

Université de Montréal

**Thérapie cellulaire pour le glaucome: régénération
tissulaire grâce aux cellules souches mésenchymateuses**

par Renaud Manuguerra-Gagné

Département de Sciences Biomédicales
Faculté de médecine

Thèse présentée à la Faculté des études supérieures
en vue de l'obtention du grade de Philosophiae Doctor, Ph.D.
en sciences biomédicales

Mars 2016

© Renaud Manuguerra-Gagné, 2016

Résumé

Les cellules souches ont été présentées comme la clé d'une médecine régénératrice, où la réparation d'un organe, la guérison de maladies dégénératives et la création de nouveaux tissus seraient des objectifs réalisables à court ou moyen terme. Les cellules souches isolées chez un adulte ont un certain degré de spécialisation limitant leur potentiel à leur organe d'origine. Mais l'une d'elles, la cellule souche mésenchymateuse (MSC), possède une versatilité qui en fait une candidate idéale pour plusieurs traitements. Il est communément accepté que les MSC exercent leur effet grâce à la production de facteurs solubles. Toutefois, leur mécanisme d'action reste jusqu'à maintenant imprécis.

Ces facteurs ayant le potentiel d'agir dans plusieurs maladies dégénératives, nous avons voulu évaluer leur effet régénératif dans l'une des maladies oculaires les plus répandues, le glaucome à angle ouvert. Cette maladie est caractérisée par une destruction des cellules ganglionnaires de la rétine suite à une élévation de la pression intraoculaire. Cette hausse de pression est souvent engendrée par une dysfonction du trabéculum, le tissu régulant la sortie de l'humeur aqueuse de l'œil.

Actuellement, la progression du glaucome peut être contrôlée, mais la maladie ne peut pas être guérie. Or la régénération du trabéculum pourrait arrêter la progression de la maladie et même renverser le processus. Ainsi, l'objectif de cette thèse était de vérifier si les MSC ont le potentiel de favoriser la régénération oculaire dans des cas de glaucome et de comprendre les mécanismes sous-jacents. Pour ce faire, nous avons injecté des MSC ou leurs facteurs sécrétés dans un modèle de glaucome induit par trabéculoplastie laser. Nous avons démontré que les MSC peuvent régénérer le trabéculum endommagé et abaisser la pression oculaire en réactivant des cellules progénitrices dans le corps ciliaire. Ces cellules prolifèrent et s'implantent dans le trabéculum une semaine après le traitement. Nous avons aussi démontré que les facteurs produits par les MSC cultivées en conditions hypoxiques induisent l'activation des cellules progénitrices. Par contre, les MSC cultivées dans un environnement normoxique n'induisent pas cet effet.

Nous avons aussi observé que les facteurs produits dans des conditions hypoxiques sont incapables de réactiver les cellules progénitrices ex vivo. Nous avons donc voulu vérifier si d'autres facteurs régénératifs sont engendrés in situ suite à l'injection des MSC. Nous avons ainsi découvert qu'un facteur produit par les macrophages migrant dans la zone endommagée permet de réguler l'activation des cellules progénitrices. Cette production requiert cependant une exposition des macrophages aux facteurs paracrines des MSC. Nous avons aussi observé que l'effet régénératif des MSC était inhibé suite à l'élimination des macrophages de l'organisme. Ceci positionne les macrophages comme un intermédiaire essentiel de l'effet régénératif exercé par les MSC.

Les résultats présentés dans cette thèse constituent une avancée importante pour l'utilisation des MSC en médecine régénératrice. Ils ont permis d'établir les bases d'un traitement potentiel pour le glaucome à angle ouvert et d'ajouter une pièce importante à la compréhension des mécanismes régénératifs des MSC. Ces connaissances devraient avoir un impact significatif sur la régénération du tissu oculaire et de plusieurs autres organes.

Mots-clés : Cellules souches mésenchymateuses, Glaucome à angle ouvert, régénération oculaire, trabéculum, macrophages, facteurs paracrines

Abstract

Stem cells have been presented as the key to regenerative medicine, where organ repair, cures for degenerative diseases and even the creation of new tissue could be achieved. Adult stem cells already possess a certain level of differentiation, which limits their potential effect to the organ where they were isolated. But one subtype, mesenchymal stem cells (MSC), possess a versatility which makes them ideal candidates for many treatments. It is commonly accepted that MSCs exert their effect through paracrine factors, but their precise mechanism of action remains uncertain.

As such factors could have a positive effect in many degenerative diseases, we wanted to study their regenerative potential in one of the most widespread ocular disease, open angle glaucoma. This disease is characterised by the destruction of retinal ganglion cells following a rise in intraocular pressure. This pressure rise is mostly caused by a dysfunction of the trabecular meshwork, the tissue regulating the outflow of aqueous humor from the eye.

Glaucoma progression can currently be controlled, but the disease cannot be cured. Meanwhile, trabecular regeneration could halt and even reverse disease progression. Thus, the objective of this thesis is to evaluate MSC potential in the regeneration of the trabecular meshwork and to understand any underlying mechanisms. To this end, we injected MSC or their secreted factors in a model of trabeculoplasty induced glaucoma. We demonstrated that MSC can regenerate the damaged trabeculum and lower ocular pressure by reactivating progenitor cells located in the ciliary body. These cells proliferate and restore the trabeculum within one week after the initial treatment. We also demonstrated that MSC factors produced under hypoxic conditions induce progenitor cell activation. Such activation does not occur with MSC factors produced under normoxic conditions.

We have also observed that factors produced under hypoxic conditions are incapable of reactivating progenitor cells in an *ex vivo* setting. Thus, we wanted to verify if any other regenerative factors are produced *in vivo* after MSC injection. We have discovered that

macrophages produce one such factor after their migration in the area of damage. Production of the macrophage factor requires contact with MSC paracrine factors. We have also observed that MSC regeneration was completely blocked following macrophage elimination from the organism. This positions macrophages as an essential intermediate in MSC-mediated tissue regeneration.

The results presented in this thesis represent an important step forward for the use of MSC in regenerative medicine. They have established a basis for an open angle glaucoma treatment and added an important element for the comprehension of MSC regenerative mechanisms. This knowledge should have a significant impact for the treatment of ocular diseases and other illnesses in many different organs.

Keywords: Mesenchymal stem cells, Open angle glaucoma, ocular regeneration, trabecular meshwork, macrophages, paracrine factors

Table des matières

Résumé.....	i
Abstract.....	iii
Table des matières.....	v
Liste des figures.....	vii
Liste des abréviations.....	viii
Remerciements.....	xi
Chapitre 1 : Introduction.....	1
1.1 Historique.....	3
1.2 Les cellules souches.....	5
1.2.1 La cellule souche embryonnaire.....	5
1.2.2 Les cellules souches adultes.....	10
1.3 La cellule souche mésenchymateuse : une cellule souche adulte avec un grand potentiel en médecine régénératrice.....	15
1.3.1 La MSC, une cellule souche impliquée dans l'homéostasie des CSH.....	15
1.3.2 La MSC en thérapie cellulaire : utilisation dans la régénération tissulaire.....	19
1.3.3 Les macrophages : Une cellule clé de la réparation tissulaire.....	31
1.3.4 L'effet paracrinien des MSC : comment le potentialiser en thérapie cellulaire ?....	34
1.3.5 Les MSC en clinique.....	35
1.4 L'œil et le glaucome à angle ouvert.....	37
1.4.1 L'œil : Organisation et description.....	37
1.4.2 La dynamique de l'humeur aqueuse.....	40
1.4.3 Le Glaucome.....	42
1.4.4 Les traitements contre le glaucome.....	49
1.4.5 Les cellules souches oculaires et la régénération tissulaire.....	52
Raisonnement, Hypothèse et Objectifs.....	58
Chapitre 2 : Article 1.....	60

2.1 Transplantation of Mesenchymal Stem Cells Promotes Tissue Regeneration in a Glaucoma Model through Laser-induced Paracrine Factor Secretion and Progenitor Cell Recruitment.....	61
2.2 Abstract.....	63
2.4 Material and Methods.....	66
2.5 Results.....	72
2.6 Discussion.....	82
2.7 Acknowledgments.....	86
2.8 References.....	86
2.9 Figures.....	94
Chapitre 3: Article 2.....	109
3.1 Mesenchymal stem cells promote ocular regeneration through macrophage recruitment in a paracrine factor dependent mechanism.....	110
3.2 Abstract.....	111
3.3 Introduction.....	112
3.4 Methods.....	113
3.5 Results.....	121
3.6 Discussion.....	128
3.7 Acknowledgements.....	133
3.8 References.....	133
3.9 Figures.....	139
Chapitre 4: Discussion.....	146
4.1 Méthode d'induction du glaucome : la photocoagulation laser.....	147
4.2 Les MSC en thérapie cellulaire pour le glaucome : mécanismes d'action.....	149
4.3 Collaboration des macrophages dans la régénération.....	155
4.4 Transfert vers la clinique.....	157
4.5 Modèle proposé des mécanismes de régénération par les MSC.....	161
Conclusion.....	163
Bibliographie.....	i

Liste des figures

Figure 1 : Origine des cellules souches.....	6
Figure 2 : Les étapes de la guérison tissulaire.....	21
Figure 3 : Le pouvoir anti-inflammatoire des MSC	27
Figure 4 : La structure de l'œil.....	39
Figure 5 : Le Trabéculum	41
Figure 6 : Impact du glaucome	43
Figure 7 : Modèle.....	162

Liste des abréviations

AH: Humeur aqueuse
Ang: angiopoietin
APLNR: apeline
BDNF: brain derived neurotrophic factor
BMP: Bone morphogenic protein
CCL: CC chemokine ligand
CNTF: ciliary derived neurotrophic factor
CD: cluster of differentiation
CFU-F: colony forming unit - fibroblast
CM: conditioned media
c-Myc: cellular myelocytomatosis oncogene
CPA: cellule présentatrice d'antigène
CSH: cellule souche hématopoïétique
CXCL: chemokine CXC ligand
DC: dendritic cell
DMLA: dégénérescence maculaire liée à l'âge
ECM: matrice extra cellulaire
EGF: epidermal growth factor
ESC: cellule souche embryonnaire
FGF: fibroblast growth factor
GDNF: glial cell line-derived neurotrophic factor
GvHD: graft versus host disease
HGF: hepatocyte growth factor
HLA: human leucocyte antigen
HO: hème-oxygénase
IDO: indoleamine 2,3-dioxygénase
IGF: insulin-like growth factor
IL: interleukine
INF: interferon
iNOS: oxyde nitrique synthétase
IPS: cellule souche pluripotente induite
Klf4: Krüppel-like factor
MIP: macrophage inflammatory protein
mmHg: millimètre de mercure
MMP: metalloproteinase
MSC: cellule souche mésenchymateuse
NE: norepinephrine
NGF: nerve growth factor

NK: natural killer cell
NSC: cellule souche neurale
Oct4: octamer-binding transcription factor
OPTN: optineurin
PAI: plasminogen activator inhibitor
PAX: paired box protein
PDGF: Platelet Derived Growth Factor
PD-L1: Programmed cell death protein 1 ligand
PGE: prostaglandin E
PLGF: Placental Growth Factor
POAG: primary open angle glaucoma
PPAR: peroxisome proliferator-activated receptors
RPE: retinal pigmented epithelium
SCF: stem cell factor
SDF: stromal derived factor
Sox2: sex determining region Y box 2
SSEA: Stage Specific Embryonic Antigens
TGF: Transforming Growth Factor
Thy: thymocyte differentiation antigen
TM: trabecular meshwork
TNF: tumor necrosis factor
TRA: transcription associated protein
VCAM: vascular cell adhesion molecule
VEGF: vascular endothelial growth factor

It's dangerous to go alone!
-Vieux sage dans une caverne

The cake is a lie
-Un scientifique inconnu

Remerciements

Je voudrais tout d'abord remercier mes directeurs de thèse, les Drs Denis-Claude Roy et Mark Lesk. Vous m'avez fait confiance dès le début et m'avez toujours soutenu dans mes travaux, même quand je commettais des erreurs qui me ramenaient loin en arrière. Mais vous avez surtout été les premiers à m'apprendre que je devais non pas simplement présenter mes résultats de recherche, mais plutôt les raconter comme une histoire. Une leçon qui m'est très utile aujourd'hui.

Je voudrais ensuite remercier tous les membres de mon laboratoire. Durant toutes ces années, vous m'avez aidé à avancer et j'ai été heureux de vous considérer tous comme mes amis. Merci d'avoir survécu à la boule de stress perpétuel qui parcourait souvent le laboratoire en panique et en clamant que l'expérience du moment était foutue. Il en va de même pour tous mes laboratoires d'adoption où j'allais chercher informations, conseils et parfois une excuse pour procrastiner. Merci aussi à tout le personnel de soutien du centre de recherche, spécialement Martine à la cytométrie lors de mes « facs annuels » ainsi que tout le personnel de l'animalerie qui a pris soin de mes animaux. Content de vous avoir présenté votre espèce de rat préféré!

Je dois surtout remercier ma blonde. Je ne serais pas où je suis aujourd'hui sans ton soutien, ton amour... et tes suggestions de concours! Il en est de même pour mes amis de longue date. Merci de m'avoir permis de me rappeler qu'il y a une vie en dehors de la recherche!

Finalement, je ne pourrai jamais assez remercier mes parents pour avoir aidé l'enfant distrait que j'étais à devenir un adulte... toujours aussi distrait. Vous avez toujours été là pour moi, si bien qu'au début je n'étais pas certain lesquels de nous étaient au doctorat. Vous m'avez toujours poussé au-delà des limites que je m'imposais et m'avez donné la meilleure des bases qu'une personne pourrait avoir pour commencer sa vie. Je suis fier d'être votre fiston!

Chapitre 1 : Introduction

My thesis is written in



WWW.PHDCOMICS.COM

Tiré de www.phdcomics.com

Le corps humain est remarquablement bien équipé lorsque vient le temps de guérir rapidement d'une blessure. Toutefois, bien que les plaquettes, les fibroblastes ou d'autres cellules locales soient en mesure d'éviter les pertes de sang et de remplacer les cellules perdues, elles ne peuvent pas toujours permettre d'en récupérer les fonctions. Même en l'absence de blessures, des maladies dégénératives peuvent endommager progressivement un organe dont les tissus ne seront pas renouvelés par la suite. Durant les dernières années, l'utilisation des cellules souches a offert la promesse de la régénération complète d'un organe, que ce soit en créant du nouveau tissu ou en lui permettant de guérir plus efficacement. Parmi celles-ci, l'une des plus prometteuses est la cellule souche mésenchymateuse. Cette dernière possède une multitude de fonctions qui en font une cellule idéale en médecine régénératrice. Elle peut se différencier afin de remplacer des os, du cartilage et d'autres tissus de soutien du corps. Elle produit des facteurs aux propriétés anti-apoptotiques, anti-inflammatoires, anti-fibrotiques ou capables de favoriser la néo vascularisation. Elle peut même activer ou préserver des cellules progénitrices locales. Ces propriétés des MSC sont particulièrement intéressantes pour le traitement de nombreuses maladies dégénératives.

Les maladies dégénératives et les défaillances d'organes sont en constante augmentation au Canada, notamment dû au vieillissement de la population. Selon l'Agence de Santé publique du Canada, 89% des Canadiens âgés de plus de 65 ans en 2011 souffraient d'au moins une maladie chronique, qu'il s'agisse de maladies cardiaques, de diabète, de dégénérescences neuronales ou d'un cancer. La prévalence de toutes ces maladies combinées a haussée de 14% par année durant la dernière décennie, et il n'y a présentement aucun signe de ralentissement de cette tendance!

Avec plus d'un demi-million de Canadiens atteints, le glaucome à angle ouvert se trouve parmi les maladies chroniques les plus courantes et cause une perte graduelle de la vision pouvant mener jusqu'à la cécité. Comme toutes les maladies dégénératives, elle affecte plus souvent les personnes plus âgées, avec une prévalence de 2,7% chez les 40 ans et plus qui augmente à 11% chez les personnes de plus de 80 ans (1). On estime que jusqu'à 80 millions de personnes à travers le monde en seront affectés en 2020 (2). Bien que des médicaments (comme des bêtabloquants ou des prostaglandines), des traitements chirurgicaux ou la trabéculoplastie au laser induisent une baisse de pression et retardent la progression du glaucome, toute fraction de la vision perdue ne pourra jamais être récupérée. Pouvoir régénérer les parties de l'œil responsables de cette maladie serait extrêmement intéressant puisque cela fournirait une solution thérapeutique curative. C'est pourquoi nous nous sommes intéressés à l'utilisation de cellules souches, plus précisément des cellules souches mésenchymateuses, afin d'élaborer une thérapie cellulaire pour le glaucome à angle ouvert. Dans cette introduction de thèse, nous passerons d'abord en revue ce qui est connu sur les cellules souches et les MSC. Par la suite, nous décrirons le développement du glaucome à angle ouvert, ses conséquences et ses remèdes actuels. Enfin, nous verrons brièvement la démarche à appliquer pour étendre les thérapies utilisant les MSC au glaucome.

1.1 Historique

Le concept de la cellule souche est une idée qui a beaucoup évolué dans le temps. Les premières observations apparaissent durant la deuxième moitié du 19e siècle, en Allemagne. Des chercheurs, tels qu'Ernst Haeckel ou Julius Cohnheim, pensent qu'il existe une hiérarchie

dans le corps et que toutes les cellules différenciées proviennent d'une cellule « souche » originelle (3, 4). L'hypothèse selon laquelle les cellules capables de produire les éléments nécessaires à la guérison d'une blessure pourraient se trouver dans la moelle osseuse commence à germer à la même époque.

Il faudra attendre 1908 pour que le scientifique russe Alexander Maximow, après observation de cellules de moelle osseuse, propose l'existence d'une « cellule souche » indifférenciée qui serait à l'origine de toutes les cellules sanguines (4). Cette hypothèse ne sera confirmée qu'un demi-siècle plus tard grâce aux travaux de deux scientifiques Canadiens, James Till et Ernest McCulloch. Ils ont découvert qu'il était possible de maintenir en vie puis de guérir une souris dont la moelle osseuse a été irradiée en lui transplantant des cellules de moelle osseuse provenant d'une souris contrôle (5). Ils ont également montré que la moelle injectée générait différents types de colonies au niveau de la rate. Cette découverte a permis d'identifier la cellule souche hématopoïétique (CSH), la cellule qui engendre toutes les cellules sanguines, des globules rouges, aux cellules immunitaires les plus spécialisées (6). Ces études ont aussi permis d'identifier les deux principales caractéristiques d'une cellule souche : la capacité de s'autorenouveler et la capacité d'engendrer des progéniteurs différenciés.

À partir des années 80, les scientifiques tentent de prouver que la CSH n'est pas unique et que d'autres variantes de cellules souches sont localisées ailleurs que dans la moelle osseuse. On assiste ainsi à la découverte de plusieurs types de cellules comme la cellule souche mésenchymateuse en 1974 (7), la cellule souche embryonnaire (ESC) en 1981 (8), la

cellule souche neuronale en 1992 (9), ou encore la cellule souche rétinienne en 2000 (10). Ces découvertes ont mené à l'idée que des cellules souches, à différents degrés de spécialisation, assurent le renouvellement naturel des cellules de notre corps et peuvent être retrouvées dans presque tous les organes.

1.2 Les cellules souches

La cellule souche est une cellule immature ou indifférenciée, un réservoir pour la production de nouvelles cellules. Elles sont principalement caractérisées par leur potentiel clonogénique et leur habilité de différenciation en un grand nombre de cellules distinctes (11). Il existe deux grandes catégories de cellules souches : les cellules indifférenciées provenant du stade embryonnaire ou les cellules plus spécialisées retrouvées dans différents organes chez l'adulte (4). Ces populations sont distinctes non seulement par leur niveau de développement, mais aussi par leur localisation, leurs marqueurs membranaires et leur capacité de différenciation.

1.2.1 La cellule souche embryonnaire

La cellule initiale est totipotente et peut recréer un organisme en entier. C'est la cellule que l'on retrouve peu de temps après la fécondation d'un ovule par un spermatozoïde. Après quelques jours de division, on peut retrouver des cellules considérées comme pluripotentes : les cellules souches embryonnaires (**Figure 1 A**). Celles-ci sont capables de créer n'importe

quel tissu du corps. Contrairement aux cellules totipotentes, si on les isole, elles seraient incapables de recréer un organisme entier par elles-mêmes (12).

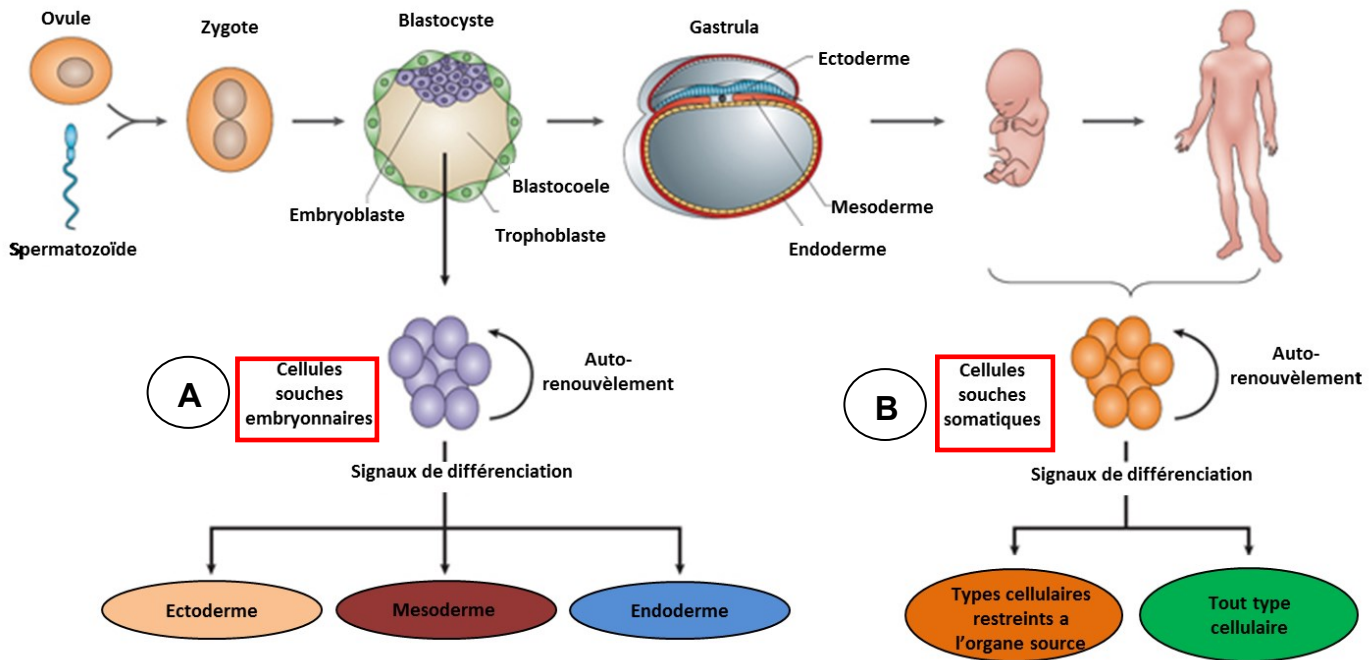


Figure 1 : Origine des cellules souches. Tiré de (13)

A. Cellules souches embryonnaires provenant du blastocyste

B. Cellules souches adultes, formées durant le développement fœtal et présentes dans le corps adulte

Les ESC peuvent être isolées à partir d'un blastocyste, la structure cellulaire que l'on retrouve au 5^e jour après la fécondation (14). Le blastocyste est composé de deux segments : le trophoblaste, qui va créer le placenta et le cordon ombilical, et la masse cellulaire interne, qui est composée de cellules souches embryonnaires qui formeront l'embryon. Lorsque mises en culture, les cellules du blastocyste développent une structure nommée «corps embryonnaire». Cette structure peut générer des cellules que l'on retrouve normalement dans l'endoderme, le

mésoderme et l'ectoderme, les trois grands feuillets embryonnaires qui sont à la base de toutes les cellules de l'organisme. Il est ensuite possible de dissocier cette structure et d'en isoler les cellules ayant le potentiel de différenciation recherché. Toutefois, cette méthode est très aléatoire, et laisse peu de place à la reproductibilité. Il est maintenant possible de guider le développement des ESC vers le phénotype désiré, permettant ainsi la production de progéniteurs pour un grand nombre de tissus (15, 16). Les méthodes développées impliquent des co-cultures avec des cellules nourricières possédant des propriétés facilitant la différenciation ou des traitements avec des cytokines ou des facteurs de croissance importants lors du développement embryonnaire dans ses différentes composantes tissulaires.

Les cellules souches embryonnaires sont hétérogènes lorsque mises en culture. Plusieurs facteurs sont donc utilisés pour les identifier ainsi que pour reconnaître leur niveau de différenciation. Parmi les marqueurs de surface, on retrouve des glycolipides importants pour la signalisation cellulaire et spécialement nommés à des fins d'identification d'ESC, les Stage Specific Embryonic Antigens (SSEA3/4) (17). D'autres protéines de surface sont utilisées pour compléter leur identification tel que TRA-1-60 et TRA-1-80, Thy-1, CD9 et Human Leukocyte Antigen-1 (HLA) en plus de l'expression des facteurs de transcription Octamer $\frac{3}{4}$ (Oct4), Sry box-containing gene 2 (Sox2) et NANOG (18). Ces trois facteurs sont essentiels à la cellule souche embryonnaire, non seulement pour le maintien de la cellule à l'état pluripotent, mais aussi pour son autorenouvellement et sa prolifération. De plus, un changement d'expression au niveau d'un de ces trois facteurs va orienter la cellule vers une différenciation en cellule de l'endoderme, du mésoderme ou de l'ectoderme (19).

Ces cellules sont présentement utilisées en recherche de deux façons : pour la création de nouveaux tissus à des fins de médecine régénératrice et pour l'étude du développement cellulaire. Ces deux champs sont interreliés, la création d'un nouveau tissu étant dépendante de notre compréhension des étapes du développement cellulaire. Presque tous les types tissulaires (la peau, les neurones, le muscle cardiaque, etc.) ont été étudiés à des fins de production *in vitro*, mais celui ayant reçu le plus d'attention est la production en laboratoire de sang à partir d'ESC. Bien que ces études semblent sur la bonne voie, la production de cellules au phénotype adulte est difficile. C'est le cas pour les globules rouges adultes produits *in vitro* qui continuent d'exprimer l'hémoglobine fœtale au lieu de la β -globuline adulte (17-(20). Ceci montre que notre compréhension du développement cellulaire est encore à parfaire avant que de telles techniques ne soient applicables cliniquement. De plus, trois autres problèmes majeurs empêchent l'utilisation de ces cellules souches embryonnaires. Le premier est sécuritaire, car l'utilisation de ces cellules engendre le risque de développement de tératomes, une tumeur composée de tous les feuilletts embryonnaires assemblés de manière anarchique (21). Le deuxième implique un phénomène de rejet, puisque les ESC sont obligatoirement différentes des cellules du receveur, ce qui force le patient à utiliser des immunosuppresseurs (22). Le dernier est d'ordre éthique, car l'obtention des ESC implique l'utilisation d'un embryon, ce qui laisse place à un tout autre débat (23).

Pour contourner ces différents problèmes, des chercheurs se sont tournés vers la production de cellules souches pluripotentes induites (IPS). Générées pour la première fois en 2006 par Takahashi et Yamanaka (24), ce sont des cellules ayant le même potentiel de différenciation que les ESC, mais obtenues à partir de cellules adultes différenciées, comme

des fibroblastes ou des cellules de la peau. L'obtention d'IPS nécessite une reprogrammation génétique pour ramener la cellule cible à un état indifférencié pluripotent. Ceci se fait par l'implantation de 4 facteurs : Oct4, Sox2, Krüppel-like factor 4 (Klf4), et cellular myelocytomatosis oncogene (c-Myc) (24, 25). Les techniques permettant leur création se sont raffinées avec le temps et il est maintenant possible de remplacer certains facteurs par des molécules chimiques ou d'obtenir des intermédiaires cellulaires qui ont un potentiel de différenciation semblable aux IPS, mais qui sont moins difficiles à générer (26). À partir des IPS, il est possible d'obtenir différents types de progéniteurs ou de cellules matures avec les mêmes procédés que pour les ESC (27). Il a aussi été démontré que les IPS ont un potentiel régénératif semblable aux ESC dans des modèles animaux *in vitro* lorsque les IPS sont produites dans de bonnes conditions (28). Toutefois, le risque de tératome reste présent avec les IPS, et, à notre connaissance, aucune étude n'utilise présentement ces cellules directement chez l'humain.

La possibilité de créer des cellules souches pluripotentes à partir de n'importe quel tissu a permis une nouvelle approche en recherche : la modélisation personnalisée de maladies. En créant des IPS à partir de cellules de peau de patients atteints d'une maladie dégénérative d'origine génétique, il est possible de différencier la cellule vers le tissu atteint par la maladie et d'observer sa progression en direct *in vitro* (29). Ceci permet une compréhension plus poussée du lien gène - phénotype - maladie, ainsi que d'évaluer en laboratoire l'effet de traitements expérimentaux pour des maladies dégénératives sans incommoder le patient. Des maladies comme l'amyotrophie spinale et la dysotonie familiale, des dégénérescences

musculaires, ont été répliquées *in vitro* avec succès grâce à ces cellules et ont mené à une meilleure compréhension de leur développement (30, 31).

1.2.2 Les cellules souches adultes

Durant le développement fœtal, les cellules embryonnaires vont progressivement disparaître au profit de cellules de plus en plus spécialisées à mesure que les différents segments du corps prennent forme. C'est dans les différents organes en développement que vont s'établir les groupes de cellules souches dites multipotentes (**Figure 1 B**). Ces cellules possèdent les mêmes caractéristiques fondamentales que les ESC : la capacité de s'autorenouveler et celle de générer des cellules capables de se différencier en de multiples types cellulaires. Toutefois, ces capacités sont plus restreintes que chez les ESC. Leur nombre de divisions est limité et leur différenciation est restreinte à certaines lignées cellulaires selon le tissu auquel elles appartiennent (32). On suppose que tous les organes du corps possèdent une population de cellules souches adulte qui leur est propre. Dans la plupart des organes, les cellules souches adultes seront actives durant toute la vie. Elles produiront constamment de nouvelles cellules pour assurer le renouvellement tissulaire, comme on peut le constater au niveau de la peau, de la cornée, de l'intestin ou de la moelle osseuse (33-35). Dans d'autres organes, ces cellules sont particulièrement actives après la naissance, mais entrent ensuite en dormance. On les retrouve dans des organes ayant un renouvellement cellulaire lent ou quasi inexistant, tel que le cerveau ou le foie, où les cellules souches ne se divisent que très rarement ou lors de blessures graves (36, 37).

Bien que leur phénotype et leur rôle varient beaucoup, toutes les cellules souches adultes ont en commun la nécessité d'une niche, un environnement tissulaire les isolant du reste de l'organisme, favorisant leur quiescence ou leur activation selon les besoins. Ces deux états sont dirigés par des signaux moléculaires, transmis entre autres via la famille Transforming Growth Factor β (TGF- β), Wnt et Notch, et produits par les différentes cellules présentes dans la niche (38-40). Ces niches comprennent des cellules progénitrices plus matures, les cellules composant le stroma ainsi que les éléments présents dans la matrice extracellulaire (ECM).

Autant chez la souris que chez l'humain, une déplétion de cellules plus différenciées dans l'environnement mène à l'activation des cellules souches adultes afin de renouveler les cellules manquantes (40, 41). Ce mécanisme a principalement été étudié chez les CSH, mais il est aussi vrai dans d'autres tissus à renouvellement rapide comme l'intestin. Ceci laisse sous-entendre que les cellules engendrées par les cellules souches (cellules filles) produisent des facteurs favorisant la quiescence des cellules souches, que ce soit par contact cellulaire direct ou par sécrétion de facteurs. L'élément le plus important de la niche se trouve dans le stroma cellulaire entourant les cellules souches (42). Il est composé de plusieurs types cellulaires ayant tous une spécialisation dans la production de facteurs régulant l'activité des cellules souches. L'effet de ces cellules stromales a été démontré dans la moelle osseuse et la peau. À ces endroits, la destruction de la niche résulte en une déplétion de la population de cellules souches qui y est rattachée, ou à un problème de prise de greffe lorsque des cellules souches sont ajoutées (43-46). On retrouve une multitude de signaux employés par la niche pour réguler les cellules souches. Par exemple, la production de stromal derived factor-1

(SDF)/CXCL12 et d'angiotensine-1 (Ang-1) par les MSC favorise la rétention des CSH dans la moelle osseuse (47). De plus, la production de Bone Morphogenic Protein (BMP) et de Wnt par les fibroblastes de la crypte intestinale favorise la prolifération cellulaire (40, 48). Enfin, la production de TGF β 2 et de Fibroblast Growth Factor 7 (FGF-7) par le stroma de la papille dermique régule la croissance des follicules pileux (34, 49).

Le contact direct entre les cellules souches adultes et les cellules de la niche joue aussi un rôle important dans leur régulation. La liaison aux intégrines (favorisant la liaison cellule-matrice) et aux cadhérines (favorisant les liens cellule-cellule), ont des rôles essentiels dans le maintien de la quiescence et de la différenciation. Ces liaisons maintiennent la position ainsi que la polarité des cellules souches dans la niche et aussi leur exposition à un gradient contrôlé de facteurs de croissance (50). De plus, la proximité des cellules souches avec la matrice extracellulaire des cellules stromales est importante pour l'activation immédiate de ces cellules en cas de blessure. La matrice peut emmagasiner plusieurs facteurs de croissance importants pour leur prolifération tels qu'Hepatocyte Growth Factor (HGF), Insuline-like Growth Factor (IGF) ou FGF et ces derniers seront libérés lors de la dégradation de la matrice extracellulaire par la réaction inflammatoire (51, 52). Enfin, les cellules souches adultes peuvent répondre à des signaux provenant de l'extérieur de la niche. Ces signaux externes proviennent de l'environnement tissulaire entourant la niche, du système nerveux, du système immunitaire et du système hormonal. Ils permettent de coordonner l'activation, la prolifération et la migration des cellules souches adultes. Des maladies, des déséquilibres de l'homéostasie, des stimulations extracorporelles et même le rythme circadien peuvent tous

entraîner une réaction du système nerveux central et la transmission de signaux d'activation des cellules souches dans la niche (53).

