analyse « single-cell » par transcriptomique a permis d'identifier 4 sous-populations de CSM(GW) définies comme « des CSM prolifératives », « des CSM de soutien de la niche », « des CSM reliées au métabolisme cellulaire », et « des CSM bio-fonctionnelles », toutes ayant des capacités spécifiques[333].

Wang *et al*. ont mis en évidence, par séquençage en « single-cell » de l'ARN et analyse t-SNE, l'existence de plusieurs clusters exprimant des gènes spécifiques pouvant être qualifiés de marqueurs.

Zhou *et al*. ont également identifié des sous-populations au sein de CSM(CO) préconditionnées. La technologie 10x genomics Sc-RNA-seq a été utilisée pour comprendre l'impact de l'IL-27 sur la différenciation des sous-populations de CSM, mettant en évidence, après stimulation, une augmentation de la sous-population IDO+ identifiée. Au sein de 2 sous- populations, « IDO - » et « IDO+ » identifiées, la sous-population « IDO+ » présentait une régulation positive des gènes associés à la différenciation et à la prolifération alors que la sous-population « IDO - » présentait une expression augmentée de gènes impliqués dans l'auto-renouvellement.

La stimulation des CSM à l'IL-27 était responsable d'une augmentation des protéines impliquées dans les capacités immunitaires des CSM au sein de la sous-population « IDO+ ». Après stimulation des CSM à l'IL-27, la proportion du cluster nommé « souche IDO+ » était augmentée. Au sein de cette sous-population « IDO+ », 7 clusters différents ont été identifiés montrant la complexité à identifier l'ensemble des sous-populations existantes de CSM[148].

Cette hétérogénéité fonctionnelle décrite au sein des CSM préconditionnées est cohérente avec les conclusions de notre projet. De surcroît, il a été spécifié que l'hétérogénéité post-préconditionnement de CSM(GW) par de l'IFNγ, du TNFα, de l'IL-4 ou de l'IL-6 résidait plutôt dans l'expression des marqueurs de surface plutôt qu'au sein du transcriptome des CSM. Hu *et al*. ont montré que le préconditionnement des CSM avec de l'IFNγ ou du TNFα diminuait l'hétérogénéité transcriptomique des CSM et permettait l'obtention de seulement 2 sous-populations de CSM sur les 3 détectées au niveau de CSM non stimulées[313].

Cependant, ces études transcriptomiques ne se rejoignent pas forcément sur la manière de classifier ces sous-populations, rendant complexe leur interprétation. C'est pourquoi l'identification de biomarqueurs au sein de ces sous-populations reste essentielle.

Certaines études ont commencé à décrire des marqueurs potentiels de certaines sous-populations de CSM. Une étude basée sur l'analyse de séquençage d'ARN en « single-cell » au sein de CSM(GW) a mis en évidence des différences d'expressions géniques, à l'origine d'une séparation fonctionnelle des CSM en sous-populations, présentant des capacités de prolifération, d'auto-renouvellement et de réponse à l'inflammation variables. De manière prometteuse les auteurs ont identifié des CSM(GW) CD142+ avec une meilleure capacité de réparation tissulaire et des CSM(GW) CD142- plus prolifératives[336].

Zhang *et al*. ont montré par séquençage d'ARN en « single-cell » une représentation en clusters et en t-SNE de sous-populations de CSM(CO) après expansion *in vitro*. Les CSM avaient été classées en 3 groupes, les CSM du « groupe 1 » avec de fortes capacités prolifératives, les CSM du « groupe 2 » avec des capacités d'adhérence cellulaire et de motilité cellulaire et enfin les CSM du « groupe 3 » impliquées dans la différenciation des CSM. Les auteurs ont proposé un marqueur de surface permettant d'isoler les CSM du « groupe 1 » fortement prolifératives, à savoir le récepteur TNFRSF12A. Cette étude suggérait l'existence de sous-populations intrinsèques, au sein des CSM(CO), présentant des marqueurs de surface spécifiques[335,337,334].

La cartographie des CSM, par les techniques récentes d'analyses transcriptomiques, permettra d'identifier plusieurs sous-populations au sein de cette population très hétérogène. La classification, en termes de marqueurs et/ou de capacités fonctionnelles, affinerait la définition de ces cellules et pourrait également permettre d'envisager une purification des sous-populations d'intérêt pour une application en thérapie cellulaire plus efficace et plus ciblée.

Bien que les CSM « naïves » soient décrites comme hautement plastiques et capables de s'adapter à leur environnement inflammatoire, le préconditionnement cellulaire serait un moyen de guider temporairement les CSM vers une sous-population présentant des capacités d'intérêts amplifiées.

Conclusion et perspectives

Ce projet a permis d'éclaircir la notion de classification des CSM en sous-phénotypes CSM1 et CSM2. En réalité, le préconditionnement moléculaire appliqué aux CSM en culture, afin de les fonctionnaliser et de les orienter vers des actions pro- ou anti-inflammatoires d'intérêts, ne permet pas une induction d'un comportement strictement immunostimulant ou strictement immunosuppresseur. Les CSM(GW) préconditionnées à l'aide de LPS, de R848, de Poly I :C ou d'IFNγTNFα, à des temps et des concentrations de stimulation optimisés, conservaient leur plasticité *in vitro*, comme démontré par le préconditionnement, hautement immunosuppresseur, à l'IFNγTNFα permettant aussi une action immunomodulatrice modérée ou immunostimulante des CSM *in vitro*. Le maintien de cette plasticité permettrait de sécuriser leur utilisation dans des indications où inflammation et immunoparalysie cohabitent, à l'instar du sepsis, du choc septique ou encore des infections sévères comme au SARS-CoV2.

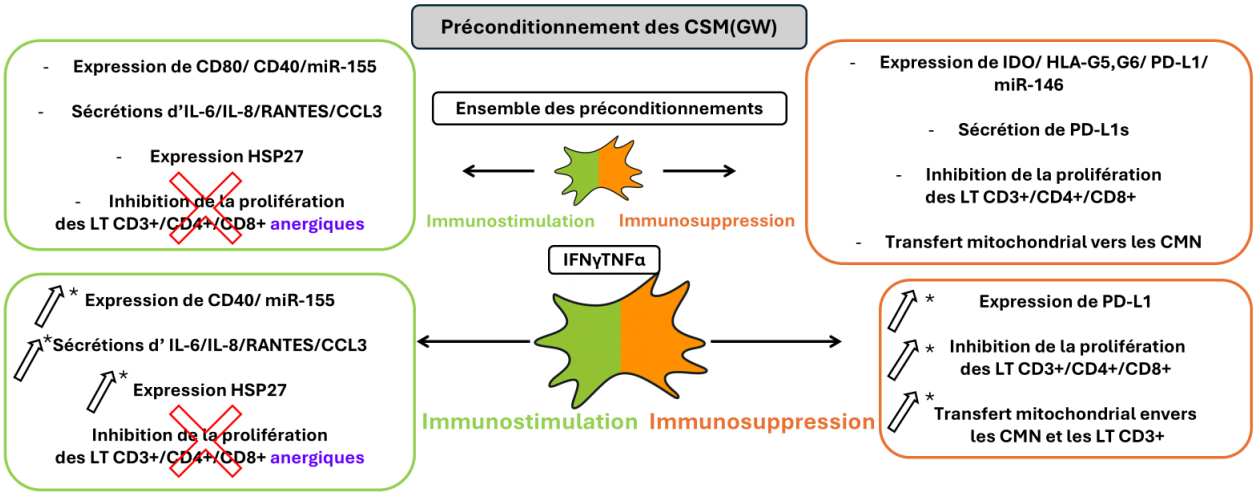


Figure 50 : Effets des préconditionnements sur le phénotype immunitaire des CSM : une conclusion phénotypique et fonctionnelle de la caractérisation post-préconditionnement.

En perspectives de ce projet, plusieurs approches pourraient être menées pour :

- Confirmer/renforcer l'impact du préconditionnement moléculaire.
- Identifier des biomarqueurs potentiels de sous-populations de CSM(GW) préconditionnées.
- Tester l'effet des CSM(GW) préconditionnées dans un essai pré-clinique murin.

Plusieurs techniques pourraient être envisagées afin de stabiliser l'effet du préconditionnement ou d'améliorer son efficacité.

En effet, si l'objectif était de rendre plus ciblée l'action des CSM envers des populations immunitaires, il pourrait être envisagé de réaliser des CAR-CSM capables de cibler spécifiquement un marqueur de costimulation comme CD28/CD80/CD86, afin d'engendrer une immunostimulation amplifiée envers des cellules cibles, ou un marqueur immunomodulateur comme PD1 afin d'entraîner une immunosuppression amplifiée des cellules exprimant ce récepteur des points de contrôles inhibiteurs. Si la stratégie CAR-CSM est extrêmement peu décrite dans la littérature, l'efficacité des CAR-T a déjà été prouvée[233] au sein de tumeurs liquides avec notamment une expertise au sein de notre équipe. Récemment, Yang *et al* ont élaboré des CAR-CSM, intégrant des nanoparticules, capables de cibler spécifiquement CLL-1, un marqueur des leucémies aiguës myéloïdes avec une efficacité démontrée sur l'inhibition de la croissance tumorale et l'induction de macrophages M1 dirigés contre la tumeur[349].

De plus, l'efficacité de CAR-Macrophages murins a aussi été mise en évidence, montrant que les CAR-Macrophages, après transduction, se polarisaient vers un profil pro-inflammatoire M1, transformant ainsi le microenvironnement tumoral immunologiquement non permissif vers un microenvironnement immunologiquement actif.

Les CAR-Macrophages HER2 permettaient de diminuer le taux de macrophages associés aux tumeurs, tout en augmentant le taux de cellules dendritiques, l'infiltration de LT CD4+/ de LT CD8+/ de cellules NK et l'activation de LT helper. Une combinaison testée, mêlant CAR-Macrophage et anticorps anti- PD1, permettait de diminuer le volume de la tumeur et favorisait la survie de modèles murins tumoraux[328].

Un autre moyen serait de stabiliser l'effet du préconditionnement cellulaire par transfection plasmique, soit avec des gènes codant pour les molécules de préconditionnement étudiées, soit par des gènes codant des acteurs des voies de signalisation activées en aval du préconditionnement moléculaire (facteur de transcription NF-kB ou protéine JAK, dans notre étude), soit par la surexpression vectorielle des TLR ou des récepteurs de type I/II à l'IFNγ et au TNFα , le tout suivi d'une stimulation par le LPS, le R848, le Poly I :C ou l'IFNγTNFα. Cela serait plus représentatif de la réalité du microenvironnement inflammatoire et permettrait ainsi d'augmenter le taux d'expression des récepteurs exprimés par les CSM. Cela faciliterait l'accessibilité des molécules de préconditionnement à la surface des CSM ou permettrait aux CSM de devenir plus sensibles au préconditionnement moléculaire.

En effet, plusieurs études ont montré l'efficacité du processus de transduction ou de transfection au niveau des CSM avec une amélioration de leurs capacités immunitaires comme décrit dans le Tableau 11.

Tableau 11 : Transductions ou transfections moléculaires appliquées aux CSM

Source de CSM	Processus de transduction/transfection utilisé	Principaux effets	Références bibliographiques
CSM(MO) murines	Vecteur de type adénovirus encodant le gène Sirt1 pour que les CSM surexpriment la protéine Sirt1	Augmentation du taux de cytokines pro-inflammatoires + du taux de LT CD8+ Augmentation des capacités pro-inflammatoires des CSM Diminution de l'expression de iNOS (=IDO chez l'humain) Diminution de la progression tumorale dans un modèle murin de tumeurs hépatiques	163
CSM(CO)	Infection par un lentivirus surexprimant IL-10	VE provenant de ces CSM : diminution du taux de LTh1/LTh17 et augmentation du taux de LT régulateurs Amélioration des scores cliniques et histologiques dans un modèle murin d'uvéite auto-immune	216
CSM(MO) murines	Plasmide surexprimant IDO	Exosomes dérivant de ces CSM : accélération de la prolifération des cellules tubulaires rénales, diminution de l'apoptose, de la fibrose et de la sécrétion de facteurs inflammatoires Induction de la polarisation des M2 et de la production de facteurs anti-inflammatoires, augmentant le processus de réparation dans le modèle murin de lésion rénale aiguë	223
CSM(CO)	Plasmide surexprimant CD73	Exosomes dérivant de ces CSM : diminution des cytokines pro-inflammatoires (TNFα, IL-1β, IL-6) et augmentation des cytokines anti-inflammatoires (IL-10, IL-4) Augmentation de la polarisation des M2 Amélioration de l'inflammation dans un modèle murin de lésions de la moelle épinière, grâce à une réduction des concentrations en ATP extracellulaire, et de l'induction d'une voie A2bR/AMPc/PKA.	226
CSM(MO) murines	Surexpression de PD-L1	Exosomes de ces CSM : augmentation de l'expression de PD1 dans la région pulmonaire inflammatoire dans un modèle murin de pneumonie, conduisant à une diminution de l'inflammation	230
CSM(MO)	Transfection d'un vecteur encodant PD-L1	Exosomes dérivant de ces CSM : augmentation du pourcentage de LT régulateurs et des cytokines anti-inflammatoires (TGF-β, IL-10) Suppression de la prolifération des LT CD4+ Induction d'une tolérance immunitaire dans un modèle murin d'allogreffe	232
CSM (Pulpe dentaire)	Transfection de vecteurs lentiviraux surexprimant TERT et HIF-1α IFNγ (50ng/ml) + TNFα (10ng/ml) + IL-1β (10ng/ml)	Exosomes dérivant de ces CSM : après coculture avec des M1 ou M2 : immunosuppression des CMN activées et diminution de leur adhérence à l'endothélium Favorisent la guérison dans un modèle murin de colite en préservant la longueur du colon, l'architecture de la muqueuse intestinale et en modulant l'infiltration des macrophages M1/M2	235

Dans un second temps, il serait intéressant de mettre en place des techniques de transcriptomique et de protéomique sur cellules isolées (single-cell), afin d'identifier des biomarqueurs potentiels de sous-populations hétérogènes de CSM(GW) après préconditionnement moléculaire.

L'étude de biomarqueurs précoces tels que les microARN, en plein essor de par leur implication dans des actions pro- et anti-inflammatoires au sein des macrophages et des CSM, mériterait d'être amplifiée.

Dans un troisième temps, il sera nécessaire d'évaluer l'efficacité des CSM préconditionnées dans un essai pré-clinique murin. Pour cela, dans le cadre de l'ARN ESSENTIEL et sous la collaboration avec le Pr. Frédéric Pène, un modèle murin de sepsis induit par ligature et ponction du ceacum (CLP) sera réalisé. Une injection précoce, à J1 post-CLP, de CSM non stimulées ou préconditionnées devra être réalisée afin de tester l'efficacité de ces CSM en prévention d'une infection secondaire. Une injection de CSM non stimulées ou préconditionnées de manière plus tardive, à J8 post-CLP et 4h après l'administration de Pseudomonas aeruginosa devra être effectuée. L'efficacité des CSM en tant que MTI sera alors évaluée dans le traitement de l'infection Pseudomonas aeruginosa, considérée comme le second type d'infection nosocomiale lors de pneumosepsis.

Enfin, pour conclure sur les perspectives en lien avec ce projet de recherche, l'établissement de deux autres pools de CSM(GW), eux aussi composés de 7 souches de cordons ombilicaux sera nécessaire afin de pouvoir vérifier de manière significative l'efficacité décrite au sein de notre pool et de n'envisager que l'utilisation de CSM issues de plusieurs cordons ombilicaux cultivées et préconditionnées ensemble, dans le modèle pré-clinique.

Valorisation des travaux scientifiques

Publication scientifique dans un journal à comité de lecture

- Théa Pignot *et al*. Can Mesenchymal Stromal Cells (MSC) be classified either as MSC1 or MSC2 phenotype? Insights from phenotypic and functional characterization. *Stem Cell Research & Therapy*. 2026. Statut : En révision

Communication orale dans un congrès international

- Théa Pignot. Impact of MSC priming: How to obtain pro-inflammatory MSC1? Communication orale, CBID, Shanghai (Chine), 2025.

Communication dans un congrès international avec acte de congrès publié dans un journal international

- Théa Pignot. How does priming influence immune phenotype of umbilical cord MSC? Présentation d'un poster, ISCT, La Nouvelle-Orléans (USA), 2025. Résumé publié dans les actes du congrès, Cytotherapy, 2025, https://doi.org/10.1016/j.jcyt.2025.03.121.

Communications dans des congrès nationaux sans publications d'actes

- Théa Pignot. Priming of MSC from umbilical cords: which molecule, which time for which impact? Présentation d'un poster, 1er symposium international Europe-Chine, Stem Cells and Regenerative Medicine, IRN CeSMeR, Nancy (France), 2024.
- Théa Pignot. Priming of MSC from umbilical cords: which molecule, which time for which impact? Présentation d'un poster, FSSCR, Paris (France), 2024.

Communication à la journée scientifique de l'école doctorale BioSE

- Théa Pignot. Obtention of pro-inflammatory MSC from umbilical cords for cell therapy applications. Journée scientifique de l'école doctorale BioSE, Vandoeuvre-lès-Nancy (France), 2023.

Engagement dans la vie universitaire et mandats de représentation

Mandats de représentation

- Représentante des doctorants au sein du conseil de l'école doctorale BioSE (2023-2025)
- Représentante des doctorants au sein du conseil de laboratoire IMoPA (2024-2026)

Enseignements

- 48 heures équivalents TD d'enseignements pour l'année universitaire 2023-2024
- 48 heures équivalents TD d'enseignements pour l'année universitaire 2024-2025

Travaux dirigés (TD) : Méthodologie du travail universitaire /Anatomie/ Immunomodulation/ Signalisation cellulaire.

Cours Magistraux (CM) : Immunomodulation /Signalisation cellulaire.

(Licence Science pour la Santé, Faculté de Médecine et de Maïeutique, Nancy).