Les cellules souches adultes sont l'un des principaux outils de la thérapie cellulaire, afin de guérir une lésion ou une dégénérescence tissulaire. Cette réparation tissulaire peut être obtenue de deux manières : les cellules implantées vont soit remplacer directement celles endommagées en se différenciant dans le type cellulaire requis (remplacement direct), soit favoriser la régénération tissulaire par leur capacité de production de cytokines et de facteurs de croissance particuliers (effet paracrine). Bien que leur capacité de différenciation soit plus limitée que celle des cellules souches embryonnaires, elles ont l'avantage d'être déjà conditionnées vers les besoins d'un organe précis. Parmi les thérapies de remplacement cellulaire direct, on peut citer la greffe de moelle osseuse, plus précisément de cellules souches hématopoïétiques, pratiquée pour la première fois en 1968, aux États-Unis (4). Cette thérapie consiste à transplanter des CSH à un patient atteint d'un cancer du sang, dans le but de remplacer sa moelle osseuse défaillante. La greffe de CSH est le type de greffe le plus utilisé dans le monde. Elle a démontré son activité au fil des ans et elle représente une des avancées thérapeutiques les plus importantes pour les patients atteints de cancers du sang, comme les leucémies, lymphomes et myélomes. Depuis cette première et plus particulièrement au cours des derniers dix ans, presque toutes les cellules souches adultes ont été étudiées en laboratoire dans le but de recréer des tissus. Il est maintenant possible d'obtenir des tissus différenciés à partir d'ESC ou d'IPS. Des MSC sont aussi utilisées avec des biomatériaux poreux pour recréer du cartilage (54-56). Toutefois, jusqu'à aujourd'hui, la seule utilisation clinique courante, autre que la greffe de CSH pour les patients atteints de cancers hématologiques ou

de maladies héréditaires, est l'utilisation de cellules souches limbales pour la régénération de la cornée (57). La production de facteurs paracrines est une propriété bien connue des cellules souches adultes. Dans les années 90, cette stratégie a été utilisée entre autres dans le contexte de l'utilisation de MSC comme cellules de soutien à la croissance de CSH *in vitro* (58). Toutefois, l'utilisation de ce potentiel en médecine régénératrice est plus récent. Les premiers mécanismes documentés démontrent des propriétés immunomodulatrices et anti-apoptiques (activation de la voie Akt/PI3K) chez certaines cellules souches adultes. Par la suite, les chercheurs ont identifié des facteurs altérant le remodelage tissulaire (effet du facteur HGF, altération de la production de métalloprotéinases (MMP)), favorisant l'angiogenèse (effet des facteurs Ang-1, Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF), Epidermal Growth Factor (EGF), FGF, Platelet Derived Growth Factor β (PDGF)) et ayant même la capacité d'activer des cellules progénitrices *in situ*, de manière analogue à celle de la niche tissulaire (effet des facteurs VEGF, HGF, FGF et IGF) (59). À ce jour, cette production de facteurs de croissance et de cytokines a été identifiée comme mécanisme effecteur chez les cellules souches neuronales (NSC) (60, 61), endothéliales (62) et même embryonnaires (52, 63). Mais peu de ces effets paracrines n'ont été aussi bien détaillés que chez la MSC.

1.3 La cellule souche mésenchymateuse : une cellule souche adulte avec un grand potentiel en médecine régénératrice

1.3.1 La MSC, une cellule souche impliquée dans l'homéostasie des CSH

1.3.1.1 Caractérisation, origine et régulation des MSC

Les cellules souches mésenchymateuses sont un élément essentiel du stroma de la moelle osseuse et ont été initialement caractérisées par Friedenstein et al. Cette cellule, alors nommé Colony Forming Unit – Fibroblast (CFU-F) sera plus tard renommé Cellule Souche/Stromale Mésenchymateuse (7). Les premières recherches sur les MSC ont permis de démontrer leur capacité de différenciation en un grand nombre de tissus de soutien (tissu osseux, adipeux et cartilagineux). Ces capacités de soutien par facteurs sécrétés sont maintenant une composante essentielle des applications cliniques des MSC. Contrairement aux cellules souches hématopoïétiques, elles ne possèdent pas de marqueur de surface déterminant qui pourrait faciliter leur identification. Leur caractérisation complète est toujours débattue aujourd'hui, ce qui est principalement dû à la rareté de ces cellules (estimée à 0.001-0.01% des cellules totales de la moelle) et donc à la difficulté de les observer *in vitro* (64). Ceci est d'autant plus complexe qu'il est difficile d'obtenir une lignée homogène de MSC *in vitro*. Les cellules en culture sont souvent composées de cellules hétérogènes ayant des morphologies ou des capacités de prolifération et de différenciation plus ou moins semblables (65, 66). On peut toutefois relever la présence de CD105, CD90 et CD73 et l'absence de tous les marqueurs hématopoïétiques (CD34, CD31 et CD45). Les MSC sont aussi capables de se

différencier en ostéocytes, chondrocytes et adipocytes (67). Il faut cependant préciser que ces critères s'appliquent principalement aux MSC mises en culture. Certains groupes ont montré qu'il était possible d'enrichir les populations de MSC en incluant d'autres marqueurs de cellules primitives, tels que Stro-1, CD29, CD146 ou même des marqueurs de type embryonnaire tels que Oct4 ou SSEA4(68). Il fut aussi observé que les MSC les plus importantes dans le maintien des CSH expriment le récepteur du Platelet-derived growth factor α (PDGF- α), ainsi que le marqueur de cellule progénitrice neurale Nestine (64).

Les multiples propriétés des MSC ainsi que leurs caractéristiques phénotypiques mal définies rendent l'identification de leur origine difficile. On sait maintenant que les MSC ont au moins deux origines embryonnaires distinctes. Les premières cellules remplissant les critères des MSC proviennent du neuroectoderme, plus précisément de cellules exprimant le marqueur SOX1 au niveau de la crête neurale. Ces cellules diminuent dramatiquement en nombre après la naissance, mais peuvent être retrouvées dans certains cas chez l'adulte (69, 70). Les MSC retrouvées couramment chez l'adulte ont une origine plutôt mésodermale. Des expériences faites à partir d'ESC ont montré que des cellules positives pour le récepteur de l'apeline (APLNR), une protéine semblable à l'angiotensine, peuvent générer *in vitro* un précurseur à la fois angiogénique et mésodermale(71, 72). Selon la balance de bFGF et de VEGF à laquelle cette colonie sera exposée, elle se différencierait soit en hémangioblaste, un précurseur de cellules endothéliales et hématopoïétiques, soit en mésenchymoangioblaste, un précurseur de MSC.

Bien que la régulation de l'autorenouvellement des MSC *in vitro* ne soit pas totalement comprise, on sait que plusieurs facteurs tels que bFGF, PDGF et EGF sont nécessaires à leur prolifération. Ces facteurs agissent sur les MSC au travers de la voie PI3K/Akt, via la production de cycline D, qui est l'une des principales voies de signalisation responsable de l'expansion rapide des MSC (73). L'activation de la voie MAP/ERK (par PDGF), la voie de signalisation TGF- β ou même des cytokines inflammatoires telles que Tumor Necrosis Factor- α (TNF α) et Interleukine-1 (Il-1) sont toutes connues pour inhiber la différenciation des MSC (74). Le maintien des MSC à l'état souche nécessite aussi un équilibre délicat entre plusieurs facteurs menant à leur différenciation en adipocytes ou en ostéocytes/chondrocytes. Lorsqu'il est nécessaire pour une MSC de se différencier en tissu de soutien, les familles Wnt ainsi que BMP sont responsables de son orientation vers un phénotype ostéoblaste en activant Runx2 et en inhibant la production de chondrocytes et d'adipocytes(75). D'un autre côté, l'activation du facteur de transcription PPAR γ , par des facteurs tels qu'IGF, ou l'insuline déclenche la différenciation des MSC en adipocytes (76, 77). Les propriétés de différenciations des MSC, leur capacité de maintien des CSH dans un état immature, la facilité de les conserver en culture ainsi que leur grand potentiel d'expansion et d'autorenouvellement, ont fait de ces cellules des candidates de choix pour la thérapie cellulaire.

1.3.1.2 Les MSC et la niche hématopoïétique

Les MSC sont principalement retrouvées dans la moelle osseuse, bien que des variantes aient été identifiées dans le tissu adipeux, le sang de cordon, la pulpe dentaire et parmi les cellules périvasculaires, c'est-à-dire les péricytes autour des vaisseaux sanguins (78).

Hormis le renouvellement cellulaire normal et leur propriété de niche, leur rôle dans ces tissus n'est pas encore élucidé. De plus, malgré un phénotype semblable, il a été démontré que leurs propriétés ne sont pas les mêmes d'un tissu à l'autre, notamment dans leur capacité de différenciation. Par exemple, les MSC isolées du tissu adipeux ou des cellules périvasculaires ne peuvent pas spontanément former du tissu osseux et nécessitent un préconditionnement *in vitro*. Il existe aussi une variabilité au niveau du sécrétome des MSC selon leur origine tissulaire. Par exemple, les MSC présentes dans le sang de cordon ont un meilleur potentiel angiogénique et neurogénique que les cellules de la moelle osseuse. D'un autre côté, les MSC provenant du tissu adipeux sécrètent des cytokines spécifiques au tissu adipeux, comme la leptine et l'adipsine, des composantes importantes pour la balance énergétique du corps. Toutefois, ces différences ne les empêchent pas de partager les même grandes capacités anti-inflammatoires, anti-apoptotiques et proangiogéniques retrouvées dans d'autres tissus (79, 80).

Dans la moelle osseuse, les MSCs ont deux rôles principaux. Le premier est la production des tissus de soutien du corps grâce à leur potentiel de différenciation. Le deuxième, essentiel, est le support des cellules souches hématopoïétiques (64). La niche formée par les MSC permet ainsi de maintenir les CSH dans un état indifférencié et de favoriser leur autorenouvellement. Les facteurs paracrines ainsi que la proximité cellulaire sont essentiels à l'accomplissement de cette tâche. La niche se situe dans la région endostéale, au niveau de la moelle adjacente à l'os, à proximité des sinus veineux parcourant cette zone (81). C'est ici qu'on retrouve une sous-population de MSC très primitive exprimant le marqueur de cellule neuronale Nestine (64). Ces cellules vont préserver les CSH grâce à plusieurs facteurs comme SDF-1/CXCL12, VCAM-1, Ang-1 et Stem Cell Factor (SCF). Ces

facteurs favorisent la quiescence, la migration et l'adhésion des CSH dans la niche ainsi leur autorenouvellement. Parmi ceux-ci, SCF, par sa liaison à c-kit, favorise l'expression du gène HOXB4, essentiel pour l'autorenouvellement et la prolifération des CSH (82). Deux autres facteurs, ang-1 et osteopontine, maintiennent les CSH en état de quiescence. La sécrétion de SDF-1, qui agit en favorisant la migration des CSH, permet de les maintenir à proximité des MSC (83). Ce type de MSC exprime aussi le récepteur adrénergique- β 3 (84). La stimulation de ce récepteur se fait par la relâche de norépinephrine (NE) provenant des fibres nerveuses avoisinantes et entraîne une baisse de production de différents facteurs de la niche. Cette variation de NE suit normalement le rythme circadien et peut orchestrer une relâche journalière des CSH, ayant ainsi un impact sur la régénération tissulaire, la défense de l'hôte et une sélection positive des CSH en fonction de leur potentiel de migration et d'adhésion à la niche (85).

1.3.2 La MSC en thérapie cellulaire : utilisation dans la régénération tissulaire

1.3.2.1 Thérapie cellulaire : enjeux et moyens

Initialement, beaucoup de chercheurs se sont penchés sur le potentiel de différenciation des MSC. Ils ont découvert qu'elles pouvaient générer des types cellulaires provenant de différents feuillets embryonnaires *in vitro*, un procédé connu comme étant la transdifférenciation (86). Bien que la transdifférenciation des MSC ait été observée *in vitro*, plusieurs études n'ont pas été en mesure de répliquer ce phénomène une fois les MSC transplantées chez l'animal. De plus, dans plusieurs cas, ces cellules ne réussissaient pas à

s'implanter à long terme dans l'organe cible (87). Des effets bénéfiques sur les niveaux d'inflammation ainsi que sur le processus de guérison du cœur, des reins, des poumons ou des nerfs ont tout de même été observés suite à l'injection des MSC (87-91). Des chercheurs ont donc émis l'hypothèse que des facteurs sécrétés par les MSC pouvaient être responsables de la régénération tissulaire (92).

1.3.2.2 Rôle des MSC à chaque étape de la régénération tissulaire

Le processus de guérison normalement observée suite à une blessure est orchestré pour agir rapidement. En contrepartie, cette réparation dans l'urgence peut laisser des traces sous la forme de cicatrices ou de tissus fibrosés (93). En temps normal, la guérison comporte trois phases : une phase inflammatoire, une phase de formation du nouveau tissu et de vascularisation et enfin une phase de remodelage tissulaire (Figure 2). L'évolution de la médecine régénératrice durant la dernière décennie a non seulement permis de mieux comprendre les mécanismes de la réparation tissulaire, mais aussi comment les améliorer. La régénération engendrée par les cellules souches est un processus complexe qui fait appel à plusieurs mécanismes distincts qui influent sur le processus normal de guérison. Les cellules souches auront aussi des effets régénératifs différents selon l'endroit où elles sont implantées et selon le temps qui s'est écoulé entre la lésion et la greffe. Il faut donc savoir à quelle étape de la guérison elles peuvent agir à leur plein potentiel.

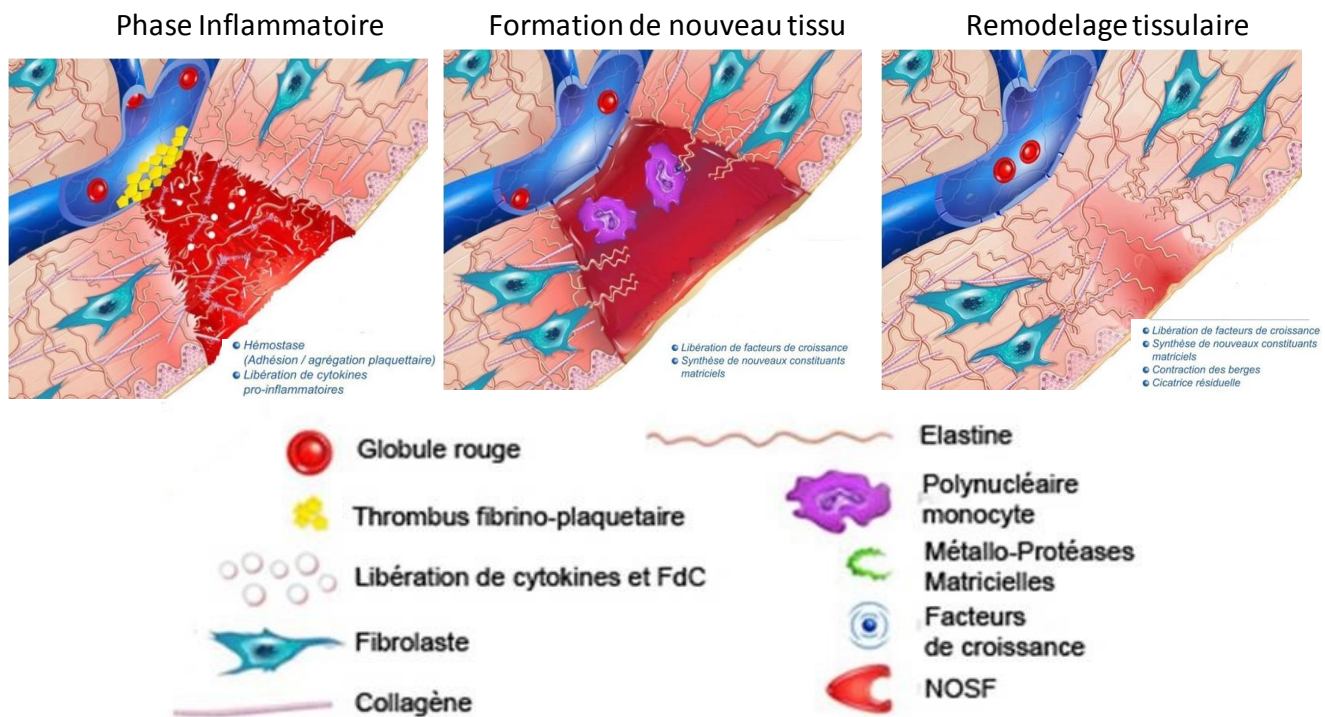


Figure 2 : Les étapes de la guérison tissulaire. Modifié de <http://www.urgo.co.uk/>

La phase inflammatoire

La phase inflammatoire, aussi appelée phase aigüe, survient immédiatement après la blessure et peut durer jusque 48 heures. Toute blessure engendre une phase inflammatoire, qu'il y ait présence de pathogènes ou non, cette dernière étant causé par la relâche de signaux provenant de cellules endommagées (généralement des protéines cytosoliques ou nucléaires). Ces derniers seront reconnus par les cellules immunitaires présentes au site de lésion, comme les macrophages et les mastocytes, et entraineront la relâche d'histamine. La priorité est d'empêcher l'infection, d'arrêter les pertes sanguines et d'éliminer les débris pouvant entraver la réparation tissulaire. Plusieurs éléments sont impliqués incluant la cascade de coagulation, la réaction inflammatoire régulée par IL-1 et TNF- α et l'arrivée des cellules du système

immunitaire inné (94). Les premières cellules à arriver sont les neutrophiles, dont l'activité phagocytaire et oxydative est requise pour l'élimination des pathogènes. La réaction inflammatoire contribue également à la maturation des cellules présentatrices d'antigènes (CPA) composées des cellules dendritiques (DC) et des monocytes/macrophages. Ces CPA activées vont présenter les antigènes aux lymphocytes dans les ganglions et ainsi favoriser leur migration au site endommagé. L'activation des lymphocytes par les CPA amplifie la réaction inflammatoire, tout d'abord par l'activation des cellules TCD4. Ces dernières augmentent la production de molécules favorisant l'inflammation et l'activation du système immunitaire, tel qu'Interféron- γ (INF) et IL-2 et facilitent l'activation des cellules TCD8 cytotoxiques (95). Un environnement inflammatoire peut être nocif pour les tissus s'il est maintenu trop longtemps. L'œdème, l'augmentation de dérivés réactifs de l'oxygène et d'autres éléments associés à l'inflammation peuvent être responsables de l'apoptose et de la fibrose tissulaire observés lors de dommages aigus et chroniques. Les neutrophiles notamment peuvent influencer négativement la réparation tissulaire. En effet, ces cellules peuvent aggraver le dommage aux cellules environnantes à cause des médiateurs toxiques employés pour éliminer les bactéries (96). Des protéases peuvent ainsi dégrader la matrice extracellulaire ainsi que les protéines sur les surfaces cellulaires (97-99). Ces modifications affectent les bases essentielles à la prolifération des cellules progénitrices locales qui pourraient autrement réparer adéquatement le tissu lésé. De plus, les neutrophiles produisent une grande quantité de radicaux libres ou d'éléments favorisant le stress oxydatif, comme le peroxyde d'hydrogène ou le superoxyde dismutase, autant d'éléments causant des dommages additionnels ou retardant le processus de guérison (100).

Le potentiel anti-inflammatoire des MSC leur permet de diminuer le stress oxydatif et l'inflammation excessive durant cette phase (101, 102). Les MSC sécrètent constitutivement plusieurs facteurs de croissance, des lipides et des cytokines ayant un potentiel anti-inflammatoire (TGF- β , HGF, Prostaglandine E2 (PGE₂), hème oxygénase-1 (HO1), IL6 et HLA-G5; **Figure 3**) (59). De plus, la production de ces facteurs solubles est augmentée lorsque les MSC sont exposées à un environnement inflammatoire (IL-1 α/β , TNF, IFN- γ) (103-105). Plusieurs de ces facteurs ont un effet inhibiteur sur les cellules immunitaires responsables du dommage tissulaire lors de l'inflammation et de la poussée oxydative. Les MSC sont capables de contrôler la réponse des neutrophiles en diminuant cette poussée oxydative ainsi que la production de dérivés réactifs de l'oxygène par un mécanisme dépendant de l'IL-6 et de STAT-3 (106). De plus, l'augmentation de l'IL-10 dans l'environnement tissulaire engendre une diminution de la migration et de l'extravasation des neutrophiles, diminuant d'autant plus le dommage cellulaire de la poussée oxydative.

Les cellules dendritiques sont essentielles dans l'induction de la réponse immunitaire. Il a été démontré que les MSC peuvent inhiber la maturation des DC grâce à un mécanisme partiellement dépendant de l'IL-6 (107) et induire des DC plus tolérogènes. L'induction d'un phénotype immature chez les DC est caractérisée par une baisse du complexe majeur d'histocompatibilité de classe 2, des molécules de costimulation CD40, CD80 et CD86 en plus d'une diminution de la sécrétion d'IL-2, d'IL-12, d'IFN- γ et de TNF et d'une augmentation de l'IL-10 (108). Ceci contribue non seulement à une baisse de facteurs inflammatoires dans l'environnement tissulaire, mais aussi à une baisse de la réponse des cellules T (109).

En plus de cette baisse d'activation indirecte, les MSC favorisent directement l'anergie des cellules T et B, et diminuent leur prolifération par de multiples mécanismes (Fig 3B). La production de TGF- β , d'IL-10 (aussi induite chez les macrophages) d'IL-6, de PGE2, de Leukemia Inhibitory factor (LIF), d'HGF et d'HO-1 inhibent la prolifération des cellules T et B tandis que l'enzyme indoleamine 2,3-dioxygénase (IDO) engendre la déplétion du tryptophan, un acide aminé essentiel à la prolifération des cellules T présentes dans l'environnement tissulaire (102, 110, 111). De plus, IDO est connu pour son rôle dans la formation de cellules T régulatrices (112), cellules capables d'inhiber l'activation et la prolifération des cellules T, B, des DC et des natural killer cells (NK) et dendritiques par des mécanismes dépendant du contact cellulaire ou par sécrétion d'Il-10 et de TGF- β (113) (Fig 3C). IDO est reconnu comme effecteur principal de ces mécanismes chez l'humain, tandis que chez la souris, les MSC sécrètent de l'oxyde nitrique (NO), qui peut avoir un rôle immunosuppresseur via la déphosphorylation de la voie Jak3/STAT5, impliquée dans la prolifération des cellules T (114, 115). Certains mécanismes d'action des MSC nécessitent aussi le contact cellulaire direct. Par exemple, les molécules Fas Ligand, Programmed cell death protein 1 ligand (PD-L1) HLA-G1 sont liées à la membrane des MSC et peuvent diminuer la prolifération et la production de cytokines inflammatoires comme IL-2 chez les cellules T, ou même induire leur apoptose (116).

Les macrophages agissent sur plusieurs fronts après l'apparition d'un dommage. Bien que reconnus comme des cellules inflammatoires, les macrophages ont un grand rôle à jouer dans les diverses étapes de la réparation tissulaire. Lors de l'étape inflammatoire, les macrophages favorisent la migration de cellules immunitaires vers la lésion et commencent à

éliminer les débris cellulaires. À l'inverse, ils sont aussi essentiels à l'arrêt de la réaction immunitaire et vont favoriser le retrait des neutrophiles des sites de lésions(117). Les macrophages peuvent reconnaître les espèces réactives d'oxygène produites par les neutrophiles et favoriser leur migration hors de la lésion ainsi qu'activer l'apoptose chez ces cellules lorsqu'un certain degré de stimulation est atteint (118). Les macrophages peuvent aussi phagocyter les neutrophiles morts au site de la lésion, ce qui est un processus essentiel à la baisse de l'inflammation (119). Les MSC peuvent agir directement sur les macrophages en sécrétant des molécules chimiotactiques, comme macrophage inflammatory protein (MIP)-1a et 1b favorisant leur recrutement aux sites de lésion (120, 121). Les MSC sont aussi capables de reprogrammer les macrophages sans contact cellulaire direct, par un mécanisme dépendant de PGE2 (Fig 3D). Cette reprogrammation mène à une baisse de production de TNF- α et d'IL-6 chez les macrophages, ainsi qu'à une hausse d'IL-10, leur conférant ainsi un phénotype anti-inflammatoire (122).

Formation de nouveau tissu

La formation de nouveau tissu débute à la fin de la réaction inflammatoire et après l'élimination des pathogènes au site de lésion. Elle nécessite la migration de cellules progénitrices et la néovascularisation au niveau de la zone endommagée. Ce processus complexe dure entre 3 et 7 jours et s'accomplit difficilement s'il y a toujours présence d'inflammation ou d'agents pathogènes. Il est initié des cellules immunitaires et endothéliales telles que les macrophages, les cellules T régulatrices, les péricytes et les cellules progénitrices endothéliales, qui favorisent la fin de la phase inflammatoire, mais aussi la production de facteurs signalant le début de la réparation tissulaire. Parmi ces derniers, les plus importants

comportent, mais ne sont pas limités à, VEGF, bFGF, EGF, IGF, HGF, PDGF, Nerve Growth Factor (NGF), etc. Tous ces facteurs agissent sur les voies cellulaires favorisant la prolifération ainsi que la différenciation cellulaire tandis que certains auront un rôle important dans le recrutement de cellules progénitrices au site de lésion (123-125). Dans certains cas, ces cellules proviennent de l'extérieur, telles que les cellules progénitrices endothéliales, produites au niveau de la moelle osseuse et circulant dans le sang en suivant les gradients chimiotactiques (126). D'autres, telles que les cellules progénitrices épithéliales (EPC) ou les cellules souches des cryptes intestinales, sont déjà présentes au sein des tissus et ont généralement des rôles importants dans le renouvellement normal d'une structure tissulaire (turnover) (127, 128). Finalement, il existe certaines cellules qui peuvent être en quiescence, telles que les NSC ou les cellules progénitrices observées dans différentes régions de l'œil et qui ne participent normalement pas au renouvellement tissulaire (129, 130). La prolifération et la différenciation de ces cellules de remplacement vont permettre d'assurer la formation d'un tissu sain et fonctionnel.

Les MSC sont capables d'agir avec d'autres cellules progénitrices présentes dans différents organes et ainsi améliorer le processus de régénération tissulaire (131). L'injection intramyocardique d'HGF et d'IGF, deux facteurs couramment produits par les MSC, peut induire la prolifération et la différenciation de cellules souches cardiaques (CSC) résidentes (132). L'effet direct des MSC sur les CSC a été observé lors de l'injection de MSC dans un cœur de porc, résultant en l'augmentation du nombre de CSC positives pour le marqueur de cellules progénitrices c-Kit et une hausse de la division des cellules cardiaques (133, 134). Dans un modèle animal, l'injection intraoculaire d'insuline et de bFGF a permis d'activer la

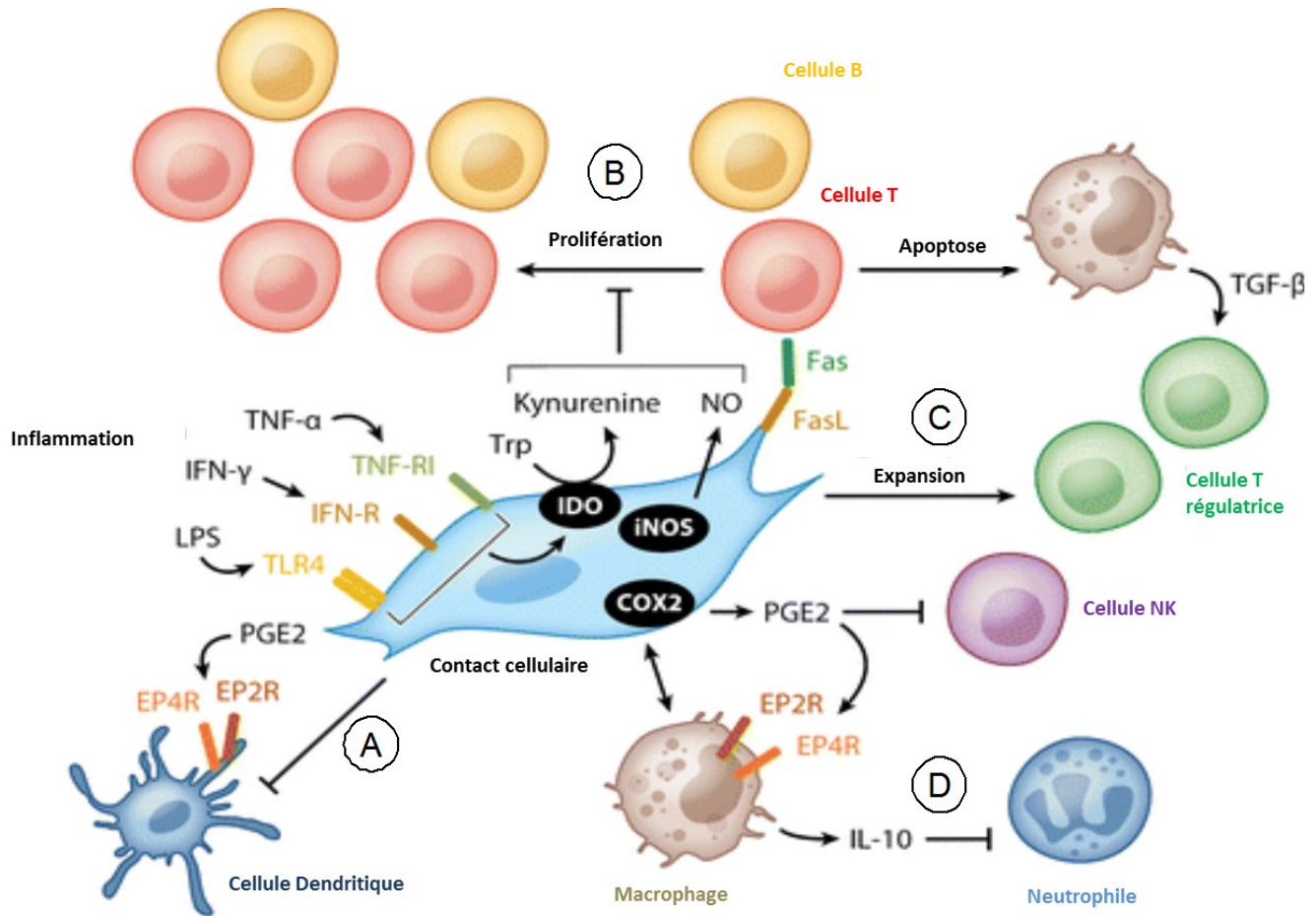


Figure 3 : Le pouvoir anti-inflammatoire des MSC. Tiré de (135)

- A. Favorisent un état tolérogénique chez les DC grâce à PGE2**
- B. Inhibent la prolifération de cellules B et T par un mécanisme dépendant d'IDO ou de contact cellulaire**
- C. Favorisent l'expansion des Tregs, via l'expression de TGF-β par les macrophages**
- D. Favorisent la relâche d'IL-10 par les macrophages, ce qui inhibe l'invasion tissulaire des neutrophiles**

prolifération de cellules de la rétine et d'augmenter leur expression de nestine, un marqueur des cellules progénitrices neurales, et de Pax6 et Chx10, deux marqueurs du développement oculaire (136). Dans d'autres cas, l'injection directe de MSC dans l'hippocampe de souris a

résulté en la prolifération de cellules souches neurales exprimant les marqueurs Sox2 et nestine et leur différenciation en cellules neurales matures (89). Les mécanismes permettant la réactivation de ces cellules progénitrices ne sont cependant pas bien connus.

Les MSC sont capables d'agir avec d'autres cellules progénitrices présentes dans différents organes et ainsi améliorer le processus de régénération tissulaire (131). L'injection intramyocardique d'HGF et d'IGF, deux facteurs couramment produits par les MSC, peut induire la prolifération et la différenciation de cellules souches cardiaques (CSC) résidentes (132). L'effet direct des MSC sur les CSC a été observé lors de l'injection de MSC dans un cœur de porc, résultant en l'augmentation du nombre de CSC positives pour le marqueur de cellules progénitrices c-Kit et une hausse de la division des cellules cardiaques (133, 134). Dans un modèle animal, l'injection intraoculaire d'insuline et de bFGF a permis d'activer la prolifération de cellules de la rétine et d'augmenter leur expression de nestine, un marqueur des cellules progénitrices neurales, et de Pax6 et Chx10, deux marqueurs du développement oculaire (136). Dans d'autres cas, l'injection directe de MSC dans l'hippocampe de souris a résulté en la prolifération de cellules souches neurales exprimant les marqueurs Sox2 et nestine et leur différenciation en cellules neurales matures (89). Les mécanismes permettant la réactivation de ces cellules progénitrices ne sont cependant pas bien connus.

Dans des études sur les ESC, il a été démontré que l'interaction entre TGF- β /Activin et bFGF était essentielle à l'expression de NANOG, l'un des 3 gènes liés la pluripotence des ESC (137, 138). Il est donc possible que la production par les MSC de différents facteurs de croissance à proximité de cellules progénitrices quiescentes puisse réactiver l'expression de

gènes régulant la différenciation et la prolifération d'une manière similaire à ce qui est observé avec les ESC. Un autre rôle important des MSC dans la régénération serait de favoriser le métabolisme et le fonctionnement des cellules non endommagées. Il a été démontré que les MSC peuvent favoriser positivement la contractilité des cellules du cœur en affectant l'expression des canaux potassiques dans les cellules cardiaques par un mécanisme impliquant bFGF (88, 139, 140). Il a aussi été montré qu'IGF peut augmenter la contractilité cardiaque *in vitro* et *in vivo* (141, 142). Bien que ce type d'effet n'ait pour l'instant été observé qu'au niveau du cœur, la possibilité que les facteurs sécrétés par les MSC puissent directement affecter le fonctionnement des cellules d'autres organes est à considérer.

La néovascularisation est un processus essentiel à la croissance tissulaire lors du processus de régénération. Dans un organisme adulte, les vaisseaux sanguins se développent uniquement suite à un dommage ou à un stress, et ce développement se déroule selon trois mécanismes complémentaires (139). Le premier est la vasculogénèse et résulte en la fabrication de nouveaux vaisseaux sanguins suite à la migration et à la différenciation de cellules progénitrices de la moelle osseuse en cellules endothéliales et en cellules musculaires lisses des parois vasculaires. Le second est l'angiogénèse et résulte en la croissance et la prolongation de vaisseaux sanguins préexistants. Le troisième est l'artériogénèse, un phénomène engendrant l'élargissement et la muscularisation de vaisseaux préexistants (143). Or les MSC favorisent les trois mécanismes de manière paracrine. Elles sont d'abord capables de recruter des EPC au site de lésion grâce à la sécrétion de VEGF, de Placental Growth Factor (PLGF), de SDF-1, de FGF, de MCP-1 et de HGF (144, 145). Ces EPC peuvent alors s'intégrer aux vaisseaux préexistants ou générer des nouveaux capillaires. Les facteurs Ang-1,

VEGF, FGF, PDGF β , HGF et IGF-1 peuvent aussi favoriser la prolifération des cellules endothéliales et des cellules musculaires lisses ainsi que prolonger ou renforcer les vaisseaux sanguins (146, 147). La sécrétion par les MSC de facteurs anti-apoptotiques facilite la régénération tissulaire en évitant un dommage supplémentaire aux nouveaux capillaires. De plus, les MSC peuvent offrir un support direct aux cellules endothéliales soit par leur matrice extracellulaire, soit en s'intégrant aux vaisseaux lors de leur différenciation en péricytes, bien que ces évènements n'aient été observés que rarement (148, 149).

Remodelage tissulaire

Lors du remodelage tissulaire, tous les mécanismes impliqués jusqu'à maintenant vont progressivement se désactiver. Les cellules qui ont participé à la guérison vont entrer en apoptose ou migrer hors de la zone réparée laissant derrière elles un tissu neuf. Cependant, pour certains organes, ou dans le cas d'un dommage tissulaire aigu ou chronique, on peut assister à un processus de cicatrisation anormal qui mène à une fibrose. Cette dernière est le résultat d'une grande prolifération de fibroblastes et des myofibroblastes ainsi que d'une production excessive de matrice extracellulaire, qui auront pour conséquence la perte de l'architecture et de la fonction du tissu sous-jacent. Ces fibroblastes, régulés par le TGF- β , remplaceront le tissu endommagé par une matrice extracellulaire essentiellement composée de collagène, un tissu décellularisé qu'on appelle communément la cicatrice (150). Ceci peut avoir de graves conséquences selon l'étendue ou la localisation de la lésion, surtout pour des organes comme le cœur ou le cerveau. Or il a été montré que la transplantation de MSC peut atténuer la fibrose dans plusieurs organes comme le cœur, le foie, les poumons et les reins (151-154). Le mécanisme d'action sous-jacent implique une baisse de la prolifération des

fibroblastes, une baisse de la synthèse des collagènes I et III, une baisse du remodelage tissulaire engendré par les MMP-2 et -9 et de leurs inhibiteurs tissulaires (TIMP) ainsi qu'une baisse d'expression du TGF- β (139, 155). L'un des principaux facteurs responsable de ces effets est la sécrétion d'HGF (156). Ce facteur de croissance peut être sécrété par les MSC ou par des fibroblastes après stimulation avec bFGF. HGF peut inhiber la production de collagénase chez les fibroblastes en bloquant TGF- β /SMAD (157, 158). Les facteurs des MSC diminuant la prolifération des fibroblastes ne sont pas bien connus, mais ce processus, démontré *in vitro* avec des fibroblastes cardiaques, peut impliquer l'activation des gènes responsables régulant la prolifération de ces cellules, tels que l'elastine (Eln), la myocardine (Myocd) et le DNA-damage inducible transcript 3 (Ddit3) (159). L'hypoxie, l'inflammation, et l'infiltration d'un organe par des cellules immunitaires sont aussi des éléments favorisant la fibrose et les MSC sont en mesure de les diminuer. Ceci pourrait en retour favoriser la baisse de la fibrose tissulaire (155, 160). Il est toutefois important de spécifier que les MSC ne semblent pas pouvoir exercer d'effet anti-fibrotique lorsqu'une fibrose tissulaire est déjà installée dans un organe. Dans ce cas, les MSC peuvent même aggraver la fibrose (161).