Encadrement d'étudiants stagiaires au laboratoire IMoPA

- Etudiant en 3ème année de Licence (2024)
- Etudiante en 3ème année de Licence et deux étudiants en 1ère année de Master (2025)

Récompense

- Lauréate en seconde place du prix de recherche Wittner 2025

Abréviations :

2-DG : 2-désoxy-D-glucose

ACAN : Aggrecan

ADN : Acide désoxyribonucléique

ALP : Phosphatase alcaline

ALT : Alanine aminotransférase

Alpha MEM : Minimum Essential Medium

AMPc : Adénosine monophosphate cyclique

ANGPTL4 : Angiopoietin-like 4

ANXA1 : Annexine A1

AP-1 : Activator Protein-1

APC : Allophycocyanine

ARG1 : Arginase 1

ARN : Acide ribonucléique

AST : Aspartate aminotransférase

ATP : Adénosine triphosphate

BALB/c : Bagg Albino/c

BCA: Bicinchoninic Acid

BCL2: B-cell lymphoma 2

BCR: B Cell Receptor

BPIFB4: BPI Fold Containing Family B Member 4

BPF : Bonnes pratiques de fabrication

BSA : Bovine Serum Albumin

BUV : Brilliant Ultraviolet

Ca^{2+} : Ion calcium

CAR : Chimeric Antigen Receptor

CD : Cluster de différenciation

CFU-F: Colony Forming Unit-Fibroblast

CLL-1 : C-type lectin-like molecule-1

CLP : Cecal Ligation and Puncture

CMF : Cytométrie en Flux

CMH : Complexe Majeur d'Histocompatibilité

CMN : Cellules mononucléées

CO : Cordon ombilical

COL2A1 : Collagène type II alpha 1

COMP : Cartilage Oligomeric Matrix Protein

COX : Cyclooxygénase

CPA : Cellules Présentatrices d'Antigène

CpG: Cytosine-phosphate-Guanine

CRP: C-Reactive Protein

CS : Cellule Souche

CSA : Cellule Souche Adulte

CSE : Cellule Souche Embryonnaire

CSF : Cellule Souche Fœtale

CSM : Cellule Souche/Stromale Mésenchymateuse

CTGF : Connective Tissue Growth Factor

CTL : Cytotoxic T Lymphocyte

CTLA-4 : Cytotoxic T-Lymphocyte Antigen-4

CTV: CellTrace Violet

CY: Cyanine

DAMP: Damage-Associated Molecular Patterns

DKK1: Dickkopf WNT Signaling Pathway Inhibitor 1

DMSO : Diméthylsulfoxyde

DO : Densité Optique

EAE : Encéphalomyélite auto-immune expérimentale

ECL: Enhanced Chemiluminescence

EDTA : Acide éthylène diamine tétra acétique

ENG: Endoglin

ERK: Extracellular signal-Regulated Kinase

EFS : Etablissement Français du Sang

FGF : Fibroblast Growth Factor

FiO_2 : Fraction inspirée en oxygène

FITC : Fluorescéine isothiocyanate

FOXO1: Forkhead box O1

FOXP3: Forkhead box P3

FSC-A: Forward Scatter Area

GAG: Glycosaminoglycanes

GM-CSF: Granulocyte-Macrophage-Colony-Stimulating Factor

GMP: Good Manufacturing Practice

GRN: Granulin

GROγ: Growth-Regulated Oncogene gamma

GVHD: Graft-versus-Host Disease

GW: Gelée de Wharton

HGF: Hepatocyte Growth Factor

HIF-1α: Hypoxia-Inducible Factor-1 alpha

HLA: Human Leukocyte Antigen

HLA-G: Human Leukocyte Antigen-G

HOMER2: Homer Scaffold Protein 2

HRP: Horseradish Peroxidase

HSP27: Heat Shock Protein 27

HUVEC: Human Umbilical Vein Endothelial Cells

ICAM: Intercellular Adhesion Molecule

IDO: Indoleamine 2,3-dioxygénase

IFNγ: Interféron gamma

IFNGR: Interferon gamma Receptor

IgE: Immunoglobuline E

IKK: Ikappa B Kinase

IkB: Ikappa B

IL : Interleukine

IMF: Intensité Médiane de Fluorescence

iNOS: Inducible Nitric Oxide Synthase

IP_3: Inositol triphosphate

iPS(C): Induced Pluripotent Stem (Cell)

IRAK: Interleukin-1 Receptor-Associated Kinase

IRF: Interferon Regulatory Factor

ITGB1: Integrine beta 1

JAK: Janus Kinase

JNK: c-Jun N-terminal Kinase

KLF4: Kruppel-Like Factor 4

KYN: Kynurénine

LAG3: Lymphocyte Activation Gene 3

LB: Lymphocyte B

LBA: Liquide Broncho-Alvéolaire

LIGHT (TNFSF14): TNF superfamily member 14

LPA : Lésions pulmonaires aiguës

LPS : Lipopolysaccharide

LT : Lymphocyte T

LT A : Lymphocyte T activé

LT NA : Lymphocyte T non activé

LTh: Lymphocyte T helper

L-1MT: 1-methyl-L-Tryptophan

MAPK: Mitogen-Activated Protein Kinase

MCP: Monocyte Chemoattractant Protein

MD-2: Myeloid Differentiation factor-2

MEWS: Modified Early Warning Score

MIF: Macrophage Migration Inhibitory Factor

MIG: Monokine Induced by Gamma interferon

MIP-1β: Macrophage Inflammatory Protein-1 beta

miR: microRNA (microARN)

MLR: Mixed Lymphocyte Reaction

MMP : Matrix Metalloproteinase

MO : Moelle Osseuse

MPO: Myéloperoxydase

MyD88: Myeloid Differentiation Primary Response 88

NaCl : Chlorure de sodium

NEMO: NF-kB Essential Modulator

NET: Neutrophil Extracellular Trap

NEWS: National Early Warning Score

NIK: NF-kB-Inducing Kinase

NLRP3: NLR Family Pyrin Domain Containing 3

NK: Natural Killer

NF-kB: Nuclear Factor-kappa B

NO: Nitric Oxide

NOD: Non-Obese Diabetic (mouse/ souris)

NS: Non stimulé

NTA: Nanoparticle Tracking Analysis

OCT-4: Octamer-binding transcription factor-4

OXPHOS: Oxidative Phosphorylation

p38: MAPK p38

PAMP: Pathogen-Associated Molecular Patterns

PBS: Phosphate Buffered Saline

PCR: Polymerase Chain Reaction

PD/ PD-L1: Programmed Death/ Programmed Death-Ligand 1

PDGFR Beta: Platelet-Derived Growth Factor Receptor Beta

PEG : Polyéthylène glycol

PE : Phycoérythrine

PerCP : Peridinin-Chlorophyll Protein

PGE2 : Prostaglandine E2

PIK3 : Phosphoinositide 3-Kinase

PIICS: Persistent Inflammation, Immunosuppression, and Catabolism Syndrome

PIP_2: Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate

PKA : Protéine Kinase A

PLC : Phospholipase C

PNN: Polynucléaires neutrophiles

Poly(I:C): Polyinosinic-polycytidylic acid

PPARγ: Peroxisome Proliferator-Activated Receptor gamma

PPI: Protein-Protein Interaction

PRR: Pattern Recognition Receptors

PTEN: Phosphatase and Tensin Homolog

R848: Resiquimod

RAF: Proto-oncogene sérine/thréonine kinase

RIPK: Receptor-Interacting Protein Kinase

RIPA: Radio-Immunoprecipitation Assay (Tampon de lyse)

RPMI: Roswell Park Memorial Institute

RUNX2: Runt-related transcription factor-2

SASP: Senescence-Associated Secretory Phenotype

SCF: Stem Cell Factor

SCID: Severe Combined Immunodeficiency

SDF-1: Stromal cell-Derived Factor-1

SDRA : Syndrome de Détresse Respiratoire Aiguë

SDS: Sodium dodecyl sulfate

SIRT1: Sirtuin 1

SOCS: Suppressor Of Cytokine Signaling

SOFA: Sequential Organ Failure Assessment

SOX: SRY-related HMG-box

SPP1: Secreted phosphoprotein 1 (Osteopontin)

Src: Proto-oncogene, non-receptor Tyrosine Kinase

SSC-A: Side Scatter-Area

STAT: Signal Transducer and Activator of Transcription

STC-1 : Stanniocalcin-1

SVF : Sérum de Veau Fœtal

TA: Tissu Adipeux

TAK1: TGF-β Activated Kinase 1

TBK1: TANK-Binding Kinase 1

TBST: Tris-Buffered Saline Tween

TCR: T Cell Receptor

TERT: Telomerase Reverse Transcriptase

TGF-β: Transforming Growth Factor Beta

THBS1: Thrombospondine 1

TIM-3: T-cell Immunoglobulin Mucin-3

TL1A: TNF-like ligand 1A

TLR: Toll-Like Receptor

TNFα: Tumor Necrosis Factor alpha

TNFR: TNF Receptor

TNFSF10: TNF superfamily member 10

TRAIL: TNF Related Apoptosis Inducing Ligand

TRADD: TNFR-Associated Death Domain

TRAF: TNF Receptor-Associated Factor

TRAM: TRIF-Related Adaptor Molecule

TRIF: TIR (Toll/Interleukin-1 Receptor)-domain-containing-adapter-inducing IFN Beta

TRIM29: Tripartite motif-containing protein 29

Tris-HCl : Tris(hydroxyméthyl) aminométhane chlorhydrate

TSG6: TNF-Stimulated Gene 6

t-SNE : t-Distributed Stochastic Neighbour Embedding

TWIST: Twist-related protein

VCAM: Vascular Cell Adhesion Molecule

VE : Vésicule Extracellulaire

VEGF : Vascular Endothelial Growth Factor

VPA : Valproic acid

Références Bibliographiques

1. Tian, Z., Yu, T., Liu, J., Wang, T., and Higuchi, A. (2023). Introduction to stem cells. Prog Mol Biol Transl Sci *199*, 3–32. https://doi.org/10.1016/bs.pmbts.2023.02.012.

2. Zakrzewski, W., Dobrzyński, M., Szymonowicz, M., and Rybak, Z. (2019). Stem cells: past, present, and future. Stem Cell Res Ther *10*, 68. https://doi.org/10.1186/s13287-019-1165-5.

3. Sharma, R. (2016). iPS Cells—The Triumphs and Tribulations. Dent J (Basel) *4*, 19. https://doi.org/10.3390/dj4020019.

4. Masson, E. Les cellules souches mésenchymateuses : des cellules pour la médecine régénérative du futur ? EM-Consulte. https://www.em-consulte.com/article/275307/les-cellules-souches-mesenchymateusesc-des-cellule.

5. Phinney, D.G. (2024). Alexander Friedenstein, Mesenchymal Stem Cells, Shifting Paradigms and Euphemisms. Bioengineering (Basel) *11*, 534. https://doi.org/10.3390/bioengineering11060534.

6. Caplan, A.I. (1991). Mesenchymal stem cells. J Orthop Res *9*, 641–650. https://doi.org/10.1002/jor.1100090504.

7. Horwitz, E.M., Le Blanc, K., Dominici, M., Mueller, I., Slaper-Cortenbach, I., Marini, F.C., Deans, R.J., Krause, D.S., and Keating, A. (2005). Clarification of the nomenclature for MSC: The International Society for Cellular Therapy position statement. Cytotherapy *7*, 393–395. https://doi.org/10.1080/14653240500319234.1. Liu, W.-T., Jing, Y.-Y., Yan, F., Han, Z.-P., Lai, F.-B., Zeng, J.-X., Yu, G.-F., Fan, Q.-M., Li, R., Zhao, Q.-D., et al. (2016). LPS-induced CXCR4-dependent migratory properties and a mesenchymal-like phenotype of colorectal cancer cells. Cell Adh Migr *11*, 13–23. https://doi.org/10.1080/19336918.2015.1134404.

8. Lataillade, J.-J., Grange, P.B. de la, Uzan, G., and Bousse-Kerdilès, M.-C.L. (2010). Les cellules souches ont-elles l'âge de leur niche ? - À la recherche d'un sérum de jouvence.... Med Sci (Paris) *26*, 582–585. https://doi.org/10.1051/medsci/2010266-7582.

9. D'Ippolito, G., Diabira, S., Howard, G.A., Roos, B.A., and Schiller, P.C. (2006). Low oxygen tension inhibits osteogenic differentiation and enhances stemness of human MIAMI cells. Bone *39*, 513–522. https://doi.org/10.1016/j.bone.2006.02.061.

10. Grayson, W.L., Zhao, F., Bunnell, B., and Ma, T. (2007). Hypoxia enhances proliferation and tissue formation of human mesenchymal stem cells. Biochem Biophys Res Commun *358*, 948–953. https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2007.05.054.

11. Marino, L., Castaldi, M.A., Rosamilio, R., Ragni, E., Vitolo, R., Fulgione, C., Castaldi, S.G., Serio, B., Bianco, R., Guida, M., et al. (2019). Mesenchymal Stem Cells from the Wharton's Jelly of the Human Umbilical Cord: Biological Properties and Therapeutic Potential. Int J Stem Cells *12*, 218–226. https://doi.org/10.15283/ijsc18034.

12. Jovic, D., Yu, Y., Wang, D., Wang, K., Li, H., Xu, F., Liu, C., Liu, J., and Luo, Y. (2022). A Brief Overview of Global Trends in MSC-Based Cell Therapy. Stem Cell Rev Rep *18*, 1525–1545. https://doi.org/10.1007/s12015-022-10369-1.

13. Lu, W., and Allickson, J. (2025). Mesenchymal stromal cell therapy: Progress to date and future outlook. Mol Ther *33*, 2679–2688. https://doi.org/10.1016/j.ymthe.2025.02.003.

14. Suresh, S., Venkatesan, V., Thangavel, S., and Marepally, S. (2025). Exploring MSC and HSPC interactions: new frontiers in hematopoiesis and transplant medicine. Stem Cell Res Ther *16*, 640. https://doi.org/10.1186/s13281.

15. Méndez-Ferrer, S., Michurina, T.V., Ferraro, F., Mazloom, A.R., MacArthur, B.D., Lira, S.A., Scadden, D.T., Ma'ayan, A., Enikolopov, G.N., and Frenette, P.S. (2010). Mesenchymal and haematopoietic stem cells form a unique bone marrow niche. Nature *466*, 829–834. https://doi.org/10.1038/nature09262.

16. Pontikoglou, C., Deschaseaux, F., Sensebé, L., and Papadaki, H.A. (2011). Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells: Biological Properties and Their Role in Hematopoiesis and Hematopoietic Stem Cell Transplantation. Stem Cell Rev and Rep *7*, 569–589. https://doi.org/10.1007/s12015-011-9228-8.

17. Murayama, M.A., Shimizu, J., Miyabe, C., Yudo, K., and Miyabe, Y. (2023). Chemokines and chemokine receptors as promising targets in rheumatoid arthritis. Front Immunol *14*, 1100869. https://doi.org/10.3389/fimmu.2023.1100869.

18. Marion, N.W., and Mao, J.J. (2006). Mesenchymal Stem Cells and Tissue Engineering. Methods Enzymol *420*, 339–361. https://doi.org/10.1016/S0076-6879(06)20016-8.

19. Wu, D., Liu, R., Cen, X., Dong, W., Chen, Q., Lin, J., Wang, X., Ling, Y., Mao, R., Sun, H., et al. (2025). Preclinical study of engineering MSCs promoting diabetic wound healing and other inflammatory diseases through M2 polarization. Stem Cell Research & Therapy *16*, 113. https://doi.org/10.1186/s13287-025-04248-y.

20. Li, T., Chan, R.W.S., Li, R.H.W., Ng, E.H.Y., Zhang, S., and Yeung, W.S.B. (2024). Endometrial mesenchymal stromal/stem cells improve regeneration of injured endometrium in mice. Biological Research *57*, 6. https://doi.org/10.1186/s40659-024-00484-3.

21. Fu, X., Liu, G., Halim, A., Ju, Y., Luo, Q., and Song, G. (2019). Mesenchymal Stem Cell Migration and Tissue Repair. Cells *8*. https://doi.org/10.3390/cells8080784.

22. Lapidot, T., Dar, A., and Kollet, O. (2005). How do stem cells find their way home? Blood *106*, 1901–1910. https://doi.org/10.1182/blood-2005-04-1417.

23. Karp, J.M., and Teo, G.S.L. (2009). Mesenchymal Stem Cell Homing: The Devil Is in the Details. Cell Stem Cell *4*, 206–216. https://doi.org/10.1016/j.stem.2009.02.001.

24. Nam, D., Park, A., Dubon, M.J., Yu, J., Kim, W., Son, Y., and Park, K.-S. (2020). Coordinated Regulation of Mesenchymal Stem Cell Migration by Various Chemotactic Stimuli. International Journal of Molecular Sciences *21*, 8561. https://doi.org/10.3390/ijms21228561.

25. Sajjad, U., Ahmed, M., Iqbal, M.Z., Riaz, M., Mustafa, M., Biedermann, T., and Klar, A.S. (2024). Exploring mesenchymal stem cells homing mechanisms and improvement strategies. Stem Cells Transl Med *13*, 1161–1177. https://doi.org/10.1093/stcltm/szae045.

26. Pesaresi, M., Bonilla-Pons, S.A., Sebastian-Perez, R., Di Vicino, U., Alcoverro-Bertran, M., Michael, R., and Cosma, M.P. (2021). The Chemokine Receptors Ccr5 and Cxcr6 Enhance Migration of Mesenchymal Stem Cells into the Degenerating Retina. Mol Ther *29*, 804–821. https://doi.org/10.1016/j.ymthe.2020.10.026.

27. Song, Y., Li, R., Ye, M., Pan, C., Zheng, L., Wang, Z.-W., and Zhu, X. (2022). Differences in chemotaxis of human mesenchymal stem cells and cervical cancer cells. Apoptosis *27*, 840–851. https://doi.org/10.1007/s10495-022-01749-6.

28. Cuesta-Gomez, N., Graham, G.J., and Campbell, J.D.M. (2021). Chemokines and their receptors: predictors of the therapeutic potential of mesenchymal stromal cells. J Transl Med *19*, 156. https://doi.org/10.1186/s12967-021-02822-5.

29. Yang, Y., Li, J., Lei, W., Wang, H., Ni, Y., Liu, Y., Yan, H., Tian, Y., Wang, Z., Yang, Z., et al. (2023). CXCL12-CXCR4/CXCR7 Axis in Cancer: from Mechanisms to Clinical Applications. Int J Biol Sci *19*, 3341–3359. https://doi.org/10.7150/ijbs.82317.

30. Marquez-Curtis, L.A., Gul-Uludag, H., Xu, P., Chen, J., and Janowska-Wieczorek, A. (2013). CXCR4 transfection of cord blood mesenchymal stromal cells with the use of cationic liposome enhances their migration toward stromal cell-derived factor-1. Cytotherapy *15*, 840–849. https://doi.org/10.1016/j.jcyt.2013.02.009.

31. Hernandez, P.A., Gorlin, R.J., Lukens, J.N., Taniuchi, S., Bohinjec, J., Francois, F., Klotman, M.E., and Diaz, G.A. (2003). Mutations in the chemokine receptor gene CXCR4 are associated with WHIM syndrome, a combined immunodeficiency disease. Nat Genet *34*, 70–74. https://doi.org/10.1038/ng1149.

32. O'Hayre, M., Salanga, C.L., Handel, T.M., and Allen, S.J. (2008). Chemokines and cancer: migration, intracellular signalling and intercellular communication in the microenvironment. Biochem J *409*, 635–649. https://doi.org/10.1042/BJ20071493.

33. Hervás-Salcedo, R., Fernández-García, M., Hernando-Rodríguez, M., Suárez-Cabrera, C., Bueren, J.A., and Yáñez, R.M. (2023). Improved efficacy of mesenchymal stromal cells stably expressing CXCR4 and IL-10 in a xenogeneic graft versus host disease mouse model. Front Immunol *14*, 1062086. https://doi.org/10.3389/fimmu.2023.1062086.

34. Bidkhori, H.R., Bahrami, A.R., Farshchian, M., Heirani-tabasi, A., Mirahmadi, M., Hasanzadeh, H., Ahmadiankia, N., Faridhosseini, R., Dastpak, M., Shabgah, A.G., et al. (2021). Mesenchymal Stem/Stromal Cells Overexpressing CXCR4R334X Revealed Enhanced Migration: A Lesson Learned from the Pathogenesis of WHIM Syndrome. Cell Transplant *30*, 09636897211054498. https://doi.org/10.1177/09636897211054498.

35. Xu, L., Li, Y., Sun, H., Li, D., and Hou, T. (2013). Structural basis of the interactions between CXCR4 and CXCL12/SDF-1 revealed by theoretical approaches. Mol. BioSyst. *9*, 2107–2117. https://doi.org/10.1039/C3MB70120D.

36. Ullah, M., Liu, D.D., and Thakor, A.S. (2019). Mesenchymal Stromal Cell Homing: Mechanisms and Strategies for Improvement. iScience *15*, 421–438. https://doi.org/10.1016/j.isci.2019.05.004.

37. Wang, L., Nie, F., Lu, Z., and Chong, Y. (2025). Mechanism underlying the involvement of CXCR4/CXCL12 in diabetic wound healing and prospects for responsive hydrogel-loaded CXCR4 formulations. Front. Pharmacol. *16*. https://doi.org/10.3389/fphar.2025.1561112.