1.3.3 Les macrophages : Une cellule clé de la réparation tissulaire

Les macrophages jouent un rôle de premier plan durant la guérison et sont responsables de la transition entre chaque phase du processus ainsi que de la régulation des mécanismes spécifiques à chacune. Les macrophages trouvés chez l'adulte proviennent de deux sources : les macrophages résidents, présents dans les tissus et cellules de première ligne lors d'une blessure; et les macrophages dérivés de monocytes circulant dans le sang. Ces monocytes

circulants seront attirés par un gradient de chimiokines produits par des cellules immunitaires au site de lésion, notamment par CCL2 qui favorise leur migration vers une zone endommagée (162). Il a été montré que l'élimination des macrophages avait des effets importants à différentes phases de la réparation tissulaire, et que ces effets pouvaient être différents selon le moment de leur retrait : défaillance complète des mécanismes de réparation si les macrophages sont éliminés durant la phase inflammatoire, alors qu'on observe plutôt des problèmes vasculaires et hémorragiques s'ils sont retirés lors de la formation du nouveau tissu. Leur retrait au moment du remodelage tissulaire ne semble avoir aucun impact (163). Les effets des macrophages lors du processus de guérison ne sont pas limités à la phagocytose et à la régulation des cellules immunitaires, ils impliquent aussi la régulation de certaines cellules progénitrices. Des études récentes ont montré que les macrophages induisent l'activation et la prolifération de cellules souches présentes dans les follicules pileux par un mécanisme impliquant la voie des protéines Wnt, et qu'ils jouent un rôle important dans la régulation de la niche de ces cellules (164).

Traditionnellement, les macrophages sont classifiés en cellules inflammatoires, nommées M1, identifiables par leur profil CD68+/CD80+, et anti-inflammatoires, nommées M2 et caractérisées par leur profil CD68+/CD163/CD206+. Suite à leur activation, les macrophages pro-inflammatoires M1 vont produire une grande quantité de médiateurs cellulaires et de cytokines. On retrouve parmi ceux-ci certains des éléments les plus importants d'une réaction inflammatoire tels que l'Il-1, -6 et -12 en plus du TNF α et de l'oxyde nitrique synthétase (165, 166). Les macrophages peuvent aussi produire des molécules chimiotactiques essentielles au recrutement de tous les types cellulaires nécessaires à la réponse immune. Les

macrophages de type M2 ont une action anti-inflammatoire, grâce à la production d'antagoniste de IL-1 (IL-1R antagoniste, IL-1R2) et d'interleukine-10. Les macrophages M2 produisent par ailleurs divers facteurs de croissance, tels que TGF- β 1, VEGF, IGF-1 et des membres de la famille FGF (167, 168). Bien que des populations purifiées des deux sous types n'ont été observées qu'*in vitro* jusqu'à maintenant, il a été proposé que la transition de macrophages de phénotype M1 à des macrophages de phénotype M2 est une étape essentielle au processus de guérison (169). L'hypothèse généralement acceptée serait que ces cellules peuvent se différencier en phénotype M1 ou M2 en fonction de certains facteurs présents dans l'environnement tissulaire. L'activation de Toll-Like Receptors (TLR) ou la présence d'INF- γ stimule la différenciation des monocytes en M1 tandis que la présence d'IL-4 ou d'IL-10, de glucocorticoïdes et de prostaglandines stimulerait la production de macrophages de type M2 (170, 171). Il a aussi été montré que la phagocytose de neutrophiles par les macrophages peut en affecter le phénotype et faciliterait la transition du type M1 vers M2 (172). Les macrophages, qui arrivent progressivement au fur et à mesure de l'évolution de la blessure, vont faire face à des environnements tissulaires distincts qui orientent leur différenciation selon les besoins. Il n'est pas non plus certain que cette différenciation soit finale. Certaines études montrent que les macrophages peuvent osciller entre les deux phénotypes selon les signaux reçus ou encore posséder des phénotypes inflammatoires et anti-inflammatoires simultanément(173). Les sites de lésions contiennent donc un continuum de macrophages orientés vers le phénotype M1 ou M2 exprimant un profil mixte des marqueurs phénotypiques des deux groupes, ce qui complique la compréhension de leur l'impact sur la régénération tissulaire (171, 174).

1.3.4 L'effet paracrinien des MSC : comment le potentialiser en thérapie cellulaire ?

Plusieurs indices laissent sous-entendre l'importance des facteurs paracrines comme mécanisme effecteur de la régénération tissulaire par les MSC. Il faut noter qu'un nombre très limité de cellules injectées s'intègrent au tissu, entre 1 à 5% selon les organes ciblés et les conditions de culture (87, 90, 91, 175). De plus, dans plusieurs cas, les effets bénéfiques observés se sont manifestés aussi tôt que 72h après l'injection (87-89), soit trop peu de temps pour attribuer l'effet à une différenciation cellulaire et à un remplacement du tissu endommagé.

L'environnement auquel sont exposés les MSC a une grande importance sur leur production de facteurs régénératifs. Dans plusieurs cas, les MSC ne peuvent exercer leurs effets régénératifs qu'en étant injectés durant la phase aiguë, ou inflammatoire, du processus de guérison, lorsque les facteurs inflammatoires, hypoxiques et le stress cellulaire sont à leur niveau le plus élevé. Lorsque l'environnement tissulaire est passé à un stade de dommage chronique, ou présentant une fibrose, l'ajout de MSC n'a que peu ou pas d'impact favorable sur la lésion (176, 177). Ceci démontre que l'exposition des MSC à certains facteurs peut modifier ou augmenter leur potentiel migratoire ainsi que leur production de facteurs favorisant la survie et la croissance de cellules environnantes. Les MSC sont d'ailleurs redoutées dans les traitements contre le cancer, car elles seraient capables de migrer vers la zone tumorale endommagée et d'y produire des facteurs favorisant la croissance des cellules néoplasiques (178, 179).

Un moyen simple développé afin de récolter les facteurs sécrétés par les MSC est le préconditionnement des cellules *in vitro*, de la même manière que l'aurait fait un environnement tissulaire endommagé. Cette méthode a confirmé que les facteurs produits par les MSC peuvent exercer un effet régénératif similaire à l'ajout direct de ces cellules (180, 181). Les MSC étant des cellules réactives à leur environnement, le type de facteurs produits et leur quantité varient selon l'exposition à des facteurs inflammatoires (IL-1 α / β , TNF, IFN- γ) ou à des conditions hypoxiques (88, 109). Des concentrations variables d'oxygène sont souvent utilisées comme mode de conditionnement des MSC. Les concentrations utilisées varient entre 2 et 5% d'O₂, ce qui est semblable à ce l'on retrouve normalement au niveau de la niche dans la moelle osseuse. Ceci favoriserait la production de facteurs semblables à ceux produits pour le maintien des CSH. Ces conditions seraient aussi favorables à la production de facteurs pouvant agir sur différentes voies cellulaires et ainsi influencer toutes les phases de la guérison tissulaire (182-184). Dans d'autres cas, des modifications génétiques, comme la surexpression du gène de survie Akt1 chez les MSC, peuvent aussi augmenter significativement l'expression de facteurs reconnus comme ayant des effets protecteurs (VEGF, FGF-2, HGF, IGF-1, TB4) (88, 185).

1.3.5 Les MSC en clinique

Selon le site clinicaltrials.gov, un site reconnu d'enregistrement des études cliniques réalisées à travers le monde et dirigé par le National Institute of Health (NIH), plus de 400 études cliniques impliquant les MSC étaient en cours au niveau mondial en 2015. Ces études cliniques se basent sur la capacité de différenciation cellulaire des MSC ainsi que le potentiel

régénératif de leurs facteurs paracrines identifiés dans plusieurs modèles de dommage tissulaire ou de maladie dégénérative. On peut regrouper leurs effets cliniques en deux grands segments : la régénération/protection tissulaire et l'immunomodulation.

La régénération ou protection tissulaire implique la réparation d'un tissu endommagé ou, si les cellules souches sont injectées tôt durant la phase aigüe, la prévention de dommage additionnel suivant la formation de la lésion. Les maladies cardiaques étant l'une des principales causes de mortalité dans le monde, cela fait du cœur l'un des organes sur lequel l'impact des MSC a été étudié le plus rapidement. Des études précliniques *in vitro* et *in vivo* ont démontré que les MSC peuvent protéger les cardiomyocytes par la production de facteurs paracrines (186, 187). Sur le plan clinique, une multitude d'études employant des MSC dans le traitement de crises cardiaques ont été publiées. Toutefois les résultats de ces dernières sont parfois contradictoires et des méthodes d'isolation de MSCs variables entre les différents laboratoires rendent difficile la comparaison des résultats (188). À plus petite échelle, les MSC ont présenté des résultats bénéfiques chez l'humain dans le traitement de membres ischémiques, dans le contexte de diabète, ainsi que dans l'accélération de la guérison de peau chez des grands brûlés (189, 190). Des résultats similaires ont été observés dans plusieurs organes traités avec des MSC, tels que le foie (191, 192), les reins (87, 193) ou les poumons (194-196). Les MSC ont même été utilisées pour atténuer certaines maladies génétiques. Des fœtus atteints d'ostéogenèse imparfaite ont été traités par injection de MSC *in utero* à 32 semaines de grossesse, ce qui a mené à une baisse du nombre de fractures comparativement à des enfants non traités (197).

Les propriétés immunomodulatrices des MSC, ainsi que leur capacité à s'adapter au milieu auquel elles sont exposées, en font un outil intéressant pour le traitement de maladies auto-immunes et inflammatoires. L'un des principaux exemples cliniques est l'utilisation de MSC dans le traitement de la maladie du greffon contre l'hôte (GvHD) suite à une transplantation de moelle osseuse, et ce même dans des cas réfractaires aux traitements conventionnels (198-200). Plusieurs autres maladies inflammatoires et auto-immunes ont été traitées dans des études cliniques grâce à la capacité des MSC d'induire la prolifération de cellules T régulatrices, la conversion de macrophages vers un phénotype anti-inflammatoire et par la production de facteurs anti-inflammatoires directs, tels que PGE2, TGF- β et IDO (201, 202). Des maladies telles que le lupus érythémateux, la maladie de Crohn ou la sclérose en plaques ont toutes été la cible de traitements par les MSC, et ces traitements ont montré des résultats souvent bénéfiques sur la santé des patients (203-205). Les MSC ont aussi été utilisées dans des études animales ou cliniques de greffes de différents organes, comme le cœur, les reins et le foie, afin d'étudier leur potentiel antirejet. Bien que toutes ces études aient démontré une baisse de l'inflammation, les résultats sur la capacité des MSC à faciliter la prise de la greffe sont plus variables (135, 206, 207).

1.4 L'œil et le glaucome à angle ouvert

1.4.1 L'œil : Organisation et description

L'œil est notre fenêtre sur le monde. Il est structuré en deux cavités, la chambre antérieure et le corps vitré. Il est aussi composé de trois couches tissulaires (**Figure 4**). La couche externe comporte la cornée, couche transparente à l'avant de l'œil, ainsi que la

scélrotique, membrane externe rigide qui forme toute la surface de l'œil et soutient sa structure. La couche intermédiaire pigmentaire, l'uvée, comprend les tissus de soutien de l'œil : (a) la choroïde, couche vasculaire qui alimente l'œil, (b) le corps ciliaire, dont la structure interne produit l'humeur aqueuse (AH), (c) le trabéculum (TM), qui régule la sortie de l'AH de l'œil, et (d) l'iris, dont les multiples couches comportent des muscles régulant la taille de la pupille ainsi qu'un épithélium pigmentaire bloquant le passage de la lumière. La zone interne est la rétine. Elle transforme les informations visuelles en signaux nerveux qui vont alors quitter l'œil par le nerf optique pour être interprétés par le cerveau. Cette structure est complexe et est le principal site de dommage dans plusieurs maladies oculaires. La rétine est divisée en plusieurs segments parmi lesquels on retrouve, dans l'ordre, les cellules ganglionnaires rétiniennes, dont les prolongements forment le nerf optique, les cellules bipolaires, responsables de transmettre le signal optique vers les cellules ganglionnaires, et les photorécepteurs. Le tout est apposé à l'épithélium pigmentaire de la rétine, juste au-dessus de la choroïde contenant tous les vaisseaux sanguins de la rétine. Les cellules ganglionnaires convergent à la lamina cribrosa, l'un des points les plus minces de l'œil, aussi appelé papille optique, pour y former le nerf optique et acheminer les signaux nerveux vers le cerveau.

Au cœur de l'œil, les deux compartiments (la chambre antérieure et la chambre postérieure de l'œil) baignent dans deux liquides différents, dont le rôle est de maintenir la forme de l'œil et de laisser passer la lumière sans interférence, de la cornée jusqu'à la rétine. Le corps vitré est situé dans la partie arrière de l'œil et est rempli par une humeur relativement stagnante du même nom, principalement composée d'eau et de collagène de type 2, d'acide hyaluronique et d'une grande quantité de protéines. De l'autre côté, la chambre antérieure est

remplie par l'humeur aqueuse, un liquide à très faible concentration protéique généré à partir du plasma sanguin, et qui est en constante circulation. Ce filtrat est produit par le corps ciliaire et retourne dans la circulation sanguine après son passage par le trabéculum. Il a plusieurs rôles tels que fournir les éléments nutritifs et l'oxygène aux différents tissus de la chambre antérieure, qui ne sont pas alimentés par des vaisseaux sanguins, ou encore transporter les anticorps nécessaires à la défense contre les pathogènes. Ce filtrat doit être bien contrôlé puisqu'il est le principal responsable de la pression intraoculaire (IOP). L'œil étant principalement composé de liquide, il nécessite une pression interne pour maintenir sa forme et sa précision. Cette pression est régulée par la balance entre le débit de production d'humeur aqueuse et le débit de sa sortie. Des éléments systémiques, tel que la pression sanguine, peuvent influencer cette pression, mais dans une moindre mesure (208, 209). Ce qui permet sa régulation précise est le cycle de l'humeur aqueuse dans la chambre antérieure.

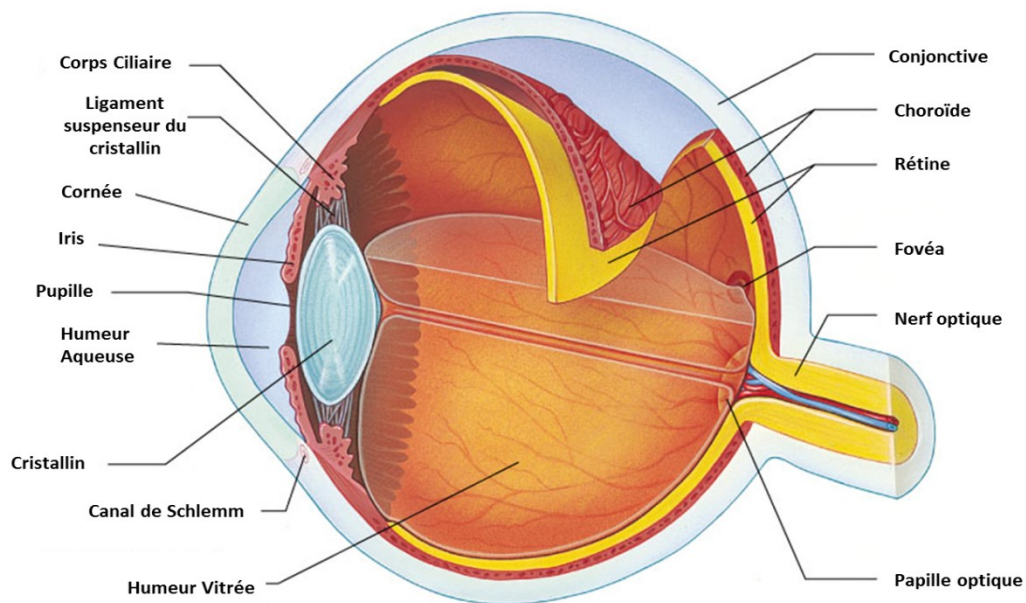


Figure 4 : La structure de l'œil. Tiré de (210)

1.4.2 La dynamique de l'humeur aqueuse

Le cycle de l'humeur aqueuse commence dans le corps ciliaire (**Figure 5A**). Il est régulé par le système nerveux autonome régulant des canaux ioniques permettant le passage de l'eau à travers les vaisseaux sanguins vers la chambre postérieure de l'œil, derrière l'iris (211-213). De là, l'AH circule au travers de la pupille et traverse la chambre antérieure avant d'atteindre le trabéculum et de quitter l'œil par deux voies possibles. Environ 15% de l'humeur aqueuse quittera l'œil par la voie dite uvéosclérale, c'est-à-dire en se diffusant librement entre les fibres musculaires de l'oeil avant d'être drainée au niveau de la sclère. La majorité de l'humeur quittera toutefois l'œil au travers le TM puis du canal de Schlemm et des veines épisclérales (212, 213). Le TM est composé de trois parties: le trabéculum uvéoscléral, le trabéculum cornéoscléral et le tissu juxtacanaliculaire (**Figure 5B**). Ces trois segments sont formés à partir de fibres de tissu conjonctif, principalement du collagène I et III, ainsi que des fibres élastiques de plus en plus rapprochées. Ces fibres sont recouvertes par les cellules trabéculaires qui adhèrent à une membrane basale composée de collagène IV et de laminine (214). Le TM est complété par une matrice extracellulaire dense au niveau du tissu juxtacanaliculaire. Cette matrice est composée de fibronectine, de proteoglycans, d'acide hyaluronique, ainsi que de collagène IV. Cette matrice serait responsable de la résistance au passage de l'humeur aqueuse. (212-215).

Le passage de l'humeur aqueuse à travers le trabéculum est un mécanisme essentiellement passif où le liquide pénètre principalement entre les cellules dans des vacuoles ou des pores agissant comme des valves à sens unique (216). Ces pores varient de 0.1 à 3 μm en diamètre selon la pression, et laissent passer l'humeur aqueuse, mais aussi certaines

particules comme la ferritine, des microvésicules ou même des cellules (217, 218). La pression augmente en réponse à la résistance au passage de l’humeur aqueuse à travers le trabéculum, jusqu’à ce que cette pression soit assez élevée pour forcer le passage de l’humeur jusqu’au canal de Schlemm (214). La pression est constamment régulée par la production de matrice extracellulaire ainsi que par sa dégradation grâce à la production de métalloprotéinases par les cellules trabéculaires. Cette dynamique est contrôlée par la tension mécanique ressentie au niveau des cellules trabéculaires ou en réponse à certains facteurs présents dans l’humeur aqueuse (214, 215). L’étirement ou la contraction des muscles présents dans le corps ciliaire peut aussi influencer la taille des pores dans le TM, aidant ou nuisant au passage de l’humeur aqueuse. De plus, tout blocage du TM par l’accumulation de débris cellulaires est normalement évité grâce à la capacité de phagocytose qu’ont les cellules trabéculaires (219, 220).

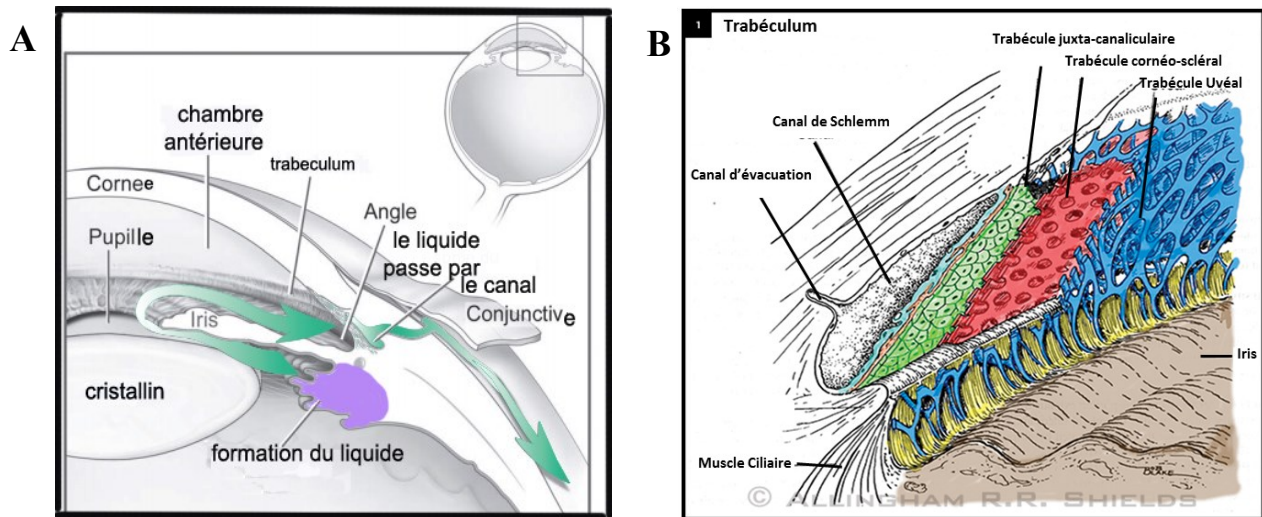


Figure 5 : Le Trabéculum. Tiré et modifié de (216, 221)

A. Le cycle de l’humeur aqueuse

B. Structure du trabéculum

1.4.3 Le Glaucome

Le glaucome n'est pas une maladie comme telle, mais bien un regroupement de diverses conditions entraînant un dommage au nerf optique et la mort des cellules ganglionnaires de la rétine (dont les axones forment le nerf optique). Le glaucome peut mener de la perte de la vision périphérique jusqu'à la cécité. La pathophysiologie classique du glaucome est la perte des cellules ganglionnaires périphériques avec un enfoncement de la papille optique. Le stress induit par la pression induit une déformation et un remodelage tissulaire au niveau de la lamina (le point le plus mince de l'œil et point de passage des fibres nerveuses pour former le nerf optique) ce qui induit un dommage aux cellules nerveuses et l'interruption du passage de signaux essentiels à la survie des cellules ganglionnaires (222). La hausse de la pression intraoculaire dans des maladies comme le glaucome est le résultat de plusieurs mécanismes distincts. Tous ont comme conséquence d'empêcher le passage de l'humeur aqueuse par le TM et son accumulation dans la chambre antérieure (223).

Plusieurs conditions cliniques peuvent donc mener au glaucome. Ces conditions ont été regroupées en trois grandes catégories: 1- le glaucome à angle ouvert (Figure 6B, primaire ou secondaire), 2- à angle fermé (Figure 6C, primaire ou secondaire), et 3- développemental. Les glaucomes développementaux sont liés à des défauts physiologiques, et ne peuvent pas être corrigés par la médecine régénératrice sans impliquer d'autres interventions. Les glaucomes à angle fermé, quant à eux, sont un groupe de maladies caractérisées par une fermeture complète ou partielle de l'angle formé par l'iris et la cornée, engendré par un déplacement de l'iris ou d'autres anomalies physiques (221). L'augmentation de pression dans cette variante peut être très forte et rapide. Elle peut être caractérisée selon la cause du déplacement de l'iris: une

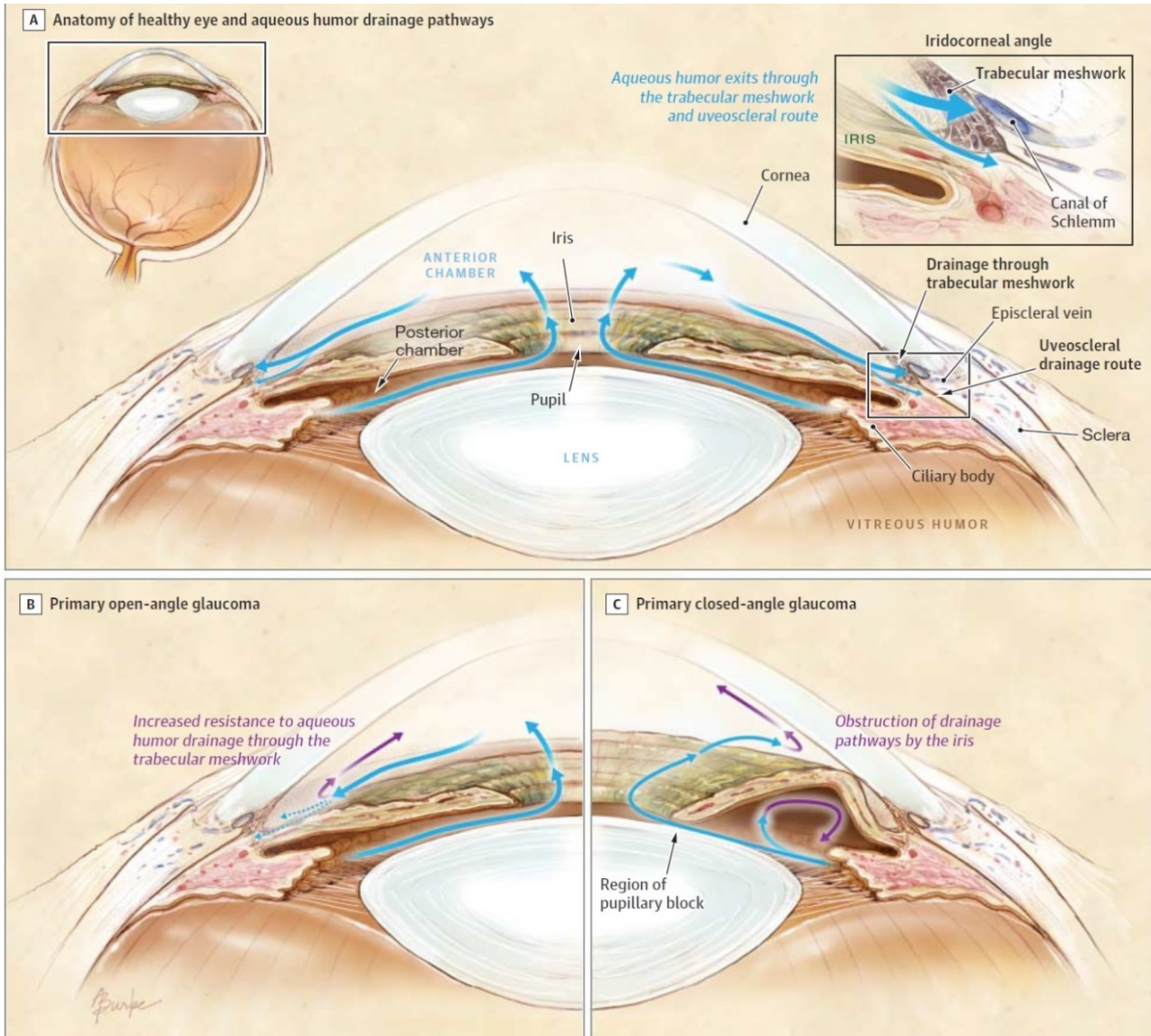


Figure 6 : Impact du glaucome, tiré de (222)

A. Le cycle de l'humeur aqueuse dans un œil sain

B. Impact du glaucome à angle ouvert. L'humeur aqueuse ne peut traverser correctement le trabéculum et reflue vers la chambre antérieure.

C. Impact du glaucome à angle fermé. L'humeur aqueuse ne peut pas atteindre au trabéculum et reflue vers la chambre antérieure.

traction au niveau de la chambre antérieure, une pression au niveau de la chambre postérieure ou un blocage de la pupille.

Certaines anomalies peuvent engendrer des hausses de pression menant à une forme de glaucome (224). Ici, la résistance au passage de l'humeur aqueuse est un effet secondaire d'une pathologie oculaire initialement sans lien apparent. Si la cause est pré-trabéculaire, elle est due à la croissance d'un nouvel élément tissulaire dans la chambre antérieure qui peut éventuellement recouvrir l'iris et le trabéculum. Ce nouvel élément est généralement causé par une néovascularisation dans la chambre antérieure ou la formation d'une membrane endothéliale. Ces nouveaux tissus vont bloquer les pores du trabéculum, emprisonnant l'humeur dans la chambre antérieure et causant la hausse de pression. Lorsque la cause est post-trabéculaire, elle est généralement reliée à une hausse de pression dans la veine épisclérale, le vaisseau sanguin drainant le canal de Schlemm (221, 224). Cette hausse de pression va augmenter la résistance au passage de l'humeur aqueuse, qui compte essentiellement sur des mécanismes passifs pour progresser, et ne pourra pas sortir de l'œil si cela va à l'encontre du gradient de pression. Chaque millimètre de mercure (mmHg) de plus dans la pression de la veine épisclérale causera une hausse similaire de la pression intraoculaire (225).

De toutes ces variantes, le glaucome à angle ouvert est le plus répandu. Il est caractérisé par une chambre antérieure dégagée, sans anomalie apparente pouvant expliquer la hausse de pression (221). Il peut être considéré comme primaire lorsque le problème provient des cellules trabéculaires, ou secondaire lorsque le problème est causé par une

obstruction à l'intérieur du trabéculum. Le glaucome primaire à angle ouvert (POAG) est le plus courant des deux genres (212, 213, 223, 226). Il s'agit aussi d'une maladie idiopathique, car les éléments menant à son développement ne sont pas toujours connus ou compris. Bien que son point de départ soit inconnu, beaucoup de changements au niveau du TM peuvent être observés et ont été identifiés comme étant des éléments pouvant aggraver la condition du patient. Les éléments les plus courants sont la mort des cellules trabéculaires, la perte d'élasticité du TM, son épaissement ainsi que l'accumulation de matrice extracellulaire(227).

Plusieurs études ont indiqué une baisse du nombre de cellules trabéculaires dans des cas de POAG (227-230). Ces études sont cependant controversées, car elles manquaient de sujets contrôles sains permettant de déterminer si ce problème était présent à la naissance ou acquis durant la vie adulte(231). Des groupes comparant des biopsies trabéculaires provenant de patients souffrant de POAG avec celles de patients souffrant de glaucome à angle fermé ont tout de même démontré un plus grand ratio de cellules trabéculaires apoptotiques chez les patients souffrant de POAG (232). La raison derrière cette hausse de mort cellulaire est incertaine, mais pourrait être induite ou intensifiée par une forte activité phagocytaire, des défauts génétiques (qui seront expliqués ci-dessous) ou un stress oxydatif induit par le glaucome lui-même (219, 232-234). Sachant que le rôle de cellules trabéculaires normales est de maintenir la structure du TM, de remodeler la matrice extracellulaire entre les fibres qui le composent ainsi que de phagocyter les débris tissulaires, la perte de ces dernières ne peut qu'exacerber l'intensité et la progression du glaucome. De plus, grâce à un modèle de souris knock-out, il a été démontré que la perte du gène pro-apoptotique BAX avait un effet

protecteur dans le glaucome et inhibait la hausse de pression (235). Cette découverte suggère que la mort des cellules trabéculaires est une des causes principales de glaucome primaire à angle ouvert.

Un autre changement observé dans le trabéculum de patients avec POAG est l'épaississement des fibres du TM au niveau uvéal et cornéoscléral (227, 236). La perte des cellules trabéculaires expose la membrane basale des fibres à l'humeur aqueuse et favorise leur fusion par contact et adhérence de la collagénase à leur surface (224). Il a été proposé que ces événements mènent à une plus grande rigidité du trabéculum, ce qui empêche son expansion ou sa contraction au gré des mouvements des muscles dans le corps ciliaire (237-239). Toutefois, aucune corrélation n'a encore été démontrée entre la hausse de la pression intraoculaire et le nombre de fibres fusionnées. Il a été suggéré que ces changements dans le nombre ou l'épaisseur des fibres sont un processus normal chez des personnes plus âgées, bien qu'à un rythme plus lent que ce qui est observé dans le glaucome. Il se pourrait donc que ce processus qui accompagne la progression de la maladie ne soit qu'une exagération d'un événement normal (237).

Un des changements les plus communs chez des patients atteints de POAG est l'augmentation de quantité de matrice extracellulaire au niveau du tissu juxtacanaliculaire, ainsi que l'accumulation par adhérence de glycoprotéines, de fibronectine et d'élastine. On nomme « plaque » la structure formée par l'accumulation de ces éléments (212, 227). Une des causes de cette dérégulation est l'augmentation de TGF- β 2 dans l'humeur aqueuse. On peut retrouver ce facteur à une concentration 50% plus élevée que la normale chez des patients

atteints de POAG (240, 241). Le TGF- β 2 stimule la production *in vitro* d'ECM par les cellules trabéculaires. TGF- β 2 favorise aussi la production de l'inhibiteur de l'activateur du plasminogène (PAI) qui bloque l'activation des métalloprotéinases, responsables de la dégradation de la matrice (242). Il a aussi été montré qu'un excès de TGF- β 2 peut mener à la formation d'un complexe de fibronectine qui ne peut être dégradé par les métalloprotéinases (212, 242, 243). De plus, le stress oxydatif présent au niveau du TM, et qui est causé par le glaucome lui-même, peut augmenter la production de matrice par régulation négative de micro-RNA, dont miR-29, dont le rôle est, entre autres de réprimer la production d'ECM (244). Bien que l'accumulation de cette plaque soit significativement plus élevée chez des patients atteints de POAG et qu'elle risque grandement d'empêcher le passage d'humeur aqueuse, il existe toujours une controverse entourant son rôle comme cause principale de la hausse de pression intraoculaire. En effet, plusieurs patients observés au début du développement de la maladie n'ont pas cette accumulation de plaque, ce qui l'élimine comme facteur déclencheur de la hausse. (212, 237).

Bien que la cause de la hausse de pression dans le POAG ne soit pas bien comprise, des mutations génétiques représentent l'un des principaux suspects. Le glaucome à angle ouvert est ainsi considéré comme héréditaire dans de nombreux cas et plusieurs mutations situées sur des loci liés au glaucome ont été identifiées (désignées GLC1A jusqu'à GLC1N) (226, 245). Parmi celles-ci, l'une des plus étudiées est la mutation du gène codant pour la protéine myociline (MYOC/GLC1A) qui est principalement produite et sécrétée par les cellules trabéculaires (226, 245, 246). Cette mutation est responsable de 5% des cas adultes de POAG et de plus de 10% de la forme juvénile (226). Le rôle de la myociline n'est pas

entièrement compris, mais cette mutation cause la rétention et l'accumulation de cette protéine dans les cellules trabéculaires (247, 248). Étant donné que la délétion expérimentale du gène MYOC ne cause pas de hausse de pression dans des modèles expérimentaux, il a été suggéré que l'accumulation intracellulaire de cette protéine serait toxique pour le TM, causant la mort ou la dégradation de ces cellules et menant au glaucome a angle ouvert (249). La myociline est aussi en cause dans les glaucomes engendrés par la prise de corticostéroïdes. En effet, les cellules trabéculaires exposées à ces substances augmentent fortement leur expression de myociline et certaines études ont démontré un lien entre cette hausse d'expression et la hausse de pression (250).