38. Mahmoud, R., Bassiouny, M., Badawy, A., Darwish, A., Yahia, S., and El-Tantawy, N. (2024). Maternal and neonatal factors' effects on wharton's jelly mesenchymal stem cell yield. Sci Rep *14*, 24376. https://doi.org/10.1038/s41598-024-72386-z.

39. Alexeev, V., Donahue, A., Uitto, J., and Igoucheva, O. (2013). Analysis of chemotactic molecules in bone marrow-derived mesenchymal stem cells and the skin: Ccl27-Ccr10 axis as a basis for targeting to cutaneous tissues. Cytotherapy *15*, 171-184.e1. https://doi.org/10.1016/j.jcyt.2012.11.006.

40. Bieńko, K., Leszcz, M., Więckowska, M., Białek, J., Petniak, A., Szymanowski, R., Wilińska, A., Piszcz, B., Krzyżanowski, A., Kwaśniewska, A., et al. (2023). VEGF Expression in Umbilical Cord MSC Depends on the Patient's Health, the Week of Pregnancy in Which the Delivery Took Place, and the Body Weight of the Newborn – Preliminary Report. Stem Cells Cloning *16*, 5–18. https://doi.org/10.2147/SCCAA.S399303.

41. Nishikawa, G., Kawada, K., Nakagawa, J., Toda, K., Ogawa, R., Inamoto, S., Mizuno, R., Itatani, Y., and Sakai, Y. (2019). Bone marrow-derived mesenchymal stem cells promote colorectal cancer progression via CCR5. Cell Death Dis *10*, 264. https://doi.org/10.1038/s41419-019-1508-2.

42. De Becker, A., and Riet, I.V. (2016). Homing and migration of mesenchymal stromal cells: How to improve the efficacy of cell therapy? World J Stem Cells *8*, 73–87. https://doi.org/10.4252/wjsc.v8.i3.73.

43. CXCR3-deficient mesenchymal stem cells fail to infiltrate into the nephritic kidney and do not ameliorate lupus symptoms in MRL.Faslpr mice - J H Lee, H K Lee, H S Kim, JS Kim, A Y Ji, J S Lee, K S Kim, T Y Lee, S C Bae, Y Kim, J T Hong, S B Han, 2018 https://journals.sagepub.com/doi/abs/10.1177/0961203318794871.

44. Mäkelä, T., Takalo, R., Arvola, O., Haapanen, H., Yannopoulos, F., Blanco, R., Ahvenjärvi, L., Kiviluoma, K., Kerkelä, E., Nystedt, J., 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*, 392–402. https://doi.org/10.1016/j.jcyt.2014.12.004.

45. Brooks, A., Futrega, K., Liang, X., Hu, X., Liu, X., Crawford, D.H.G., Doran, M.R., Roberts, M.S., and Wang, H. (2017). Concise Review: Quantitative Detection and Modeling the In Vivo Kinetics of Therapeutic Mesenchymal Stem/Stromal Cells. Stem Cells Transl Med *7*, 78–86. https://doi.org/10.1002/sctm.17-0209.

46. Walczak, P., Zhang, J., Gilad, A.A., Kedziorek, D.A., Ruiz-Cabello, J., Young, R.G., Pittenger, M.F., van Zijl, P.C.M., Huang, J., and Bulte, J.W.M. (2008). Dual-Modality Monitoring of Targeted Intraarterial Delivery of Mesenchymal Stem Cells After Transient Ischemia. Stroke *39*, 1569–1574. https://doi.org/10.1161/STROKEAHA.107.502047.

47. Ji, X., Wang, L., Zhong, Y., Xu, Q., Yan, J., Pan, D., Xu, Y., Chen, C., Wang, J., Wang, G., et al. (2024). Impact of mesenchymal stem cell size and adhesion modulation on in vivo distribution: insights from quantitative PET imaging. Stem Cell Res Ther *15*, 456. https://doi.org/10.1186/s13287-024-04078-4.

48. Lee, R.H., Boregowda, S.V., Shigemoto-Kuroda, T., Bae, E., Haga, C.L., Abbery, C.A., Bayless, K.J., Haskell, A., Gregory, C.A., Ortiz, L.A., et al. TWIST1 and TSG6 are coordinately regulated and function as potency biomarkers in human MSCs. Sci Adv *9*, eadi2387. https://doi.org/10.1126/sciadv.adi2387.

49. Wang, S., Guo, L., Ge, J., Yu, L., Cai, T., Tian, R., Jiang, Y., Zhao, R.C., and Wu, Y. (2015). Excess Integrins Cause Lung Entrapment of Mesenchymal Stem Cells. STEM CELLS *33*, 3315–3326. https://doi.org/10.1002/stem.2087.

50. Takayama, Y., Kusamori, K., Katsurada, Y., Obana, S., Itakura, S., and Nishikawa, M. (2023). Efficient delivery of mesenchymal stem/stromal cells to injured liver by surface PEGylation. Stem Cell Res Ther *14*, 216. https://doi.org/10.1186/s13287-023-03446-w.

51. Garg, A., Khan, S., Luu, N., Nicholas, D.J., Day, V., King, A.L., Fear, J., Lalor, P.F., and Newsome, P.N. (2023). TGFβ1 priming enhances CXCR3-mediated mesenchymal stromal cell engraftment to the liver and enhances anti-inflammatory efficacy. J Cell Mol Med *27*, 864–878. https://doi.org/10.1111/jcmm.17698.

52. Khatri, R., Petry, S.F., and Linn, T. (2021). Intrapancreatic MSC transplantation facilitates pancreatic islet regeneration. Stem Cell Res Ther *12*, 121. https://doi.org/10.1186/s13287-021-02173-4.

53. Piekarska, K., Urban-Wójciuk, Z., Kurkowiak, M., Pelikant-Małecka, I., Schumacher, A., Sakowska, J., Spodnik, J.H., Arcimowicz, Ł., Zielińska, H., Tymoniuk, B., et al. (2022). Mesenchymal stem cells transfer mitochondria to allogeneic Tregs in an HLA-dependent manner improving their immunosuppressive activity. Nat Commun *13*, 856. https://doi.org/10.1038/s41467-022-28338-0.

54. Song, N., Scholtemeijer, M., and Shah, K. (2020). Mesenchymal Stem Cell Immunomodulation: Mechanisms and Therapeutic potential. Trends Pharmacol Sci *41*, 653–664. https://doi.org/10.1016/j.tips.2020.06.009.

55. Xie, Y., Liu, S., Wang, L., Yang, H., Tai, C., Ling, L., Chen, L., Liu, S., and Wang, B. (2021). Individual heterogeneity screened umbilical cord-derived mesenchymal stromal cells with high Treg promotion demonstrate improved recovery of mouse liver fibrosis. Stem Cell Res Ther *12*, 359. https://doi.org/10.1186/s13287-021-02430-6.

56. Tago, Y., Kobayashi, C., Ogura, M., Wada, J., Yamaguchi, S., Yamaguchi, T., Hayashi, M., Nakaishi, T., Kubo, H., and Ueda, Y. (2021). Human amnion-derived mesenchymal stem cells attenuate xenogeneic graft-versus-host disease by preventing T cell activation and proliferation. Sci Rep *11*, 2406. https://doi.org/10.1038/s41598-021-81916-y.

57. Fiori, A., Uhlig, S., Klüter, H., and Bieback, K. (2021). Human Adipose Tissue-Derived Mesenchymal Stromal Cells Inhibit CD4+ T Cell Proliferation and Induce Regulatory T Cells as Well as CD127 Expression on CD4+CD25+ T Cells. Cells *10*, 58. https://doi.org/10.3390/cells10010058.

58. de Witte, S.F.H., Luk, F., Sierra Parraga, J.M., Gargesha, M., Merino, A., Korevaar, S.S., Shankar, A.S., O'Flynn, L., Elliman, S.J., Roy, D., et al. (2018). Immunomodulation By Therapeutic Mesenchymal Stromal Cells (MSC) Is Triggered Through Phagocytosis of MSC By Monocytic Cells. Stem Cells *36*, 602–615. https://doi.org/10.1002/stem.2779.

59. Ramasamy, R., Fazekasova, H., Lam, E.W.-F., Soeiro, I., Lombardi, G., and Dazzi, F. (2007). Mesenchymal stem cells inhibit dendritic cell differentiation and function by preventing entry into the cell cycle. Transplantation *83*, 71–76. https://doi.org/10.1097/01.tp.0000244572.24780.54.

60. Deng, Y., Zhang, Y., Ye, L., Zhang, T., Cheng, J., Chen, G., Zhang, Q., and Yang, Y. (2016). Umbilical Cord-derived Mesenchymal Stem Cells Instruct Monocytes Towards an IL10-producing Phenotype by Secreting IL6 and HGF. Sci Rep *6*, 37566. https://doi.org/10.1038/srep37566.

61. Franquesa, M., Mensah, F.K., Huizinga, R., Strini, T., Boon, L., Lombardo, E., DelaRosa, O., Laman, J.D., Grinyó, J.M., Weimar, W., et al. (2015). Human Adipose Tissue-Derived Mesenchymal Stem Cells Abrogate Plasmablast Formation and Induce Regulatory B Cells Independently of T Helper Cells. Stem Cells *33*, 880–891. https://doi.org/10.1002/stem.1881.

62. Feng, X., Feng, B., Zhou, J., Yang, J., Pan, Q., Yu, J., Shang, D., Li, L., and Cao, H. (2025). Mesenchymal stem cells alleviate mouse liver fibrosis by inhibiting pathogenic function of intrahepatic B cells. Hepatology *81*, 1211–1227. https://doi.org/10.1097/HEP.0000000000000831.

63. Bai, X., Chen, T., Li, Y., Ge, X., Qiu, C., Gou, H., Wei, S., Liu, T., Yang, W., Yang, L., et al. (2023). PD-L1 expression levels in mesenchymal stromal cells predict their therapeutic values for autoimmune hepatitis. Stem Cell Research & Therapy *14*, 370. https://doi.org/10.1186/s13287-023-03594-z.

64. Hazrati, A., Malekpour, K., Khorramdelazad, H., Rajaei, S., and Hashemi, S.M. (2024). Therapeutic and immunomodulatory potentials of mesenchymal stromal/stem cells and immune checkpoints related molecules. Biomark Res *12*, 35. https://doi.org/10.1186/s40364-024-00580-2.

65. Kawada-Horitani, E., Kita, S., Okita, T., Nakamura, Y., Nishida, H., Honma, Y., Fukuda, S., Tsugawa-Shimizu, Y., Kozawa, J., Sakaue, T., et al. (2022). Human adipose-derived mesenchymal stem cells prevent type 1 diabetes induced by immune checkpoint blockade. Diabetologia *65*, 1185–1197. https://doi.org/10.1007/s00125-022-05708-3.

66. Dai, F., Zhang, F., Sun, D., Zhang, Z.H., Dong, S.W., and Xu, J.Z. (2015). CTLA4 enhances the osteogenic differentiation of allogeneic human mesenchymal stem cells in a model of immune activation. Braz J Med Biol Res *48*, 629–636. https://doi.org/10.1590/1414-431X20154209.

67. Galaine J, Godet Y, Adotévi O. Pour comprendre : l'activation lymphocytaire T. Bulletin du Cancer [Internet]. 2016 [cité 7 avr 2026];103:S127-31. https://doi.org/10.1016/S0007-4551(16)30369-1.

68. Mittal, S.K., Cho, W., Elbasiony, E., Guan, Y., Foulsham, W., and Chauhan, S.K. (2022). Mesenchymal stem cells augment regulatory T cell function via CD80-mediated interactions and promote allograft survival. American Journal of Transplantation *22*, 1564–1577. https://doi.org/10.1111/ajt.17001.

69. Chen, G., Chong, H., Zhang, P., Wen, D., Du, J., Gao, C., Zeng, S., Zeng, L., Deng, J., Zhang, K., et al. (2024). An integrative model with HLA-DR, CD64, and PD-1 for the diagnostic and prognostic evaluation of sepsis. Immun Inflamm Dis *12*, e1138. https://doi.org/10.1002/iid3.1138.

70. Trivedi, P., and Hematti, P. (2008). Derivation and Immunological Characterization of Mesenchymal Stromal Cells from Human Embryonic Stem Cells. Exp Hematol *36*, 350–359. https://doi.org/10.1016/j.exphem.2007.10.007.

71. Machado, C. de V., Telles, P.D. da S., and Nascimento, I.L.O. (2013). Immunological characteristics of mesenchymal stem cells. Rev Bras Hematol Hemoter *35*, 62–67. https://doi.org/10.5581/1516-8484.20130017.

72. Jin, Q.-H., Kim, H.-K., Na, J.-Y., Jin, C., and Seon, J.-K. (2022). Anti-inflammatory effects of mesenchymal stem cell-conditioned media inhibited macrophages activation in vitro. Sci Rep *12*, 4754. https://doi.org/10.1038/s41598-022-08398-4.

73. Davies, L.C., Heldring, N., Kadri, N., and Le Blanc, K. (2017). Mesenchymal Stromal Cell Secretion of Programmed Death-1 Ligands Regulates T Cell Mediated Immunosuppression. Stem Cells *35*, 766–776. https://doi.org/10.1002/stem.2509.

74. Kim, J.-Y., Park, M., Kim, Y.-H., Ryu, K.-H., Lee, K.H., Cho, K.-A., and Woo, S.-Y. (2018). Tonsil-derived mesenchymal stem cells (T-MSCs) prevent Th17-mediated autoimmune response via regulation of the programmed death-1/programmed death ligand-1 (PD-1/PD-L1) pathway. J Tissue Eng Regen Med *12*, e1022–e1033. https://doi.org/10.1002/term.2423.

75. Guo, L., Schurink, B., Roos, E., Nossent, E.J., Duitman, J.W., Vlaar, A.P., van der Valk, P., Vaz, F.M., Yeh, S.-R., Geeraerts, Z., et al. (2022). Indoleamine 2,3-dioxygenase (IDO)-1 and IDO-2 activity and severe course of COVID-19. The Journal of Pathology *256*, 256–261. https://doi.org/10.1002/path.5842.

76. Wang, G., Cao, K., Liu, K., Xue, Y., Roberts, A.I., Li, F., Han, Y., Rabson, A.B., Wang, Y., and Shi, Y. (2018). Kynurenic acid, an IDO metabolite, controls TSG-6-mediated immunosuppression of human mesenchymal stem cells. Cell Death Differ *25*, 1209–1223. https://doi.org/10.1038/s41418-017-0006-2.

77. Lim, J.-Y., Kim, B.-S., Ryu, D.-B., Kim, T.W., Park, G., and Min, C.-K. (2021). The therapeutic efficacy of mesenchymal stromal cells on experimental colitis was improved by the IFN-γ and poly(I:C) priming through promoting the expression of indoleamine 2,3-dioxygenase. Stem Cell Res Ther *12*, 37. https://doi.org/10.1186/s13287-020-02087-7.

78. Wang, J., Liu, Y., Ding, H., Shi, X., and Ren, H. (2021). Mesenchymal stem cell-secreted prostaglandin E2 ameliorates acute liver failure via attenuation of cell death and regulation of macrophage polarization. Stem Cell Res Ther *12*, 15. https://doi.org/10.1186/s13287-020-02070-2.

79. Ortiz-Virumbrales, M., Menta, R., Pérez, L.M., Lucchesi, O., Mancheño-Corvo, P., Avivar-Valderas, Á., Palacios, I., Herrero-Mendez, A., Dalemans, W., de la Rosa, O., et al. (2020). Human adipose mesenchymal stem cells modulate myeloid cells toward an anti-inflammatory and reparative phenotype: role of IL-6 and PGE2. Stem Cell Res Ther *11*, 462. https://doi.org/10.1186/s13287-020-01975-2.

80. Selmani, Z., Naji, A., Gaiffe, E., Obert, L., Tiberghien, P., Rouas-Freiss, N., Carosella, E.D., and Deschaseaux, F. (2009). HLA-G is a crucial immunosuppressive molecule secreted by adult human mesenchymal stem cells. Transplantation *87*, S62-66. https://doi.org/10.1097/TP.0b013e3181a2a4b3.

81. Boura, J.S., Vance, M., Yin, W., Madeira, C., Lobato da Silva, C., Porada, C.D., and Almeida-Porada, G. (2014). Evaluation of gene delivery strategies to efficiently overexpress functional HLA-G on human bone marrow stromal cells. Mol Ther Methods Clin Dev *1*, 14041. https://doi.org/10.1038/mtm.2014.41.

82. Nykänen, A.I., Mariscal, A., Duong, A., Ali, A., Takahagi, A., Bai, X., Zehong, G., Joe, B., Takahashi, M., Chen, M., et al. (2024). Lung Transplant Immunomodulation with Genetically Engineered Mesenchymal Stromal Cells—Therapeutic Window for Interleukin-10. Cells *13*, 859. https://doi.org/10.3390/cells13100859.

83. Lin, T., Pajarinen, J., Nabeshima, A., Lu, L., Nathan, K., Yao, Z., and Goodman, S.B. (2017). Establishment of NF-κB sensing and IL-4 secreting mesenchymal stromal cells as an "on-demand" drug delivery system to modulate inflammation. Cytotherapy *19*, 1025–1034. https://doi.org/10.1016/j.jcyt.2017.06.008.

84. Liu, F., Qiu, H., Xue, M., Zhang, S., Zhang, X., Xu, J., Chen, J., Yang, Y., and Xie, J. (2019). MSC-secreted TGF-β regulates lipopolysaccharide-stimulated macrophage M2-like polarization via the Akt/FoxO1 pathway. Stem Cell Res Ther *10*, 345. https://doi.org/10.1186/s13287-019-1447-y.

85. van Niel, G., D'Angelo, G., and Raposo, G. (2018). Shedding light on the cell biology of extracellular vesicles. Nat Rev Mol Cell Biol *19*, 213–228. https://doi.org/10.1038/nrm.2017.125.

86. Vesiclepedia 2019: a compendium of RNA, proteins, lipids and metabolites in extracellular vesicles | Nucleic Acids Research | Oxford Academic https://academic.oup.com/nar/article/47/D1/D516/5160990?login=false.

87. L. Ramos, T., Sánchez-Abarca, L.I., Muntión, S., Preciado, S., Puig, N., López-Ruano, G., Hernández-Hernández, Á., Redondo, A., Ortega, R., Rodríguez, C., et al. (2016). MSC surface markers (CD44, CD73, and CD90) can identify human MSC-derived extracellular vesicles by conventional flow cytometry. Cell Commun Signal *14*, 2. https://doi.org/10.1186/s12964-015-0124-8.

88. Jung, J.H., Kang, S.A., Park, J.-H., Kim, S.-D., Yu, H.S., Mun, S.J., and Cho, K.-S. (2024). Immunomodulatory Effect of Adipose Stem Cell-Derived Extra-Cellular Vesicles on Cytokine Expression and Regulatory T Cells in Patients with Asthma. Int J Mol Sci *25*, 10524. https://doi.org/10.3390/ijms251910524.

89. Wang, Z., Shahzad, K.A., Li, X., Cai, B., Xu, M., Li, J., and Tan, F. (2024). Immunomodulatory effect of mesenchymal stem cells-derived extracellular vesicles to modulate the regulatory T cells and Th1/Th2 imbalance in peripheral blood mononuclear cells of patients with allergic rhinitis. Scandinavian Journal of Immunology *100*, e13416. https://doi.org/10.1111/sji.13416.

90. dos Santos, C.C., Lopes-Pacheco, M., English, K., Rolandsson Enes, S., Krasnodembskaya, A., and Rocco, P.R.M. (2024). The MSC-EV-microRNAome: A Perspective on Therapeutic Mechanisms of Action in Sepsis and ARDS. Cells *13*, 122. https://doi.org/10.3390/cells13020122.

91. Pei, Z., Cen, J., Zhang, X., Gong, C., Sun, M., Meng, W., Mao, G., Wan, J., Hu, B., He, X., et al. (2023). MiR-146a-5p delivered by hucMSC extracellular vesicles modulates the inflammatory response to sulfur mustard-induced acute lung injury. Stem Cell Res Ther *14*, 149. https://doi.org/10.1186/s13287-023-03375-8.

92. Wang, J., Huang, R., Xu, Q., Zheng, G., Qiu, G., Ge, M., Shu, Q., and Xu, J. (2020). Mesenchymal Stem Cell–Derived Extracellular Vesicles Alleviate Acute Lung Injury Via Transfer of miR-27a-3p*. Critical Care Medicine *48*, e599. https://doi.org/10.1097/CCM.0000000000004315.

93. Yao, M., Cui, B., Zhang, W., Ma, W., Zhao, G., and Xing, L. (2021). Exosomal miR-21 secreted by IL-1β-primed-mesenchymal stem cells induces macrophage M2 polarization and ameliorates sepsis. Life Sciences *264*, 118658. https://doi.org/10.1016/j.lfs.2020.118658.

94. Su, Y., Silva, J.D., Doherty, D., Simpson, D.A., Weiss, D.J., Rolandsson-Enes, S., McAuley, D.F., O'Kane, C.M., Brazil, D.P., and Krasnodembskaya, A.D. (2023). Mesenchymal stromal cells-derived extracellular vesicles reprogramme macrophages in ARDS models through the miR-181a-5p-PTEN-pSTAT5-SOCS1 axis. https://doi.org/10.1136/thoraxjnl-2021-218194.

95. Spees, J.L., Olson, S.D., Whitney, M.J., and Prockop, D.J. (2006). Mitochondrial transfer between cells can rescue aerobic respiration. Proc Natl Acad Sci U S A *103*, 1283–1288. https://doi.org/10.1073/pnas.0510511103.

96. Liu, K., Ji, K., Guo, L., Wu, W., Lu, H., Shan, P., and Yan, C. (2014). Mesenchymal stem cells rescue injured endothelial cells in an in vitro ischemia–reperfusion model via tunneling nanotube like structure-mediated mitochondrial transfer. Microvascular Research *92*, 10–18. https://doi.org/10.1016/j.mvr.2014.01.008.

97. Jackson, M.V., Morrison, T.J., Doherty, D.F., McAuley, D.F., Matthay, M.A., Kissenpfennig, A., O'Kane, C.M., and Krasnodembskaya, A.D. (2016). Mitochondrial Transfer via Tunneling Nanotubes is an Important Mechanism by Which Mesenchymal Stem Cells Enhance Macrophage Phagocytosis in the In Vitro and In Vivo Models of ARDS. Stem Cells *34*, 2210–2223. https://doi.org/10.1002/stem.2372.

98. Brestoff, J.R., Singh, K.K., Aquilano, K., Becker, L.B., Berridge, M.V., Boilard, E., Caicedo, A., Crewe, C., Enríquez, J.A., Gao, J., et al. (2025). Recommendations for mitochondria transfer and transplantation nomenclature and characterization. Nat Metab *7*, 53–67. https://doi.org/10.1038/s42255-024-01200-x.

99. Ribeiro-Rodrigues, T.M., Martins-Marques, T., Morel, S., Kwak, B.R., and Girão, H. (2017). Role of connexin 43 in different forms of intercellular communication – gap junctions, extracellular vesicles and tunnelling nanotubes. J Cell Sci *130*, 3619–3630. https://doi.org/10.1242/jcs.200667.

100. Islam, M.N., Das, S.R., Emin, M.T., Wei, M., Sun, L., Westphalen, K., Rowlands, D.J., Quadri, S.K., Bhattacharya, S., and Bhattacharya, J. (2012). Mitochondrial transfer from bone-marrow–derived stromal cells to pulmonary alveoli protects against acute lung injury. Nat Med *18*, 759–765. https://doi.org/10.1038/nm.2736.

101. Gomzikova, M.O., James, V., and Rizvanov, A.A. (2021). Mitochondria Donation by Mesenchymal Stem Cells: Current Understanding and Mitochondria Transplantation Strategies. Front Cell Dev Biol *9*, 653322. https://doi.org/10.3389/fcell.2021.653322.

102. Wada, K.-I., Hosokawa, K., Ito, Y., and Maeda, M. (2017). Quantitative control of mitochondria transfer between live single cells using a microfluidic device. Biol Open *6*, 1960–1965. https://doi.org/10.1242/bio.024869.

103. Falchi, A.M., Sogos, V., Saba, F., Piras, M., Congiu, T., and Piludu, M. (2013). Astrocytes shed large membrane vesicles that contain mitochondria, lipid droplets and ATP. Histochem Cell Biol *139*, 221–231. https://doi.org/10.1007/s00418-012-1045-x.

104. Morrison, T.J., Jackson, M.V., Cunningham, E.K., Kissenpfennig, A., McAuley, D.F., O'Kane, C.M., and Krasnodembskaya, A.D. (2017). Mesenchymal Stromal Cells Modulate Macrophages in Clinically Relevant Lung Injury Models by Extracellular Vesicle Mitochondrial Transfer. Am J Respir Crit Care Med *196*, 1275–1286. https://doi.org/10.1164/rccm.201701-0170OC.

105. Thomas, M.A., Fahey, M.J., Pugliese, B.R., Irwin, R.M., Antonyak, M.A., and Delco, M.L. (2022). Human mesenchymal stromal cells release functional mitochondria in extracellular vesicles. Front Bioeng Biotechnol *10*, 870193. https://doi.org/10.3389/fbioe.2022.870193.

106. Akhter, W., Nakhle, J., Vaillant, L., Garcin, G., Le Saout, C., Simon, M., Crozet, C., Djouad, F., Jorgensen, C., Vignais, M.-L., et al. (2023). Transfer of mesenchymal stem cell mitochondria to CD4+ T cells contributes to repress Th1 differentiation by downregulating T-bet expression. Stem Cell Res Ther *14*, 12. https://doi.org/10.1186/s13287-022-03219-x.

107. Court, A.C., Le-Gatt, A., Luz-Crawford, P., Parra, E., Aliaga-Tobar, V., Bátiz, L.F., Contreras, R.A., Ortúzar, M.I., Kurte, M., Elizondo-Vega, R., et al. (2020). Mitochondrial transfer from MSCs to T cells induces Treg differentiation and restricts inflammatory response. EMBO Rep *21*, e48052. https://doi.org/10.15252/embr.201948052.

108. Xia, L., Zhang, C., Lv, N., Liang, Z., Ma, T., Cheng, H., Xia, Y., and Shi, L. (2022). AdMSC-derived exosomes alleviate acute lung injury via transferring mitochondrial component to improve homeostasis of alveolar macrophages. Theranostics *12*, 2928–2947. https://doi.org/10.7150/thno.69533.

109. Vaillant, L., Akhter, W., Nakhle, J., Simon, M., Villalba, M., Jorgensen, C., Vignais, M.-L., and Hernandez, J. (2024). The role of mitochondrial transfer in the suppression of CD8+ T cell responses by Mesenchymal stem cells. Stem Cell Res Ther *15*, 394. https://doi.org/10.1186/s13287-024-03980-1.

110. Dominici, M., Le Blanc, K., Mueller, I., Slaper-Cortenbach, I., Marini, F., Krause, D., Deans, R., Keating, A., Prockop, D., and Horwitz, E. (2006). Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. Cytotherapy *8*, 315–317. https://doi.org/10.1080/14653240600855905.

111. Tsiklauri, L., Werner, J., Kampschulte, M., Frommer, K.W., Berninger, L., Irrgang, M., Glenske, K., Hose, D., Khassawna, T.E., Pons-Kühnemann, J., et al. (2018). Visfatin alters the cytokine and matrix-degrading enzyme profile during osteogenic and adipogenic MSC differentiation. Osteoarthritis and Cartilage *26*, 1225–1235. https://doi.org/10.1016/j.joca.2018.06.001.

112. Carbonare, L.D., Bertacco, J., Marchetto, G., Cheri, S., Deiana, M., Minoia, A., Tiso, N., Mottes, M., and Valenti, M.T. (2021). Methylsulfonylmethane enhances MSC chondrogenic commitment and promotes pre-osteoblasts formation. Stem Cell Res Ther *12*, 326. https://doi.org/10.1186/s13287-021-02396-5.

113. Pelekanos, R.A., Ting, M.J., Sardesai, V.S., Ryan, J.M., Lim, Y.-C., Chan, J.K., and Fisk, N.M. (2014). Intracellular trafficking and endocytosis of CXCR4 in fetal mesenchymal stem/stromal cells. BMC Cell Biol *15*, 15. https://doi.org/10.1186/1471-2121-15-15.

114. Krampera, M., Galipeau, J., Shi, Y., Tarte, K., and Sensebe, L. (2013). Immunological characterization of multipotent mesenchymal stromal cells–The International Society for Cellular Therapy (ISCT) working proposal. Cytotherapy *15*, 1054–1061. https://doi.org/10.1016/j.jcyt.2013.02.010.

115. 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. (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*, 151–159. https://doi.org/10.1016/j.jcyt.2015.11.008.

116. Viswanathan, S., Shi, Y., Galipeau, J., Krampera, M., Leblanc, K., Martin, I., Nolta, J., Phinney, D.G., and Sensebe, L. (2019). Mesenchymal stem versus stromal cells: International Society for Cell & Gene Therapy (ISCT®) Mesenchymal Stromal Cell committee position statement on nomenclature. Cytotherapy *21*, 1019–1024. https://doi.org/10.1016/j.jcyt.2019.08.002.

117. Wang, Y., Chen, X., Cao, W., and Shi, Y. (2014). Plasticity of mesenchymal stem cells in immunomodulation: pathological and therapeutic implications. Nat Immunol *15*, 1009–1016. https://doi.org/10.1038/ni.3002.

118. Wang, Y., Fang, J., Liu, B., Shao, C., and Shi, Y. (2022). Reciprocal regulation of mesenchymal stem cells and immune responses. Cell Stem Cell *29*, 1515–1530. https://doi.org/10.1016/j.stem.2022.10.001.

119. Ren, G., Zhang, L., Zhao, X., Xu, G., Zhang, Y., Roberts, A.I., Zhao, R.C., and Shi, Y. (2008). Mesenchymal Stem Cell-Mediated Immunosuppression Occurs via Concerted Action of Chemokines and Nitric Oxide. Cell Stem Cell *2*, 141–150. https://doi.org/10.1016/j.stem.2007.11.014.

120. Constantin, G., Marconi, S., Rossi, B., Angiari, S., Calderan, L., Anghileri, E., Gini, B., Dorothea Bach, S., Martinello, M., Bifari, F., et al. (2009). Adipose-Derived Mesenchymal Stem Cells Ameliorate Chronic Experimental Autoimmune Encephalomyelitis. Stem Cells *27*, 2624–2635. https://doi.org/10.1002/stem.194.

121. Kim, N., and Cho, S.-G. (2016). Overcoming immunoregulatory plasticity of mesenchymal stem cells for accelerated clinical applications. Int J Hematol *103*, 129–137. https://doi.org/10.1007/s12185-015-1918-6.

122. Li, W., Ren, G., Huang, Y., Su, J., Han, Y., Li, J., Chen, X., Cao, K., Chen, Q., Shou, P., et al. (2012). Mesenchymal stem cells: a double-edged sword in regulating immune responses. Cell Death Differ *19*, 1505–1513. https://doi.org/10.1038/cdd.2012.26.

123. Sarsenova, M., Kim, Y., Raziyeva, K., Kazybay, B., Ogay, V., and Saparov, A. (2022). Recent advances to enhance the immunomodulatory potential of mesenchymal stem cells. Front. Immunol. *13*. https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.1010399.

124. Noronha NC, N. de C., Mizukami, A., Caliári-Oliveira, C., Cominal, J.G., Rocha, J.L.M., Covas, D.T., Swiech, K., and Malmegrim, K.C.R. (2019). Priming approaches to improve the efficacy of mesenchymal stromal cell-based therapies. Stem Cell Res Ther *10*, 131. https://doi.org/10.1186/s13287-019-1224-y.

125. Grassin-Delyle, S., Abrial, C., Salvator, H., Brollo, M., Naline, E., and Devillier, P. (2018). The Role of Toll-Like Receptors in the Production of Cytokines by Human Lung Macrophages. J Innate Immun *12*, 63–73. https://doi.org/10.1159/000494463.

126. Waterman, R.S., Tomchuck, S.L., Henkle, S.L., and Betancourt, A.M. (2010). A New Mesenchymal Stem Cell (MSC) Paradigm: Polarization into a Pro-Inflammatory MSC1 or an Immunosuppressive MSC2 Phenotype. PLoS One *5*, e10088. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0010088.

127. Zhao, X., Liu, D., Gong, W., Zhao, G., Liu, L., Yang, L., and Hou, Y. (2014). The Toll-like Receptor 3 Ligand, Poly(I:C), Improves Immunosuppressive Function and Therapeutic Effect of Mesenchymal Stem Cells on Sepsis via Inhibiting MiR-143. STEM CELLS *32*, 521–533. https://doi.org/10.1002/stem.1543.

128. Liotta, F., Angeli, R., Cosmi, L., Filì, L., Manuelli, C., Frosali, F., Mazzinghi, B., Maggi, L., Pasini, A., Lisi, V., et al. (2008). Toll-Like Receptors 3 and 4 Are Expressed by Human Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stem Cells and Can Inhibit Their T-Cell Modulatory Activity by Impairing Notch Signaling. STEM CELLS *26*, 279–289. https://doi.org/10.1634/stemcells.2007-0454.

129. Najar, M., Krayem, M., Meuleman, N., Bron, D., and Lagneaux, L. (2017). Mesenchymal Stromal Cells and Toll-Like Receptor Priming: A Critical Review. Immune Netw *17*, 89–102. https://doi.org/10.4110/in.2017.17.2.89.

130. Tomchuck, S.L., Zwezdaryk, K.J., Coffelt, S.B., Waterman, R.S., Danka, E.S., and Scandurro, A.B. (2008). Toll-Like Receptors on Human Mesenchymal Stem Cells Drive Their Migration and Immunomodulating Responses. Stem Cells *26*, 99–107. https://doi.org/10.1634/stemcells.2007-0563.

131. Waterman, R.S., Henkle, S.L., and Betancourt, A.M. (2012). Mesenchymal Stem Cell 1 (MSC1)-Based Therapy Attenuates Tumor Growth Whereas MSC2-Treatment Promotes Tumor Growth and Metastasis. PLOS ONE *7*, e45590. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0045590.

132. Betancourt, A.M. (2012). New Cell-Based Therapy Paradigm: Induction of Bone Marrow-Derived Multipotent Mesenchymal Stromal Cells into Pro-Inflammatory MSC1 and Anti-inflammatory MSC2 Phenotypes. In Mesenchymal Stem Cells - Basics and Clinical Application II Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology., B. Weyand, M. Dominici, R. Hass, R. Jacobs, and C. Kasper, eds. (Springer Berlin Heidelberg), pp. 163–197. https://doi.org/10.1007/10_2012_141.

133. Ren, J., Han, X., Lohner, H., Liang, R., Liang, S., and Wang, H. (2021). Serum- and glucocorticoid-inducible kinase 1 promotes alternative macrophage polarization and restrains inflammation through FoxO1 and STAT3 signaling. J Immunol *207*, 268–280. https://doi.org/10.4049/jimmunol.2001455.

134. Zhao, K., Lin, R., Fan, Z., Chen, X., Wang, Y., Huang, F., Xu, N., Zhang, X., Zhang, X., Xuan, L., et al. (2022). Mesenchymal stromal cells plus basiliximab, calcineurin inhibitor as treatment of steroid-resistant acute graft-versus-host disease: a multicenter, randomized, phase 3, open-label trial. J Hematol Oncol *15*, 22. https://doi.org/10.1186/s13045-022-01240-4.

135. Ma, X., Che, N., Gu, Z., Huang, J., Wang, D., Liang, J., Hou, Y., Gilkeson, G., Lu, L., and Sun, L. (2013). Allogenic mesenchymal stem cell transplantation ameliorates nephritis in lupus mice via inhibition of B-cell activation. Cell Transplant *22*, 2279–2290. https://doi.org/10.3727/096368912X658692.

136. Saleh, M., Vaezi, A.A., Aliannejad, R., Sohrabpour, A.A., Kiaei, S.Z.F., Shadnoush, M., Siavashi, V., Aghaghazvini, L., Khoundabi, B., Abdoli, S., et al. (2021). Cell therapy in patients with COVID-19 using Wharton's jelly mesenchymal stem cells: a phase 1 clinical trial. Stem Cell Res Ther *12*, 410. https://doi.org/10.1186/s13287-021-02483-7.

137. Mesenchymal stem cell treatment improves outcome of COVID-19 patients via multiple immunomodulatory mechanisms - PubMed https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34702946/.

138. Le Burel, S., Thepenier, C., Boutin, L., Lataillade, J.-J., and Peltzer, J. (2017). Effect of Mesenchymal Stromal Cells on T Cells in a Septic Context: Immunosuppression or Immunostimulation? Stem Cells and Development *26*, 1477–1489. https://doi.org/10.1089/scd.2016.0184.

139. Cui, R., Rekasi, H., Hepner-Schefczyk, M., Fessmann, K., Petri, R.M., Bruderek, K., Brandau, S., Jäger, M., and Flohé, S.B. (2016). Human mesenchymal stromal/stem cells acquire immunostimulatory capacity upon cross-talk with natural killer cells and might improve the NK cell function of immunocompromised patients. Stem Cell Res Ther *7*, 88. https://doi.org/10.1186/s13287-016-0353-9.

140. Chen, X., Chen, M., Yang, Y., Xu, C., Lu, H., Xu, Y., Li, X., Wei, Y., Zhu, Z., Ding, Y., et al. (2022). Lipopolysaccharide-Preconditioned Mesenchymal Stem Cell Transplantation Attenuates Critical Persistent Inflammation Immune Suppression and Catabolism Syndrome in Mice. Shock *Publish Ahead of Print*. https://doi.org/10.1097/SHK.0000000000001993.

141. Galliou, P.-A., Argyri, N., Maria, P., Koliakos, G., and Papanikolaou, N.A. (2025). MSC1 Cells Suppress Colorectal Cancer Cell Growth via Metabolic Reprogramming, Laminin–Integrin Adhesion Signaling, Oxidative Stress Resistance, and a Tumor-Suppressive Secretome. Biomedicines *13*, 1503. https://doi.org/10.3390/biomedicines13061503.

142. Yang, Y., Wang, Y., Li, L., Chen, F., and Zhang, P. (2017). Activation of the Toll-like receptor 8 pathway increases the immunogenicity of mesenchymal stem cells from umbilical cord. Molecular Medicine Reports *16*, 2061–2068. https://doi.org/10.3892/mmr.2017.6806.

143. Liu, C., Lu, Y., Du, P., Yang, F., Guo, P., Tang, X., Diao, L., and Lu, G. (2022). Mesenchymal stem cells pretreated with proinflammatory cytokines accelerate skin wound healing by promoting macrophages migration and M2 polarization. Regenerative Therapy *21*, 192–200. https://doi.org/10.1016/j.reth.2022.06.009.

144. Byrnes, D., Masterson, C.H., Brady, J., Alagesan, S., Gonzalez, H.E., McCarthy, S.D., Fandiño, J., O'Toole, D.P., and Laffey, J.G. (2023). Differential Effects of Cytokine Versus Hypoxic Preconditioning of Human Mesenchymal Stromal Cells in Pulmonary Sepsis Induced by Antimicrobial-Resistant Klebsiella pneumoniae. Pharmaceuticals *16*, 149. https://doi.org/10.3390/ph16020149.