D'autres gènes ont aussi été liés au POAG, mais à un degré moindre que MYOC. L'un de ceux-ci est l'optineurine (OPTN/GLC1E), un gène dont la mutation cause environ 1% des cas de ce type de glaucome (251). Toutefois, cette mutation est responsable d'environ 10% des cas de glaucome normotensif, un glaucome sans hausse de pression, mais avec des dommages semblables au niveau de la rétine et du nerf optique (252). La fonction de cette protéine, ainsi son rôle dans le glaucome, sont incertains, bien qu'elle puisse interagir avec une grande quantité d'autres protéines et facteurs de transcription du TM. Sa production étant normalement augmentée lors de la hausse de la pression oculaire, il est suggéré qu'elle aurait un rôle protecteur envers les cellules trabéculaires, rôle qu'elle ne pourrait pas remplir suite à des mutations (224). Une autre mutation observée dans certains cas de POAG implique le gène WDR36 (GLC1G). Normalement, le gène WDR36 est impliqué dans l'activation et la prolifération des cellules T, alors l'interaction entre une mutation de WDR36 et le développement de POAG n'est pas encore bien comprise (253).

Lorsqu'on parle d'un glaucome secondaire à angle ouvert, c'est qu'il s'agit d'une variante dont l'origine n'est pas attribuable au trabéculum, mais où il y aura tout de même l'apparition d'un degré élevé de mort cellulaire au niveau du TM (254). Ces maladies commencent habituellement par l'accumulation d'une grande quantité de matériel fibreux dans l'humeur aqueuse, ce matériel provenant généralement des cellules pigmentaires de l'iris. (213). Ces débris sont ensuite phagocytés par les cellules trabéculaires, ce qui va éventuellement entraîner des dommages et engendrer l'apoptose par surcharge phagocytaire (224, 255). Cette mort cellulaire ainsi que l'inflammation qui en découle va engendrer les changements observés dans le glaucome à angle ouvert (213, 256).

Bien que les conséquences du glaucome mènent toujours à la destruction de la rétine et du nerf optique, le glaucome ne se développe pas de la même façon d'un patient à l'autre. Au contraire, il est composé d'une grande variété de sous-types qui eux-mêmes se développent selon des mécanismes distincts et mal compris. Malgré tout, la majorité des traitements ne ciblent que la pression oculaire afin de ralentir la progression de la maladie. Il est important pour le clinicien de connaître toutes les possibilités de traitement et pour le chercheur de fournir de nouvelles stratégies thérapeutiques afin de changer l'approche envers les patients.

1.4.4 Les traitements contre le glaucome

Ralentir la progression de la maladie pour maintenir une bonne qualité de vie est le but premier des traitements contre le glaucome. Jusqu'à maintenant, la mesure de la pression

intraoculaire est l'unique marqueur permettant d'analyser la progression de la maladie. Ce paramètre doit être ramené à des valeurs les plus basses possible (entre 16 et 21 mmHg) afin d'éviter l'apparition de dommages permanents au nerf optique. À ce jour, il existe 5 grandes catégories de médicaments utilisés en clinique : des analogues de la prostaglandine, les bêtabloquants, et des inhibiteurs de l'anhydrase carbonique, des alpha agonistes, et des miotiques.

Favoriser la sortie d'humeur aqueuse est l'une des premières cibles des médicaments contre le glaucome. La prostaglandine cible la voie uvéosclérale. Le TM est responsable de la sortie d'environ 85% de l'humeur aqueuse de l'œil. Le reste emprunte la voie uvéosclérale, c'est-à-dire que l'humeur diffuse directement dans le tissu musculaire du corps ciliaire, structure hautement vascularisée adjacente au TM dans l'œil, et va ainsi rejoindre le flux sanguin (257). Cette voie nécessite la relaxation des muscles ciliaires, le remodelage de la matrice extracellulaire et la vasodilatation des vaisseaux sanguins du corps ciliaire, trois mécanismes pouvant être favorisés par des dérivés de la prostaglandine (258, 259). Les miotiques, quant à eux, ciblent directement le trabéculum. Cet agent cholinergique diminue la contractilité du TM et facilite ainsi la sortie de l'humeur aqueuse. Une autre cible de la médication est la production d'humeur aqueuse dans le corps ciliaire. Une baisse de production, par utilisation d'alpha agonistes, de bêta bloquants ou d'inhibiteurs d'anhydrase carbonique, favorise une diminution de la pression oculaire dans tous les types de glaucome. La production d'humeur aqueuse est contrôlée en partie par des récepteurs adrénergiques (alpha et bêta). L'activation des récepteurs alpha adrénergiques, plus vasoconstricteurs, diminue la production d'humeur tandis que la stimulation des récepteurs bêta adrénergiques,

plus vasodilatateurs, en augmente la production. Un autre élément important est l'anhydrase carbonique (211). En générant des ions H^+ et HCO_3^- , cette enzyme favorise le passage de Na^+ et produit un gradient de pH essentiel à la sécrétion active de l'humeur entre le stroma du corps ciliaire et la chambre postérieure (260). Des médicaments influant sur ces récepteurs ou bloquant cette enzyme diminuent la production de nouvelle humeur et causent une baisse la pression. Ces médicaments existent sous la forme topique (gouttes pour les yeux), mais aussi orale. Pour maintenir une basse pression, ces médicaments doivent toutefois être pris tous les jours, jusqu'à 4 fois par jour dans certains cas, ce qui est souvent difficile chez les patients plus âgés affectés par cette maladie. Ces médicaments sont aussi à risque de causer des réactions allergiques ou inflammatoires, ce qui complique clairement leur utilisation.

Lorsque la pression est trop élevée ou que la médication n'atteint pas les objectifs nécessaires, la chirurgie, au laser ou par incision, devient la seule option. La trabéculoplastie au laser diminue la pression en induisant des changements biologiques au niveau de l'angle. Ces derniers peuvent être dus à une activation de la prolifération cellulaire du trabéculum ou par l'arrivée de macrophages phagocytant les débris tissulaires. Les macrophages sont d'ailleurs une composante importante du trabéculum, assurant la phagocytose de tout débris pouvant bloquer le passage de l'humeur. Ces macrophages ont été proposés comme des acteurs principaux de la baisse de pression suite à la trabéculoplastie au laser (261). Le traitement au laser induirait ainsi une réaction inflammatoire. Les macrophages recrutés au site de dommage interagiraient avec les cellules endothéliales du TM et du canal de Schlemm pour favoriser le passage de l'humeur. Cette réaction serait attribuable à la production de différents facteurs, tels que le $TNF-\alpha$, l'IL-1 et l'IL-6. La baisse de pression à des niveaux optimaux est

atteinte dans 30 à 60% des cas. Il a aussi été démontré que l'effet de ce traitement diminue avec les années, ce qui fait qu'en moyenne, un patient nécessite une nouvelle intervention ou un nouveau type de traitement après 3 ans (262, 263). Des chirurgies de pontage trabéculaire peuvent aider à baisser la pression intraoculaire, mais ne sont pas assez efficaces pour le traitement de glaucomes très avancés. Ce type de glaucome nécessite alors une trabéculéctomie ou une sclérotomie non pénétrante. Ces techniques consistent en l'excision d'une petite partie du trabéculum ou du tissu cornéoscléral afin de créer un passage à travers la sclère pour fournir une sortie physique à l'humeur aqueuse vers la conjonctive de l'œil. Toutefois, la création d'une bulle de filtration (élévation conjonctivale à l'endroit où se déverse l'humeur aqueuse) suite à l'opération peut augmenter les risques de complications infectieuses dans les années suivant l'opération. De plus, il est possible que l'œil subisse des dommages additionnels des suites d'une pression oculaire trop basse (264). Le dernier recours chirurgical consiste en un « Glaucoma Drainage Device » un tube de silicone implanté dans la chambre antérieure et connecté à une plaque de silicone ou polypropylène implantée à la surface de la sclère. Ce système est efficace là où les autres chirurgies n'ont pas réussi et dans le traitement de certains glaucomes secondaires. Il est toutefois important de spécifier que le taux de réussite de cette technique se situe entre 50 et 80% et qu'il comporte plusieurs risques de complications.

1.4.5 Les cellules souches oculaires et la régénération tissulaire

Jusqu'à maintenant, la thérapie cellulaire au niveau oculaire reste expérimentale, bien que quelques techniques soient déjà pratiquées en clinique. L'objectif principal de la plupart

de ces recherches est la régénération des cellules nerveuses et des photorécepteurs de la rétine, dont la destruction mène à la perte de vision dans les maladies oculaires, comme les dystrophies rétiniennes, le glaucome et la dégénérescence maculaire liée à l'âge (DMLA). L'utilisation de cellules souches embryonnaires ou des IPS sont parmi les avenues thérapeutiques les plus prometteuses pour réparer l'œil et font donc l'objet d'une investigation intensive. Différents types cellulaires obtenus suite à la différenciation des ESC ont été utilisés dans des modèles animaux de dégénérescence oculaire et, jusqu'à maintenant, ont permis de ralentir la progression de la perte de vision ou de restaurer la sensibilité à la lumière dans certains modèles de maladie. Le mécanisme impliqué était le remplacement des tissus endommagés par l'intégration à la rétine et la différenciation des ESC en photorécepteurs fonctionnels ou en cellules épithéliales pigmentaires de la rétine (RPE)(265). Toutefois, d'autres structures de l'œil, comme la cornée, le trabéculum, le tissu vasculaire et les cellules RPE, sont des sources potentielles de cellules progénitrices pouvant mener à de nouveaux traitements en clinique (266, 267).

1.4.5.1 La cornée

Les cellules de la cornée, comme toute autre surface épithéliale, sont constamment éliminées et renouvelées pour maintenir la transparence et l'intégrité de cette membrane. Les cellules progénitrices responsables de ce renouvellement, nommées cellules souches épithéliales limbales (LESC), se trouvent à la jonction cornéosclérale, au niveau du limbus de l'œil, plus précisément dans une structure nommée « palissades de Vogt »(57, 268). Elles sont identifiables par leur forte expression du facteur de transcription P63, de Bmi-1, de N-cadherin et de l'intégrine- α 9 (57, 269). Ces cellules peuvent s'autorenouveler et produire des cellules

d'amplifications transitoires qui vont migrer vers le centre de la cornée en suivant la membrane de Bowman et remplacer les cellules vieillissantes (270). La déficience en LESC peut résulter en une invasion de la cornée par du tissu conjonctif et une néovascularisation de la surface tissulaire, provoquant une opacification de la cornée(271). La transplantation autologue de cellules limbales est l'une des rares thérapies cellulaires oculaires présentement réalisées en clinique (57, 272).

1.4.5.2 Le trabéculum et le corps ciliaire

Plusieurs populations remplissant les caractéristiques des cellules souches ont été identifiées dans l'angle de l'œil. On retrouve ces cellules au niveau du corps ciliaire ainsi que dans une sous-population du trabéculum.

L'épithélium du corps ciliaire provient du neuroépithélium de la vésicule optique, qui est à l'origine de l'œil durant l'embryogenèse. On croit donc que cette région pourrait contenir des cellules progénitrices rétiniennes. Suite à un traitement par trabéculoplastie au laser dans des modèles animaux ou dans des organes humains en culture, une augmentation de la division cellulaire peut être observée dans l'angle de la chambre antérieure (273-278). Après l'induction du dommage, ces cellules épithéliales du corps ciliaire peuvent acquérir l'expression de marqueurs de cellules progénitrices, comme Nestine, Pax6, Sox2, Oct-3/4. Ceci peut être répliqué *in vitro* par une stimulation avec des facteurs de croissance, tels que l'insuline et bFGF (279). De plus, lorsqu'isolées et mises en culture en présence de bFGF et d'EGF, ces cellules ont la capacité de former des neurosphères (280); ces structures cellulaires sphériques non adhérentes sont représentatives des cellules souches neurales (NSC) et sont

composées d'une population hétérogène de cellules à différents niveaux de différenciation (275, 279, 281, 282). Dans ces neurosphères, on retrouve des cellules qui peuvent produire différentes sous-populations retrouvées dans la rétine, comme des photorécepteurs bâtonnets, des cellules bipolaires et des cellules ganglionnaires. Elles peuvent exprimer aussi des marqueurs de cellules rétinienne, comme la rhodopsine, l'iodopsine, la protéine kinase C (PKC) et HPC-1 (marqueur de cellules amacrines et des interneurons de la rétine), démontrant un potentiel de différenciation spontané en cellules rétinienne (274, 282). Transplantées *in vitro*, ces cellules s'intègrent dans l'espace sous-rétinien et sont capables de se différencier en photorécepteurs (283, 284). On a aussi observé leur participation dans certains rôles des RPE, comme la phagocytose des photorécepteurs de type bâtonnet périphérique, en plus de favoriser la survie des photorécepteurs dans des modèles de dégénérescence rétinienne (277, 285, 286). Il est donc possible que ces cellules progénitrices puissent agir comme cellules de soutien de la rétine. Plusieurs études tentent actuellement de déterminer si ces cellules pourraient être utilisées comme source de cellules souches pour la régénération de rétines endommagées (287, 288).

Le trabéculum possède aussi des cellules progénitrices avec des propriétés semblables aux MSC (289). Elles sont d'ailleurs identifiables par des marqueurs communs entre ces deux populations, tels que CD73, CD90 ou CD166 ainsi que OCT3/4, BMI1 ou Notch1. Mises en culture, ces cellules forment aussi des sphères qui peuvent produire des cellules neuronales, adipeuses ou cornéennes. Il est aussi possible d'obtenir des cellules morphologiquement semblables aux cellules du TM en dissociant les sphères et en les plaçant en culture adhérente (267, 276, 280). L'étude des neurosphères dérivées du TM a montré que ces cellules

expriment les protéines aquaporine-1, matrix gla (MGP) et chitinase 3-like 1 (CH3L1) qui, au niveau de l'œil, sont exprimées préférentiellement dans le TM (280). Elles sont aussi capables de phagocytose, comme les cellules trabéculaires normales. Le mécanisme de différenciation des cellules du TM n'est pas connu, mais cette différenciation s'effectue spontanément en culture en présence de sérum de veau foetal (FBS), ce qui suggère qu'il s'agit d'une population spécialisée. Des études sont en cours pour tenter de raffiner la production de ces cellules afin d'être éventuellement en mesure de remplacer les cellules endommagées du TM et de prévenir la progression du glaucome à angle ouvert.

1.4.5.3 Cellules souches et neuroprotection

Certaines études ont utilisé des cellules souches provenant de l'extérieur de l'œil, notamment des MSC, afin de vérifier leur potentiel dans le traitement de la rétine. Ces cellules, injectées au niveau de la rétine, ont exprimé un fort potentiel neuroprotecteur. Cela signifie que les MSC altèrent l'environnement inflammatoire et hypoxique de la rétine (notamment dans des modèles de dégénérescence maculaire ainsi que de glaucome avec hausse de pression intraoculaire). Les MSC sont notamment capables d'induire une baisse du niveau de TNF- α et d'INF- γ ainsi qu'une diminution de l'apoptose au niveau de la rétine. Il est supposé que la production locale du Ciliary NeuroTrophic Factor (CNTF), du Brain Derived Neurotrophic Factor (BDNF) et du bFGF est responsable de ces changements (290, 291). Certains précurseurs des cellules souches neurales sont aussi capables de favoriser la survie de cellules oculaires par des mécanismes paracrines parfois semblables aux MSC, comme, par exemple, la sécrétion de facteurs neurotrophiques (BDNF, CNTF, NGF)(292). Au

niveau du cerveau par exemple, les cellules souches neurales peuvent amener une diminution des dérivés réactifs de l'oxygène présents dans l'environnement tissulaire par production de superoxyde dismutase 2 (SOD2). Les cellules souches neurales peuvent non seulement produire directement SOD2, mais aussi activer sa production dans les cellules neurales adjacentes par un mécanisme dépendant de VEGF et de CNTF (293). D'autres types de cellules progénitrices neurales, comme les cellules précurseurs d'oligodendrocytes, peuvent protéger les neurones et réduire la dégénérescence tissulaire de la rétine dans des modèles de glaucome induits par un mécanisme impliquant IGF-1 et le Glial cell line Derived Neurotrophic Factor (GDNF) (294).

1.4.5.4 Les cellules souches mésenchymateuses et le glaucome

L'effet des MSC dans le traitement du glaucome a été vérifié dans plusieurs études fondamentales (295). Les premières études mentionnant les MSC dans le traitement du glaucome visaient la régénération ou la neuroprotection de la rétine et ont suggéré que les MSC pourraient être utilisées en combinaison avec des méthodes de contrôle de la pression intraoculaire classiques (296). Elles ont montré que les MSC étaient en mesure de diminuer la mortalité des cellules rétinienne de 15% si on les administre deux mois après l'induction de la haute pression et de 60% si la greffe était effectuée au même moment que l'induction (295, 297). Les premières études démontrant que du MSC-CM pouvait aussi avoir un effet protecteur ont été effectuées durant cette période (298, 299). Les mécanismes impliqués étaient la production de facteurs de croissance importants pour la rétine, comme CNTF, BDNF, NGF

ainsi que les propriétés anti-inflammatoires des MSC. Finalement, ces études ont démontré l'implication d'une injection locale de MSC comme condition essentielle à la neuroprotection.

Connues depuis les années 2000, les cellules progénitrices présentes dans le corps ciliaire ont été suggérées comme étant capable d'agir sur le trabéculum après que différentes études aient montré qu'un dommage comme une trabéculoplastie laser pouvait les faire sortir de leur dormance (10). Une étude publiée en 2011 par Shwartz, M. et al a démontré que les macrophages avaient un rôle important à jouer dans cette activation en modulant l'environnement tissulaire vers des conditions anti-inflammatoires (300). À notre connaissance, aucune étude n'a démontré que cette population pouvait être activée par les MSC injectées dans la chambre antérieure par l'intermédiaire des macrophages et induire une baisse de la pression intraoculaire, avant la publication présentée dans le deuxième chapitre de cette thèse. Ces résultats ont depuis été partiellement confirmés par d'autres groupes (301).

Raisonnement, Hypothèse et Objectifs

Les MSC sont des cellules abondamment décrites pour leur pouvoir régénératif exceptionnel. De ce fait, ces cellules s'avèrent des candidates particulièrement intéressantes pour la régénération tissulaire ainsi que le traitement de maladies dégénératives. Elles sont faciles à obtenir et à cultiver en laboratoire. Contrairement à d'autres types de cellules souches, elles sont relativement peu coûteuses à entretenir. De plus, leur mode d'action par production de facteurs paracrines permet d'envisager une thérapie cellulaire sans injection de cellules chez le patient. Le glaucome à angle ouvert, quant à lui, est une maladie à progression

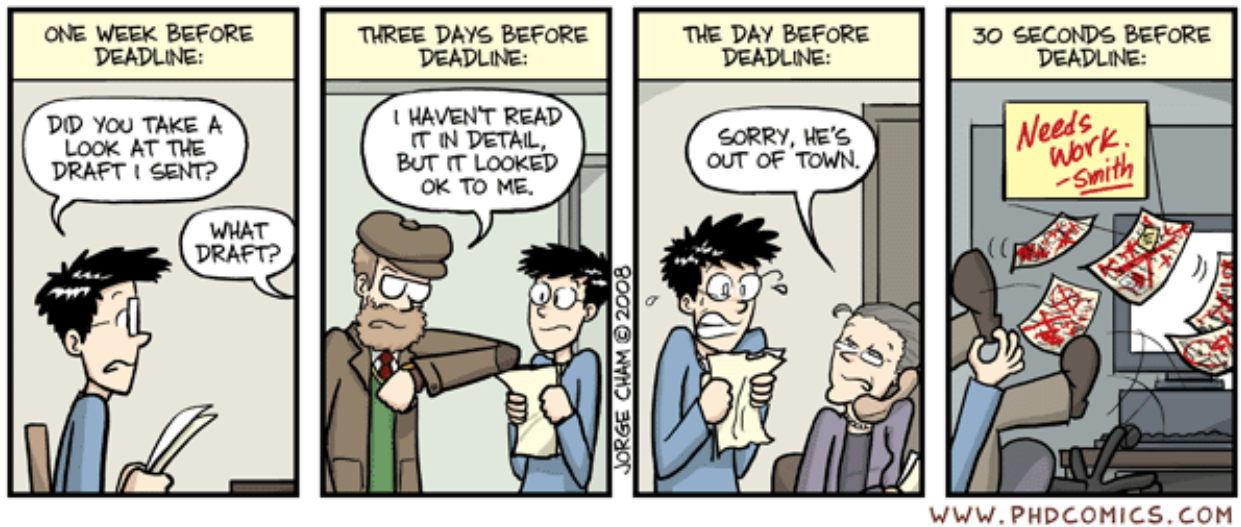
lente, mais incurable, qui affecte l'un des sens sur lesquels on se base le plus, la vue. Jusqu'à maintenant, tous les traitements connus sont capables d'en ralentir la progression, mais aucun ne permet d'arrêter sa progression. Pouvoir redonner la vision, ou du moins aider à la préserver, est un objectif qui aurait un impact important majeur pour les patients atteints de cette maladie. Toutefois, l'absence de renseignements détaillés sur tous les mécanismes d'action des MSC rend cette tâche plus difficile, ou du moins exploratoire. Malgré ces embûches, utiliser le glaucome comme modèle pour comprendre le fonctionnement des MSC est particulièrement intéressant, en raison de la capacité d'obtenir des mesures et de réaliser des observations directes *in vitro* et *in vivo*. L'utilisation de modèles expérimentaux très près de la condition clinique permet d'entrevoir les conséquences immédiates que ces résultats pourraient avoir sur la vie de milliers de patients. En tenant compte des mécanismes d'action connus des MSC, nous émettons donc l'hypothèse suivante :

« L'utilisation de MSC, ou de leurs facteurs sécrétés, permettra la régénération tissulaire du trabéculum endommagé et pourra représenter une stratégie efficace afin de bloquer la progression du glaucome à angle ouvert »

Les objectifs principaux de la thèse sont :

- Vérifier si les MSC ont la capacité de régénérer le trabéculum dans un modèle induit de glaucome à angle ouvert.
- Comprendre les mécanismes à l'origine de la régénération tissulaire et identifier les facteurs responsables de cet effet

Chapitre 2 : Article 1



Tiré de www.phdcomics.com

2.1 Transplantation of Mesenchymal Stem Cells Promotes Tissue Regeneration in a Glaucoma Model through Laser-induced Paracrine Factor Secretion and Progenitor Cell Recruitment

Renaud Manuguerra-Gagné, Patrick R. Boulos, Ahmed Ammar, François A. Leblond, Gorazd Krosl, Vincent Pichette, Mark R. Lesk and Denis-Claude Roy

Cet article a été publié dans *Stem Cells* 31(6):1136-48 (2013)

Ma contribution à cet article est majeure. Développer un modèle animal fut la tâche d’Ahmed Ammar. J’ai ensuite effectué toutes les manipulations conceptualisées par l’équipe initiale. Ce fut mon initiative de vérifier l’impact des facteurs sécrétés puis d’étudier leur effet sur les cellules progénitrices. J’ai conçu et réalisé les manipulations nécessaires pour démontrer mon hypothèse. Seule l’expérience sur la diffusion d’un marqueur radioactif par le trabéculum fut conçue grâce à l’aide du laboratoire du Dr. Vincent Pichette et nous avons participé également à la collecte des données. J’ai effectué la majeure partie de l’analyse des résultats, leur interprétation, la création des figures, la rédaction de l’article et les réponses aux réviseurs. Cet article est important pour ma thèse, car il permet la compréhension du mécanisme d’action des cellules souches. Il démontre l’importance des interactions entre les cellules greffées et les cellules progénitrices hôtes, et comment cette relation orchestre la régénération tissulaire. Au plan clinique, aucun moyen n’a encore été découvert pour réparer le trabéculum, dont la destruction est l’une des causes principales de la progression du glaucome. Mes travaux pourraient permettre de faire un premier pas dans ce sens.

Transplantation of Mesenchymal Stem Cells Promotes Tissue Regeneration in a Glaucoma Model through Laser-induced Paracrine Factor Secretion and Progenitor Cell Recruitment

Renaud Manuguerra-Gagné,^{1,2,5} Patrick R. Boulos,³ Ahmed Ammar,^{1,2} François A. Leblond,⁴ Gorazd Krosl,¹ Vincent Pichette,^{4,5,6} Mark R. Lesk^{2,3,5} and Denis-Claude Roy^{1,5}

Division of ¹Hematology-Oncology and ⁴Nephrology, Hopital Maisonneuve-Rosemont Research Center, Montreal, Canada

²Department of Vision Health Research, Hopital Maisonneuve-Rosemont, Montreal, Canada

³Department of Ophthalmology, University of Montreal, Montreal, Canada

Department of ⁵Medicine and ⁶Pharmacology, University of Montreal, Montreal, Canada

Supported by Glaucoma Research Society of Canada, Thécell Network – Fonds Recherche Quebec – Sante (FRQS), Fonds de Recherche en Ophtalmologie de l'Université de Montréal, the Fonds de recherche Québec - Santé, and Canadian Institutes for Health Research

Corresponding Authors:

Denis Claude Roy, MD

Cellular Therapy Laboratory

Telephone : 514-252-3400 ext 3331

Fax : 514-252-3430

Hopital Maisonneuve-Rosemont Research Center

5415 l'Assomption blvd.

Montreal, Quebec, H1T 2M4, Canada

Mark Lesk, MSc., MD

Glaucoma Research Laboratory

514-252-3400 ext 4959

514-251-7094

2.2 Abstract

Among bone marrow cells, hematopoietic and mesenchymal components can contribute to repair damaged organs. Such cells are usually used in acute diseases but few options are available for the treatment of chronic disorders. In the present study, we have used a laser-induced model of open angle glaucoma (OAG) to evaluate the potential of bone marrow cell populations and the mechanisms involved in tissue repair. In addition, we investigated laser-induced tissue remodeling as a method of targeting effector cells into damaged tissues. We demonstrate that among bone marrow cells, mesenchymal stem cells (MSC) induce trabecular meshwork (TM) regeneration. MSC injection into the ocular anterior chamber lead to far more efficient decrease in intraocular pressure (IOP) ($P < 0.001$) and healing than hematopoietic cells. This robust effect was attributable to paracrine factors from stressed MSC, as injection of conditioned medium from MSC exposed to low but not to normal oxygen levels resulted in an immediate decrease in IOP. Moreover, MSC and their secreted factors induced reactivation of a progenitor cell pool found in the ciliary body and increased cellular proliferation. Proliferating cells were observed within the chamber angle for at least 1 month. Laser-induced remodeling was able to target MSC to damaged areas with ensuing specific increases in ocular progenitor cells. Thus, our results identify MSC and their secretum as crucial mediators of tissue repair in OAG through reactivation of local neural progenitors. In addition, laser treatment could represent an appealing strategy to promote MSC-mediated progenitor cell recruitment and tissue repair in chronic diseases.

2.3 Introduction

One of the most important breakthroughs of the last decade is the discovery that stem cells from various tissues have the ability to repair damaged organs. However, the repair mechanisms used by such cells are only beginning to be elucidated. Such effects can be mediated by undifferentiated stem cells transforming into mature cells with specialized function (1-4). Alternatively, stem cells could also secrete cytokines and other factors that enhance intrinsic repair mechanisms and promote the development of a protective environment capable of changing the outcome for cells that have sustained potentially lethal damage (5-10). Experimental data support immune modulation and neovascularization as mechanisms, but few other pathways have been thoroughly investigated (11-14). In addition, it has been shown stem cells are particularly active when injected soon after the initiation of acute tissue damage or in the presence active disease (10, 15, 16). In chronic disorders or instances where scarring has already developed, decreased homing signals and release of cytokines within dysfunctional or fibrotic tissues may limit the efficacy of cellular interventions. Thus, there is a dire need to develop approaches to create space and enhance stem cell recruitment to such tissues.

Among the various organs targeted by cellular interventions, the eye offers particularly attractive features to rapidly advance cell therapy (17). Indeed the eye is immediately accessible for cellular injection, and allows rapid as well as direct visualization and monitoring of the impact of therapeutic interventions. One of the most important chronic optic neuropathies and an important cause of blindness worldwide is open angle glaucoma (OAG)

(18). It is primarily associated with increased resistance to the outflow of aqueous humor through the trabecular meshwork (TM) resulting from apoptotic cell loss and subsequent increase in extracellular matrix density (19-25). Elevated intraocular pressure (IOP) is the most important risk factor for glaucoma, as changes in IOP homeostasis can result in damage to the optic nerve, and reduction of IOP is the mainstay of therapy(26, 27). Treatments include life-long medication to lower the production of aqueous humor, laser treatment of the TM to temporarily help regulate IOP, or invasive surgical procedures, to allow aqueous humor outflow through alternate routes (28-31). With the possible exception of laser trabeculoplasty, current procedures do not attempt to treat the TM. Given that TM degeneration is one of the root causes of IOP elevation in OAG, the development of an efficient way to regenerate the TM could improve IOP control and potentially treat many patients with this disease.

In the present study, we investigated bone marrow (BM) cell injection to promote TM regeneration and reduce the elevated IOP in an animal glaucoma model. We showed that among BM cells, MSC migrated predominantly to the area of tissue damage and were particularly efficient at decreasing IOP, restoring aqueous humor drainage and causing histological tissue repair. Such favorable results were observed although MSC persisted for only a few days, and their effects were replicated through local injection of their secretum. In addition, MSC promoted the reactivation and proliferation of nestin-expressing ocular progenitor cells in the ciliary body which, in turn, persisted in the eye for the duration of the study. Moreover, laser therapy led to both effector cell homing and localized recruitment of endogenous nestin expressing progenitors, thereby opening the door to targeted cell-based therapy of chronic ocular and other disorders.

2.4 Material and Methods

Animals

Six to eight week old C57BL/6 male mice and 3-month-old Brown Norway female rats were purchased from Jackson Laboratories (Bar Harbor, ME, USA) and Charles River (Kingston, ON, Can), respectively. Animals were housed in pathogen-free conditions and studied using protocols approved by the Hôpital Maisonneuve-Rosemont (HMR) Research Center Animal Protection Committee.

Isolation, Culture, and Expansion of BMMC

BM was aspirated from femurs and tibias of 2-month-old C57BL/6 mice. BM mononuclear cells (BMMCs) were isolated by using density gradient centrifugation (Ficoll-Paque; Amersham Pharmacia Biotech, Montreal, QC, Can) and suspended in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM; Gibco, Burlington, ON, Can), 20% heat-inactivated (56°C, 60 min) fetal bovine serum (FBSI; Hyclone, Logan, UT, USA), 2 µM L-glutamine, 100 U/mL penicillin, and 100 µg/mL streptomycin (Gibco). Cells were plated in 75 cm² tissue culture flasks (Sarstedt, Montreal, QC, Can) and incubated at 37°C in 5% CO₂ humidified air. After 48 hours, non-adherent cells were removed, grown until approximately 90% confluence, and then passaged with medium changes every 3-4 days.

MSC characterization

After the second passage, BMSC were characterized for mesenchymal and hematopoietic markers by flow cytometry analysis. The following fluorochrome labeled anti-mouse antibodies were used: CD14- and CD45-APC; CD105-Pacific blue; CD73-PE (all eBioscience, San Diego, CA, USA); and CD90-FITC (BD, Mississauga, ON, Can). Data was collected on a FACS LSRII cytometer (BD) and analysis performed with FlowJo software (Tree Star, Ashland, OR, USA) (32). Cells positive for the hematopoietic marker CD45 were sorted using a FACS Aria III (BD) and both MSC and hematopoietic cells used for *in vivo* experiments. MSC were tested for osteogenic and adipogenic differentiation using osteocyte/chondrocyte or adipocyte differentiation media (Invitrogen, Burlington, ON, Can), and alizarin red S and oil red O staining (Sigma, Oakville, ON, Can), respectively.

Trabecular Meshwork Cell Culture

The TM cell line MUTM-NEI/1 originating from H2K^b-tsA48 heterozygote mice (genetic background CBA/ca X C57BL/10) was a kind gift of Dr. Joram Piatigorsky (33). Cells were cultured in non-permissive conditions (37°C) in 75 cm² adherent tissue culture flasks with TM cell medium consisting of Iscove's Modified Dulbecco's Medium (IMDM; Gibco) supplemented with 20% FBSI, and L-glutamine, penicillin and streptomycin at above concentrations.

Co-Culture condition

MSC to TM cell differentiation was assessed in co-culture experiments. Briefly, 1×10^6 MSC were seeded in a 75 cm^2 tissue culture flask and stained using CellTracker Blue CMAC according to manufacturer's protocol (Invitrogen). Cells were washed with Hanks medium before adding fresh TM cell culture medium and seeding of 1×10^6 MUTM-NEI/1 cells at day 0 of co-culture. After 7 days, cells were harvested and expression of TM cell markers was analyzed using flow cytometry. The following unlabeled antibodies were used according to manufacturer's protocol: Rabbit anti-mouse Pax6, aquaporin-1 (both from US Biological; Burlington, ON, Can), laminin (Sigma) and fibronectin (Millipore; Nepean, ON, Can). Primary antibodies were revealed with goat anti-rabbit AlexaFluor488 (Invitrogen).

MSC Culture medium for paracrine studies

MSC secretum was obtained after seeding 1×10^6 MSC in 15 ml DMEM for 24 hours at 37°C in 5% CO_2 humidified air at either 21% or 5% O_2 . MSC conditioned medium (CM) was then harvested and concentrated 40X using 10 kDa centrifugal filter devices (Amicon Ultra-15, Millipore)

Glaucoma Model

To induce ocular hypertension, rats were anesthetized using intraperitoneal injection of ketamine (50 mg/kg; Wyeth; Guelph, ON, Can), and xylazine (2.2 mg/kg; Bayer; Toronto, ON), and drops of the local anesthetic proparacaine (Alcon Canada; Mississauga, ON, Can) were applied to the eyes. The method developed by Levkovitch-Verbin *et al* was modified to

selectively damage only half of the circumference of the anterior chamber angle (34). Briefly, 90 spots of 50 μm diameter were directed towards the nasal 180° of the trabecular meshwork area using a Coherent Novus Omni laser (Laser Labs Inc; Tampa, FL, USA) set at 532 nm wavelength, 200 mW and 0.1 second duration. Baseline IOP was measured weekly with a Tonopen-XL (Medtronic; Mississauga, ON, Can). IOP was obtained in rats by performing an average of 10 measurements at a time by a blinded observer.

Transplantation

Before injection, cells were stained using carboxyfluorescein succinimidyl ester (CFSE, CellTrace, Invitrogen) dye. A control population was kept *in vitro* in BMSC medium to measure fluorescence changes over time. CFSE stained cells were suspended at 1×10^5 cells/ μl in saline solution (Baxter; Pointe-Claire, QC, Can). Intraocular transplantation was performed during the hour or 4 days following laser treatment. Prior to intraocular injection, ten μl of aqueous humor (AH) was removed from the anterior chamber of the treated eye using a 28^{1/2} gauge needle under direct observation with a binocular surgical microscope. Injection of ten μl of cell preparation (cells, saline solution-placebo or MSC-CM) was performed at the same injection site immediately after AH removal and under identical conditions. Injection was carried out over the course of 1 minute to avoid additional stress to the anterior chamber. Although minimal reflux was observed after injection, no leaks were observed beyond the first 24h when using the Seidel test. Rare animals (2 for the duration of the study) have sustained additional damage to the anterior chamber during the injection, and were removed from the experiment. All animals were kept under immunosuppressed conditions by daily

intraperitoneal injection of cyclosporine A (Sandimmune; Novartis Pharma, Montreal, QC, Can) starting 3 days before treatment and continued for the duration of the experiment.

Tissue Processing

Animals were euthanized by intraperitoneal injection of pentobarbital sodium (Euthanyl; Bimeda-MTC Animal Health, Cambridge, ON, Can). Enucleated eyes were embedded in Optimum Cutting Temperature (Tissue-tek O.C.T.; Fisher Scientific, Ottawa, ON, Can) compound, and flash-frozen in liquid nitrogen. Twelve μm sections were cut by cryostat (Leica, Richmond Hill, ON, Can) and mounted on slides (Fisher Scientific). After fixation in 4% paraformaldehyde, hematoxylin and eosin staining (Sigma) was used to examine anterior segment histology.