145. Byrnes, D., Masterson, C., Brady, J., Horie, S., McCarthy, S.D., Gonzalez, H., O'Toole, D., and Laffey, J. (2023). Delayed MSC therapy enhances resolution of organized pneumonia induced by antibiotic resistant Klebsiella pneumoniae infection. Front. Med. *10*. https://doi.org/10.3389/fmed.2023.1132749.

146. Voisin, C. (2021). Study of the immunomodulatory and/or migratory potential of mesenchymal stromal/stem cells derived from Wharton's jelly in a context of tissue engineering and cell therapy. PhD thesis, Université de Lorraine.

147. Aussel, C., Baudry, N., Grosbot, M., Caron, C., Vicaut, E., Banzet, S., and Peltzer, J. (2021). IL-1β primed mesenchymal stromal cells moderate hemorrhagic shock-induced organ injuries. Stem Cell Res Ther 12, 438. https://doi.org/10.1186/s13287-021-02505-4.

148. Zhou, C., Shang, S., Zhao, J., Yang, Y., Shi, M., Li, P., Li, Q., Zhang, J., Li, W., Zhang, C., et al. IL-27 Modulates Mesenchymal Stem Cell Immunoplasticity for Enhanced Lupus Nephritis Therapy via the JAK1–STAT1–IDO Axis and Tryptophan Metabolic Orchestration. Research (Wash D C) *8*, 0748. https://doi.org/10.34133/research.0748.

149. Lim, J., Lee, S., Ju, H., Kim, Y., Heo, J., Lee, H.-Y., Choi, K.-C., Son, J., Oh, Y.-M., Kim, I.-G., et al. (2017). Valproic acid enforces the priming effect of sphingosine-1 phosphate on human mesenchymal stem cells. Int J Mol Med *40*, 739–747. https://doi.org/10.3892/ijmm.2017.3053.

150. Lee, S.-G., and Joe, Y.A. (2018). Autophagy mediates enhancement of proangiogenic activity by hypoxia in mesenchymal stromal/stem cells. Biochemical and Biophysical Research Communications *501*, 941–947. https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2018.05.086.

151. Li, H., Ji, X.-Q., Zhang, S.-M., and Bi, R.-H. (2023). Hypoxia and inflammatory factor preconditioning enhances the immunosuppressive properties of human umbilical cord mesenchymal stem cells. World J Stem Cells *15*, 999–1016. https://doi.org/10.4252/wjsc.v15.i11.999.

152. Chen, X., Zhang, F., He, X., Xu, Y., Yang, Z., Chen, L., Zhou, S., Yang, Y., Zhou, Z., Sheng, W., et al. (2013). Chondrogenic differentiation of umbilical cord-derived mesenchymal stem cells in type I collagen-hydrogel for cartilage engineering. Injury *44*, 540–549. https://doi.org/10.1016/j.injury.2012.09.024.

153. Bartosh, T.J., Ylöstalo, J.H., Mohammadipoor, A., Bazhanov, N., Coble, K., Claypool, K., Lee, R.H., Choi, H., and Prockop, D.J. (2010). Aggregation of human mesenchymal stromal cells (MSCs) into 3D spheroids enhances their antiinflammatory properties. Proc Natl Acad Sci U S A *107*, 13724–13729. https://doi.org/10.1073/pnas.1008117107.

154. Voisin, C., Cauchois, G., Reppel, L., Laroye, C., Louarn, L., Schenowitz, C., Sonon, P., Poras, I., Wang, V., D. Carosella, E., et al. (2020). Are the Immune Properties of Mesenchymal Stem Cells from Wharton's Jelly Maintained during Chondrogenic Differentiation? J Clin Med *9*, 423. https://doi.org/10.3390/jcm9020423.

155. Nava, M.M., Raimondi, M.T., and Pietrabissa, R. (2012). Controlling Self-Renewal and Differentiation of Stem Cells via Mechanical Cues. J Biomed Biotechnol *2012*, 797410. https://doi.org/10.1155/2012/797410.

156. Winer, J.P., Janmey, P.A., McCormick, M.E., and Funaki, M. (2009). Bone marrow-derived human mesenchymal stem cells become quiescent on soft substrates but remain responsive to chemical or mechanical stimuli. Tissue Eng Part A *15*, 147–154. https://doi.org/10.1089/ten.tea.2007.0388.

157. Kurte, M., Vega-Letter, A.M., Luz-Crawford, P., Djouad, F., Noël, D., Khoury, M., and Carrión, F. (2020). Time-dependent LPS exposure commands MSC immunoplasticity through TLR4 activation leading to opposite therapeutic outcome in EAE. Stem Cell Res Ther *11*, 416. https://doi.org/10.1186/s13287-020-01840-2.

158. Brandau, S., Jakob, M., Bruderek, K., Bootz, F., Giebel, B., Radtke, S., Mauel, K., Jäger, M., Flohé, S.B., and Lang, S. (2014). Mesenchymal Stem Cells Augment the Anti-Bacterial Activity of Neutrophil Granulocytes. PLoS One *9*, e106903. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0106903.

159. Kukia, N.R., Alipanah-Moghadam, R., Delirezh, N., and Mazani, M. (2018). Mesenchymal Stromal Stem Cell-Derived Microvesicles Enhance Tumor Lysate Pulsed Dendritic Cell Stimulated Autologous T lymphocyte Cytotoxicity. Asian Pac J Cancer Prev *19*, 1895–1902. https://doi.org/10.22034/APJCP.2018.19.7.1895.

160. Tolstova, T., Dotsenko, E., Kozhin, P., Novikova, S., Zgoda, V., Rusanov, A., and Luzgina, N. (2023). The effect of TLR3 priming conditions on MSC immunosuppressive properties. Stem Cell Res Ther *14*, 344. https://doi.org/10.1186/s13287-023-03579-y.

161. Song, Y., Dou, H., Li, X., Zhao, X., Li, Y., Liu, D., Ji, J., Liu, F., Ding, L., Ni, Y., et al. (2017). Exosomal miR-146a Contributes to the Enhanced Therapeutic Efficacy of Interleukin-1β-Primed Mesenchymal Stem Cells Against Sepsis. STEM CELLS *35*, 1208–1221. https://doi.org/10.1002/stem.2564.

162. Kim, H.-J., Kim, H., Lee, J.-H., and Hwangbo, C. (2023). Toll-like receptor 4 (TLR4): new insight immune and aging. Immun Ageing *20*, 67. https://doi.org/10.1186/s12979-023-00383-3.

163. Ye, F., Jiang, J., Zong, C., Yang, X., Gao, L., Meng, Y., Li, R., Zhao, Q., Han, Z., and Wei, L. (2020). Sirt1-Overexpressing Mesenchymal Stem Cells Drive the Anti-tumor Effect through Their Pro-inflammatory Capacity. Mol Ther *28*, 874–888. https://doi.org/10.1016/j.ymthe.2020.01.018.

164. Seumen, C.H.T., Grimm, T.M., and Hauck, C.R. (2021). Protein phosphatases in TLR signaling. Cell Commun Signal *19*, 45. https://doi.org/10.1186/s12964-021-00722-1.

165. Shoshina, O.O., Kozhin, P.M., Shadrin, V.S., Romashin, D.D., Rusanov, A.L., and Luzgina, N.G. (2021). Phenotypic Features of Mesenchymal Stem Cell Subpopulations Obtained under the Influence of Various Toll-Like Receptors Ligands. Bull Exp Biol Med *170*, 555–559. https://doi.org/10.1007/s10517-021-05105-7.

166. CHEN, Y., LIN, J., ZHAO, Y., MA, X., and YI, H. (2021). Toll-like receptor 3 (TLR3) regulation mechanisms and roles in antiviral innate immune responses. J Zhejiang Univ Sci B *22*, 609–632. https://doi.org/10.1631/jzus.B2000808.

167. Kawasaki, T., and Kawai, T. (2014). Toll-Like Receptor Signaling Pathways. Front Immunol *5*, 461. https://doi.org/10.3389/fimmu.2014.00461.

168. Yu, Y., Yoo, S.M., Park, H.H., Baek, S.Y., Kim, Y.-J., Lee, S., Kim, Y.L., Seo, K.-W., and Kang, K.-S. (2019). Preconditioning with interleukin-1 beta and interferon-gamma enhances the efficacy of human umbilical cord blood-derived mesenchymal stem cells-based therapy via enhancing prostaglandin E2 secretion and indoleamine 2,3-dioxygenase activity in dextran sulfate sodium-induced colitis. Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine *13*, 1792–1804. https://doi.org/10.1002/term.2930.

169. Zhou, Y., Chen, X., Cao, Z., Li, J., Long, H., Wu, Y., Zhang, Z., and Sun, Y. (2021). R848 Is Involved in the Antibacterial Immune Response of Golden Pompano (Trachinotus ovatus) Through TLR7/8-MyD88-NF-κB-Signaling Pathway. Front Immunol *11*, 617522. https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.617522.

170. Wu, Y., Deshpande, A., Geraci, N., Budde, P., Sellers, V., Velisetty, P., Sun, C., Strand, F., Bhavsar, C., Niewold, T.B., et al. (2025). TLR7/8 Activation in Immune Cells and Muscle by RNA-Containing Immune Complexes: Role in Inflammation and the Pathogenesis of Myositis. Arthritis Rheumatol *77*, 190–201. https://doi.org/10.1002/art.42989.

171. Toriola, S.L., Satnarine, T., Zohara, Z., Adelekun, A., Seffah, K.D., Salib, K., Dardari, L., Taha, M., Dahat, P., and Penumetcha, S.S. Recent Clinical Studies on the Effects of Tumor Necrosis Factor-Alpha (TNF-α) and Janus Kinase/Signal Transducers and Activators of Transcription (JAK/STAT) Antibody Therapies in Refractory Cutaneous Sarcoidosis: A Systematic Review. Cureus *15*, e44901. https://doi.org/10.7759/cureus.44901.

172. Vega-Letter, A.M., Kurte, M., Fernández-O'Ryan, C., Gauthier-Abeliuk, M., Fuenzalida, P., Moya-Uribe, I., Altamirano, C., Figueroa, F., Irarrázabal, C., and Carrión, F. (2016). Differential TLR activation of murine mesenchymal stem cells generates distinct immunomodulatory effects in EAE. Stem Cell Res Ther *7*, 150. https://doi.org/10.1186/s13287-016-0402-4.

173. Padmanabhan, S., Gaire, B., Zou, Y., Uddin, M.M., and Vancurova, I. (2022). IFNγ-induced PD-L1 expression in ovarian cancer cells is regulated by JAK1, STAT1 and IRF1 signaling. Cell Signal *97*, 110400. https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2022.110400.

174. Garcia-Diaz, A., Shin, D.S., Moreno, B.H., Saco, J., Escuin-Ordinas, H., Rodriguez, G.A., Zaretsky, J.M., Sun, L., Hugo, W., Wang, X., et al. (2017). Interferon Receptor Signaling Pathways Regulating PD-L1 and PD-L2 Expression. Cell Rep *19*, 1189–1201. https://doi.org/10.1016/j.celrep.2017.04.031.

175. Noone, C., Kihm, A., English, K., O'Dea, S., and Mahon, B.P. (2013). IFN-γ Stimulated Human Umbilical-Tissue-Derived Cells Potently Suppress NK Activation and Resist NK-Mediated Cytotoxicity In Vitro. Stem Cells Dev *22*, 3003–3014. https://doi.org/10.1089/scd.2013.0028.

176. IFN-γ immune priming of macrophages in vivo induces prolonged STAT1 binding and protection against Cryptococcus neoformans | PLOS Pathogens https://journals.plos.org/plospathogens/article?id=10.1371/journal.ppat.1007358.

177. Chinnadurai, R., Copland, I.B., Patel, S.R., and Galipeau, J. (2014). IDO-Independent Suppression of T Cell Effector Function by IFN-γ–Licensed Human Mesenchymal Stromal Cells. The Journal of Immunology *192*, 1491–1501. https://doi.org/10.4049/jimmunol.1301828.

178. Gough, P., and Myles, I.A. (2020). Tumor Necrosis Factor Receptors: Pleiotropic Signaling Complexes and Their Differential Effects. Front Immunol *11*, 585880. https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.585880.

179. Yang, R., Huang, H., Cui, S., Zhou, Y., Zhang, T., and Zhou, Y. (2020). IFN-γ promoted exosomes from mesenchymal stem cells to attenuate colitis via miR-125a and miR-125b. Cell Death Dis *11*, 603. https://doi.org/10.1038/s41419-020-02788-0.

180. Stefańska, K., Ożegowska, K., Hutchings, G., Popis, M., Moncrieff, L., Dompe, C., Janowicz, K., Pieńkowski, W., Gutaj, P., Shibli, J.A., et al. (2020). Human Wharton's Jelly—Cellular Specificity, Stemness Potency, Animal Models, and Current Application in Human Clinical Trials. J Clin Med *9*, 1102. https://doi.org/10.3390/jcm9041102.

181. Cheng, A., Choi, D., Lora, M., Shum-Tim, D., Rak, J., and Colmegna, I. (2020). Human multipotent mesenchymal stromal cells cytokine priming promotes RAB27B-regulated secretion of small extracellular vesicles with immunomodulatory cargo. Stem Cell Research & Therapy *11*, 539. https://doi.org/10.1186/s13287-020-02050-6.

182. Karahuseyinoglu, S., Cinar, O., Kilic, E., Kara, F., Akay, G.G., Demiralp, D.O., Tukun, A., Uckan, D., and Can, A. (2007). Biology of stem cells in human umbilical cord stroma: in situ and in vitro surveys. Stem Cells *25*, 319–331. https://doi.org/10.1634/stemcells.2006-0286.

183. Su, W., Wan, Q., Huang, J., Han, L., Chen, X., Chen, G., Olsen, N., Zheng, S.G., and Liang, D. (2015). Culture medium from TNF-α-stimulated mesenchymal stem cells attenuates allergic conjunctivitis through multiple antiallergic mechanisms. J Allergy Clin Immunol *136*, 423-432.e8. https://doi.org/10.1016/j.jaci.2014.12.1926.

184. Gogiel, T., Wolańska, M., Galewska, Z., Kinalski, P., Sobolewski, K., and Romanowicz, L. (2017). Distribution of cathepsin L in human umbilical cord tissues. Acta Biochim Pol *64*, 507–512. https://doi.org/10.18388/abp.2017_1513.

185. Nakao, Y., Fukuda, T., Zhang, Q., Sanui, T., Shinjo, T., Kou, X., Chen, C., Liu, D., Watanabe, Y., Hayashi, C., et al. (2021). Exosomes from TNF-α-treated human gingiva-derived MSCs enhance M2 macrophage polarization and inhibit periodontal bone loss. Acta Biomater *122*, 306–324. https://doi.org/10.1016/j.actbio.2020.12.046.

186. Zhang, S., Jiang, L., Hu, H., Wang, H., Wang, X., Jiang, J., Ma, Y., Yang, J., Hou, Y., Xie, D., et al. (2020). Pretreatment of exosomes derived from hUCMSCs with TNF-α ameliorates acute liver failure by inhibiting the activation of NLRP3 in macrophage. Life Sciences *246*, 117401. https://doi.org/10.1016/j.lfs.2020.117401.

187. Davies, J.E., Walker, J.T., and Keating, A. (2017). Concise Review: Wharton's Jelly: The Rich, but Enigmatic, Source of Mesenchymal Stromal Cells. Stem Cells Transl Med *6*, 1620–1630. https://doi.org/10.1002/sctm.16-0492.

188. Kim, M., Shin, D.I., Choi, B.H., and Min, B.-H. (2021). Exosomes from IL-1β-Primed Mesenchymal Stem Cells Inhibited IL-1β- and TNF-α-Mediated Inflammatory Responses in Osteoarthritic SW982 Cells. Tissue Eng Regen Med *18*, 525–536. https://doi.org/10.1007/s13770-020-00324-x.

189. Collagen and Glycosaminoglycans of Wharton's Jelly | Neonatology | Karger Publishers https://karger.com/neo/article-abstract/71/1/11/368541/Collagen-and-Glycosaminoglycans-of-Wharton-s-Jelly.

190. Tang, J., Wu, T., Xiong, J., Su, Y., Zhang, C., Wang, S., Tang, Z., and Liu, Y. (2015). Porphyromonas gingivalis lipopolysaccharides regulate functions of bone marrow mesenchymal stem cells. Cell Prolif *48*, 239–248. https://doi.org/10.1111/cpr.12173.

191. Kestendjieva, S., Chervenkov, M., Oreshkova, T., Mourdjeva, M., and Stoyanova, E. (2024). Mesenchymal Stromal/Stem Cells Isolated by Explant Culture Method from Wharton's Jelly and Subamnion Possess Similar Biological Characteristics. Applied Sciences *14*. https://doi.org/10.3390/app14178036.

192. Ti, D., Hao, H., Tong, C., Liu, J., Dong, L., Zheng, J., Zhao, Y., Liu, H., Fu, X., and Han, W. (2015). LPS-preconditioned mesenchymal stromal cells modify macrophage polarization for resolution of chronic inflammation via exosome-shuttled let-7b. J Transl Med *13*, 308. https://doi.org/10.1186/s12967-015-0642-6.

193. Vieira Paladino, F., de Moraes Rodrigues, J., da Silva, A., and Goldberg, A.C. (2019). The Immunomodulatory Potential of Wharton's Jelly Mesenchymal Stem/Stromal Cells. Stem Cells Int *2019*, 3548917. https://doi.org/10.1155/2019/3548917.

194. Xu, R., Zhang, F., Chai, R., Zhou, W., Hu, M., Liu, B., Chen, X., Liu, M., Xu, Q., Liu, N., et al. (2019). Exosomes derived from pro-inflammatory bone marrow-derived mesenchymal stem cells reduce inflammation and myocardial injury via mediating macrophage polarization. J Cell Mol Med *23*, 7617–7631. https://doi.org/10.1111/jcmm.14635.

195. Rogulska, O., Vavrinova, E., Vackova, I., Smolkova, K., and Petrenko, Y. (2025). Enhancing adipogenesis in Wharton's jelly multipotent mesenchymal stromal cells through lipidomic insights and fatty acid supplementation. Sci Rep *15*, 30962. https://doi.org/10.1038/s41598-025-16867-9.

196. Fuenzalida, P., Kurte, M., Fernández-O'ryan, C., Ibañez, C., Gauthier-Abeliuk, M., Vega-Letter, A.M., Gonzalez, P., Irarrázabal, C., Quezada, N., Figueroa, F., et al. (2016). Toll-like receptor 3 pre-conditioning increases the therapeutic efficacy of umbilical cord mesenchymal stromal cells in a dextran sulfate sodium–induced colitis model. Cytotherapy *18*, 630–641. https://doi.org/10.1016/j.jcyt.2016.02.002.

197. Chen, C.-F., Chen, Y.-C., Fu, Y.-S., Tsai, S.-W., Wu, P.-K., Chen, C.-M., Chang, M.-C., and Chen, W.-M. (2021). Characterization of Osteogenesis and Chondrogenesis of Human Decellularized Allogeneic Bone with Mesenchymal Stem Cells Derived from Bone Marrow, Adipose Tissue, and Wharton's Jelly. Int J Mol Sci *22*, 8987. https://doi.org/10.3390/ijms22168987.

198. Li, Q., Li, J., Sun, L., Sun, Y., Zhao, F., Liu, P., Peng, X., Xuan, X., Li, Y., Wang, P., et al. (2021). Exosomes derived from LPS-stimulated human thymic mesenchymal stromal cells enhance inflammation via thrombospondin-1. Biosci Rep *41*, BSR20203573. https://doi.org/10.1042/BSR20203573.

199. Pelusi, L., Schiavone, V., Bologna, G., Cerritelli, P., Lezza, D., Pantalone, A., Santalucia, M., Buda, R., Pandolfi, A., and Mandatori, D. (2021). Chondrogenic Differentiation of Human Wharton's Jelly and Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stem Cells: Focus on the Role of an Acrylamide-Free Cross-Linked Hyaluronic Acid Hydrogel. J Orthop Res Ther *6*. https://doi.org/10.29011/2575-8241.001209.

200. Qiu, Y., Guo, J., Mao, R., Chao, K., Chen, B., He, Y., Zeng, Z., Zhang, S., and Chen, M. (2017). TLR3 preconditioning enhances the therapeutic efficacy of umbilical cord mesenchymal stem cells in TNBS-induced colitis via the TLR3-Jagged-1-Notch-1 pathway. Mucosal Immunology *10*, 727–742. https://doi.org/10.1038/mi.2016.78.

201. Reppel, L., Schiavi, J., Charif, N., Leger, L., Yu, H., Pinzano, A., Henrionnet, C., Stoltz, J.-F., Bensoussan, D., and Huselstein, C. (2015). 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 *6*, 260. https://doi.org/10.1186/s13287-015-0263-2.

202. Xu, C., Feng, C., Huang, P., Li, Y., Liu, R., Liu, C., Han, Y., Chen, L., Ding, Y., Shao, C., et al. (2022). TNFα and IFNγ rapidly activate PI3K-AKT signaling to drive glycolysis that confers mesenchymal stem cells enhanced anti-inflammatory property. Stem Cell Res Ther *13*, 491. https://doi.org/10.1186/s13287-022-03178-3.

203. Arki, M.K., Moeinabadi-Bidgoli, K., Niknam, B., Mohammadi, P., Hassan, M., Hossein-Khannazer, N., and Vosough, M. (2024). Immunomodulatory performance of GMP-compliant, clinical-grade mesenchymal stromal cells from four different sources. Heliyon *10*, e24948. https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2024.e24948.

204. Sun, L., Wang, J., Wang, Q., He, Z., Sun, T., Yao, Y., Wang, W., and Shen, P. (2022). Pretreatment of umbilical cord derived MSCs with IFN-γ and TNF-α enhances the tumor-suppressive effect on acute myeloid leukemia. Biochem Pharmacol *199*, 115007. https://doi.org/10.1016/j.bcp.2022.115007.

205. Impaired B Cell Inhibition by Lupus Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells Is Caused by Reduced CCL2 Expression | The Journal of Immunology | Oxford Academic https://academic.oup.com/jimmunol/article-abstract/193/10/5306/7960453?login=false.

206. Philipp, D., Suhr, L., Wahlers, T., Choi, Y.-H., and Paunel-Görgülü, A. (2018). Preconditioning of bone marrow-derived mesenchymal stem cells highly strengthens their potential to promote IL-6-dependent M2b polarization. Stem Cell Res Ther *9*, 286. https://doi.org/10.1186/s13287-018-1039-2.

207. Trivanović, D., Kocić, J., Mojsilović, S., Krstić, A., Ilić, V., Okić-Đorđević, I., Santibanez, J.F., Jovčić, G., Terzić, M., and Bugarski, D. (2013). Mesenchymal stem cells isolated from peripheral blood and umbilical cord Wharton's jelly. Srpski arhiv za celokupno lekarstvo *141*, 178–186. https://doi.org/10.2298/SARH1304178T.

208. Han, X., Yang, Q., Lin, L., Xu, C., Zheng, C., Chen, X., Han, Y., Li, M., Cao, W., Cao, K., et al. (2014). Interleukin-17 enhances immunosuppression by mesenchymal stem cells. Cell Death Differ *21*, 1758–1768. https://doi.org/10.1038/cdd.2014.85.

209. Carvalho, M.S., Alves, L., Bogalho, I., Cabral, J.M.S., and da Silva, C.L. (2021). Impact of Donor Age on the Osteogenic Supportive Capacity of Mesenchymal Stromal Cell-Derived Extracellular Matrix. Front Cell Dev Biol *9*, 747521. https://doi.org/10.3389/fcell.2021.747521.

210. Lin, T., Pajarinen, J., Nabeshima, A., Lu, L., Nathan, K., Jämsen, E., Yao, Z., and Goodman, S.B. (2017). Preconditioning of murine mesenchymal stem cells synergistically enhanced immunomodulation and osteogenesis. Stem Cell Res Ther *8*, 277. https://doi.org/10.1186/s13287-017-0730-z.

211. Zhang, Q., Fu, L., Liang, Y., Guo, Z., Wang, L., Ma, C., and Wang, H. (2018). Exosomes originating from MSCs stimulated with TGF-β and IFN-γ promote Treg differentiation. J Cell Physiol *233*, 6832–6840. https://doi.org/10.1002/jcp.26436.

212. Massaro, F., Corrillon, F., Stamatopoulos, B., Dubois, N., Ruer, A., Meuleman, N., Bron, D., and Lagneaux, L. (2023). Age-related changes in human bone marrow mesenchymal stromal cells: morphology, gene expression profile, immunomodulatory activity and miRNA expression. Front. Immunol. *14*. https://doi.org/10.3389/fimmu.2023.1267550.

213. Wang, S., Wang, G., Zhang, L., Li, F., Liu, K., Wang, Y., Shi, Y., and Cao, K. (2020). Interleukin-17 promotes nitric oxide-dependent expression of PD-L1 in mesenchymal stem cells. Cell Biosci *10*, 73. https://doi.org/10.1186/s13578-020-00431-1.

214. Hao, M., Jiang, H., Zhao, Y., Li, C., and Jiang, J. (2024). Identification of potential biomarkers for aging diagnosis of mesenchymal stem cells derived from the aged donors. Stem Cell Research & Therapy *15*, 87. https://doi.org/10.1186/s13287-024-03689-1.

215. 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. (2017). Umbilical cord-derived mesenchymal stromal cells: predictive obstetric factors for cell proliferation and chondrogenic differentiation. Stem Cell Res Ther *8*, 161. https://doi.org/10.1186/s13287-017-0609-z.

216. Li, Y., Ren, X., Zhang, Z., Duan, Y., Li, H., Chen, S., Shao, H., Li, X., and Zhang, X. (2022). Effect of small extracellular vesicles derived from IL-10-overexpressing mesenchymal stem cells on experimental autoimmune uveitis. Stem Cell Res Ther *13*, 100. https://doi.org/10.1186/s13287-022-02780-9.

217. Mahmoud, R., Bassiouny, M., Badawy, A., Darwish, A., Yahia, S., and El-Tantawy, N. (2024). Maternal and neonatal factors' effects on wharton's jelly mesenchymal stem cell yield. Sci Rep *14*, 24376. https://doi.org/10.1038/s41598-024-72386-z.

218. Hackel, A., Aksamit, A., Bruderek, K., Lang, S., and Brandau, S. (2021). TNF-α and IL-1β sensitize human MSC for IFN-γ signaling and enhance neutrophil recruitment. Eur J Immunol *51*, 319–330. https://doi.org/10.1002/eji.201948336.

219. Gil-Kulik, P., Świstowska, M., Krzyżanowski, A., Petniak, A., Kwaśniewska, A., Płachno, B.J., Galkowski, D., Bogucka-Kocka, A., and Kocki, J. (2022). Evaluation of the Impact of Pregnancy-Associated Factors on the Quality of Wharton's Jelly-Derived Stem Cells Using SOX2 Gene Expression as a Marker. Int J Mol Sci *23*, 7630. https://doi.org/10.3390/ijms23147630.

220. Mesenchymal Stem Cell Therapy (MSCT) Market Outlook 2026 to 2033 https://www.24lifesciences.com/mesenchymal-stem-cell-therapymsct-market-1377.

221. Ragni, E., Perucca Orfei, C., De Luca, P., Mondadori, C., Viganò, M., Colombini, A., and de Girolamo, L. (2020). Inflammatory priming enhances mesenchymal stromal cell secretome potential as a clinical product for regenerative medicine approaches through secreted factors and EV-miRNAs: the example of joint disease. Stem Cell Res Ther *11*, 165. https://doi.org/10.1186/s13287-020-01677-9.

222. Gao, Y., Chi, Y., Chen, Y., Wang, W., Li, H., Zheng, W., Zhu, P., An, J., Duan, Y., Sun, T., et al. (2023). Multi-omics analysis of human mesenchymal stem cells shows cell aging that alters immunomodulatory activity through the downregulation of PD-L1. Nat Commun *14*, 4373. https://doi.org/10.1038/s41467-023-39958-5.

223. Xie, X., Yang, X., Wu, J., Tang, S., Yang, L., Fei, X., and Wang, M. (2022). Exosome from indoleamine 2,3-dioxygenase-overexpressing bone marrow mesenchymal stem cells accelerates repair process of ischemia/reperfusion-induced acute kidney injury by regulating macrophages polarization. Stem Cell Res Ther *13*, 367. https://doi.org/10.1186/s13287-022-03075-9.

224. Li, Y., Jin, M., Guo, D., Shen, S., Lu, K., Pan, R., Sun, L., Zhang, H., Shao, J., and Pan, G. (2024). Unveiling the immunogenicity of allogeneic mesenchymal stromal cells: Challenges and strategies for enhanced therapeutic efficacy. Biomedicine & Pharmacotherapy *180*, 117537. https://doi.org/10.1016/j.biopha.2024.117537.

225. Guan, F., Wu, X., Zhou, J., Lin, Y., He, Y., Fan, C., Zeng, Z., and Xiong, W. (2024). Mitochondrial transfer in tunneling nanotubes—a new target for cancer therapy. J Exp Clin Cancer Res *43*, 147. https://doi.org/10.1186/s13046-024-03069-w.

226. Zhai, X., Chen, K., Yang, H., Li, B., Zhou, T., Wang, H., Zhou, H., Chen, S., Zhou, X., Wei, X., et al. (2021). Extracellular vesicles derived from CD73 modified human umbilical cord mesenchymal stem cells ameliorate inflammation after spinal cord injury. J Nanobiotechnology *19*, 274. https://doi.org/10.1186/s12951-021-01022-z.

227. López-García, L., and Castro-Manrreza, M.E. (2021). TNF-α and IFN-γ Participate in Improving the Immunoregulatory Capacity of Mesenchymal Stem/Stromal Cells: Importance of Cell–Cell Contact and Extracellular Vesicles. International Journal of Molecular Sciences *22*, 9531. https://doi.org/10.3390/ijms22179531.

228. Jing, R., Bai, S., Zhang, P., Ren, H., Jia, L., Li, W., and Zheng, G. (2024). IDO-1 impairs antitumor immunity of natural killer cells in triple-negative breast cancer via up-regulation of HLA-G. Breast Cancer *31*, 135–147. https://doi.org/10.1007/s12282-023-01522-w.

229. Mebarki, M., Abadie, C., Larghero, J., and Cras, A. (2021). Human umbilical cord-derived mesenchymal stem/stromal cells: a promising candidate for the development of advanced therapy medicinal products. Stem Cell Res Ther *12*, 152. https://doi.org/10.1186/s13287-021-02222-y.

230. Wu, Y., Wang, H., Song, A., Wang, X., Ma, Q., Yao, C., Xu, J., Dai, H., Wang, C., Lu, T., et al. (2023). PD-L1-Expressing Extracellular Vesicles for the Treatment of Pneumonia. ACS Biomater Sci Eng *9*, 6464–6471. https://doi.org/10.1021/acsbiomaterials.3c01173.

231. Zoehler, B., Fracaro, L., Boldrini-Leite, L.M., da Silva, J.S., Travers, P.J., Brofman, P.R.S., Bicalho, M. da G., and Senegaglia, A.C. (2022). HLA-G and CD152 Expression Levels Encourage the Use of Umbilical Cord Tissue-Derived Mesenchymal Stromal Cells as an Alternative for Immunosuppressive Therapy. Cells *11*, 1339. https://doi.org/10.3390/cells11081339.

232. Ou, Q., Dou, X., Tang, J., Wu, P., and Pan, D. (2022). Small extracellular vesicles derived from PD-L1-modified mesenchymal stem cell promote Tregs differentiation and prolong allograft survival. Cell Tissue Res *389*, 465–481. https://doi.org/10.1007/s00441-022-03650-9.

233. Shalabi, H., Qin, H., Su, A., Yates, B., Wolters, P.L., Steinberg, S.M., Ligon, J.A., Silbert, S., DéDé, K., Benzaoui, M., et al. (2022). CD19/22 CAR T cells in children and young adults with B-ALL: phase 1 results and development of a novel bicistronic CAR. Blood *140*, 451–463. https://doi.org/10.1182/blood.2022015795.

234. Kornepati, A.V.R., Vadlamudi, R.K., and Curiel, T.J. (2022). Programmed death ligand 1 signals in cancer cells. Nat Rev Cancer *22*, 174–189. https://doi.org/10.1038/s41568-021-00431-4.

235. Gómez-Ferrer, M., Amaro-Prellezo, E., Dorronsoro, A., Sánchez-Sánchez, R., Vicente, Á., Cosín-Roger, J., Barrachina, M.D., Baquero, M.C., Valencia, J., and Sepúlveda, P. (2021). HIF-Overexpression and Pro-Inflammatory Priming in Human Mesenchymal Stromal Cells Improves the Healing Properties of Extracellular Vesicles in Experimental Crohn's Disease. Int J Mol Sci *22*, 11269. https://doi.org/10.3390/ijms222011269.

236. Muthu, S., Jeyaraman, M., Kotner, M.B., Jeyaraman, N., Rajendran, R.L., Sharma, S., Khanna, M., Rajendran, S.N.S., Oh, J.M., Gangadaran, P., et al. (2022). Evolution of Mesenchymal Stem Cell Therapy as an Advanced Therapeutic Medicinal Product (ATMP)—An Indian Perspective. Bioengineering (Basel) *9*, 111. https://doi.org/10.3390/bioengineering9030111.

237. Zhou, H., Liu, Y., Zhou, T., Yang, Z., Ni, B., Zhou, Y., Xu, H., Lin, X., Lin, S., He, C., et al. (2024). IL-23 Priming Enhances the Neuroprotective Effects of MSC-Derived Exosomes in Treating Retinal Degeneration. Invest Ophthalmol Vis Sci *65*, 8. https://doi.org/10.1167/iovs.65.10.8.

238. Fernández-Garza, L.E., Barrera-Barrera, S.A., and Barrera-Saldaña, H.A. (2023). Mesenchymal Stem Cell Therapies Approved by Regulatory Agencies around the World. Pharmaceuticals (Basel) *16*, 1334. https://doi.org/10.3390/ph16091334.

239. NEWTON, S., DING, Y., CHUNG, C.-S., CHEN, Y., LOMAS-NEIRA, J.L., and AYALA, A. (2004). Sepsis-Induced Changes in Macrophage Co-Stimulatory Molecule Expression. Surg Infect (Larchmt) *5*, 375–383. https://doi.org/10.1089/sur.2004.5.375.

240. Calligaris, M., Zito, G., Busà, R., Bulati, M., Iannolo, G., Gallo, A., Carreca, A.P., Cuscino, N. Castelbuono, S., Carcione, C., et al. (2024). Proteomic analysis and functional validation reveal distinct therapeutic capabilities related to priming of mesenchymal stromal/stem cells with IFN-γ and hypoxia: potential implications for their clinical use. Front Cell Dev Biol *12*, 1385712. https://doi.org/10.3389/fcell.2024.1385712.

241. Ancans, J. (2012). Cell therapy medicinal product regulatory framework in Europe and its application for MSC-based therapy development. Front Immunol *3*, 253. https://doi.org/10.3389/fimmu.2012.00253.

242. Mebarki, M., Iglicki, N., Marigny, C., Abadie, C., Nicolet, C., Churlaud, G., Maheux, C., Boucher, H., Monsel, A., Menasché, P., et al. (2021). Development of a human umbilical cord-derived mesenchymal stromal cell-based advanced therapy medicinal product to treat immune and/or inflammatory diseases. Stem Cell Res Ther *12*, 571. https://doi.org/10.1186/s13287-021-02637-7.

243. Wynn, R.F., Hart, C.A., Corradi-Perini, C., O'Neill, L., Evans, C.A., Wraith, J.E., Fairbairn, L.J., and Bellantuono, I. (2004). A small proportion of mesenchymal stem cells strongly expresses functionally active CXCR4 receptor capable of promoting migration to bone marrow. Blood *104*, 2643–2645. https://doi.org/10.1182/blood-2004-02-0526.

244. Gardashli, M., Baron, M., Drohat, P., Quintero, D., Kaplan, L.D., Szeto, A., Mendez, A.J., Best, T.M., and Kouroupis, D. (2024). The roles of regulatory-compliant media and inflammatory/oxytocin priming selection in enhancing human mesenchymal stem/stromal cell immunomodulatory properties. Sci Rep *14*, 29438. https://doi.org/10.1038/s41598-024-80050-9.

245. Çopuroğlu, M., Yalçın, Ö.T., and Kara, S.G. (2025). Clinical feasibility and cost efficiency of perinatal mesenchymal stem cell production under GMP conditions. Sci Rep *16*, 2791. https://doi.org/10.1038/s41598-025-32738-9.

246. Najafi, R., and Sharifi, A.M. (2013). Deferoxamine preconditioning potentiates mesenchymal stem cell homing*in vitro*and in streptozotocin-diabetic rats. Expert Opinion on Biological Therapy. https://doi.org/10.1517/14712598.2013.782390.

247. Sarre, C., Contreras-Lopez, R., Nernpermpisooth, N., Barrere, C., Bahraoui, S., Terraza, C., Tejedor, G., Vincent, A., Luz-Crawford, P., Kongpol, K., et al. (2022). PPARβ/δ priming enhances the anti-apoptotic and therapeutic properties of mesenchymal stromal cells in myocardial ischemia–reperfusion injury. Stem Cell Res Ther *13*, 167. https://doi.org/10.1186/s13287-022-02840-0.

248. Seeger, F.H., Rasper, T., Fischer, A., Muhly-Reinholz, M., Hergenreider, E., Leistner, D.M., Sommer, K., Manavski, Y., Henschler, R., Chavakis, E., et al. (2012). Heparin disrupts the CXCR4/SDF-1 axis and impairs the functional capacity of bone marrow-derived mononuclear cells used for cardiovascular repair. Circ Res *111*, 854–862. https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.112.265678.

249. Badraiq H, Cvoro A, Galleu A, Simon M, Miere C, Hobbs C, et al. Effects of maternal obesity on Wharton's Jelly mesenchymal stromal cells. Sci Rep [Internet]. 2017 [cité 7 avr 2026];7:17595. https://doi.org/10.1038/s41598-017-18034-1

250. Shu, L., Niu, C., Li, R., Huang, T., Wang, Y., Huang, M., Ji, N., Zheng, Y., Chen, X., Shi, L., et al. (2020). Treatment of severe COVID-19 with human umbilical cord mesenchymal stem cells. Stem Cell Res Ther *11*, 361. https://doi.org/10.1186/s13287-020-01875-5.

251. Rawat, S., Dadhwal, V., and Mohanty, S. (2021). Dexamethasone priming enhances stemness and immunomodulatory property of tissue-specific human mesenchymal stem cells. BMC Dev Biol *21*, 16. https://doi.org/10.1186/s12861-021-00246-4.

252. Lanzoni, G., Linetsky, E., Correa, D., Messinger Cayetano, S., Alvarez, R.A., Kouroupis, D., Alvarez Gil, A., Poggioli, R., Ruiz, P., Marttos, A.C., 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 Transl Med *10*, 660–673. https://doi.org/10.1002/sctm.20-0472.

253. Furset, G., Fløisand, Y., and Sioud, M. (2008). Impaired expression of indoleamine 2, 3-dioxygenase in monocyte-derived dendritic cells in response to Toll-like receptor-7/8 ligands. Immunology *123*, 263–271. https://doi.org/10.1111/j.1365-2567.2007.02695.x.