Aqueous humor outflow

To monitor aqueous humor outflow, we relied on a modified methodology from P.L. Kaufman et al (35). Briefly, 5 μl of C-14 labeled dextran (Dextran [carboxyl-14C] Avg M.W. 70,000, American Radiolabeled Chemicals Inc. St-Louis, MO, USA) was injected on day 8 over the course of one minute in the anterior chamber of rats from laser treated, laser + low oxygen CM treated or untreated groups (n=3 per group). One hour prior to intraocular injection, unlabeled dextran (0.5ml, 100mg/ml, Sigma) was injected intravenously to reduce risk of radiolabeled dextran entrapment in organs. To calculate trabecular outflow, blood samples were taken from a cannula implanted in the jugular vein on the side of the treated eye

of anesthetised animals. Blood samples were collected every 2 minutes after dextran C-14 injection to monitor re-entry of the radiolabeled marker to the blood.

EDU labeling

To monitor the fate of anterior chamber cells during tissue regeneration, 9 animals were injected intraperitoneally with 50mg/kg of EDU (Invitrogen) from days 1 to 3 after laser damage and intraocular injections (36).

Immunofluorescence

Samples were incubated for 1 hour with blocking-permeabilizing solution of PBS containing 1 mg/ml bovine serum albumin (BSA; Vector Labs., Burlington, ON, Can) and 1 µl/ml Tween (Sigma). Slides were incubated overnight at 4°C with unlabeled mouse anti-nestin, rabbit anti-Ki67 (BD) and rabbit anti F4-80 antibodies (abcam, Toronto, ON, Can). Primary antibodies were revealed with goat anti-rabbit AlexaFluor488 and goat anti-mouse AlexaFluor594 (all from Invitrogen). Nuclei were stained with mounting medium containing DAPI (Vectashield; Vector Labs). EDU labeling was performed with Click-it EDU Alexa Fluor 488 imaging kit (Invitrogen) according to manufacturer's instructions. Histological sections were observed by confocal microscopy (Axiovert 100 LSM 510Meta; Carl Zeiss, Jena, Germany) and fluorescence and surface area of anterior chamber structures analyzed using AxioVs40 V4.8.2.0 (Carl Zeiss).

Tunnel assay

TUNEL assay was performed using the *In Situ* Cell Death Detection Kit, Fluorescein (Roche) according to the manufacturer's instructions. Briefly, ocular sections were permeabilized in 0.1% Tween for 15 minutes. Sections were then incubated with the enzyme terminal deoxynucleotidyl transferase and fluorescein-conjugated dUTP at 37°C for 1 hour. Nuclear DNA was stained with DAPI (Vector Labs).

Statistical analysis

Comparisons between animal groups were done using two-way ANOVA and Mann-Whitney T test. Statistical analyses were performed using GraphPad Prism version 4.0 (San Diego, CA, USA). All statistical tests were two-sided and performed at the significance level of 0.05.

2.5 Results

Animal glaucoma model

In order to study the contribution of MSC to the regeneration of the TM in glaucoma, we opted for a modified version of the laser-induced animal model developed by Levkovitch-Verbin *et al* which allowed for an internal control consisting of an untreated segment within the laser treated eye. Laser treatment covering 180° of the anterior chamber angle resulted in a significant elevation of the IOP, with a peak IOP of 26.9 ± 0.7 mmHg at day 12 (Fig.1A, mean \pm SEM; $n=10$; $p<0.001$), as opposed to healthy control animals with peak IOP of 20.8 ± 0.2

mmHg (Fig. 1A, $n=10$). Laser induced IOP elevation persisted for a period of approximately 30 days.

Injection of bone marrow cells *in vivo* decreases IOP

We first investigated the ability of cultured BMSCs to promote IOP pressure recovery *in vivo* (Fig. 1A). Increased IOP was observed in all groups on day 2 after laser exposure. While IOP continued to rise in laser treated animals, peaking on day 10, the ocular injection of 1×10^6 BMSCs rapidly lowered IOP, which returned to baseline significantly earlier (day 8) than in the laser only group (day 32)($p < 0.01$). Injection of saline solution resulted in IOP similar to untreated controls. Even cellular controls, which consisted of lymphocytes, failed to impact on IOP curves. The nature of injection content had no effect on IOP levels at day 2 for all groups (mean ranging from 26.5 to 27.7 in all 4 groups). However, the time required for BMSC to reduce the mean IOP by 50% was 4.3 days, 5 times faster than the time required to obtain the same pressure drop in the laser only (20.5 days), saline (22.5 days) or lymphocyte (22.2 days; $p < 0.001$) control groups.

BMSC Characterization

Adherent BMSCs harvested from B6 mice and expanded in culture *in vitro* were tested for hematopoietic markers (CD45 and CD14). After 2 passages, 65% of these adherent cells were negative for CD45 and CD14 (Supplementary Fig. 1A). These cells expressed classical MSC markers: CD73, CD90 and CD105 (Supplementary Fig. 1B-D), and were capable of adipogenic and osteogenic differentiation in the proper media, thus satisfying MSC

criteria (Supplementary Fig. 1E-F). To determine which of hematopoietic cells (37) or MSC mediated the IOP drop, BMMC were sorted according to CD45 expression and injected *in vivo* (Fig. 1B). Both hematopoietic (CD45+) and MSC groups were injected the same number of cells (5×10^5 cells) corresponding approximately to that found in the total BMMC population. Laser only animals had a peak IOP of 26.8 ± 0.7 mmHg on day 6 and those injected with CD45+ cells peaked at 25.6 ± 0.6 mmHg on day 12. In contrast, the MSC group demonstrated a rapid fall in IOP on day 5 (21.6 ± 0.7 mmHg; $n=9$; $p<0.01$). The time required to reduce the pressure by 50% was 4.5 days, 6 times faster than the time required to obtain the same drop in the laser control (27.8 days) or CD45+ cells (26 days; $p < 0.001$). Additionally, cumulative IOP was significantly lower in groups treated with MSC ($p<0.01$ for BMMC and $p<0.001$ for MSC) than in the other injection control groups (Fig. 1C). Thus, these results indicate that within BMMCs, MSC are primarily responsible for the rapid restoration of baseline IOP.

Injection of MSC *in vivo* restores TM structure

Ocular tissue sections were performed to investigate mechanisms used by MSC to promote healing of anterior chamber angle structures. One week post photocoagulation, anterior chamber angle structures (iris, ciliary body and TM) of damaged eyes showed signs of inflammation, desquamation, and anterior synechiae (Fig. 1E). Cellular composition of these structures at one week depended on the treatment, as pigmented cells were the dominant cell population in the laser only groups, with the additional presence of non-pigmented cells in the MSC-injected laser-treated eyes. One month after photocoagulation, eyes that did not receive

MSC transplantation presented scarring in the TM area, as well as invasion by pigmented epithelial cells. In contrast, eyes that received a MSC graft had an angle structure and histology that approximated that of the intact eye. These observations were confirmed by measuring the surface area of the TM area (Fig 1D). After 30 days, no significant changes could be observed between the normal TM surface area and the group that received MSC transplantation while the group that did not received MSC had a significantly smaller TM surface ($p < 0,01$). These results indicate that MSC injection leads to efficient structural recovery of the anterior chamber angle.

MSC do not transdifferentiate into TM cells *in vitro*

To investigate potential differentiation of MSC into TM cells upon exposure to TM cell environment, these two populations were co-cultured *in vitro*. MSC could be tracked using fluorescent dye labeling (CellTracker Blue) and evaluated for the acquisition of TM features by monitoring the surface antigens aquaporin-1, fibronectin and laminin as well as the nuclear transcription factor Pax6, since these molecules ensure the proper development and function of TM cells (Supplementary Fig. 2). All MUTM-NEI/1 TM cells expressed these surface antigens and transcription factor. However, few MSC expressed laminin and aquaporin-1 in normal culture conditions. Expression levels of Pax6 and fibronectin were not found to be significantly different between both cell populations prior to co-culture. After 7 days of co-incubation, the MSC population failed to acquire expression of aquaporin and laminin indicating that direct contact with TM cells did not promote MSC differentiation.

***In vivo* MSCs migration and survival**

To investigate the mechanisms implicated in IOP lowering, we evaluated the ability of MSC to migrate and integrate *in vivo* into the TM. CFSE labeling of MSC on the day of injection enabled their subsequent detection by immunofluorescence. Tissue sections from animals sacrificed at 24, 48 and 96 hours revealed a major decrease in the number of CFSE+ cells over time (Fig. 2). Cells were no longer detectable in the anterior chamber 96 hours after their injection. MSC clearance may be due to ocular microglia phagocytosis, as approximately 1 in 5 CFSE+ cells co-expressed microglia marker F 4/80 on day 2 (Supplementary Fig. 3). CFSE expression of MSC kept *in vitro* in culture medium was detectable by fluorescent microscopy for 7 days (data not shown). Interestingly, 24 hours after MSC administration, a high number ($2.2 \pm 0.1 \times 10^4$) of cells had migrated to the area of laser damage while only half that number ($1.2 \pm 0.2 \times 10^4$; $p < 0.01$) was found in the intact area. Although this proportion was maintained at 48h ($1.0 \pm 0.2 \times 10^4$ and $0.5 \pm 0.2 \times 10^4$ in the damaged and intact areas, respectively) the difference was no longer found to be significant at that time. These findings demonstrate that MSC have the ability to specifically migrate to the area of laser damage but do not remain in the anterior chamber for a prolonged period of time.

MSC secreted factors influence ocular regeneration

TM regeneration was observed although MSC rapidly cleared out from the chamber angle (96 h), suggesting that these cells are not inducing tissue repair by integrating the TM and directly replacing the damaged cells. This could imply that their effect was instead mediated by secreted factors and by activation of an endogenous repair mechanism. Hypoxia

and cytokines produced by immune cells or enviroing tissue are known to induce changes in MSC secreted factors (38-40). To determine the implication of such a mechanism, MSC conditioned medium (CM) was harvested after 24 hour *in vitro* culture under either normoxic or low-oxygen conditions. No significant effect on IOP was observed when laser treated animals were injected concentrated (40X) normoxic MSC-CM (Fig. 3A). Interestingly, when concentrated (40X) low-oxygen CM was injected immediately after laser treatment, peak IOP and subsequent measurements were found to be similar to that of the MSC treated group. We tested the robustness of our treatments by delaying the injection of low-oxygen CM, saline solution control and MSC until 4 days after laser exposure to allow damage and inflammation to develop further in the anterior chamber (Fig. 3B). Again MSC and low-oxygen CM groups induced similar decreases in IOP while saline solution induced no significant improvements. Treatment on day 0 instead of day 4 resulted in lower cumulative IOP for both MSC and low-oxygen MSC-CM ($p < 0.05$; Fig. 3C). Histological sections revealed that four days after CM injection, anterior chamber angle tissue structures (iris, ciliary body and TM) showed clear signs of inflammation, desquamation and anterior synechiae (Fig. 3E) Two weeks after photocoagulation, eyes that received normoxic CM treatment still showed considerable signs of scarring. In contrast, eyes that received low-oxygen CM treatment had an angle structure and histology closer to that of the intact eye. These observations were confirmed by measurement of the TM surface area (Fig. 3D). After two weeks, no significant changes could be observed between the normal TM surface area and the group that received low-oxygen CM treatment while the group that received normoxic CM treatment had a significantly smaller TM surface ($p < 0.01$).

Additionally, injection of low-oxygen CM restored TM functionality by increasing aqueous humor outflow (Supplementary Fig. 4). Indeed, clearance of the radiolabeled tracer was very low after laser damage when compared to normal controls with an estimated peak clearance of 0.04 ± 0.006 $\mu\text{l}/\text{min}$ versus 0.20 ± 0.06 $\mu\text{l}/\text{min}$, respectively ($p < 0,05$). Low oxygen-CM groups demonstrated significantly greater humor clearance (0.11 ± 0.003 $\mu\text{l}/\text{min}$, $p < 0,05$) than laser treated groups. Overall, these results indicate that cellular stress is required for MSC to secrete therapeutic factors, and that such factors exert a key role in the functional recovery of ocular tissue.

Decreased IOP allows for better survival of retinal cells

To confirm the importance of decreased intraocular pressure for the survival of retinal cells, a TUNEL assay was performed on eyes treated with low-oxygen and normoxic CM (Supplementary Figure 5). After 12 days of sustained IOP, TUNEL-positive apoptotic cells were observed within the retina of all treated eyes but in significantly lower numbers in group treated with low-oxygen CM. These data indicates the importance of IOP drop in retinal cell survival.

MSC trigger the appearance of nestin+ progenitor cells

The outer layer of the ciliary body pigmented epithelium is home to a quiescent neural progenitor cell (NPC) population that can be detected by expression of the progenitor cell marker nestin (41-47). As both pigmented and non-pigmented cells were observed in the TM area of MSC and MSC-CM treated eyes, we investigated whether these cells could represent

neural progenitor cells. Staining for nestin-positive cells was conducted in the chamber angle area: ciliary body, TM and limited portion of the iris (Fig. 4). In an untreated eye, no nestin positive cells were detectable (Fig.7A). Few nestin-positive cells were detected in the laser treated group injected with the lymphocyte control cell population (Fig. 4A). In comparison, a high proportion of nestin-positive cells were observed in the MSC and low-oxygen CM treated groups, and were comprised of both pigmented and non-pigmented cells (Fig. 4B-C). Importantly, all nestin positive cells were found to be endogenous to the eye as the selected antibody was rat specific and nestin expression profiles were identical in eyes treated with MSC and MSC-CM (Fig. 4D).

Nestin expression and cellular proliferation correlates with ocular regeneration

As nestin expression is lost in differentiated neural progenitors and mature cells, we used this marker to investigate progenitor cell evolution during tissue regeneration (Fig. 5 and Supplementary Figure 6). Intact eyes revealed neither cells positive for nestin nor the proliferation nuclear marker Ki67 (with the exception of the corneal surface, which contains replicating (Ki67+) cells). A small number of nestin+ and Ki67 + cells could be observed in laser-treated eyes injected with lymphocyte controls: 2.5% (nestin) and 1% (Ki67) of total cells in the laser damaged area (Fig. 5A-B). Both markers were absent in the intact area of this group. In contrast, an increased number of cells harboring nestin and Ki67 were found in the laser damaged area of MSC treated rats and peaking on day 4 (Fig. 5C-D). Approximately 25% of nestin positive cells co-expressed Ki67 (data not shown). Interestingly, the moment of peak expression for nestin and Ki67 corresponded to the time required to lower IOP by 50% in

the MSC and MSC-CM treated groups. Although MSC were found in the intact area of the eye, this region was comprised of a significantly lower number of nestin and Ki67 positive cells than the laser damaged area ($p < 0.001$).

In the normoxic CM treated group, we found only a trend for an increased number of nestin positive cells between days 2 and 4 (Fig. 5E-F). In addition, no significant differences in nestin and Ki67 expression were observed between the intact and damaged areas in this group. Nestin and Ki67 expressing cells were significantly more abundant in the low-oxygen CM than in the normoxic CM group ($p < 0.01$ and $p < 0.05$, respectively; Fig. 5G-H and Supplementary Fig. 6). While the injection of CM should lead to an even distribution of paracrine factors in the anterior chamber aqueous humor, a higher number of nestin⁺ cells was found in the damaged than the intact area of the low-oxygen CM treated eyes ($p < 0.05$). Collectively, these results indicate that MSC and their secretum have a predominant effect on the activation of neural progenitor cells, which primarily occurs in the laser treated area.

Proliferating cells integrate and survive in chamber angle structures.

As both Nestin and Ki67 are transient markers, we investigated the fate of the proliferating cells using EDU staining (Figure 6). In animals treated with low oxygen CM, the peak of proliferation was observed between days 1 and 3, hence, a group of animals was treated by daily intraperitoneal injections of EDU during that time to stain the proliferating cells. A large number of EDU positive cells ($6,4 \pm 0.4 \times 10^5$; Fig. 6 B-C, J) were found in the damaged area of the treated eyes on day 8. Although these cells decreased significantly ($p < 0.001$) when

observing treated animals on day 32 ($5,2 \pm 0.4 \times 10^5$; Fig 6 H-I, J), they were still present in large enough numbers to confirm they successfully implanted in the area of damage. No EDU positive cells were detectable after one month in the intact area (Fig. 6 G). This indicates that the Ki67+ cells observed between days 1 and 4 remained, a majority of which were nestin+, remained in the chamber angle and fully integrated in the ciliary body and TM.

Laser exposure raises local ocular tissue sensitivity to MSC secretum

In light of the finding that cellular damage promoted local recruitment of progenitor cells, we evaluated whether laser-induced tissue damage had a local or systemic influence on MSC- or MSC-CM-induced progenitor cell recruitment and cellular proliferation. To answer this question, intact versus laser-treated eyes were injected with MSC and low-oxygen CM. In an intact eye, no nestin or Ki67 positive cells could be detected after MSC injection (Fig. 7A; C). In contrast, the injection of the same number of cells in a laser damaged eye led to an increase in nestin and Ki67 positive cells which was predominant in the area of laser damage (Fig. 7A; D). In addition, low-oxygen CM increased nestin and Ki67 positive cells diffusely in the anterior chamber of both eyes whether they were laser-treated or not (Fig. 7B; E). Moreover, laser treatment was the only factor causing a differential increase in nestin-expression after CM exposure (Fig. 7B; F; $P < 0.01$). These results indicate that laser exposure enhances cellular sensitivity to MSC resulting in targeted NPC generation and cell proliferation. MSC-CM generated increases in nestin and Ki6 positive cells in laser-unexposed eyes or ocular regions, but only laser exposure promoted differential NPC enhancement.

2.6 Discussion

While embryonic stem cells have been used to repair damaged ocular tissues, to our knowledge this is the first study to report that bone marrow cell subsets harbor regenerative potential, both functional and histological, for the anterior segment of the eye. We identified MSC as prime mediators of this beneficial effect. In addition, our findings demonstrate the unique ability of paracrine factors secreted by low-oxygen cultured MSCs to enhance the function and stimulate the proliferation of ocular progenitor cells. We also report that local stem cell recruitment in the ocular anterior chamber upon exposure to MSC was associated with functional tissue repair. Moreover, laser-induced endogenous progenitor cell stimulation could explain why very short exposure to MSC or their paracrine factors can repair dysfunctional trabecular meshwork. Such an approach opens the door to cellular therapy in patients with chronic conditions, such as glaucoma.

MSC were found to be the crucial BMSC sub-population inducing a functional regenerative effect and lowering IOP, as ablation of MSC from the injected cells resulted in considerably less efficient tissue repair. Neither injection of saline solution nor lymphocytes could decrease IOP, indicating that IOP drop did not result from non-specific medium or cell injections. In addition, lymphocytes being particularly prone to induce immune reactivity, the fact that their administration failed to decrease IOP suggests that the decreased pressure did not result from an increased inflammatory response to the graft (48-50). Interestingly, MSC injected in the anterior ocular chamber persisted only for a few days, far less than the 5 weeks persistence in the retina observed after MSC injection in the vitreous in a similar glaucoma

model (51). However, the duration of MSC infiltration of the TM observed in our study is in line with other studies of intra-arterial cell injection in animal models of stroke where MSC persist only transiently and are no longer found after 7 days (5, 52-54). This could result from MSC escaping from the injected eye through the TM or from early mortality after migrating to areas of severe cellular stress inhospitable to long term engraftment (55). Our findings suggest that such an environment leads to MSC apoptosis and phagocytosis by ocular microglia. Conversely, the observed beneficial effects indicate that long term engraftment is not required for ocular regeneration and that less than 4 days are sufficient to generate a physiological effect.

The mechanisms by which MSC induce tissue recovery are still widely debated, with cellular differentiation and paracrine effects being the two lead possibilities (8). Our results clearly favor the latter, as the lack of MSC differentiation *in vitro* upon exposure to TM cells, their early disappearance from the TM *in vivo* as well as the rapid decrease of IOP and rise of aqueous humor clearance within days of low-oxygen MSC-CM injection, all indicate that MSC likely act through the release of soluble mediators. Moreover, the absence of pressure lowering after injection of unstressed MSC-CM reinforces the need for cellular stress to activate MSC (56-63). These findings provide clear evidence that MSC can act in a paracrine fashion and exert their protective and regenerative effect without the need for prolonged tissue infiltration.

The ciliary body hosts a cell population known to be quiescent neuronal progenitor cells identifiable by the interfilament protein nestin (41-44). Nestin is commonly used as a neuronal stem/progenitor cells marker and has been observed in a broad range of regenerating tissues after injury (64-66). Our data clearly indicate that MSC secretum is responsible for the upregulation of nestin, as well as the cellular proliferation marker Ki67 in the TM. The fact that the peak in nestin-positive cells corresponded to the IOP descent implies a role for neural progenitor cells in tissue regeneration or at least identifies these cells as indicators of functional tissue regeneration. Importantly, nestin and Ki67 were expressed only transiently following exposure to MSC and MSC-CM. This is a reassuring finding since uncontrolled cell proliferation could be deleterious, particularly in a closed environment such as the eye. Additionally, cells tagged with EDU during this active proliferation period were present in large numbers in the damaged area 1 month after injury, indicating that these cells actively take part in tissue remodeling and in functional recovery after regeneration is complete, a phenomenon suggesting that not only tissue protection, but also tissue regeneration is occurring. However, the current model does not allow for longer term studies and it will be interesting to challenge not only the long-term regenerative potential of MSC and MSC-CM, but also long term functionality of the regenerated TM.

The use of 180° laser-induced damage in this animal model, with 180° intact area in the same eye, allowed the precision of MSC-induced regeneration to be revealed with striking accuracy. Indeed, the damaged TM area contained a greater proportion of transplanted MSC compared to intact areas of the same eye, indicating that injected cells migrate preferentially to the site of laser treatment. Laser induced humoral gradients emanating from damaged cells

probably contributed to MSC migration, as inflammatory cytokines and chemokines involved in the migration of immune cells toward wound sites are also implicated in MSC mediated chemotaxis (67-69). In addition, we have observed that nestin and EDU positive cells were increased more efficiently in laser-treated areas. Nevertheless, MSC usage resulted in a more localized effect than MSC-CM, thus implying that MSC might need to be in close contact with damaged cells to upregulate their cytokine production and influence cells in their immediate vicinity. Such cytokine upregulation could result from damaged area hypoxia, and also from contact with inflammatory factors or other cytokines mediating a form of cellular stress. Moreover, soluble mediators from laser-damaged cells could synergize with MSC secretum to upregulate NPC surface receptors enhancing their response. While the administration of MSC can promote the delivery of numerous therapeutic factors under tightly regulated mechanisms, MSC secretum injection may represent a clinical strategy with broad applicability and low potential for toxicity.

The present study has important clinical implications not only for the treatment of acute disorders but also for chronic diseases such as glaucoma. Indeed, one could envision that laser trabeculoplasty, a standard clinical treatment for glaucoma, could be combined with MSC or MSC-CM administration to promote TM regeneration in glaucoma patients. Laser trabeculoplasty would have the advantage of generating local damage and inflammation within the TM architecture necessary for MSC activation, although it does not induce the same degree of inflammation or tissue architectural changes as in our model. It might also remove non- or dysfunctional TM cells thus creating space for new TM cells. By promoting preferential homing of MSC to the TM, laser therapy would enable them to enhance nestin-

positive stem cell recruitment to replace / repair damaged tissues. However it remains to be determined whether the lower treatment intensity of laser trabeculoplasty and human MSC would yield the same results in humans as the currently investigated treatment conditions. The fact that neuronal progenitor cells can be found throughout the CNS, and that MSC or their secretum can rapidly recruit neural progenitor cells could therefore have implications in the treatment of neurodegenerative disorders outside the eye.

2.7 Acknowledgments

The authors wish to thank Dr. Leonard Levin and Dr. Nicolas Noiseux for their helpful discussions on the manuscript, Dr. Guy Allaire for his expert input on the ocular histology and Dr. Gilbert Bernier for his expertise on ocular progenitor cells.

2.8 References

1. Wu Y, Chen L, Scott PG, Tredget EE. Mesenchymal stem cells enhance wound healing through differentiation and angiogenesis. *Stem cells*. 2007;25(10):2648-59. Epub 2007/07/07.
2. Li H, Fu X, Ouyang Y, Cai C, Wang J, Sun T. Adult bone-marrow-derived mesenchymal stem cells contribute to wound healing of skin appendages. *Cell and tissue research*. 2006;326(3):725-36. Epub 2006/08/15.
3. Mellough CB, Sernagor E, Moreno-Gimeno I, Steel DH, Lako M. Efficient stage-specific differentiation of human pluripotent stem cells toward retinal photoreceptor cells. *Stem cells*. 2012;30(4):673-86. Epub 2012/01/24.
4. Fujimoto Y, Abematsu M, Falk A, Tsujimura K, Sanosaka T, Juliandi B, et al. Treatment of a mouse model of spinal cord injury by transplantation of human induced pluripotent stem

cell-derived long-term self-renewing neuroepithelial-like stem cells. *Stem cells*. 2012;30(6):1163-73. Epub 2012/03/16.

5.Gnecchi M, Zhang Z, Ni A, Dzau VJ. Paracrine mechanisms in adult stem cell signaling and therapy. *Circ Res*. 2008;103(11):1204-19. Epub 2008/11/26.

6.Munoz JR, Stoutenger BR, Robinson AP, Spees JL, Prockop DJ. Human stem/progenitor cells from bone marrow promote neurogenesis of endogenous neural stem cells in the hippocampus of mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005;102(50):18171-6. Epub 2005/12/07.

7.Nguyen BK, Maltais S, Perrault LP, Tanguay JF, Tardif JC, Stevens LM, et al. Improved function and myocardial repair of infarcted heart by intracoronary injection of mesenchymal stem cell-derived growth factors. *J Cardiovasc Transl Res*. 2010;3(5):547-58. Epub 2010/06/19.

8.Phinney DG, Prockop DJ. Concise review: mesenchymal stem/multipotent stromal cells: the state of transdifferentiation and modes of tissue repair--current views. *Stem Cells*. 2007;25(11):2896-902. Epub 2007/09/29.

9.Uccelli A, Moretta L, Pistoia V. Mesenchymal stem cells in health and disease. *Nat Rev Immunol*. 2008;8(9):726-36. Epub 2009/01/28.

10.van Haaften T, Byrne R, Bonnet S, Rochefort GY, Akabutu J, Bouchentouf M, et al. Airway delivery of mesenchymal stem cells prevents arrested alveolar growth in neonatal lung injury in rats. *Am J Respir Crit Care Med*. 2009;180(11):1131-42. Epub 2009/08/29.

11.Le Blanc K, Rasmusson I, Sundberg B, Gotherstrom C, Hassan M, Uzunel M, et al. Treatment of severe acute graft-versus-host disease with third party haploidentical mesenchymal stem cells. *Lancet*. 2004;363(9419):1439-41. Epub 2004/05/04.

12.Pittenger MF, Martin BJ. Mesenchymal stem cells and their potential as cardiac therapeutics. *Circ Res*. 2004;95(1):9-20. Epub 2004/07/10.

13.Takahashi M, Li TS, Suzuki R, Kobayashi T, Ito H, Ikeda Y, et al. Cytokines produced by bone marrow cells can contribute to functional improvement of the infarcted heart by protecting cardiomyocytes from ischemic injury. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2006;291(2):H886-93. Epub 2006/04/11.

14. Togel F, Hu Z, Weiss K, Isaac J, Lange C, Westenfelder C. Administered mesenchymal stem cells protect against ischemic acute renal failure through differentiation-independent mechanisms. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2005;289(1):F31-42. Epub 2005/02/17.
15. Ninichuk V, Gross O, Segerer S, Hoffmann R, Radomska E, Buchstaller A, et al. Multipotent mesenchymal stem cells reduce interstitial fibrosis but do not delay progression of chronic kidney disease in collagen4A3-deficient mice. *Kidney international*. 2006;70(1):121-9. Epub 2006/05/26.
16. Wang W, Jiang Q, Zhang H, Jin P, Yuan X, Wei Y, et al. Intravenous administration of bone marrow mesenchymal stromal cells is safe for the lung in a chronic myocardial infarction model. *Regenerative medicine*. 2011;6(2):179-90. Epub 2011/03/12.
17. Levin LA, Ritch R, Richards JE, Borrás T. Stem cell therapy for ocular disorders. *Arch Ophthalmol*. 2004;122(4):621-7. Epub 2004/04/14.
18. Quigley HA. Open-angle glaucoma. *N Engl J Med*. 1993;328(15):1097-106. Epub 1993/04/15.
19. Acott TS, Kelley MJ. Extracellular matrix in the trabecular meshwork. *Experimental eye research*. 2008;86(4):543-61. Epub 2008/03/04.
20. Alvarado J, Murphy C, Polansky J, Juster R. Age-related changes in trabecular meshwork cellularity. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 1981;21(5):714-27. Epub 1981/11/01.
21. Baleriola J, Garcia-Feijoo J, Martinez-de-la-Casa JM, Fernandez-Cruz A, de la Rosa EJ, Fernandez-Durango R. Apoptosis in the trabecular meshwork of glaucomatous patients. *Molecular vision*. 2008;14:1513-6. Epub 2008/08/30.
22. Caballero M, Liton PB, Epstein DL, Gonzalez P. Proteasome inhibition by chronic oxidative stress in human trabecular meshwork cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 2003;308(2):346-52. Epub 2003/08/07.
23. Grierson I, Howes RC. Age-related depletion of the cell population in the human trabecular meshwork. *Eye (Lond)*. 1987;1 (Pt 2):204-10. Epub 1987/01/01.
24. Tamm ER. The trabecular meshwork outflow pathways: structural and functional aspects. *Experimental eye research*. 2009;88(4):648-55. Epub 2009/02/26.

25. Tamm ER, Fuchshofer R. What increases outflow resistance in primary open-angle glaucoma? *Surv Ophthalmol.* 2007;52 Suppl 2:S101-4. Epub 2007/12/06.
26. Kwon YH, Fingert JH, Kuehn MH, Alward WL. Primary open-angle glaucoma. *N Engl J Med.* 2009;360(11):1113-24. Epub 2009/03/13.
27. Chauhan BC, Mikelberg FS, Artes PH, Balazsi AG, LeBlanc RP, Lesk MR, et al. Canadian Glaucoma Study: 3. Impact of risk factors and intraocular pressure reduction on the rates of visual field change. *Arch Ophthalmol.* 2010;128(10):1249-55. Epub 2010/08/11.
28. Leske MC, Wu SY, Hennis A, Honkanen R, Nemesure B, Group BES. Risk factors for incident open-angle glaucoma: the Barbados Eye Studies. *Ophthalmology.* 2008;115(1):85-93. Epub 2007/07/17.
29. Leske MC, Wu SY, Honkanen R, Nemesure B, Schachat A, Hyman L, et al. Nine-year incidence of open-angle glaucoma in the Barbados Eye Studies. *Ophthalmology.* 2007;114(6):1058-64. Epub 2007/04/03.
30. McKinnon SJ, Goldberg LD, Peeples P, Walt JG, Bramley TJ. Current management of glaucoma and the need for complete therapy. *The American journal of managed care.* 2008;14(1 Suppl):S20-7. Epub 2008/03/20.
31. Robert MC, Hamel P, Blondeau P, Lesk MR. Persistent Leak After Glaucoma Aqueous Shunt Implantation. *Journal of glaucoma.* 2012. Epub 2012/05/12.
32. Bastien JP, Krosi G, Therien C, Rashkovan M, Scotto C, Cohen S, et al. Photodepletion differentially affects CD4+ Tregs versus CD4+ effector T cells from patients with chronic graft-versus-host disease. *Blood.* 2010;116(23):4859-69. Epub 2010/08/28.
33. Tamm ER, Russell P, Piatigorsky J. Development of characterization of a immortal and differentiated murine trabecular meshwork cell line. *Investigative ophthalmology & visual science.* 1999;40(7):1392-403. Epub 1999/06/08.
34. Levkovitch-Verbin H, Quigley HA, Martin KR, Valenta D, Baumrind LA, Pease ME. Translimbal laser photocoagulation to the trabecular meshwork as a model of glaucoma in rats. *Investigative ophthalmology & visual science.* 2002;43(2):402-10. Epub 2002/01/31.

35. Gabelt BT, Seeman JL, Podos SM, Mittag TW, Kaufman PL. Aqueous humor dynamics in monkeys after topical 8-iso PGE(2). *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2004;45(3):892-9. Epub 2004/02/27.
36. Shruster A, Ben-Zur T, Melamed E, Offen D. Wnt signaling enhances neurogenesis and improves neurological function after focal ischemic injury. *PloS one.* 2012;7(7):e40843. Epub 2012/07/21.
37. Mansour S, Roy DC, Bouchard V, Nguyen BK, Stevens LM, Gobeil F, et al. COMPARE-AMI trial: comparison of intracoronary injection of CD133+ bone marrow stem cells to placebo in patients after acute myocardial infarction and left ventricular dysfunction: study rationale and design. *Journal of cardiovascular translational research.* 2010;3(2):153-9. Epub 2010/06/19.
38. Herrmann JL, Wang Y, Abarbanell AM, Weil BR, Tan J, Meldrum DR. Preconditioning mesenchymal stem cells with transforming growth factor-alpha improves mesenchymal stem cell-mediated cardioprotection. *Shock.* 2010;33(1):24-30. Epub 2009/12/10.
39. Rosova I, Dao M, Capoccia B, Link D, Nolte JA. Hypoxic preconditioning results in increased motility and improved therapeutic potential of human mesenchymal stem cells. *Stem cells.* 2008;26(8):2173-82. Epub 2008/05/31.
40. Trivedi P, Tray N, Nguyen T, Nigam N, Gallicano GI. Mesenchymal stem cell therapy for treatment of cardiovascular disease: helping people sooner or later. *Stem cells and development.* 2010;19(7):1109-20. Epub 2010/01/23.
41. Abdouh M, Bernier G. In vivo reactivation of a quiescent cell population located in the ocular ciliary body of adult mammals. *Experimental eye research.* 2006;83(1):153-64. Epub 2006/03/28.
42. Bhatia B, Singhal S, Lawrence JM, Khaw PT, Limb GA. Distribution of Muller stem cells within the neural retina: evidence for the existence of a ciliary margin-like zone in the adult human eye. *Experimental eye research.* 2009;89(3):373-82. Epub 2009/04/22.
43. London A, Itskovich E, Benhar I, Kalchenko V, Mack M, Jung S, et al. Neuroprotection and progenitor cell renewal in the injured adult murine retina requires healing monocyte-

derived macrophages. *The Journal of experimental medicine*. 2011;208(1):23-39. Epub 2011/01/12.

44.Martinez-Navarrete GC, Angulo A, Martin-Nieto J, Cuenca N. Gradual morphogenesis of retinal neurons in the peripheral retinal margin of adult monkeys and humans. *The Journal of comparative neurology*. 2008;511(4):557-80. Epub 2008/10/08.

45.MacNeil A, Pearson RA, MacLaren RE, Smith AJ, Sowden JC, Ali RR. Comparative analysis of progenitor cells isolated from the iris, pars plana, and ciliary body of the adult porcine eye. *Stem Cells*. 2007;25(10):2430-8. Epub 2007/06/30.

46.Ohta K, Ito A, Tanaka H. Neuronal stem/progenitor cells in the vertebrate eye. *Development, growth & differentiation*. 2008;50(4):253-9. Epub 2008/03/14.

47.Xu H, Sta Iglesia DD, Kielczewski JL, Valenta DF, Pease ME, Zack DJ, et al. Characteristics of progenitor cells derived from adult ciliary body in mouse, rat, and human eyes. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2007;48(4):1674-82. Epub 2007/03/29.

48.de Smet MD, Gunning F, Feenstra R. The surgical management of chronic hypotony due to uveitis. *Eye*. 2005;19(1):60-4. Epub 2004/08/21.

49.Willermann F, Rosenbaum JT, Bodaghi B, Rosenzweig HL, Childers S, Behrend T, et al. Interplay between innate and adaptive immunity in the development of non-infectious uveitis. *Progress in retinal and eye research*. 2012;31(2):182-94. Epub 2011/11/29.

50.Kerr EC, Copland DA, Dick AD, Nicholson LB. The dynamics of leukocyte infiltration in experimental autoimmune uveoretinitis. *Progress in retinal and eye research*. 2008;27(5):527-35. Epub 2008/08/30.

51.Johnson TV, Bull ND, Hunt DP, Marina N, Tomarev SI, Martin KR. Neuroprotective effects of intravitreal mesenchymal stem cell transplantation in experimental glaucoma. *Investigative ophthalmology & visual science*. 2010;51(4):2051-9. Epub 2009/11/26.

52.Duffield JS, Park KM, Hsiao LL, Kelley VR, Scadden DT, Ichimura T, et al. Restoration of tubular epithelial cells during repair of the postischemic kidney occurs independently of bone marrow-derived stem cells. *J Clin Invest*. 2005;115(7):1743-55. Epub 2005/07/12.

53. Gneccchi M, He H, Noiseux N, Liang OD, Zhang L, Morello F, et al. Evidence supporting paracrine hypothesis for Akt-modified mesenchymal stem cell-mediated cardiac protection and functional improvement. *Faseb J*. 2006;20(6):661-9. Epub 2006/04/04.
54. Noiseux N, Gneccchi M, Lopez-Illasaca M, Zhang L, Solomon SD, Deb A, et al. Mesenchymal stem cells overexpressing Akt dramatically repair infarcted myocardium and improve cardiac function despite infrequent cellular fusion or differentiation. *Mol Ther*. 2006;14(6):840-50. Epub 2006/09/13.
55. Copland IB, Galipeau J. Death and inflammation following somatic cell transplantation. *Seminars in immunopathology*. 2011;33(6):535-50. Epub 2011/05/03.
56. Aggarwal S, Pittenger MF. Human mesenchymal stem cells modulate allogeneic immune cell responses. *Blood*. 2005;105(4):1815-22. Epub 2004/10/21.
57. Block GJ, Ohkouchi S, Fung F, Frenkel J, Gregory C, Pochampally R, et al. Multipotent stromal cells are activated to reduce apoptosis in part by upregulation and secretion of stanniocalcin-1. *Stem Cells*. 2009;27(3):670-81. Epub 2009/03/10.
58. Djouad F, Bouffi C, Ghannam S, Noel D, Jorgensen C. Mesenchymal stem cells: innovative therapeutic tools for rheumatic diseases. *Nat Rev Rheumatol*. 2009;5(7):392-9. Epub 2009/07/02.
59. Groh ME, Maitra B, Szekely E, Koc ON. Human mesenchymal stem cells require monocyte-mediated activation to suppress alloreactive T cells. *Exp Hematol*. 2005;33(8):928-34. Epub 2005/07/26.
60. Hatzistergos KE, Quevedo H, Oskouei BN, Hu Q, Feigenbaum GS, Margitich IS, et al. Bone marrow mesenchymal stem cells stimulate cardiac stem cell proliferation and differentiation. *Circ Res*. 2010;107(7):913-22. Epub 2010/07/31.
61. Nagaya N, Fujii T, Iwase T, Ohgushi H, Itoh T, Uematsu M, et al. Intravenous administration of mesenchymal stem cells improves cardiac function in rats with acute myocardial infarction through angiogenesis and myogenesis. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2004;287(6):H2670-6. Epub 2004/07/31.

- 62.Uccelli A, Prockop DJ. Why should mesenchymal stem cells (MSCs) cure autoimmune diseases? *Curr Opin Immunol*. 2010;22(6):768-74. Epub 2010/11/26.
- 63.Li L, Zhang S, Zhang Y, Yu B, Xu Y, Guan Z. Paracrine action mediate the antifibrotic effect of transplanted mesenchymal stem cells in a rat model of global heart failure. *Mol Biol Rep*. 2009;36(4):725-31. Epub 2008/03/28.
- 64.Beguin PC, El-Helou V, Gillis MA, Duquette N, Gosselin H, Brugada R, et al. Nestin (+) stem cells independently contribute to neural remodelling of the ischemic heart. *Journal of cellular physiology*. 2011;226(5):1157-65. Epub 2010/10/15.
- 65.Bhatia B, Jayaram H, Singhal S, Jones MF, Limb GA. Differences between the neurogenic and proliferative abilities of Muller glia with stem cell characteristics and the ciliary epithelium from the adult human eye. *Experimental eye research*. 2011;93(6):852-61. Epub 2011/10/13.
- 66.Wiese C, Rolletschek A, Kania G, Blyszczuk P, Tarasov KV, Tarasova Y, et al. Nestin expression--a property of multi-lineage progenitor cells? *Cellular and molecular life sciences : CMLS*. 2004;61(19-20):2510-22. Epub 2004/11/05.
- 67.Bocker W, Docheva D, Prall WC, Egea V, Pappou E, Rossmann O, et al. IKK-2 is required for TNF-alpha-induced invasion and proliferation of human mesenchymal stem cells. *Journal of molecular medicine*. 2008;86(10):1183-92. Epub 2008/07/05.
- 68.Liu ZJ, Zhuge Y, Velazquez OC. Trafficking and differentiation of mesenchymal stem cells. *Journal of cellular biochemistry*. 2009;106(6):984-91. Epub 2009/02/21.
- 69.Zhang M, Mal N, Kiedrowski M, Chacko M, Askari AT, Popovic ZB, et al. SDF-1 expression by mesenchymal stem cells results in trophic support of cardiac myocytes after myocardial infarction. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*. 2007;21(12):3197-207. Epub 2007/05/15.

2.9 Figures

Figure 1

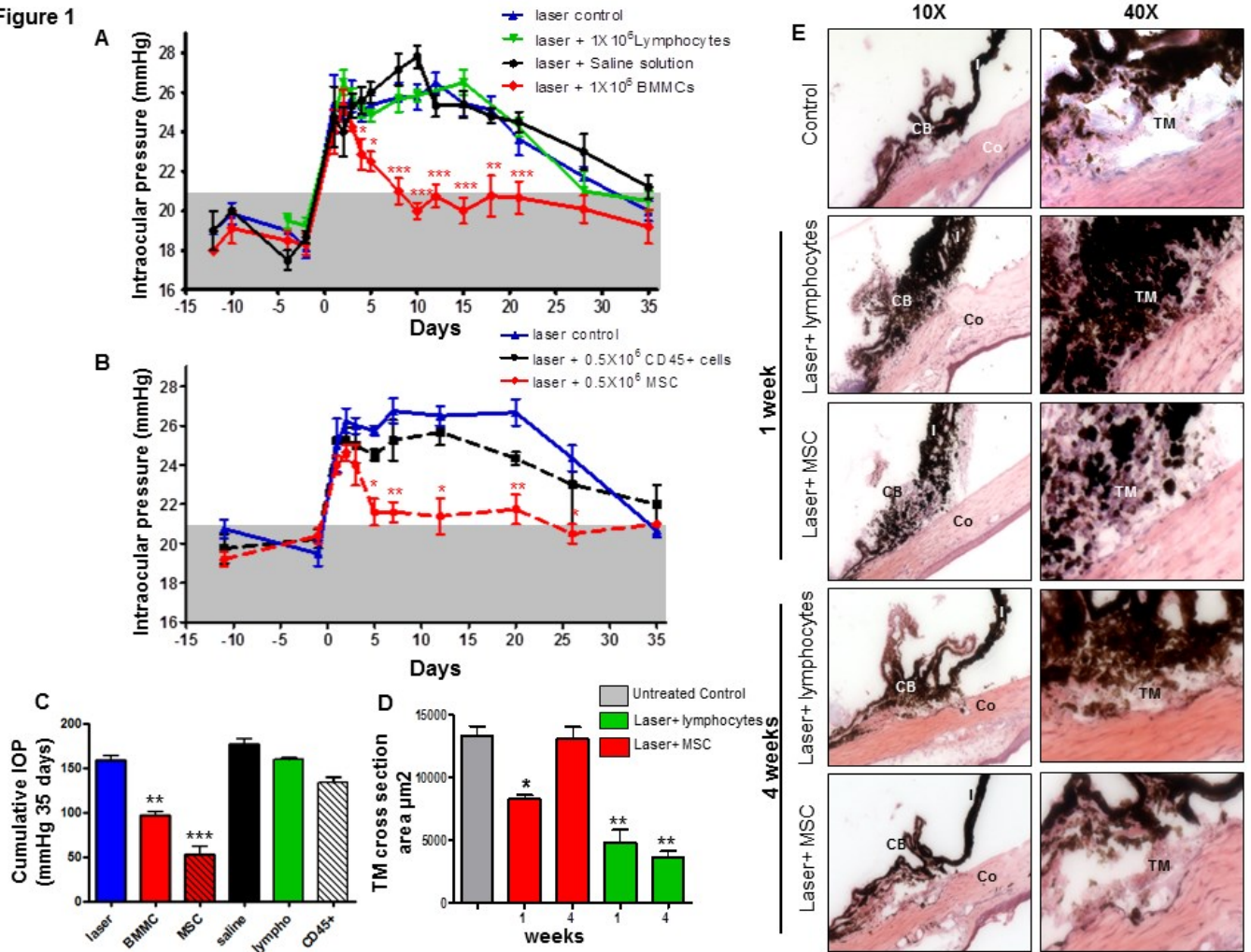


Figure 1. MSC induce a rapid return to normal IOP levels in experimental glaucoma. A) Ocular anterior chambers were either injected with 1×10^6 BMMC (red), 1×10^6 lymphocytes (black), saline (green), or received no additional treatment (blue). The grey area represents IOP normal range. IOP was reported as mean \pm SEM of 4 experiments evaluating 12 animals per group. **B)** 0.5×10^6 CD45 + cells (black) or 0.5×10^6 MSC (red line) were injected intraocularly after laser exposure and evaluated as described above. Mean \pm SEM of 3 experiments evaluating 9 animals per group. **C)** Cumulative IOP exposure in eyes that received laser damage and injection of different cellular populations and controls. Calculated

as the integral of IOP over the 4-week experimental period. D) TM Cross section area measurements in μm^2 . TM surface area was measured for each experimental control (red - laser+MSC group; green - laser+lymphocyte group) and compared to the surface area of a normal TM (grey) E) Representative images of hematoxylin-eosin (HE) staining at 20X and 40X of rat ocular anterior segment before (C: control) and 1 week after laser exposure alone or followed by MSC injection, as well as 4 weeks after laser damage alone or followed by MSC injection. CB: ciliary body; Co: Cornea; I: Iris; TM: Trabecular meshwork. Significance compared to laser control group: * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

Figure 2

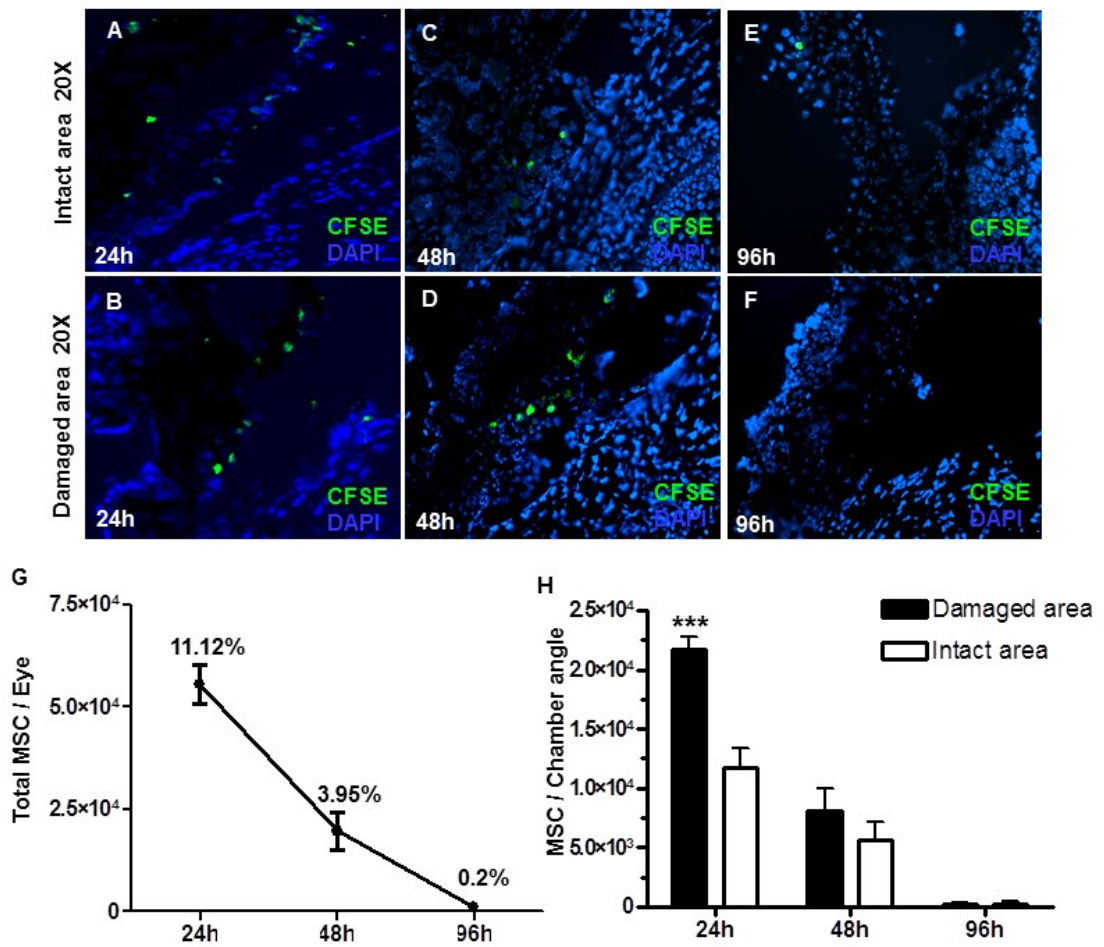


Figure 2. *In vivo* MSCs migration and survival. CFSE-stained MSC were injected in the anterior chamber and tracked *in vivo*. **A-F)** Representative images of the intact (A,C,E) and laser damaged (B,D,F) chamber angles are shown at 24, 48 and 96 hours, respectively, after laser damage and cell injection. Nuclei were DAPI stained. **G)** Compilation of total number of CFSE+ cells present in the eye at 24, 48 and 96 hours after cell injection. Cell numbers (mean±SEM) were determined by fluorescence microscopy analysis of sequential ocular sections (n=5 per time point). Percentages of residual cells are indicated according to the number of injected MSC. **H)** Distribution of CFSE+ cells to the intact or damaged area was measured at each time-point. AC: Anterior Chamber; Cb: ciliary body; Co: Cornea; I: Iris; L: Lens; Arrow: TM. Significance: ***p<0.001.

Figure 3

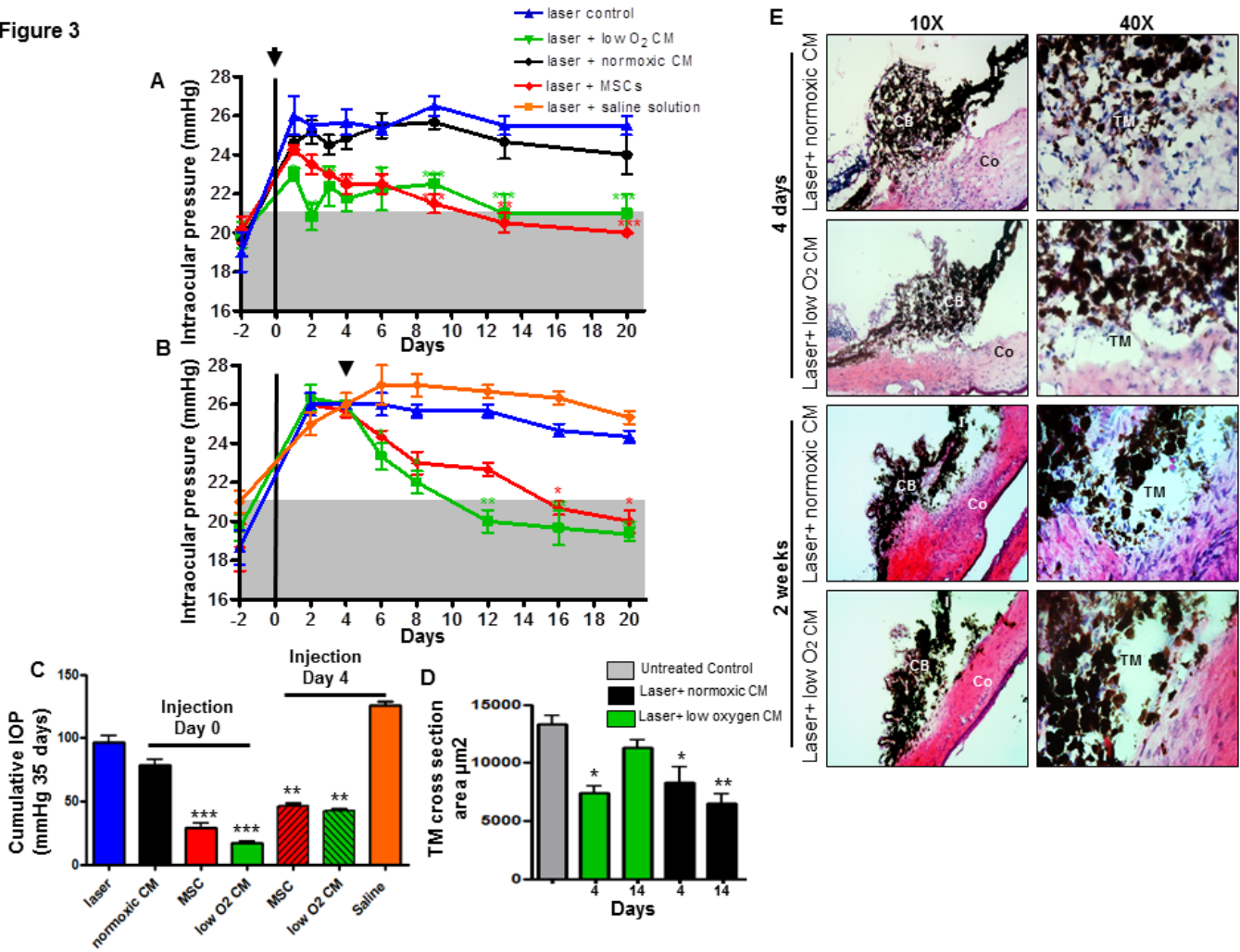


Figure 3. MSC secreted factors promote ocular regeneration. IOP was measured in animals exposed to laser treatment alone (blue) and with injection of MSC (red), saline solution (orange) or MSC-CM generated in normoxic (black) or low-oxygen (green) conditions. MSC-CM was injected either **A**) immediately (day 0) or **B**) 4 days after laser damage. The grey area represents the normal range of IOP. Black vertical lines correspond to the time of laser treatment, and black arrowhead to the time of injection of MSC or their CM. Results expressed as mean±SEM of 3 independent experiments, each with 3 animals per group. **C**) Cumulative IOP exposure in eyes that received laser damage and injection of different cellular populations and controls. Calculated as the integral of IOP over the 3-week experimental period. **D**) TM Cross section area measurements in μm^2 . TM surface area was measured for each experimental control (red - laser+MSC group; green - laser+lymphocyte

group) and compared to the surface area of a normal TM (grey) **E**) Anterior ocular segments from rats treated immediately following laser exposure with normoxic or low-oxygen MSC-CM were stained with hematoxylin-eosin (HE). Evaluations at 10X and 40X were performed at day 4 and 14 after MSC-CM injection. Cb: ciliary body; Co: Cornea; I: Iris. Significance compared to laser control group: * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

Figure 4

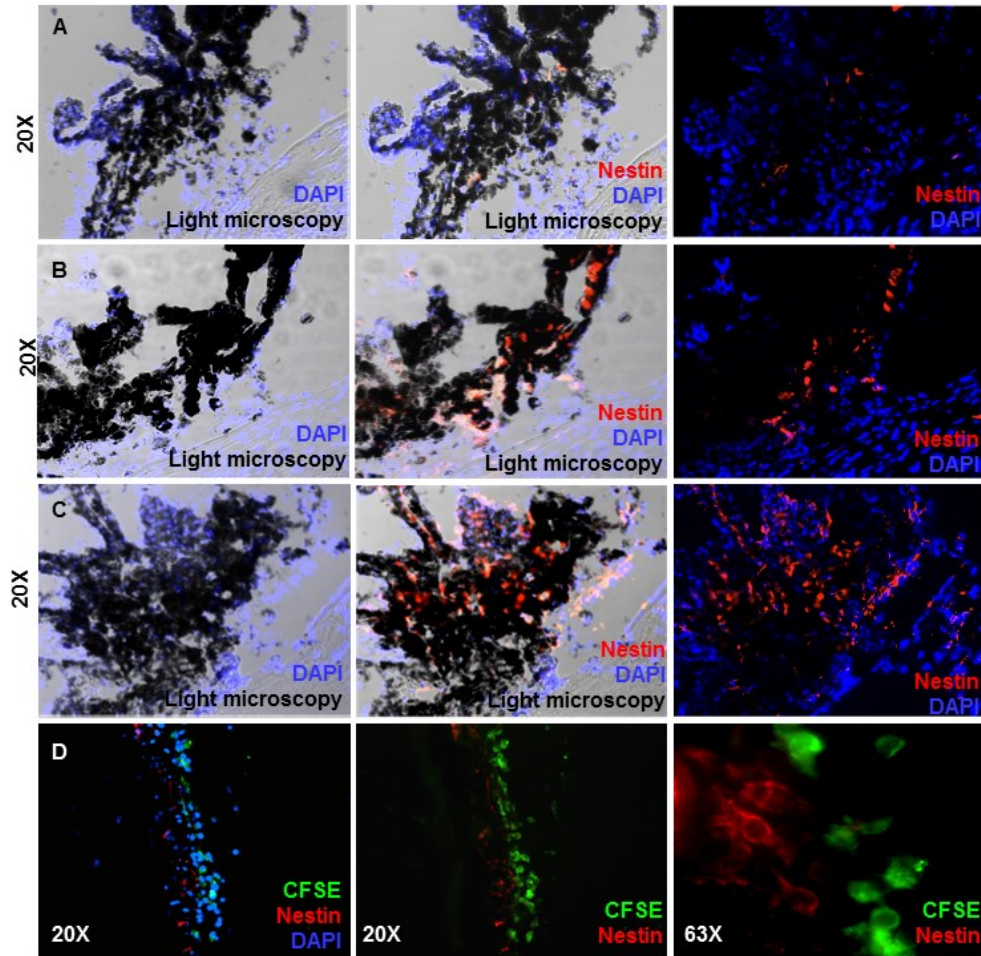


Figure 4. MSC trigger appearance of nestin⁺ cells. A-C) Light microscopy and immunofluorescence images at 20X of TM area from ocular sections of laser treated animals injected with A) lymphocyte controls, B) 0.5×10^6 MSC or C) low-oxygen MSC-CM and evaluated for stem/progenitor cells using nestin. Nestin⁺ cells were identified at day 2 after laser treatment and co-localized with pigmented (darkened areas under light microscopy) and non pigmented cells. **D)** CFSE-stained MSC (green) injected at day 0 in laser treated animals were evaluated on day 2 to measure co-expression of nestin (red) (20X with (top) and without (20X middle 20X and 63 X bottom) DAPI nuclear staining in blue).

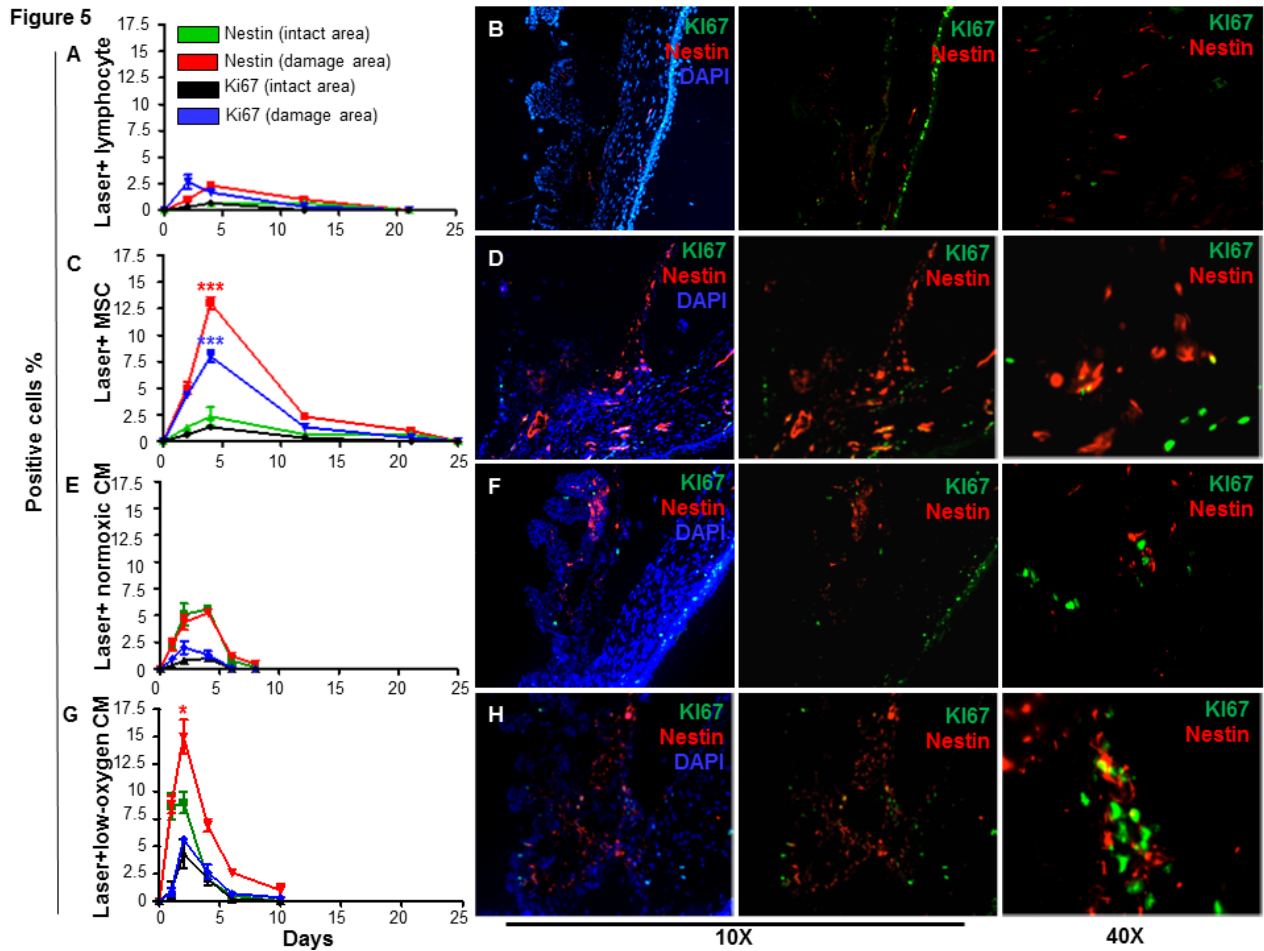


Figure 5. Nestin expression and cellular proliferation correlates with ocular regeneration. Graphs represent compilation of nestin and Ki67 expressing cells in both the intact and damaged chamber angles based on the treatment received: **A)** laser treated eye with lymphocyte control injection, **C)** laser treated eye with MSC injection, **E)** laser treated eye with normoxic CM injection, **G)** laser treated eye with low-oxygen CM injection. Three animals per group from 2 separate experiments (N=6). Numbers indicate the percentage of positive cells found in the area composed of the ciliary body, the TM and a limited portion of the iris. Immunofluorescence histological sections from a rat eye were stained for nestin and Ki67 (**B-D-F-H**). Pictures are representative images of each group at 20X and 40X at the time point of peak nestin expression. Nestin (red) Ki67 (green) and Dapi (blue). Significance comparing damaged to intact areas: * $p < 0.05$, *** $p < 0.001$.

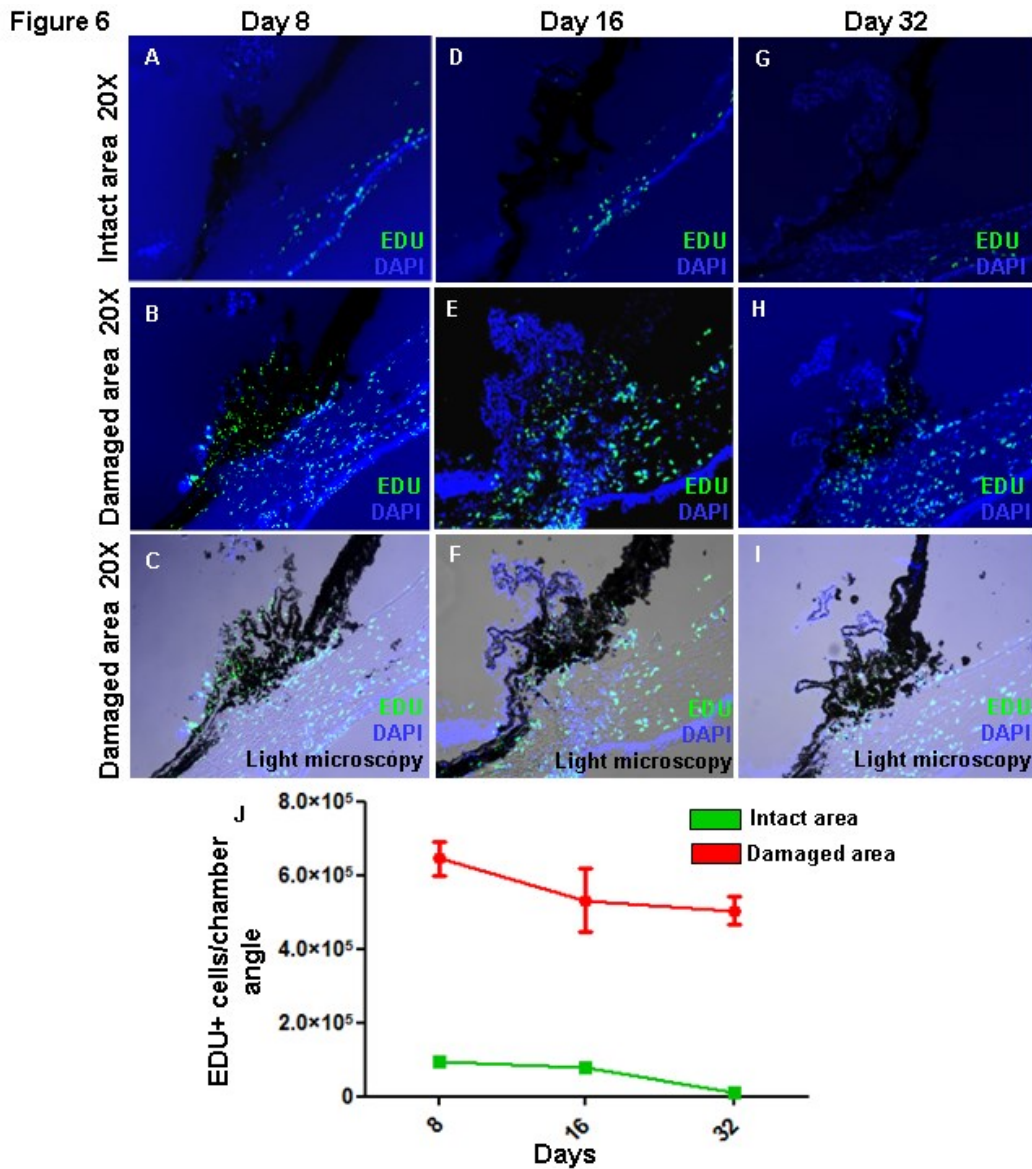


Figure 6. Proliferating cells integrate chamber angle structures. Rats were treated with EDU to observe the replicating cells fate. **A-I)** Representative images of the intact (A,D,G) and laser damaged (B-C,E-F,H-I) chamber angles are shown at day 8, 16 and 32, both as immunofluorescence and light microscopy images, after laser damage and cell injection. Nuclei were DAPI stained. **J)** Compilation of total number of EDU+ cells present in the eye at days 8, 16 and 32 after laser damage and low-oxygen CM injection. Cell numbers (mean \pm SEM) were determined by fluorescence microscopy analysis of sequential ocular sections (n=3 per time point).