254. Garg, A., Khan, S., Luu, N., Nicholas, D.J., Day, V., King, A.L., Fear, J., Lalor, P.F., and Newsome, P.N. (2023). TGFβ1 priming enhances CXCR3-mediated mesenchymal stromal cell engraftment to the liver and enhances anti-inflammatory efficacy. J Cell Mol Med *27*, 864–878. https://doi.org/10.1111/jcmm.17698.

255. Monsel, A., Hauw-Berlemont, C., Mebarki, M., Heming, N., Mayaux, J., Nguekap Tchoumba, O., Diehl, J.-L., Demoule, A., Annane, D., Marois, C., et al. (2022). Treatment of COVID-19-associated ARDS with mesenchymal stromal cells: a multicenter randomized double-blind trial. Crit Care *26*, 48. https://doi.org/10.1186/s13054-022-03930-4.

256. Benvenuto, F., Ferrari, S., Gerdoni, E., Gualandi, F., Frassoni, F., Pistoia, V., Mancardi, G., and Uccelli, A. (2007). Human Mesenchymal Stem Cells Promote Survival of T Cells in a Quiescent State. Stem Cells *25*, 1753–1760. https://doi.org/10.1634/stemcells.2007-0068.

257. Umar, S., Debnath, K., Leung, K., Huang, C.-C., Lu, Y., Gajendrareddy, P., and Ravindran, S. (2024). Immunomodulatory properties of naïve and inflammation-informed dental pulp stem cell derived extracellular vesicles. Front Immunol *15*, 1447536. https://doi.org/10.3389/fimmu.2024.1447536.

258. Sitbon, A., Hauw-Berlemont, C., Mebarki, M., Heming, N., Mayaux, J., Diehl, J.-L., Demoule, A., Annane, D., Marois, C., Demeret, S., et al. (2024). Treatment of COVID-19-associated ARDS with umbilical cord-derived mesenchymal stromal cells in the STROMA-CoV-2 multicenter randomized double-blind trial: long-term safety, respiratory function, and quality of life. Stem Cell Res Ther *15*, 109. https://doi.org/10.1186/s13287-024-03729-w.

259. Pochon C, Laroye C, Kimmoun A, Reppel L, Dhuyser A, Rousseau H, et al. Efficacy of Wharton Jelly Mesenchymal Stromal Cells infusions in moderate to severe SARS-Cov-2 related acute respiratory distress syndrome: a phase 2a double-blind randomized controlled trial. Front Med [Internet]. 2023 [cité 7 avr 2026];10:1224865. https://doi.org/10.3389/fmed.2023.1224865

260. Jeong, J., Park, J.-K., Shin, J., Jung, I., Kim, H.-W., Park, A., Cho, H., Kang, S.-M., Shin, S., Park, E., et al. (2025). Inflammatory cytokine-primed MSC-derived extracellular vesicles ameliorate acute lung injury via enhanced immunomodulation and alveolar repair. Stem Cell Res Ther *16*, 450. https://doi.org/10.1186/s13287-025-04576-z.

261. Matas, J., García, C., Poblete, D., Vernal, R., Ortloff, A., Luque-Campos, N., Hidalgo, Y., Cuenca, J., Infante, C., Cadiz, M.I., et al. (2024). A Phase I Dose-Escalation Clinical Trial to Assess the Safety and Efficacy of Umbilical Cord-Derived Mesenchymal Stromal Cells in Knee Osteoarthritis. Stem Cells Transl Med *13*, 193–203. https://doi.org/10.1093/stcltm/szad088.

262. Kim DH, Yoo KH, Yim YS, Choi J, Lee SH, Jung HL, et al. Cotransplanted Bone Marrow Derived Mesenchymal Stem Cells (MSC) Enhanced Engraftment of Hematopoietic Stem Cells in a MSC-dose Dependent Manner in NOD/SCID Mice. J Korean Med Sci [Internet]. 2006 [cité 7 avr 2026];21:1000. https://doi.org/10.3346/jkms.2006.21.6.1000

263. Brizio, M., Mancini, M., Lora, M., Joy, S., Zhu, S., Brilland, B., Reinhardt, D.P., Farge, D., Langlais, D., and Colmegna, I. (2024). Cytokine priming enhances the antifibrotic effects of human adipose derived mesenchymal stromal cells conditioned medium. Stem Cell Res Ther *15*, 329. https://doi.org/10.1186/s13287-024-03916-9.

264. Vieujean, S., Loly, J.-P., Boutaffala, L., Meunier, P., Reenaers, C., Briquet, A., Lechanteur, C., Baudoux, E., Beguin, Y., and Louis, E. (2022). Mesenchymal Stem Cell Injection in Crohn's Disease Strictures: A Phase I-II Clinical Study. J Crohns Colitis *16*, 506–510. https://doi.org/10.1093/ecco-jcc/jjab154.

265. Rivera-Cruz, C.M., and Figueiredo, M.L. (2023). Evaluation of human adipose-derived mesenchymal stromal cell Toll-like receptor priming and effects on interaction with prostate cancer cells. Cytotherapy *25*, 33–45. https://doi.org/10.1016/j.jcyt.2022.09.009.

266. Wanakumjorn, P., Kimura, K., Castillo, D., McLarty, E., Formaker, R., Qiao, R., Farrell, K., Brostoff, T., Ramarapu, R., Pires, J., et al. (2025). Mesenchymal stem/stromal cell therapy improves immune recovery in a feline model of severe coronavirus infection. Stem Cells Transl Med *14*, szaf025. https://doi.org/10.1093/stcltm/szaf025.

267. Cisneros, B., García-Aguirre, I., Unzueta, J., Arrieta-Cruz, I., González-Morales, O., Domínguez-Larrieta, J.M., Tamez-González, A., Leyva-Gómez, G., and Magaña, J.J. (2022). Immune system modulation in aging: Molecular mechanisms and therapeutic targets. Front. Immunol. *13*. https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.1059173.

268. Chou, L.-Y., Ho, C.-T., and Hung, S.-C. (2022). Paracrine Senescence of Mesenchymal Stromal Cells Involves Inflammatory Cytokines and the NF-κB Pathway. Cells *11*, 3324. https://doi.org/10.3390/cells11203324.

269. Gnani, D., Crippa, S., della Volpe, L., Rossella, V., Conti, A., Lettera, E., Rivis, S., Ometti, M., Fraschini, G., Bernardo, M.E., et al. (2019). An early-senescence state in aged mesenchymal stromal cells contributes to hematopoietic stem and progenitor cell clonogenic impairment through the activation of a pro-inflammatory program. Aging Cell *18*, e12933. https://doi.org/10.1111/acel.12933.

270. Zhou, B., Zhao, Z., Zhang, X., Deng, W., and Li, Y. (2020). Effect of Allogenic Bone Marrow Mesenchymal Stem Cell Transplantation on T Cells of Old Mice. Cell Reprogram *22*, 30–35. https://doi.org/10.1089/cell.2019.0055.

271. Kashirina, D., Matveeva, D., Ezdakova, M., Brzhozovskiy, A., Kononikhin, A., Pastushkova, L., Larina, I., Nikolaev, E., Buravkova, L., and Ratushnyy, A. (2025). Influence of Stress-Induced Senescence on the Secretome of Primary Mesenchymal Stromal Cells. Biomolecules *15*, 1734. https://doi.org/10.3390/biom15121734.

272. Wang, X., Guo, D., He, C., Wang, X., Wei, Y., Zhang, F., Wang, L., and Yang, Y. (2025). Clinical application of mesenchymal stem cells in immunosenescence: a qualitative review of their potential and challenges. Stem Cell Res Ther *16*, 265. https://doi.org/10.1186/s13287-025-04360-z.

273. Cheng, Z., Ou, L., Zhou, X., Li, F., Jia, X., Zhang, Y., Liu, X., Li, Y., Ward, C.A., Melo, L.G., et al. (2008). Targeted Migration of Mesenchymal Stem Cells Modified With CXCR4 Gene to Infarcted Myocardium Improves Cardiac Performance. Molecular Therapy *16*, 571–579. https://doi.org/10.1038/sj.mt.6300374.

274. Siraj, Y., Galderisi, U., and Alessio, N. (2023). Senescence induces fundamental changes in the secretome of mesenchymal stromal cells (MSCs): implications for the therapeutic use of MSCs and their derivates. Front Bioeng Biotechnol *11*, 1148761. https://doi.org/10.3389/fbioe.2023.1148761.

275. IDSA. Surviving Sepsis Campaign Adult Guidelines 2021 [Internet]. [cité 7 avr 2026]. https://www.idsociety.org/practice-guideline/surviving-sepsis-campaign-adult-guidelines-2021/. Consulté le 7 avr 2026

276. Kizilay Mancini, Ö., Lora, M., Shum-Tim, D., Nadeau, S., Rodier, F., and Colmegna, I. (2017). A Proinflammatory Secretome Mediates the Impaired Immunopotency of Human Mesenchymal Stromal Cells in Elderly Patients with Atherosclerosis. Stem Cells Transl Med *6*, 1132–1140. https://doi.org/10.1002/sctm.16-0221.

277. Srzić, I., Nesek Adam, V., and Tunjić Pejak, D. (2022). SEPSIS DEFINITION: WHAT'S NEW IN THE TREATMENT GUIDELINES. Acta Clin Croat *61*, 67–72. https://doi.org/10.20471/acc.2022.61.s1.11.

278. Luk, F., de Witte, S.F.H., Korevaar, S.S., Roemeling-van Rhijn, M., Franquesa, M., Strini, T., van den Engel, S., Gargesha, M., Roy, D., Dor, F.J.M.F., et al. (2016). Inactivated Mesenchymal Stem Cells Maintain Immunomodulatory Capacity. Stem Cells and Development *25*, 1342–1354. https://doi.org/10.1089/scd.2016.0068.

279. Kellum, J.A., Formeck, C.L., Kernan, K.F., Gómez, H., and Carcillo, J.A. (2022). Subtypes and Mimics of Sepsis. Crit Care Clin *38*, 195–211. https://doi.org/10.1016/j.ccc.2021.11.013.

280. Volk, H.D., Reinke, P., Krausch, D., Zuckermann, H., Asadullah, K., Müller, J.M., Döcke, W.D., and Kox, W.J. (1996). Monocyte deactivation--rationale for a new therapeutic strategy in sepsis. Intensive Care Med *22 Suppl 4*, S474-481. https://doi.org/10.1007/BF01743727.

281. Gao, X., Cai, S., Li, X., and Wu, G. (2025). Sepsis-induced immunosuppression: mechanisms, biomarkers and immunotherapy. Front Immunol *16*, 1577105. https://doi.org/10.3389/fimmu.2025.1577105.

282. Meng, S.-S., Xu, X.-P., Chang, W., Lu, Z.-H., Huang, L.-L., Xu, J.-Y., Liu, L., Qiu, H.-B., Yang, Y., and Guo, F.-M. (2018). LincRNA-p21 promotes mesenchymal stem cell migration capacity and survival through hypoxic preconditioning. Stem Cell Res Ther *9*, 280. https://doi.org/10.1186/s13287-018-1031-x.

283. Li H, Jiang Y, Jiang X, Guo X, Ning H, Li Y, et al. CCR7 Guides Migration of Mesenchymal Stem Cell to Secondary Lymphoid Organs: A Novel Approach to Separate GvHD from GvL Effect. Stem Cells [Internet]. 2014 [cité 7 avr 2026];32:1890-903. https://doi.org/10.1002/stem.1656.

284. Pochon C. Immunorégulation de la maladie du Greffon contre l'Hôte (GVH) par les cellules souches mésenchymateuses de la gelée de Wharton : études in vitro et in vivo sur un modèle de GVH chez la souris NSG [Internet] [Doctorat ès Sciences de la vie et de la santé, PhD]. Université de Lorraine; 2022 [cité 7 avr 2026]. https://doi.org/10.70675/1edae8f9zad36z40e7zb49fza590d3a8746a

285. Zhuang, Y., Peng, H., Chen, Y., Zhou, S., and Chen, Y. (2017). Dynamic monitoring of monocyte HLA-DR expression for the diagnosis, prognosis, and prediction of sepsis. Front Biosci (Landmark Ed) *22*, 1344–1354. https://doi.org/10.2741/4547.

286. Sun, X.-F., Luo, W.-C., Huang, S.-Q., Zheng, Y.-J., Xiao, L., Zhang, Z.-W., Liu, R.-H., Zhong, Z.-W., Song, J.-Q., Nan, K., et al. (2025). Immune-cell signatures of persistent inflammation, immunosuppression, and catabolism syndrome after sepsis. Med *6*, 100569. https://doi.org/10.1016/j.medj.2024.12.003.

287. Feng, G., Zheng, K., Cao, T., Zhang, J., Lian, M., Huang, D., Wei, C., Gu, Z., and Feng, X. (2018). Repeated stimulation by LPS promotes the senescence of DPSCs via TLR4/MyD88-NF-κB-p53/p21 signaling. Cytotechnology *70*, 1023–1035. https://doi.org/10.1007/s10616-017-0180-6.

288. Rudd, K.E., Johnson, S.C., Agesa, K.M., Shackelford, K.A., Tsoi, D., Kievlan, D.R., Colombara, D.V., Ikuta, K.S., Kissoon, N., Finfer, S., et al. (2020). Global, regional, and national sepsis incidence and mortality, 1990–2017: analysis for the Global Burden of Disease Study. Lancet *395*, 200–211. https://doi.org/10.1016/S0140-6736(19)32989-7.

289. Roemeling-van Rhijn, M., Reinders, M.E., Franquesa, M., Engela, A.U., Korevaar, S.S., Roelofs, H., Genever, P.G., IJzermans, J.N., Betjes, M.G., Baan, C.C., et al. (2013). Human Allogeneic Bone Marrow and Adipose Tissue Derived Mesenchymal Stromal Cells Induce CD8+ Cytotoxic T Cell Reactivity. J Stem Cell Res Ther *3*, 004. https://doi.org/10.4172/2157-7633.S6-004.

290. Schlosser, K., Wang, J.-P., Dos Santos, C., Walley, K.R., Marshall, J., Fergusson, D.A., Winston, B.W., Granton, J., Watpool, I., Stewart, D.J., 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. Crit Care Med *47*, 918–925. https://doi.org/10.1097/CCM.0000000000003657.

291. Liu, W., Brodsky, A.S., Feng, M., Liu, Y., Ding, J., Jayasuriya, C.T., and Chen, Q. (2021). Senescent Tissue-Resident Mesenchymal Stromal Cells Are an Internal Source of Inflammation in Human Osteoarthritic Cartilage. Front Cell Dev Biol *9*, 725071. https://doi.org/10.3389/fcell.2021.725071.

292. Zhang, J., Akiyama, K., Mun, A.Y., Tagashira, R., Zou, T., Matsunaga, N., Kohno, T., and Kuboki, T. (2024). Age-Related Effects on MSC Immunomodulation, Macrophage Polarization, Apoptosis, and Bone Regeneration Correlate with IL-38 Expression. Int J Mol Sci *25*, 3252. https://doi.org/10.3390/ijms25063252.

293. He, X., Ai, S., Guo, W., Yang, Y., Wang, Z., Jiang, D., and Xu, X. (2018). Umbilical cord-derived mesenchymal stem (stromal) cells for treatment of severe sepsis: aphase 1 clinical trial. Translational Research *199*, 52–61. https://doi.org/10.1016/j.trsl.2018.04.006.

294. Premer, C., Hare, J.M., Yuan, S.Y., and Wilson, J.W. (2025). Mesenchymal stem/stromal cells as a therapeutic for sepsis: a review on where do we stand? Stem Cell Res Ther *16*, 245. https://doi.org/10.1186/s13287-025-04371-w.

295. Česnik, A.B., and Švajger, U. (2024). The issue of heterogeneity of MSC-based advanced therapy medicinal products–a review. Front Cell Dev Biol *12*, 1400347. https://doi.org/10.3389/fcell.2024.1400347.

296. Viswanathan, S., Ciccocioppo, R., Galipeau, J., Krampera, M., Le Blanc, K., Martin, I., Moniz, K., Nolta, J., Phinney, D.G., Shi, Y., et al. (2021). Consensus International Council for Commonality in Blood Banking Automation-International Society for Cell & Gene Therapy statement on standard nomenclature abbreviations for the tissue of origin of mesenchymal stromal cells. Cytotherapy *23*, 1060–1063. https://doi.org/10.1016/j.jcyt.2021.04.009.

297. Samuelsson, H., Ringdén, O., Lönnies, H., and Blanc, K.L. (2009). Optimizing in vitro conditions for immunomodulation and expansion of mesenchymal stromal cells. Cytotherapy *11*, 129–136. https://doi.org/10.1080/14653240802684194.

298. Mebarki, M., Moine-Picard, C., Enjaume-Rauch, R., Laurent-Puig, A., Suissa, A., Feyants, V., Larghero, J., and Cras, A. (2025). Pooling umbilical cord-mesenchymal stromal cells derived from selected multiple donors reduces donor-dependent variability and improves their immunomodulatory properties. Stem Cell Res Ther *16*, 252. https://doi.org/10.1186/s13287-025-04361-y.

299. Vega-Letter, A.M., Kurte, M., Fernández-O'Ryan, C., Gauthier-Abeliuk, M., Fuenzalida, P., Moya-Uribe, I., Altamirano, C., Figueroa, F., Irarrázabal, C., and Carrión, F. (2016). Differential TLR activation of murine mesenchymal stem cells generates distinct immunomodulatory effects in EAE. Stem Cell Research & Therapy *7*, 150. https://doi.org/10.1186/s13287-016-0402-4.

300. Advantages of pooling of human bone marrow-derived mesenchymal stromal cells from different donors versus single-donor MSCs | Scientific Reports https://www.nature.com/articles/s41598-024-62544-8.

301. Kholodenko, I.V., Kholodenko, R.V., Majouga, A.G., and Yarygin, K.N. (2022). Apoptotic MSCs and MSC-Derived Apoptotic Bodies as New Therapeutic Tools. Curr Issues Mol Biol *44*, 5153–5172. https://doi.org/10.3390/cimb44110351.

302. Abbaspour, M., Ghafourian Boroujerdnia, M., Tahoori, M.T., Oraki Kohshour, M., Ghasemi Dehcheshmeh, M., Amirzadeh, S., and Amari, A. (2024). Poly (I:C) increases the expression of *galectin 1, 3, 9* and *HGF* genes in exosomes isolated from human Wharton's jelly mesenchymal stem cells. Heliyon *10*, e35343. https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2024.e35343.

303. Huang, S., Wang, D., Gu, F., Zhang, Z., Deng, W., Chen, W., Tang, X., Yao, G., Feng, X., and Sun, L. (2016). No significant effects of Poly(I:C) on human umbilical cord-derived mesenchymal stem cells in the treatment of B6.MRL-Fas(lpr) mice. Curr Res Transl Med *64*, 55–60. https://doi.org/10.1016/j.retram.2016.03.002.

304. Contreras-Lopez, R., Elizondo-Vega, R., Luque-Campos, N., Torres, M.J., Pradenas, C., Tejedor, G., Paredes-Martínez, M.J., Vega-Letter, A.M., Campos-Mora, M., Rigual-Gonzalez, Y., et al. (2021). The ATP synthase inhibition induces an AMPK-dependent glycolytic switch of mesenchymal stem cells that enhances their immunotherapeutic potential. Theranostics *11*, 445–460. https://doi.org/10.7150/thno.51631.

305. Hänel, G., Angerer, C., Petry, K., Lichtenegger, F.S., and Subklewe, M. (2021). Blood DCs activated with R848 and poly(I:C) induce antigen-specific immune responses against viral and tumor-associated antigens. Cancer Immunol Immunother *71*, 1705–1718. https://doi.org/10.1007/s00262-021-03109-w.