Figure 7

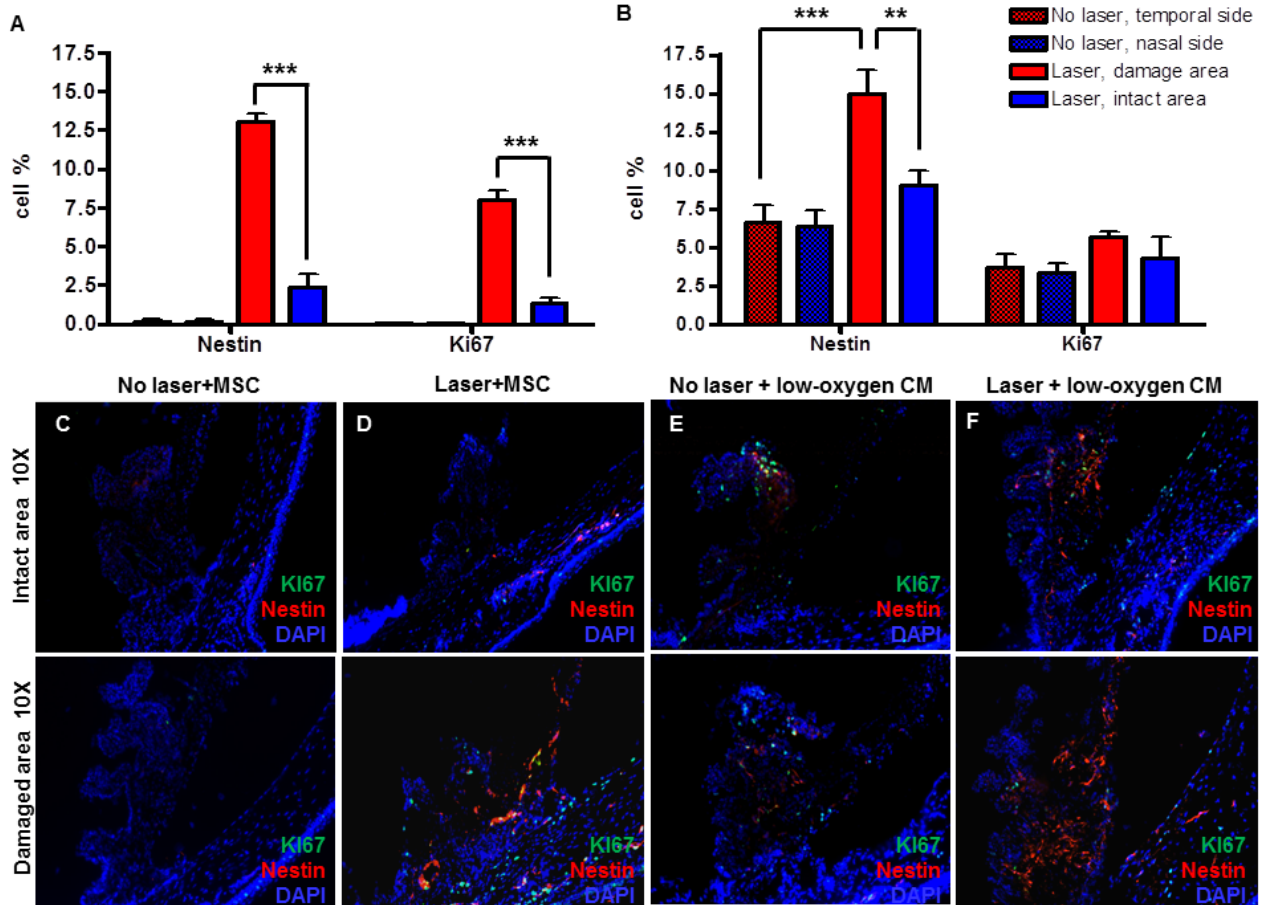
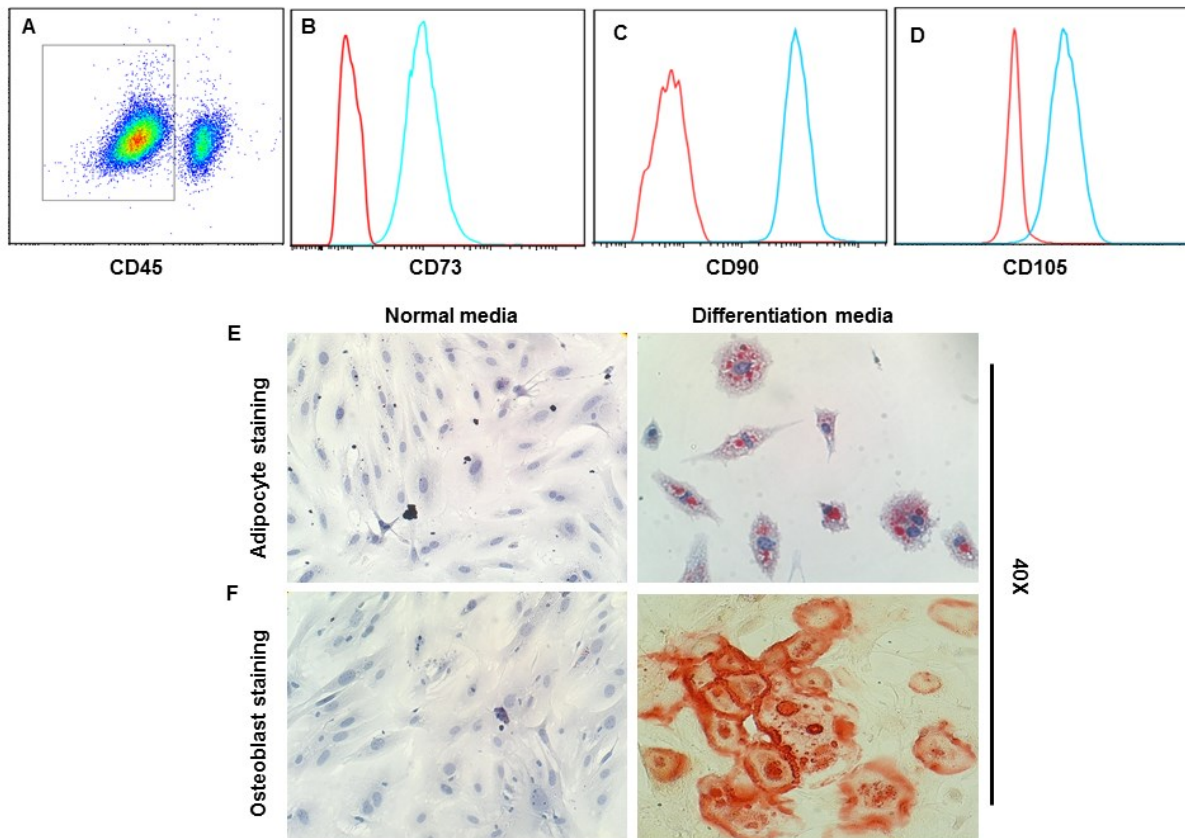


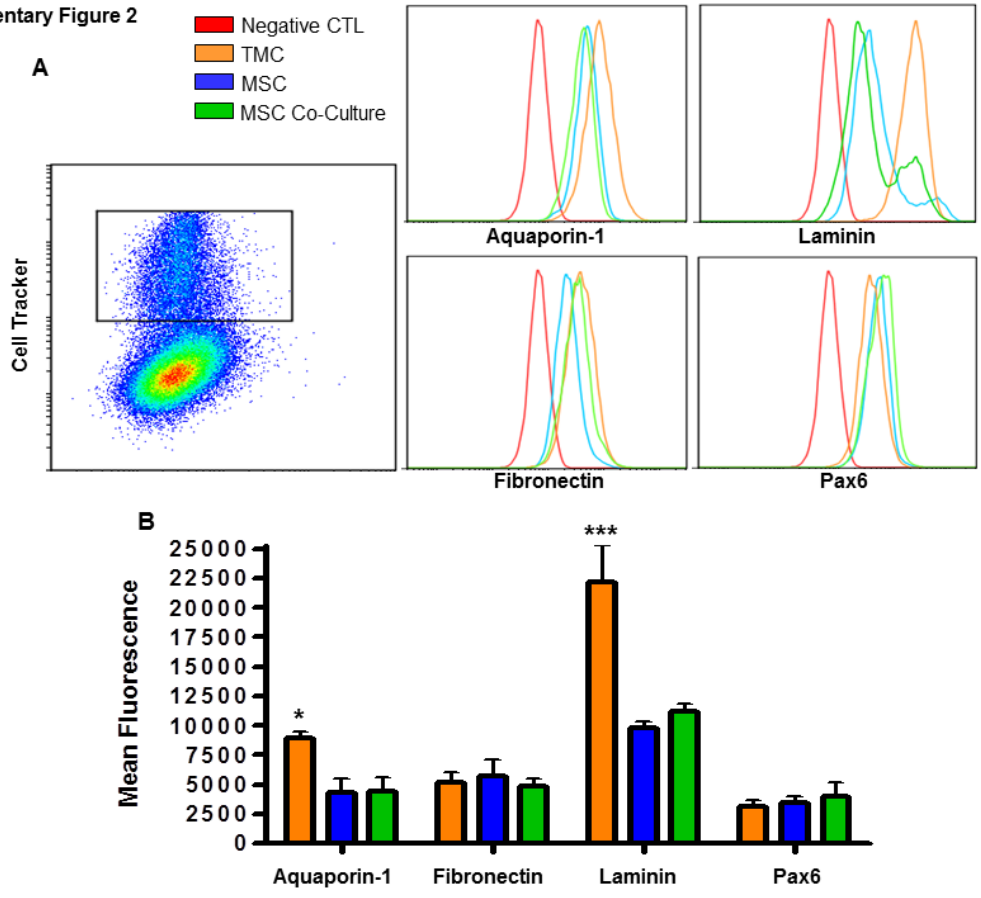
Figure 7. Cellular damage raises ocular tissue sensitivity to MSC secretum. Bar graphs are compilations of nestin and Ki67 positive cells after **A**) MSC injection or **B**) Low-oxygen CM injection. Areas observed were both the temporal (checkered red) and nasal (checkered blue) sides of an intact eye or the damaged (red) and intact (blue) areas of a laser treated eye. Pictures are representative images of each group (20X) in both the damaged and the intact area: **C**) Intact eye with MSC injection, **D**) Damaged eye with MSC injection, **E**) Intact eye with Low-oxygen CM injection, **F**) Damaged eye with low-oxygen CM injection. Nestin (red) Ki67 (green) and Dapi (blue). Significance: ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

Supplementary Figure 1



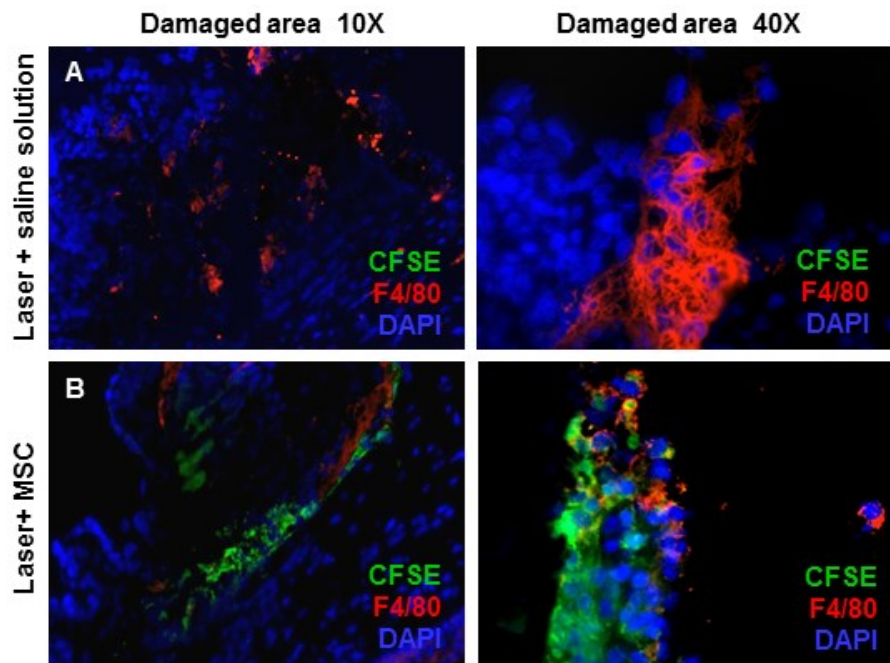
Supplementary Figure 1. BMMC Characterization. BMMC population was characterized for hematopoietic cells and MSC. **A)** Using CD45 and CD14 hematopoietic marker, we identified 65% of non hematopoietic cells after 2 passages *in vitro*. Gated cells were positive for CD73 (**B**) CD90 (**C**) and CD105 (**D**). Selected CD45-CD14 negative cells were plated in adipogenic (**E**) and osteogenic (**F**) media, were allowed to differentiate and compared to non treated MSC controls. Representative images of flow cytometry analysis and MSC differentiation (40X)

Supplementary Figure 2



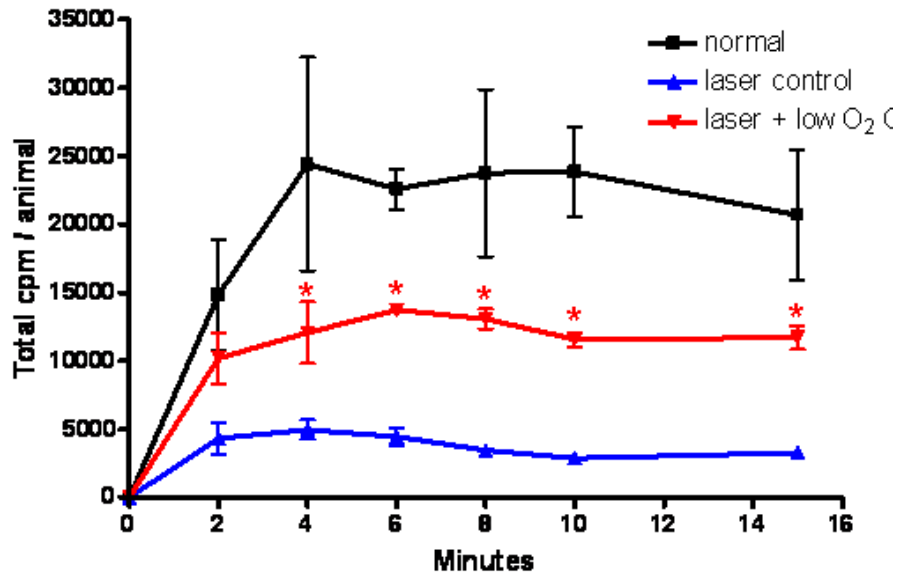
Supplementary Figure 2. MSC do not transdifferentiate into TM cells *in vitro*. **A)** TM cells and MSC before and after 1 week co-culture with TM cells were assessed for the presence of laminin, fibronectin, aquaporin-1 and Pax6 by flow cytometry. Fluorescence intensity was measured on cell tracker positive MSC (dot plot). **B)** Compilation of mean fluorescence intensity for each antigen in TM cells, MSC alone and MSC co-cultured with TM. (Mean±SEM; n=3 from 3 distinct experiments). Significance: *p<0.05, ***p<0.001.

Supplementary Figure 3



Supplementary Figure 3. MSC phagocytosis by ocular microglia. Pictures are representative images of day 2 post laser damage tissue sections that were stained with microglia marker F 4/80 after A) injection of saline solution or B) injection with CFSE+ MSC.

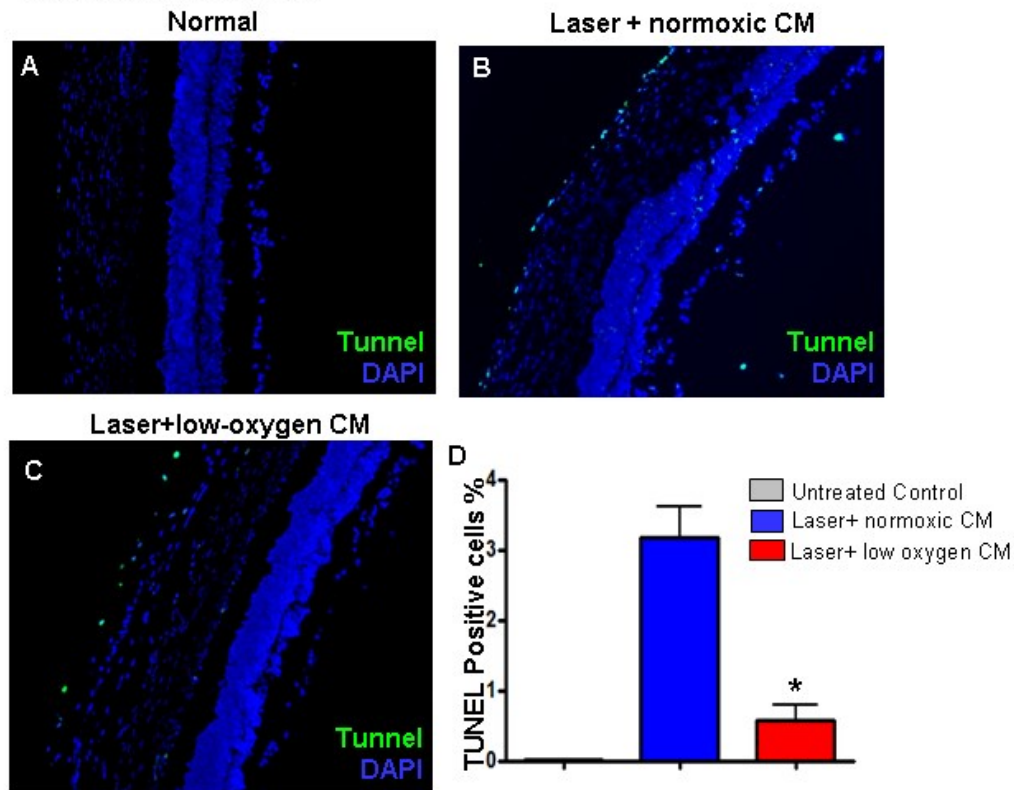
Supplementary Figure 4



Supplementary Figure 4. MSC paracrine factors promote restoration of TM function.

Aqueous humor clearance was evaluated by measuring peripheral blood radioactive tracer levels in counts per minutes (CPM) at different time points after injection of radiotracer in normal eyes (black line, n=3), laser treated eyes (blue line, n=3) and low oxygen CM treated eyes (red line, n=3). Results are expressed as mean±SEM of 2 independent experiments. Statistical significance was observed in low O₂ CM exposed eyes versus laser only and normal controls: *p<0.05

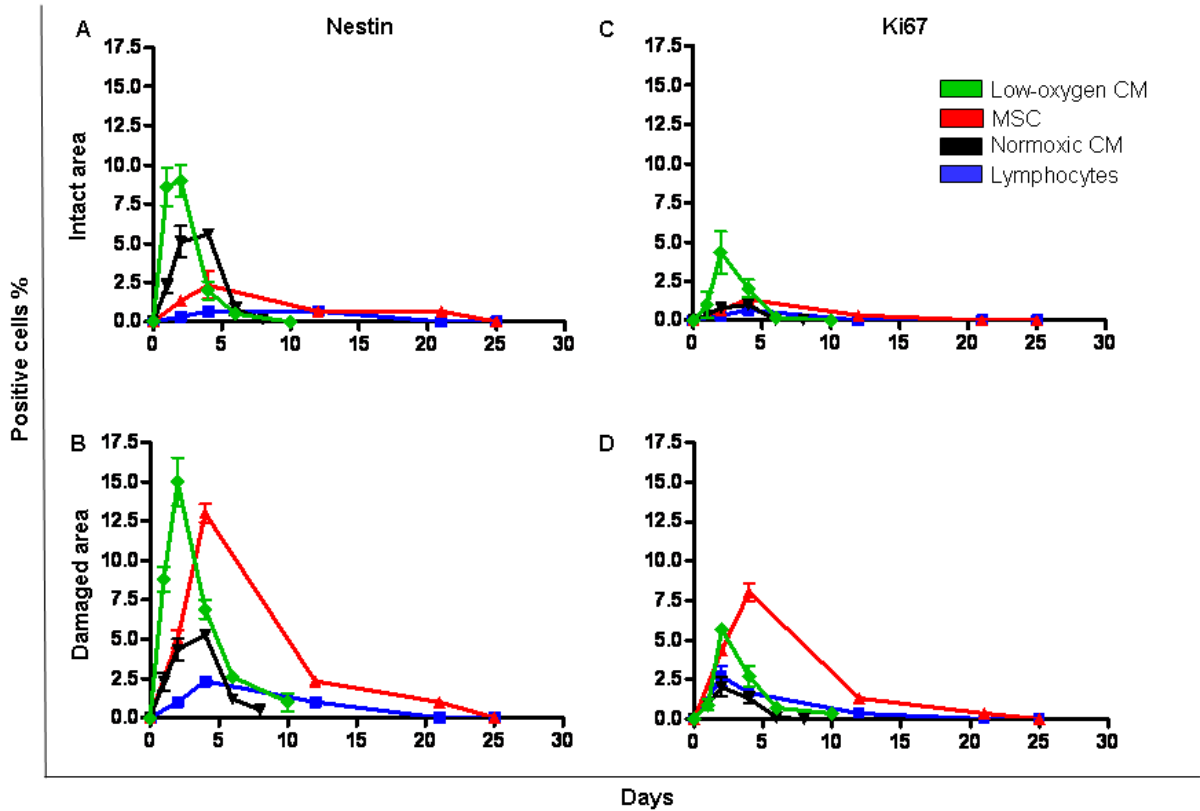
Supplementary Figure 5



Supplementary Figure 5. Decreased IOP allows for better survival of retinal cells

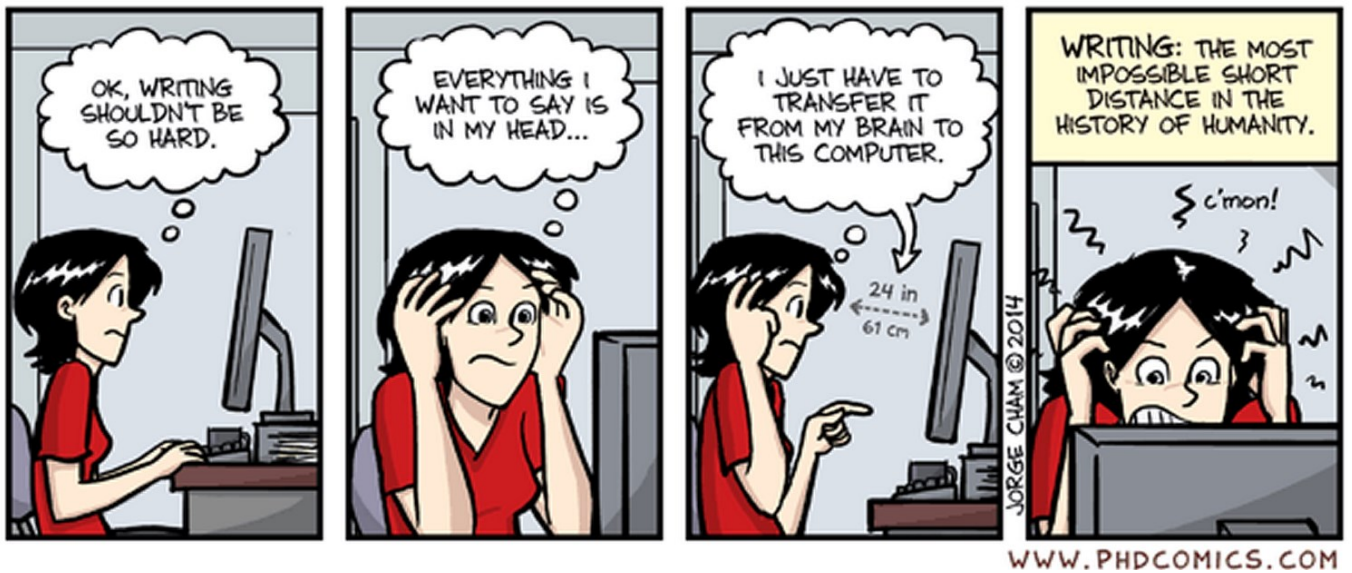
Histological sections of the retinal area from a rat eye stained by TUNEL assay. Pictures are representative images of retinas from a A) untreated control B) Laser + normoxic CM treated eye, day 12 C) laser + low oxygen treated eye, day 12. D) Compilation of total number of TUNEL+ cells present in the retina 12 days after laser damage and CM injection. Cell numbers (mean±SEM) were determined by fluorescence microscopy analysis of sequential ocular sections (n=3 per time point).

Supplementary Figure 6



Supplementary Figure 6. Nestin expression and cellular proliferation in the damaged and intact areas. Graphs represent compilation of nestin (A-B) and Ki67 (C-D) expressing cells based on their location: Intact area (A-C) and damaged area (B-D). Three animals per group from 2 separate experiments (N=6). Numbers indicate the percentage of positive cells found in the area composed of the ciliary body, the TM and a limited portion of the iris.

Chapitre 3: Article 2



Tiré de www.phdcomics.com

3.1 Mesenchymal stem cells promote ocular regeneration through macrophage recruitment in a paracrine factor dependent mechanism

Renaud Manuguerra-Gagné, Vibhuti Dave, Mark R. Lesk, Denis-Claude Roy

Cet article attend approbation de brevet avant publication

Ma contribution à cet article est majeure. J'ai été celui qui a réalisé l'absence d'effet du MSC-CM *ex vivo* et qui a suggéré que d'autres facteurs pouvaient être produits *in vivo*. J'ai donc conçu et réalisé les manipulations nécessaires pour démontrer mon hypothèse. J'ai effectué la majeure partie de l'analyse des résultats, leur interprétation, la création des figures et la rédaction de l'article. Cet article est important pour ma thèse, car il démontre que l'effet des cellules souches nécessite l'apport d'autres populations cellulaires pour favoriser la réparation tissulaire. Il démontre l'importance des macrophages ainsi que de la production de facteurs locaux pour assurer la régénération tissulaire. Au plan clinique, mes travaux ont permis la découverte d'un des facteurs responsables des effets régénératifs observés lors de mes travaux. Ce facteur pourrait permettre de développer un traitement simple et efficace pour le glaucome ouvert.

3.2 Abstract

It is commonly accepted that mesenchymal stem cells (MSC) exert their regenerative effect through the production of soluble factors, but the exact mechanism is often unknown. Open angle glaucoma is a degenerative disease that could greatly benefit from MSC therapy. It is characterised by high intraocular pressure (IOP), linked to a dysfunction of the trabecular meshwork (TM), the tissue regulating the outflow of aqueous humor. We have previously demonstrated that MSC conditioned media (MSC-CM) induce ocular regeneration and lower IOP in glaucoma models by promoting the reactivation of local progenitor cells. This effect takes place even though the MSC-CM is only injected once. In the present study, we have found that these factors alter the ocular tissue environment, resulting in the observed long term regeneration. Quantitative PCR measurements demonstrated significant upregulation of basic fibroblast growth factor (bFGF) in the regenerating area 24 hours after injection of MSC-CM. In addition, we investigated a specific macrophage subset mainly found in the regenerating area and found that they were responsible for this upregulation. The injection of purified bFGF in a glaucoma model has allowed us to partially recreate the regenerative effect of the MSC-CM both on stem cell activation and IOP decrease. Additionally, both the inhibition of bFGF and the elimination of ocular macrophages by injection of clodronate liposomes reversed the regenerative effect. These results indicate that MSC can alter local cells and induce the production of growth factors in an area of damage. These findings have broad application to promote tissue regeneration in a large number of diseases.

3.3 Introduction

Among the different stem cells used in regenerative therapy, few are generating as much enthusiasm as mesenchymal stem cells (MSC). Indeed, MSC demonstrate therapeutic potential in regenerative medicine for almost all types of organ failures, degenerative diseases and immune disorders (1-4). Although many studies report favourable results using MSCs early in disease progression, the complexity of their mechanisms of action and uncertainty about determining events has limited the harnessing of their full therapeutic potential. While there seems to be a consensus that the MSC secretome represents the most prominent mechanism of action, the identification of soluble factors and cellular mediators as well as the sequence of events leading to tissue regeneration remains a tantalising challenge(5-8).

MSCs can affect regeneration through induction of proliferation and apoptosis control, by lowering inflammation or by influencing tissue remodeling and neovascularisation (9-13). Indeed, many growth factors and cytokines, such as VEGF, HGF, IGF and bFGF, are essential to normal wound healing process and have often been studied as hypothetical primary modes of MSC effect (14). Some groups recently reported that MSC promote regeneration by altering the wound environment (15-17). One of their primary local targets are inflammatory macrophages, of which they can change the phenotype from M1 (pro inflammatory) to M2 (anti-inflammatory) (18, 19). In wound healing, M2 macrophages can contribute to tissue regeneration by supplying additional growth factors while favouring an anti-inflammatory environment (20). Additionally, continued presence of anti-inflammatory macrophages in the

wounded area long after the injected MSC or MSC conditioned media (MSC-CM) has been cleared from the organ could have a long term influence on tissue regeneration.

Understanding the inner workings of MSC secretome would go a long way towards bringing these therapies in clinic. We have recently showed the regenerative effect of MSC in open angle glaucoma (OAG), a degenerative ocular disease where the loss of function of the trabecular meshwork induces high ocular pressure and optic nerve damage. Moreover, MSC and their secreted factors induced reactivation and proliferation of a progenitor cell pool found in the ciliary body. In the current study, we have investigated how this secretome is responsible for the functional tissue regeneration. We show that MSC-CM cannot activate the progenitors without support from monocyte-derived macrophages. This has led us to the hypothesis that infiltrating macrophages are required for the MSC secretome to attain its regenerative potential, as these cells are affected by the MSC secretome and start producing their own growth factors upon exposure. Among these we identified basic fibroblast growth factor (bFGF) as a key regulator of tissue regeneration. These altered effector cells, which can reside in injured tissues, could potentially change the course of chronic disease treatments.

3.4 Methods

Animals

Six to eight week old C57BL/6 male mice and 3-month-old Brown Norway female rats were purchased from Jackson Laboratories (Bar Harbor, ME, <http://www.jax.org>) and Charles

River (Kingston, ON, Canada, <http://www.criver.com>), respectively. Animals were housed in pathogen-free conditions and studied using protocols approved by the Hôpital Maisonneuve-Rosemont (HMR) Research Center Animal Protection Committee.

Isolation, Culture, and Expansion of Mesenchymal Stromal Cells

BM was aspirated from femurs and tibias of 2-month-old C57BL/6 mice. BM mononuclear cells (BMMCs) were isolated using density gradient centrifugation (Ficoll-Paque; Amersham Pharmacia Biotech, Montreal, QC, Canada, <http://www.amersham.com>) and suspended in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM; Gibco, Burlington, ON, Canada, <http://www.invitrogen.com>), 20% heat-inactivated (56°C, 60 minutes) fetal bovine serum (FBSI; Hyclone, Logan, UT <http://www.hyclone.com>), 2 µM L-glutamine, 100 U/mL penicillin, and 100 µg/mL streptomycin (Gibco). Cells were plated in 75 cm² tissue culture flasks (Sarstedt, Montreal, QC, Canada, <http://www.sarstedt.com>) and incubated at 37°C in 5% CO₂ humidified air. After 48 hours, non-adherent cells were removed, grown until approximately 90% confluence, and then passaged with medium changes every 3–4 days.

MSC Characterization

After the second passage, adherent bone marrow cells were characterized for mesenchymal and hematopoietic markers using flow cytometry analysis. The following fluorochrome-labeled anti-mouse antibodies were used: CD14- and CD45-Allophycocyanin (APC), CD105-Pacific blue, CD73-Phycoerythrin (PE) (all eBioscience, San Diego, CA, <http://www.ebioscience.com>), and CD90-fluorescein isothiocyanate (FITC) (BD, Mississauga,

ON, Canada, <http://www.bd.com>). Data were collected on a FACS LSRII cytometer (BD) and analysis performed with FlowJo software (Tree Star, Ashland, OR, <http://www.treestar.com>). Cells positive for the hematopoietic marker CD45 were sorted using a FACS Aria III (BD), and both MSC and hematopoietic cells were used for *in vivo* experiments. MSC were tested for osteogenic and adipogenic differentiation using osteocyte/chondrocyte or adipocyte differentiation media (Invitrogen, Burlington, ON, Canada, <http://www.invitrogen.com>), and alizarin red S and oil red O staining (Sigma, Oakville, ON, Canada, <http://www.sigmaaldrich.com>), respectively.

MSC Culture Medium preparation

MSC secretum was obtained after seeding 1×10^6 MSC in 15 mL DMEM for 24 hours at 37°C in 5% CO₂ humidified air at 5% O₂. MSC conditioned medium (CM) was then harvested and concentrated 40× using 10 kDa centrifugal filter devices (Amicon Ultra-15, Millipore).

Mass spectrometry and Western Blot

The concentrated medium obtained from both 21% O₂ and 5% O₂ culture conditions was loaded on a 12% SDS-PAGE gel. The whole protein run was then cut into 3 bands per conditioned based on general molecular weight: 10 to 50 kDa, 50 to 100kDa and 100+ kDa. The bands containing the peptides were analyzed by liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) at the Taplin Mass Spectrometry Facility (Harvard Medical School).

Presence or absence of proteins of interest was confirmed by immunoblotting using primary antibodies recognizing bFGF and VEGF (Abcam). The membranes were blocked with 3% dried milk in 10 mM Tris-HCl, pH 7.4, 0.15 M NaCl, and 0.2% Tween, and incubated with the primary antibodies at a 1:1,000 dilution followed by exposure to a secondary antibody conjugated to horseradish peroxidase (1:5,000 dilution). Bound antibody was detected using chemiluminescence using a FujiFilm LAS-3000 (R&D systems, Minneapolis, MN, <https://www.rndsystems.com/>)

Glaucoma Model

To induce ocular hypertension, rats were anesthetized using intraperitoneal injection of ketamine (50 mg/kg; Wyeth, Guelph, ON, Canada, <http://www.pfizer.com>) and xylazine (2.2 mg/kg; Bayer, Toronto, ON, Canada, <http://www.bayer.com>), and drops of the local anesthetic proparacaine (Alcon Canada, Mississauga, ON, Canada, <http://www.alcon.ca>) were applied to the eyes. The method developed by Levkovitch-Verbin et al. (21) was modified to selectively damage only half of the circumference of the anterior chamber angle (22). Briefly, 90 spots of 50 μ m diameter were directed toward the nasal 180° of the TM area using a Coherent Novus Omni laser (Laser Labs; Tampa, FL, <http://www.laserlabs.com>) set at 532 nm wavelength, 200 mW, and 0.1-second duration. Baseline IOP was measured weekly with a Tonopen-XL (Medtronic, Mississauga, ON, Canada, <http://www.medtronic.ca>). IOP was obtained in rats by performing an average of 10 measurements at a time by a masked observer.

Intra-ocular injections

Intraocular transplantation was performed during the hour following laser treatment. Prior to intraocular injection, 10 µL of aqueous humor (AH) was removed from the anterior chamber of the treated eye using a 28^{1/2} gauge needle. Injection of 10 µL of MSC-CM or different concentrations of bFGF (25ng, 50ng, 100ng or 200ng) was performed at the same injection site immediately after AH removal and under identical conditions. Injection was carried out over the course of 1 minute to avoid additional stress to the anterior chamber. Although minimal reflux was observed after injection, no leaks were observed beyond the first 24 hours when using the Seidel test. Animals that sustained additional damage to the anterior chamber during the injection were removed from the experiment.

Tissue Processing

Animals were euthanized by intraperitoneal injection of pentobarbital sodium (Euthanyl; Bimeda-MTC Animal Health, Cambridge, ON, Canada, <http://www.bimedamtc.com>). Enucleated eyes were embedded in Optimum Cutting Temperature (Tissue-tek O.C.T.; Fisher Scientific, Ottawa, ON, Canada, <http://www.fisherscientific.com>) compound and flash-frozen in liquid nitrogen. Twelve micrometer sections were cut by cryostat (Leica, Richmond Hill, ON, Canada, <http://www.leica.com>) and mounted on slides (Fisher Scientific). Immunofluorescence staining was performed after fixation in 4% paraformaldehyde to examine anterior segment histology.

Immunofluorescence

Samples were incubated for 1 hour with blocking-permeabilizing solution of phosphate buffered saline (PBS) containing 1 mg/ml bovine serum albumin (Vector Labs., Burlington, ON, Canada, <http://www.vectorlabs.com>) and 1 μ L/mL Tween (Sigma). Slides were incubated overnight at 4°C with unlabeled rabbit anti-Ki67 (BD), rabbit anti F4-80 and mouse anti-nestin antibodies (Abcam, Toronto, ON, Canada, <http://www.abcam.com>). Primary antibodies were revealed with goat anti-rabbit AlexaFluor488 and goat anti-mouse AlexaFluor594 (all from Invitrogen). Nuclei were stained with mounting medium containing 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) (Vectashield; Vector Labs). Confocal microscopy (Axiovert 100 LSM 510Meta; Carl Zeiss, Jena, Germany, <http://www.zeiss.com>) was performed on histological sections, while fluorescence and surface area of anterior chamber structures were analyzed using AxioVs40 V4.8.2.0 (Carl Zeiss).

Isolation of Ocular Progenitor Cells

Ciliary body cells were isolated from adult BN rats as described previously (23). Briefly, eyes were removed after euthanasia from intraperitoneal injection of pentobarbital sodium. Tissue dissection was performed in neurosphere medium composed of DMEM / F12 (1:1), 2% B-27, heparin (20 ng/mL), 2 μ M L-glutamine, 100 U/mL penicillin, and 100 μ g/mL streptomycin (all from Gibco). The ciliary body was isolated under direct observation under a binocular surgical microscope. The harvested tissue was first cut in pieces less than 1mm long and then treated with Tryple and DNase-1 (both from Invitrogen) for 20 minutes at 37°C. Cells were collected by centrifugation at 1500 rpm for 5 minutes. The supernatant was

replaced with neurosphere medium supplement and cells were plated in non-adherent 24 wells culture plates (Sarstedt). This medium was complemented with a combination of growth factors (10 ng/mL basic fibroblast growth factor (bFGF) and 20 ng/mL epithelial growth factor (EGF, Sigma-Aldrich) or 200 μ L of concentrated MSC-CM 5%. Growth factors or MSC-CM were added daily for 7 days by which time they had formed round collections of cells known as neurosphere cells.

Macrophages isolation

Mice spleens were treated as described previously (24). Briefly, spleens were treated with collagenase (1 mg/mL in PBS, Type V from *Clostridium histolyticum*, Sigma–Aldrich) for 15 min at 37 °C and passed through a 70 μ M cell strainer (BD Biosciences) to yield single-cell suspensions prior to staining with antibodies. The fluorochrome-labeled anti-mouse F4-80 and CD11b antibodies were used to sort out spleen macrophages. All samples were acquired using FACSCanto I (BD Biosciences) and were analyzed using the FlowJo software (TreeStar, Ashland, OR). Sorted cells were placed in culture in 24 well plates at density of 1×10^6 cells/ml, 1ml per well and were stimulated for 24h in the presence of 200 μ L of MSC-CM. Cells were then isolated by centrifugation and prepared for RNA extraction.