306. Hu, Y., Park-Min, K.-H., Yarilina, A., and Ivashkiv, L.B. (2008). Regulation of STAT pathways and IRF1 during human dendritic cell maturation by TNF-α and PGE2. J Leukoc Biol *84*, 1353–1360. https://doi.org/10.1189/jlb.0107040.

307. Neo, S.H., Her, Z., Othman, R., Tee, C.A., Ong, L.C., Wang, Y., Tan, I., Tan, J., Yang, Y., Yang, Z., et al. (2023). Expansion of human bone marrow-derived mesenchymal stromal cells with enhanced immunomodulatory properties. Stem Cell Res Ther *14*, 259. https://doi.org/10.1186/s13287-023-03481-7.

308. Opitz, C.A., Litzenburger, U.M., Lutz, C., Lanz, T.V., Tritschler, I., Köppel, A., Tolosa, E., Hoberg, M., Anderl, J., Aicher, W.K., et al. (2009). Toll-Like Receptor Engagement Enhances the Immunosuppressive Properties of Human Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stem Cells by Inducing Indoleamine-2,3-dioxygenase-1 via Interferon-β and Protein Kinase R. STEM CELLS *27*, 909–919. https://doi.org/10.1002/stem.7.

309. Khan, I., Zhang, L., Mohammed, M., Archer, F.E., Abukharmah, J., Yuan, Z., Rizvi, S.S., Melek, M.G., Rabson, A.B., Shi, Y., et al. (2014). Effects of Wharton's jelly-derived mesenchymal stem cells on neonatal neutrophils. J Inflamm Res *8*, 1–8. https://doi.org/10.2147/JIR.S71987.

310. Rashedi, I., Gómez-Aristizábal, A., Wang, X.-H., Viswanathan, S., and Keating, A. (2017). TLR3 or TLR4 Activation Enhances Mesenchymal Stromal Cell-Mediated Treg Induction via Notch Signaling. Stem Cells *35*, 265–275. https://doi.org/10.1002/stem.2485.

311. Zhang, P., Wu, P., Khan, U.Z., Zhou, Z., Sui, X., Li, C., Dong, K., Liu, Y., Qing, L., and Tang, J. (2023). Exosomes derived from LPS-preconditioned bone marrow-derived MSC modulate macrophage plasticity to promote allograft survival via the NF-κB/NLRP3 signaling pathway. J Nanobiotechnology *21*, 332. https://doi.org/10.1186/s12951-023-02087-8.

312. Pan, Z.K., Fisher, C., Li, J.-D., Jiang, Y., Huang, S., and Chen, L.-Y. (2011). Bacterial LPS up-regulated TLR3 expression is critical for antiviral response in human monocytes: evidence for negative regulation by CYLD. International Immunology *23*, 357–364. https://doi.org/10.1093/intimm/dxr019.

313. Hu, Z., Li, D., Wu, S., Pei, K., Fu, Z., Yang, Y., Huang, Y., Yang, J., Liu, C., Hu, J., et al. (2024). Unveiling the functional heterogeneity of cytokine-primed human umbilical cord mesenchymal stem cells through single-cell RNA sequencing. Cell Biosci *14*, 40. https://doi.org/10.1186/s13578-024-01219-3.

314. Monguió-Tortajada, M., Franquesa, M., Sarrias, M.-R., and Borràs, F.E. (2018). Low doses of LPS exacerbate the inflammatory response and trigger death on TLR3-primed human monocytes. Cell Death Dis *9*, 499. https://doi.org/10.1038/s41419-018-0520-2.

315. Quero, L., Tiaden, A.N., Hanser, E., Roux, J., Laski, A., Hall, J., and Kyburz, D. (2020). miR-221-3p Drives the Shift of M2-Macrophages to a Pro-Inflammatory Function by Suppressing JAK3/STAT3 Activation. Front Immunol *10*, 3087. https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.03087.

316. Gaytán-Pacheco, N., Ibáñez-Salazar, A., Herrera-Van Oostdam, A.S., Oropeza-Valdez, J.J., Magaña-Aquino, M., Adrián López, J., Monárrez-Espino, J., and López-Hernández, Y. (2022). miR-146a, miR-221, and miR-155 are Involved in Inflammatory Immune Response in Severe COVID-19 Patients. Diagnostics (Basel) *13*, 133. https://doi.org/10.3390/diagnostics13010133.

317. Kuçi, Z., Bönig, H., Kreyenberg, H., Bunos, M., Jauch, A., Janssen, J.W.G., Škifić, M., Michel, K., Eising, B., Lucchini, G., et al. (2016). Mesenchymal stromal cells from pooled mononuclear cells of multiple bone marrow donors as rescue therapy in pediatric severe steroid-refractory graft-versus-host disease: a multicenter survey. Haematologica *101*, 985–994. https://doi.org/10.3324/haematol.2015.140368.

318. Lee, H.-J., Jung, H., and Kim, D.-K. (2021). IDO and CD40 May Be Key Molecules for Immunomodulatory Capacity of the Primed Tonsil-Derived Mesenchymal Stem Cells. Int J Mol Sci *22*, 5772. https://doi.org/10.3390/ijms22115772.

319. Son, T.W., Yun, S.P., Yong, M.S., Seo, B.N., Ryu, J.M., Youn, H.Y., Oh, Y.M., and Han, H.J. (2013). Netrin-1 protects hypoxia-induced mitochondrial apoptosis through HSP27 expression via DCC- and integrin α6β4-dependent Akt, GSK-3β, and HSF-1 in mesenchymal stem cells. Cell Death Dis *4*, e563. https://doi.org/10.1038/cddis.2013.94.

320. Batulan, Z., Pulakazhi Venu, V.K., Li, Y., Koumbadinga, G., Alvarez-Olmedo, D.G., Shi, C., and O'Brien, E.R. (2016). Extracellular Release and Signaling by Heat Shock Protein 27: Role in Modifying Vascular Inflammation. Front Immunol *7*, 285. https://doi.org/10.3389/fimmu.2016.00285.

321. Wei, L., Liu, T.-T., Wang, H.-H., Hong, H.-M., Yu, A.L., Feng, H.-P., and Chang, W.-W. (2011). Hsp27 participates in the maintenance of breast cancer stem cells through regulation of epithelial-mesenchymal transition and nuclear factor-κB. Breast Cancer Res *13*, R101. https://doi.org/10.1186/bcr3042.

322. Jammes, M., Contentin, R., Audigié, F., Cassé, F., and Galéra, P. (2023). Effect of pro-inflammatory cytokine priming and storage temperature of the mesenchymal stromal cell (MSC) secretome on equine articular chondrocytes. Front Bioeng Biotechnol *11*, 1204737. https://doi.org/10.3389/fbioe.2023.1204737.

323. S, I., Fc, P., Ge, K., P, P., Hj, S., Ek, G., and Mh, D. (2006). Immunomodulatory effects of mesenchymal stem cells in a rat organ transplant model. Transplantation *81*. https://doi.org/10.1097/01.tp.0000209919.90630.7b.

324. Murray, P.J., Allen, J.E., Biswas, S.K., Fisher, E.A., Gilroy, D.W., Goerdt, S., Gordon, S., Hamilton, J.A., Ivashkiv, L.B., Lawrence, T., et al. (2014). Macrophage activation and polarization: nomenclature and experimental guidelines. Immunity *41*, 14–20. https://doi.org/10.1016/j.immuni.2014.06.008.

325. Mills, C.D., Kincaid, K., Alt, J.M., Heilman, M.J., and Hill, A.M. (2000). M-1/M-2 macrophages and the Th1/Th2 paradigm. J Immunol *164*, 6166–6173. https://doi.org/10.4049/jimmunol.164.12.6166.

326. Seo, I., Kim, S., Hyun, J., Kim, Y., Park, H.S., Yoon, J., and Bhang, S.H. (2023). Enhancing viability and angiogenic efficacy of mesenchymal stem cells via HSP90α and HSP27 regulation based on ROS stimulation for wound healing. Bioeng Transl Med *8*, e10560. https://doi.org/10.1002/btm2.10560.

327. Kim, D.S., Jang, I.K., Lee, M.W., Ko, Y.J., Lee, D.-H., Lee, J.W., Sung, K.W., Koo, H.H., and Yoo, K.H. (2018). Enhanced Immunosuppressive Properties of Human Mesenchymal Stem Cells Primed by Interferon-γ. eBioMedicine *28*, 261–273. https://doi.org/10.1016/j.ebiom.2018.01.002.

328. Pierini, S., Gabbasov, R., Oliveira-Nunes, M.C., Qureshi, R., Worth, A., Huang, S., Nagar, K., Griffin, C., Lian, L., Yashiro-Ohtani, Y., et al. (2025). Chimeric antigen receptor macrophages (CAR-M) sensitize HER2+ solid tumors to PD1 blockade in pre-clinical models. Nat Commun *16*, 706. https://doi.org/10.1038/s41467-024-55770-1.

329. Chen, X., Gan, Y., Li, W., Su, J., Zhang, Y., Huang, Y., Roberts, A.I., Han, Y., Li, J., Wang, Y., et al. (2014). The interaction between mesenchymal stem cells and steroids during inflammation. Cell Death Dis *5*, e1009. https://doi.org/10.1038/cddis.2013.537.

330. Peng, M., Li, N., Wang, H., Li, Y., Liu, H., Luo, Y., Lang, B., Zhang, W., Li, S., Tian, L., et al. (2025). Macrophages: Subtypes, Distribution, Polarization, Immunomodulatory Functions, and Therapeutics. MedComm (2020) *6*, e70304. https://doi.org/10.1002/mco2.70304.

331. Ozato, K., Tsujimura, H., and Tamura, T. (2002). Toll-like receptor signaling and regulation of cytokine gene expression in the immune system. Biotechniques *Suppl*, 66–68, 70, 72 passim.

332. Xie, Z., Yu, W., Ye, G., Li, J., Zheng, G., Liu, W., Lin, J., Su, Z., Che, Y., Ye, F., et al. (2022). Single-cell RNA sequencing analysis of human bone-marrow-derived mesenchymal stem cells and functional subpopulation identification. Exp Mol Med *54*, 483–492. https://doi.org/10.1038/s12276-022-00749-5.

333. Chen, P., Tang, S., Li, M., Wang, D., Chen, C., Qiu, Y., Fang, Z., Zhang, H., Gao, H., Weng, H., et al. (2022). Single-Cell and Spatial Transcriptomics Decodes Wharton's Jelly-Derived Mesenchymal Stem Cells Heterogeneity and a Subpopulation with Wound Repair Signatures. Adv Sci (Weinh) *10*, 2204786. https://doi.org/10.1002/advs.202204786.

334. Wang, Q., Li, J., Wang, S., Deng, Q., Wang, K., Dai, X., An, Y., Dong, G., Ke, W., Chen, F., et al. (2021). Single-cell transcriptome profiling reveals molecular heterogeneity in human umbilical cord tissue and culture-expanded mesenchymal stem cells. The FEBS Journal *288*, 5311–5330. https://doi.org/10.1111/febs.15834.

335. Zhang, C., Han, X., Liu, J., Chen, L., Lei, Y., Chen, K., Si, J., Wang, T., Zhou, H., Zhao, X., et al. (2022). Single-cell Transcriptomic Analysis Reveals the Cellular Heterogeneity of Mesenchymal Stem Cells. Genomics Proteomics Bioinformatics *20*, 70–86. https://doi.org/10.1016/j.gpb.2022.01.005.

336. Sun, C., Wang, L., Wang, H., Huang, T., Yao, W., Li, J., and Zhang, X. (2020). Single-cell RNA-seq highlights heterogeneity in human primary Wharton's jelly mesenchymal stem/stromal cells cultured in vitro. Stem Cell Res Ther *11*, 149. https://doi.org/10.1186/s13287-020-01660-4.

337. Wang, Z., Chai, C., Wang, R., Feng, Y., Huang, L., Zhang, Y., Xiao, X., Yang, S., Zhang, Y., and Zhang, X. (2021). Single-cell transcriptome atlas of human mesenchymal stem cells exploring cellular heterogeneity. Clin Transl Med *11*, e650. https://doi.org/10.1002/ctm2.650.

338. Li, J., Pan, Y., Yang, J., Wang, J., Jiang, Q., Dou, H., and Hou, Y. (2022). Tumor necrosis factor-α-primed mesenchymal stem cell-derived exosomes promote M2 macrophage polarization via Galectin-1 and modify intrauterine adhesion on a novel murine model. Front Immunol *13*, 945234. https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.945234.

339. Shen, S., Li, Y., Jin, M., Fan, D., Pan, R., Lin, A., Chen, Y., Xiang, L., Zhao, R.C., and Shao, J. (2022). CD4+ CTLs Act as a Key Effector Population for Allograft Rejection of MSCs in a Donor MHC-II Dependent Manner in Injured Liver. Aging Dis *13*, 1919–1938. https://doi.org/10.14336/AD.2022.0314.

340. Chan, W.K., Lau, A.S.-Y., Li, J.C.-B., Law, H.K.-W., Lau, Y.L., and Chan, G.C.-F. (2008). MHC expression kinetics and immunogenicity of mesenchymal stromal cells after short-term IFN-γ challenge. Experimental Hematology *36*, 1545–1555. https://doi.org/10.1016/j.exphem.2008.06.008.

341. Hu, S., Yuan, J., Xu, J., Li, X., Zhang, G., Ma, Q., Zhang, B., Hu, T., and Song, G. (2019). TNF-α and IFN-γ synergistically inhibit the repairing ability of mesenchymal stem cells on mice colitis and colon cancer. Am J Transl Res *11*, 6207–6220.

342. Raicevic, G., Najar, M., Stamatopoulos, B., De Bruyn, C., Meuleman, N., Bron, D., Toungouz, M., and Lagneaux, L. (2011). The source of human mesenchymal stromal cells influences their TLR profile as well as their functional properties. Cell Immunol *270*, 207–216. https://doi.org/10.1016/j.cellimm.2011.05.010.

343. Li, X., Bai, J., Ji, X., Li, R., Xuan, Y., and Wang, Y. (2014). Comprehensive characterization of four different populations of human mesenchymal stem cells as regards their immune properties, proliferation and differentiation. International Journal of Molecular Medicine *34*, 695–704. https://doi.org/10.3892/ijmm.2014.1821.

344. Mei, Y.-B., Zhou, W.-Q., Zhang, X.-Y., Wei, X.-J., and Feng, Z.-C. (2013). Lipopolysaccharides Shapes the Human Wharton's Jelly-Derived Mesenchymal Stem Cells in Vitro. Cellular Physiology and Biochemistry *32*, 390–401. https://doi.org/10.1159/000354446.

345. Obtulowicz, P., Lech, W., Strojek, L., Sarnowska, A., and Domanska-Janik, K. (2016). Induction of Endothelial Phenotype from Wharton's Jelly-Derived MSCs and Comparison of Their Vasoprotective and Neuroprotective Potential with Primary WJ-MSCs in CA1 Hippocampal Region Ex Vivo. Cell Transplant *25*, 715–727. https://doi.org/10.3727/096368915X690369.

346. Ren G, Zhang L, Zhao X, Xu G, Zhang Y, Roberts AI, et al. Mesenchymal Stem Cell-Mediated Immunosuppression Occurs via Concerted Action of Chemokines and Nitric Oxide. Cell Stem Cell [Internet]. 2008 [cité 7 avr 2026];2:141-50. https://doi.org/10.1016/j.stem.2007.11.014.

347.Zorova LD, Kovalchuk SI, Popkov VA, Chernikov VP, Zharikova AA, Khutornenko AA, et al. Do Extracellular Vesicles Derived from Mesenchymal Stem Cells Contain Functional Mitochondria? IJMS [Internet]. 2022 [cité 11 mai 2026];23:7408. https://doi.org/10.3390/ijms23137408.

348. Zhao M, Liu S, Wang C, Wang Y, Wan M, Liu F, et al. Correction to "Mesenchymal Stem Cell-Derived Extracellular Vesicles Attenuate Mitochondrial Damage and Inflammation by Stabilizing Mitochondrial DNA". ACS Nano [Internet]. 2021 [cité 11 mai 2026];15:20692-20692. https://doi.org/10.1021/acsnano.1c09895.

349. Yang L-Y, Huang M, Zheng X-L, Liu M-X, Wu Q-B, Fan X-X. Biomimetic universal CAR-mesenchymal stem cell nanohybrids for anti-tumor therapy. Bioactive Materials [Internet]. 2026 [cité 10 août 2026];57:267-83. https://doi.org/10.1016/j.bioactmat.2025.11.004.

Résumé : Les Cellules Souches/Stromales Mésenchymateuses (MSC) présentent d'importantes capacités d'immunomodulation, faisant de ces cellules une cible de choix en recherche. Les CSM habituellement décrites comme des cellules immunosuppressives ont été largement étudiées pour leur capacité à inhiber une réaction inflammatoire excessive. Cependant, plus récemment, il a été montré que les CSM, à l'image des macrophages, présentaient deux phénotypes immunitaires : l'un pro-inflammatoire appelé CSM1 et l'autre anti-inflammatoire dit CSM2. Si l'intérêt des CSM2 dans des pathologies inflammatoires a déjà été montré, les CSM1 immunostimulantes auraient, elles aussi, un rôle à jouer dans des pathologies où réside une anergie immunitaire ou une immunoparalysie. *In vitro*, un préconditionnement cellulaire permettrait d'obtenir ces deux phénotypes. Ainsi, ce projet a eu pour objectif d'obtenir des CSM1 après préconditionnement de CSM de la gelée de Wharton (GW) par du LPS ou du R848 ou des CSM2 par du Poly I :C ou de l'IFNγTNFα. Après caractérisations phénotypiques et fonctionnelles des CSM, il a été montré que les préconditionnements utilisés ne permettaient pas l'obtention stricte de CSM1 ou de CSM2. Les CSM maintenaient une plasticité immunitaire à l'image des CSM préconditionnées avec de l'IFNγTNFα, préconditionnement pourtant largement décrit pour induire un phénotype anti-inflammatoire, capables de s'adapter à leur environnement afin d'exercer une action pro- ou anti-inflammatoire. Le maintien de cette plasticité permettrait aux CSM fonctionnalisées de conserver des capacités d'adaptation au contexte inflammatoire, constituant un véritable atout en thérapie cellulaire. **Mots-clés :** CSM, préconditionnement, caractérisation, immunomodulation, plasticité.

Abstract: Mesenchymal Stem/Stromal Cells (MSC) present important immunomodulatory capacities, that's why they are targeted in research. MSC described as immunosuppressive cells have been well studied thanks to their capacity of inhibiting excessive inflammatory response. However, it has been shown that MSC, as macrophages, had two immune phenotypes named pro-inflammatory MSC1 and anti-inflammatory MSC2. If the impact of MSC2 has been shown in inflammatory diseases, immunostimulatory MSC1 would be very interesting in diseases with immune anergy or immunoparalysis. *In vitro*, priming described as biochemical, mechanic or environmental stimulation could enable the obtention of these two immune phenotypes. The objective of this study was the obtention of MSC1 phenotype by priming MSC from Wharton's Jelly (WJ) with LPS or R848 or the obtention of MSC2 by priming MSC with Poly I:C or IFNγTNFα. After phenotypic and functional characterizations, it has been shown that the obtention of MSC1 or MSC2 is not complete under priming conditions used in this study. MSC maintained their immune plasticity after priming notably like MSC primed with IFNγTNFα known to induce anti-inflammatory phenotype. MSC plasticity can be a real advantage in cell therapy, by their adaptation to inflammatory context. **Keywords:** MSC, priming, characterization, immunomodulation, plasticity.