RNA isolation and real time PCR

Total mRNA was isolated from 1×10^6 macrophages after 24h in culture, or from fresh chamber angle tissue samples. The different samples were processed in Trizol (Ambion, Austin, TX, <http://www.lifetechnologies.com>) and purified using phenol-chloroform (Sigma).

A minimum of 1 µg of total RNA was subjected to reverse transcription using iScript Reverse Transcription Supermix (Bio Rad, Mississauga, Ontario, <http://www.bio-rad.com/>). TaqMan gene expression assay primers were obtained for rat VEGF, bFGF, EGF and CNTF or mouse bFGF and VEGF (Applied Biosystems, www.lifetechnologies.com/). Real time PCR was performed on an ABI 7500 Real-Time PCR System and analyzed using the ABI 7500 software (Applied Biosystems). The expression level of each gene was normalized against the expression level of glyceraldehyde 3-phosphate (GAPDH).

In vivo blocking assay

In vivo FGFR inhibition was performed as described previously (25). Briefly inhibition was achieved using the chemical agent, SSR128129E (Axom Medchem, Groningen, Netherlands, <http://www.axonmedchem.com/>). Rats were treated orally by daily ingestion of 30 mg/kg SSR, starting 2 days before laser treatment and intraocular injections and continuing until day 2, at which time tissue samples were collected.

Macrophage depletion

Clodronate liposomes were purchased from Professor Nico van Rooijen of Vrije University, The Netherlands (www.clodronateliposomes.org). These were prepared as previously described (26, 27). After warming and suspension of the liposomes, a dose of 1ml (5mg/ml) was administered intravenously to induce macrophage depletion. This was done twice, on days -4 and -1 before laser treatment, to ensure the absence of monocyte/macrophage population capable of migrating in the eye after the laser treatment.

Statistical Analysis

Comparisons between animal groups were done using two-way ANOVA and Mann–Whitney *t* test. Statistical analyses were performed using GraphPad Prism version 4.0 (San Diego, CA, <http://www.graphpad.com>). All statistical tests were two-sided and performed at the significance level of 0.05.

3.5 Results

MSC-CM effect on ocular progenitor cells *in vivo* and *in vitro*

Paracrine factors secreted by MSC can alter the phenotypic and functional properties of progenitor cells as well as immune cells and favour the migration of many cell types important for tissue regeneration (8, 9, 12). We have previously shown that injection of MSC conditioned media in an animal glaucoma model leads to the activation of progenitor cells in the ciliary body positive for nestin and Pax6 (Fig. 1 A), induces their proliferation and leads to rapid functional tissue regeneration (22). While the wound healing process was the direct result of the MSC-CM injection, the complexity of the inflammatory environment makes it difficult to confirm that MSC factors are the only components responsible for the healing effect. In order to identify the crucial factors involved in the ocular regeneration, it is therefore important to separate the effect of endogenous ocular factors from MSC paracrine factors. In order to assess the true impact of MSC-CM on the activation and proliferation of progenitor cells without interference of other endogenous factors, we isolated those cells from the ciliary body of an undamaged eye. After tissue dissociation, the harvested cells were plated in progenitor culture media with addition of either bFGF and EGF, growth factors known for

neurosphere generation, or MSC-CM. Daily administration of bFGF and EGF resulted in 135 ± 13 (mean \pm stand err.) neurospheres after 2 weeks in culture (Fig 1 B-D) while daily addition of MSC-CM failed to generate any neurospheres ($2,2 \pm 0,4$) in the same time span (Fig. 1 B-D). Mass spectrometry analysis confirmed absence of these two growth factors from MSC media. This stands in stark contrast to the rapid activation of the progenitor cells previously observed *in vivo* following MSC-CM injection. These findings demonstrate that although MSC-CM promotes the generation of Pax6/Nestin double positive cells and induces their proliferation *in vivo* as observed by their Ki67 expression, the same medium was incapable of replicating this effect *in vitro*. This finding suggested that MSC-CM may be affecting function/phenotype of cells already present or recruited to the damaged tissue environment and that these cells play a critical role in tissue regeneration.

MSC-CM induces production of endogenous growth factors in the treated eye.

As MSC-CM can induce progenitor cell activation *in vivo* but not *in vitro*, we sought to uncover if they altered the tissue environment in a way that favoured progenitor cell activation. MSC can lead to the upregulation of regenerative growth factors, both through alteration of the immune response or by favouring the migration of cells involved in wound healing (28, 29). To determine if paracrine factors involved in the progenitor activation were upregulated *in vivo* following MSC-CM injection, we investigated the role of different treatments (normal, laser treated, laser treated + 21% O₂ conditioned MSC-CM and laser treated + 5% O₂ conditioned MSC-CM) on the RNA levels of four growth factors known for their impact on regeneration (VEGF, EGF, bFGF and CNTF) within the tissue structures

comprising the chamber angle (ciliary body, trabecular meshwork, iris and cornea segments (Fig.2 E). Two of the four factors, VEGF and bFGF, were found to be significantly upregulated in samples obtained from the hypoxic MSC-CM treated groups ($p=0.05$ and $p<0.01$ respectively), with bFGF showing as much as four-fold higher expression in the hypoxic MSC-CM treated group compared to the laser treated group without MSC-CM exposure. Meanwhile, control laser treated eyes and eyes exposed to normoxic CM not only failed to upregulate any of these 4 factors, but VEGF, EGF, bFGF and CNTF were downregulated compared to normal untreated eyes.

These observations were confirmed by immunofluorescence staining of the damaged chamber angle (Fig.2 B-E). The strong upregulation of bFGF can readily be confirmed in the hypoxic MSC-CM treated group (Fig.2 A-D, with and without DAPI). VEGF and bFGF co-localisation was only observed in the MSC-CM 5% O₂ condition. In addition, we found that the bFGF upregulation did not appear to localize to the iris pigmented epithelial cell population, but instead concentrated in non-pigmented stromal cells (Fig.2 E). Finally, while VEGF was found to be present in the MSC-CM supernatant, the same could not be said about bFGF, implying that the only source of this growth factor was within the eye (Fig.2 F). These results also indicate that only MSC-CM prepared under low oxygen conditions induced endogenous growth factors production in the damaged area.

Injection of bFGF partially replicates MSC-CM injection.

To determine the contribution of bFGF on progenitor cell generation and proliferation, laser treated eyes were exposed to increasing concentrations of purified bFGF (Fig. 3 A). Expression of nestin and Ki67 was measured in eyes undergoing anterior injections of bFGF ranging from 10ng to 200ng in the same fashion as MSC-CM. All concentrations of bFGF injected in the anterior chamber of a damaged eye led to the appearance and proliferation of nestin positive cells (Fig. 3 B). This effect was strongest with an injection of 25ng of bFGF, in which case $6,98 \pm 0,97\%$ of the chamber angle cells were nestin positive a significantly higher expression than that of the 10ng injection ($3,71 \pm 0,45\%$, $p=0,05$). In contrast, MSC-CM led to $12,1 \pm 1,48\%$ nestin positive cells in the same area, indicating that this single growth factor replicated 57% of the MSC-CM effect. Additionally, injection of 25ng of bFGF almost completely replicated the effect of MSC-CM on cellular proliferation, with Ki67 positivity in $4,89 \pm 0,77\%$ of chamber angle cells compared to $5,7 \pm 0,32\%$ in MSC-CM 5%O₂ condition. Interestingly, increasing doses of bFGF resulted in a lower frequency of nestin positive cells ($5,4 \pm 0,46\%$, $3,96 \pm 0,61\%$ and $3,86 \pm 0,32\%$ for 50ng, 100ng, and 200ng bFGF, respectively, in the ocular chamber angle. A similar gradual decrease in Ki67 expressing cells ($3,86 \pm 0,26\%$, $3,56 \pm 0,29\%$ and $2,46 \pm 0,64\%$) was observed upon exposure to increasing bFGF doses. Collectively, these data strongly suggest that bFGF secretion and concentration are important mechanisms governing MSC tissue regenerative capacity.

Blocking FGF receptors inhibits progenitor cell activation.

In view of the importance of bFGF contribution to progenitor cell reactivation and proliferation in the ciliary body, we investigated the link between bFGF production and MSC-CM injection. To determine the impact of endogenous bFGF on progenitor cell recruitment and proliferation, we blocked the FGF receptor (FGFr) pathway using a multi FGF receptor inhibitor, the small molecule SSR128129E (SSR). SSR usage was selected because four different FGF receptors are present in mammalian cells, each binding more than one FGF subtype. Inherently, SSR inhibits signalling of all FGFr after binding to their extracellular domain. Oral administration of this molecule started 2 days before laser damage and MSC-CM injection and continued daily until day 2 post treatment, the previously identified maximal peak of nestin and pax6 expression in the ciliary body. Administration of SSR led to a dramatic decrease of nestin and Ki67 expression in MSC-CM treated eyes (Fig. 4 A-B; $p < 0,001$). Indeed, animals given SSR showed inhibition of nestin expression by 43,7% of the level found in control MSC-CM treated animals. Ki67 expression decreased by 60% over controls in the same treatment conditions. These results, along with results from bFGF injection *in vitro* described above, indicate that the endogenous production of bFGF is a key player in the regeneration mechanism activated following the addition of MSC-CM.

Macrophages are responsible for bFGF production.

We next investigated which cell type was at the origin of bFGF production following MSC-CM exposure. Growth factors originated from a localized non-pigmented cell population in the chamber angle. Interestingly, MSC have been shown to tamper with immune function,

with macrophages being one of their prime targets (15, 16, 30). Macrophages play an important role in wound healing, not only for the clearance of debris or invading pathogens, but also for tissue regeneration (20, 31, 32). In addition, MSC can influence macrophage secretome and induce their conversion into an anti-inflammatory M2 phenotype, which is also known to favour tissue regeneration (18). Moreover, the prompt migration of macrophages into areas of tissue damage, led us to investigate whether they could mediate the previously identified *in vivo* production of bFGF and VEGF. Light microscopy examination of histological sections of ocular anterior chamber angle revealed a population of non-pigmented cells present in the angle after laser damage but absent from untreated tissue (Fig.5 A-B;). Such non pigmented cells were observed in all other groups (laser, laser + MSC-CM 5% O₂ and laser + MSC-CM 21% O₂). We deduced that these cells likely migrated in this area in response to laser damage. Since early migration to an area of tissue damage also reflected normal macrophage behaviour, we tested these cells for known macrophage markers. One universal marker in rodents is F4/80. Using immunofluorescent staining, it can be seen that the majority of recruited non pigmented cells present in the angle are F4/80 positive. Importantly, most F4/80 positive cells are also positive for intracellular bFGF, indicating that these cells are producing this growth factor.

To confirm these results, we isolated F4/80 positive cells from the spleen and placed them in culture in the presence or absence of MSC-CM (Fig.5 F-G). After 24h, bFGF expression was upregulated at least two-fold in MSC-CM culture conditions when compared to unstimulated cells. In contrast, no upregulation of VEGF was found in MSC-CM treated F4/80 positive cells. Taken together, these results indicate that MSC-CM can induce bFGF

production in macrophages and that these cells could be responsible for the upregulation of bFGF found in MSC-CM treated chamber angle.

Macrophage elimination inhibits progenitor cell reactivation.

Although the role of macrophages in the production endogenous of bFGF has been shown, we have yet to demonstrate the importance of this specific population for the progenitor cell reactivation observed after MSC-CM injection. To determine if macrophages are key players for tissue regeneration in this setting, we specifically eliminated this cell population *in vivo* and observed its impact on the nestin positive cells. Macrophages were depleted from treated animals using clodronate liposomes. Animals were injected with liposomes prior to MSC-CM treatment to ensure efficient macrophage depletion. Administration of liposomes led to a significant decrease of macrophages in the eye ($p < 0.001$, Fig 6 A-B). This decrease in ocular macrophages resulted in a strong decrease in both progenitor cell numbers and proliferation (Fig 6 C-D). Interestingly the effect was stronger on the expression of nestin than on the expression of Ki67 with a measured decrease of 75% compared to 40%, respectively. Taken together with their expression of bFGF, these results demonstrate the importance of the migrating macrophages to the local induction of ocular progenitors.

Macrophage numbers and bFGF alter the progression of IOP in a glaucoma model

Previous results clearly demonstrate the necessity of both bFGF and macrophages in the reactivation of ocular progenitor cells. What remains to be seen is the impact of these two

elements on the regenerative process as a whole. We studied the impact of both macrophage presence and bFGF on functional TM regeneration through intraocular pressure progression and tissue histology. As demonstrated previously (22), increased IOP was observed in all groups on day 2 after laser exposure (Fig 7 A-B). While IOP continued to rise in laser-treated animals, peaking on day 10, the ocular injection of MSC-CM lowered IOP, which returned to baseline significantly earlier (day 6) than in the laser only group (day 33; $p < .01$). Interestingly, elimination of macrophages by clodronate liposomes injections in MSC-CM treated groups resulted in IOP similar to untreated controls (Fig.7 B). Levels of bFGF also have an impact on the progression of IOP. In the case of groups treated with MSC-CM and FGF receptor inhibitor SSR, IOP did not return to baseline until day 16 (Fig.7 A). This is 2,6 times slower than in regular MSC-CM groups, yet still twice as fast than in groups that only received laser damage. In contrast, a single injection of 25ng of purified bFGF on day 0 allowed for a significantly lower IOP as early as day 4 compared to the laser only group ($p < 0,001$), but this effect was lost on day 8 and IOP did not return to baseline until day 30. Taken together, these results demonstrate that macrophages are a key player in TM regeneration by MSC-CM and that bFGF plays an important role in this effect.

3.6 Discussion

While MSC have been demonstrated to favor tissue regeneration in multiple diseases, animals or even human clinical trials, there is no consensus on their mechanism of action. While neovascularisation and anti-inflammatory or anti apoptotic pathways were found to be involved, these broad terms only scratch the surface of the complex cellular interactions at

work in MSC-induced tissue regeneration. While these effects could result from factors produced by MSC, other cell populations are likely important intermediates. In this study, we identified two of these important interactions. We demonstrate that the reactivation of ocular progenitor cells occurs through the effect of MSC paracrine factors on both the ocular cells and the macrophages that migrate to the wound. Additionally, we identified bFGF as an essential factor for ocular regeneration. These findings not only open the door to a better understanding of the mechanisms of cellular therapy, but also to rapid and safe treatment approaches relying on the injection of a defined cocktail of regenerative factors.

We found MSC-CM on its own to be ineffective for neurosphere growth *in vitro*. This was an unexpected observation, as MSC have been shown to stimulate other types of cell cultures *in vitro* before (33). This could be due to specific requirements of the ocular progenitor cells, and could also be explained by the absence of the MSC themselves. While bFGF is an important element for the *in vitro* culture of neurosphere, it has also previously been found present in certain MSC supernatants (34). Surprisingly, mass spectrometry data revealed that it was absent from our conditioned media. It has been shown that bFGF is often located in the extracellular matrix and will only be released under certain conditions (35). Different elements could explain the absence of this factor from our conditioned medium such as isolation or culture methods, number of cell passages or the time lapse used to prepare the culture medium. Although MSC-CM has proven inadequate for neurosphere culture *in vitro*, it still has a remarkable potential to activate nestin positive cells *in vivo*. This observation prompted the investigation of cell populations that could produce other paracrine factors *in vivo* to complement MSC medium and lead to tissue regeneration.

Regenerative mechanisms are complex cascades that require multiple messengers and often generate chain reactions between the injected population and the cell types in the tissue environment. Our results clearly demonstrate that ocular progenitor cells require the interaction between MSC-CM and macrophages migrating in the wounded area for their activation. Indeed, macrophages have always been found present at several stages of the wound healing process (36). Normal wound healing acts in 3 phases: the inflammatory stage, recruitment of fibroblast, and tissue remodeling. Many subtypes of macrophages act as coordinator of these steps, with inflammatory M1 subtype in the early days, and M2 macrophages at the resolution stage. M2 macrophages are known to produce anti-inflammatory molecules and growth factors, such as VEGF and IGF. An early shift to the M2 subtype could not only decrease inflammation but positively impact progenitor cell activation before the arrival of epithelial or fibrotic cells.

Several studies support a role for macrophages in the treatment of human glaucoma. Indeed, selective laser trabeculoplasty has been shown to decrease intraocular pressure despite the absence of TM coagulation. Studies demonstrated 5- to 8-fold increases in the number of monocytes and macrophages present in the trabecular meshwork of monkey eyes treated with laser trabeculoplasty as compared with untreated controls (37). It has been hypothesised that macrophages interact with the injured tissue and help decrease IOP. Other studies have shown the positive impact of monocyte/macrophages on ocular progenitor activation (31). These groups injected macrophages directly in the eye and demonstrated their potential to activate progenitor cells. However, these macrophages were considered to play an immunoregulatory role as a mean of action for tissue renewal. We show that MSC-CM and macrophages

interactions are crucial and lead to the production of additional growth factors with a determining effect. This leads not only to greater progenitor activation, but also to the long-term tissue reconstitution that we had previously observed. The fact that lowering the number of macrophages significantly lowers the number of proliferating and nestin positive cells in the wound area, along with a strong inhibition of IOP decrease, confirms their role in progenitor cell reactivation and long-term tissue replacement.

While a shift to anti-inflammatory conditions by M2 macrophages could benefit progenitor cell reactivation, this drop in inflammation may also yield additional beneficial effects. We have observed that endogenous growth factors like VEGF and bFGF are significantly upregulated in the damaged area. This upregulation is caused in part by the homing macrophages, with the strongest upregulation centered on bFGF. This upregulation is observed upon exposure to MSC-CM, and could also be influenced by the inflammatory environment or other cell populations, as the upregulation found *in vitro* is not as large as the one found *in vivo*. bFGF is a well-known growth factor that has an important role in wound healing (38-40). Injection of bFGF on its own can replicate 50% of the nestin activation and nearly 100% of the cellular proliferation observed in our model. In addition, the inhibition of bFGF receptors leads to a significant delay in both progenitor cell activation and IOP decrease. While injection of this purified factor can diminish IOP, a single injection on day 0 was not enough to induce long term effects indicating the importance of sustained production by the tissue environment. While this finding supports other factors being required to fully replicate MSC-CM effect, the potency of bFGF alone on a recently damaged tissue highlights its importance as a key element in the wound healing reaction.

The present study has important clinical implications for both acute and chronic diseases. As we now know that macrophages are an important component of MSC induced wound healing, the idea of using controlled acute damage to promote macrophage migration to the area where regeneration is required could be an essential component in the treatment of chronic diseases. Indeed, tissue degeneration such as the one found in glaucoma is a slow process. As it takes years to fully develop, macrophages will not migrate to the TM in the same way that we have seen in our acute laser damage model. Minute controlled damage, such as the one already used in selective laser trabeculoplasty for glaucoma, could be an essential addition to other clinical treatments. Indeed, the addition of cells for tissue regeneration after a heart attack or stroke is thought to be necessary in the early days after the injury (41-44). Such cells may alter macrophage activity in a way that the response pathway is oriented toward a regenerative rather than a fibrotic process. Additionally, the discovery that a single growth factor is responsible for 50% of the effect could accelerate clinical implementations of methods where the goal is reactivation of local progenitor cells. The present finding highlights the role of cellular interactions, identifies crucial roles for specific growth factors, and underlines the importance of timing and nature of damage for efficient tissue regeneration. These observations could have an impact on a large number of acute and chronic disorders where tissue regeneration is of major importance.

3.7 Acknowledgements

The authors wish to thank Dr. El Bachir Affar for his expertise in proteomics and molecular biology, Drs. Sylvie Lesage and Nathalie Labrecque for their expertise on macrophages and immune cells and Dr. Gilbert Bernier for his expertise on ocular progenitor cells.

3.8 References

1. Karantalis V, DiFede DL, Gerstenblith G, Pham S, Symes J, Zambrano JP, et al. Autologous mesenchymal stem cells produce concordant improvements in regional function, tissue perfusion, and fibrotic burden when administered to patients undergoing coronary artery bypass grafting: The Prospective Randomized Study of Mesenchymal Stem Cell Therapy in Patients Undergoing Cardiac Surgery (PROMETHEUS) trial. *Circulation research*. 2014;114(8):1302-10.
2. Martinez-Gonzalez I, Cruz MJ, Moreno R, Morell F, Munoz X, Aran JM. Human mesenchymal stem cells resolve airway inflammation, hyperreactivity, and histopathology in a mouse model of occupational asthma. *Stem cells and development*. 2014;23(19):2352-63.
3. Resnick IB, Barkats C, Shapira MY, Stepensky P, Bloom AI, Shimoni A, et al. Treatment of severe steroid resistant acute GVHD with mesenchymal stromal cells (MSC). *American journal of blood research*. 2013;3(3):225-38.
4. Volarevic V, Nurkovic J, Arsenijevic N, Stojkovic M. Concise review: Therapeutic potential of mesenchymal stem cells for the treatment of acute liver failure and cirrhosis. *Stem cells*. 2014.
5. Chen L, Xu Y, Zhao J, Zhang Z, Yang R, Xie J, et al. Conditioned medium from hypoxic bone marrow-derived mesenchymal stem cells enhances wound healing in mice. *PLoS One*. 2014;9(4):e96161. Epub 2014/05/02.

6. Jun EK, Zhang Q, Yoon BS, Moon JH, Lee G, Park G, et al. Hypoxic conditioned medium from human amniotic fluid-derived mesenchymal stem cells accelerates skin wound healing through TGF-beta/SMAD2 and PI3K/Akt pathways. *International journal of molecular sciences*. 2014;15(1):605-28.
7. Linero I, Chaparro O. Paracrine effect of mesenchymal stem cells derived from human adipose tissue in bone regeneration. *PloS one*. 2014;9(9):e107001.
8. Windmolders S, De Boeck A, Koninckx R, Daniels A, De Wever O, Bracke M, et al. Mesenchymal stem cell secreted platelet derived growth factor exerts a pro-migratory effect on resident Cardiac Atrial appendage Stem Cells. *Journal of molecular and cellular cardiology*. 2014;66:177-88.
9. Hatzistergos KE, Quevedo H, Oskouei BN, Hu Q, Feigenbaum GS, Margitich IS, et al. Bone marrow mesenchymal stem cells stimulate cardiac stem cell proliferation and differentiation. *Circulation research*. 2010;107(7):913-22.
10. Nascimento DS, Mosqueira D, Sousa LM, Teixeira M, Filipe M, Resende TP, et al. Human umbilical cord tissue-derived mesenchymal stromal cells attenuate remodeling after myocardial infarction by proangiogenic, antiapoptotic, and endogenous cell-activation mechanisms. *Stem cell research & therapy*. 2014;5(1):5.
11. Schweizer R, Kamat P, Schweizer D, Dennler C, Zhang S, Schnider JT, et al. Bone marrow-derived mesenchymal stromal cells improve vascular regeneration and reduce leukocyte-endothelium activation in critical ischemic murine skin in a dose-dependent manner. *Cytherapy*. 2014.
12. Shruster A, Ben-Zur T, Melamed E, Offen D. Wnt signaling enhances neurogenesis and improves neurological function after focal ischemic injury. *PloS one*. 2012;7(7):e40843.
13. Stagg J, Galipeau J. Mechanisms of immune modulation by mesenchymal stromal cells and clinical translation. *Current molecular medicine*. 2013;13(5):856-67.
14. Baraniak PR, McDevitt TC. Stem cell paracrine actions and tissue regeneration. *Regenerative medicine*. 2010;5(1):121-43. Epub 2009/12/19.

15. Wise AF, Williams TM, Kiewiet MB, Payne NL, Siatskas C, Samuel CS, et al. Human mesenchymal stem cells alter macrophage phenotype and promote regeneration via homing to the kidney following ischemia-reperfusion injury. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2014;306(10):F1222-35. Epub 2014/03/14.
16. Chen L, Tredget EE, Wu PY, Wu Y. Paracrine factors of mesenchymal stem cells recruit macrophages and endothelial lineage cells and enhance wound healing. *PLoS One*. 2008;3(4):e1886. Epub 2008/04/03.
17. Shin L, Peterson DA. Human mesenchymal stem cell grafts enhance normal and impaired wound healing by recruiting existing endogenous tissue stem/progenitor cells. *Stem cells translational medicine*. 2013;2(1):33-42. Epub 2013/01/04.
18. Cho DI, Kim MR, Jeong HY, Jeong HC, Jeong MH, Yoon SH, et al. Mesenchymal stem cells reciprocally regulate the M1/M2 balance in mouse bone marrow-derived macrophages. *Experimental & molecular medicine*. 2014;46:e70. Epub 2014/01/11.
19. Dayan V, Yannarelli G, Billia F, Filomeno P, Wang XH, Davies JE, et al. Mesenchymal stromal cells mediate a switch to alternatively activated monocytes/macrophages after acute myocardial infarction. *Basic research in cardiology*. 2011;106(6):1299-310.
20. He L, Marneros AG. Macrophages are essential for the early wound healing response and the formation of a fibrovascular scar. *The American journal of pathology*. 2013;182(6):2407-17.
21. Levkovitch-Verbin H, Quigley HA, Martin KR, Valenta D, Baumrind LA, Pease ME. Translimbal laser photocoagulation to the trabecular meshwork as a model of glaucoma in rats. *Investigative ophthalmology & visual science*. 2002;43(2):402-10.
22. Manuguerra-Gagne R, Boulos PR, Ammar A, Leblond FA, Krosi G, Pichette V, et al. Transplantation of mesenchymal stem cells promotes tissue regeneration in a glaucoma model through laser-induced paracrine factor secretion and progenitor cell recruitment. *Stem Cells*. 2013;31(6):1136-48. Epub 2013/03/16.

23. Xu H, Sta Iglesia DD, Kielczewski JL, Valenta DF, Pease ME, Zack DJ, et al. Characteristics of progenitor cells derived from adult ciliary body in mouse, rat, and human eyes. *Investigative ophthalmology & visual science*. 2007;48(4):1674-82.
24. Chognard G, Bellemare L, Pelletier AN, Dominguez-Punaro MC, Beauchamp C, Guyon MJ, et al. the dichotomous pattern of IL-12r and IL-23R expression elucidates the role of IL-12 and IL-23 in inflammation. *PloS one*. 2014;9(2):e89092.
25. Bono F, De Smet F, Herbert C, De Bock K, Georgiadou M, Fons P, et al. Inhibition of tumor angiogenesis and growth by a small-molecule multi-FGF receptor blocker with allosteric properties. *Cancer cell*. 2013;23(4):477-88.
26. Summan M, Warren GL, Mercer RR, Chapman R, Hulderman T, Van Rooijen N, et al. Macrophages and skeletal muscle regeneration: a clodronate-containing liposome depletion study. *American journal of physiology Regulatory, integrative and comparative physiology*. 2006;290(6):R1488-95.
27. Ferenbach DA, Sheldrake TA, Dhaliwal K, Kipari TM, Marson LP, Kluth DC, et al. Macrophage/monocyte depletion by clodronate, but not diphtheria toxin, improves renal ischemia/reperfusion injury in mice. *Kidney international*. 2012;82(8):928-33.
28. Gubert F, Zaverucha-do-Valle C, Figueiredo FR, Bargas-Rega M, Paredes BD, Mencilha AL, et al. Bone-marrow cell therapy induces differentiation of radial glia-like cells and rescues the number of oligodendrocyte progenitors in the subventricular zone after global cerebral ischemia. *Stem cell research*. 2013;10(2):241-56.
29. Cantinieaux D, Quertainmont R, Blacher S, Rossi L, Wanet T, Noel A, et al. Conditioned medium from bone marrow-derived mesenchymal stem cells improves recovery after spinal cord injury in rats: an original strategy to avoid cell transplantation. *PloS one*. 2013;8(8):e69515.
30. Eggenhofer E, Hoogduijn MJ. Mesenchymal stem cell-educated macrophages. *Transplantation research*. 2012;1(1):12. Epub 2013/02/02.
31. London A, Itskovich E, Benhar I, Kalchenko V, Mack M, Jung S, et al. Neuroprotection and progenitor cell renewal in the injured adult murine retina requires healing monocyte-

derived macrophages. *The Journal of experimental medicine*. 2011;208(1):23-39. Epub 2011/01/12.

32. Wohl SG, Schmeer CW, Witte OW, Isenmann S. Proliferative response of microglia and macrophages in the adult mouse eye after optic nerve lesion. *Investigative ophthalmology & visual science*. 2010;51(5):2686-96.

33. Jing D, Fonseca AV, Alakel N, Fierro FA, Muller K, Bornhauser M, et al. Hematopoietic stem cells in co-culture with mesenchymal stromal cells--modeling the niche compartments in vitro. *Haematologica*. 2010;95(4):542-50. Epub 2010/02/11.

34. Tasso R, Gaetani M, Molino E, Cattaneo A, Monticone M, Bachi A, et al. The role of bFGF on the ability of MSC to activate endogenous regenerative mechanisms in an ectopic bone formation model. *Biomaterials*. 2012;33(7):2086-96. Epub 2011/12/16.

35. Powers CJ, McLeskey SW, Wellstein A. Fibroblast growth factors, their receptors and signaling. *Endocrine-related cancer*. 2000;7(3):165-97. Epub 2000/10/06.

36. Ben-Mordechai T, Holbova R, Landa-Rouben N, Harel-Adar T, Feinberg MS, Abd Elrahman I, et al. Macrophage subpopulations are essential for infarct repair with and without stem cell therapy. *Journal of the American College of Cardiology*. 2013;62(20):1890-901. Epub 2013/08/27.

37. Latina MA, Tumbocon JA. Selective laser trabeculoplasty: a new treatment option for open angle glaucoma. *Curr Opin Ophthalmol*. 2002;13(2):94-6. Epub 2002/03/07.

38. Liu Q, Huang Y, Lan Y, Zuo Q, Li C, Zhang Y, et al. Acceleration of skin regeneration in full-thickness burns by incorporation of bFGF-loaded alginate microspheres into a CMCS-PVA hydrogel. *Journal of tissue engineering and regenerative medicine*. 2015. Epub 2015/06/30.

39. Akita S, Akino K, Imaizumi T, Hirano A. Basic fibroblast growth factor accelerates and improves second-degree burn wound healing. *Wound repair and regeneration : official publication of the Wound Healing Society [and] the European Tissue Repair Society*. 2008;16(5):635-41. Epub 2009/01/09.

40. Fischer AJ, McGuire CR, Dierks BD, Reh TA. Insulin and fibroblast growth factor 2 activate a neurogenic program in Muller glia of the chicken retina. *J Neurosci.* 2002;22(21):9387-98. Epub 2002/11/06.
41. Hosseini SM, Farahmandnia M, Razi Z, Delavarifar S, Shakibajahromi B. 12 hours after cerebral ischemia is the optimal time for bone marrow mesenchymal stem cell transplantation. *Neural regeneration research.* 2015;10(6):904-8. Epub 2015/07/23.
42. Malliaras K, Marban E. Cardiac cell therapy: where we've been, where we are, and where we should be headed. *British medical bulletin.* 2011;98:161-85. Epub 2011/06/10.
43. Eckert A, Huang L, Gonzalez R, Kim HS, Hamblin MH, Lee JP. Bystander Effect Fuels Human Induced Pluripotent Stem Cell-Derived Neural Stem Cells to Quickly Attenuate Early Stage Neurological Deficits After Stroke. *Stem cells translational medicine.* 2015;4(7):841-51. Epub 2015/05/31.
44. Chang MY, Chang CH, Chen CH, Cheng B, Lin YD, Luo CY, et al. The time window for therapy with peptide nanofibers combined with autologous bone marrow cells in pigs after acute myocardial infarction. *PLoS One.* 2015;10(3):e0115430. Epub 2015/03/11.

3.9 Figures

Fig. 1

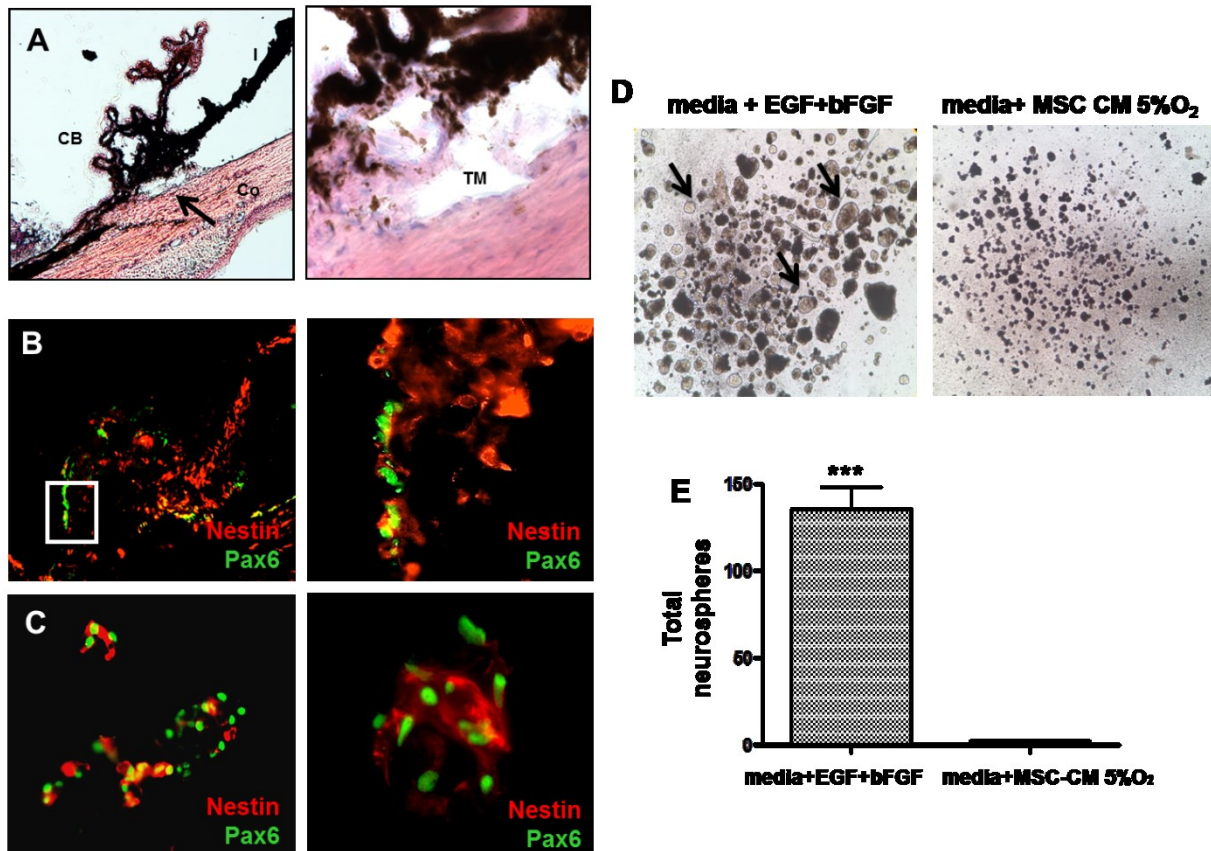


Figure 1. MSC-CM effect on ocular progenitor cells *in vivo* and *in vitro*. A-B) Representative immunofluorescent images of A) a chamber angle on day 2 after laser damage and MSC-CM 5% O₂ injection or B) a neurosphere generated *in vitro* from ciliary body tissue sample. Primitive ocular progenitor cells are both Nestin (red, membrane) and Pax6 (green, nuclei) positive. C-D) Production of neurospheres *in vitro* from ciliary body tissue samples in presence of bFGF and EGF or MSC-CM 5% O₂. Results are shown as either representative images (C) or compilation of the average number of spheres produced by condition (D). Results expressed as mean±SEM of three independent experiments, each with two isolated ciliary bodies per group. Arrowhead: Neurosphere

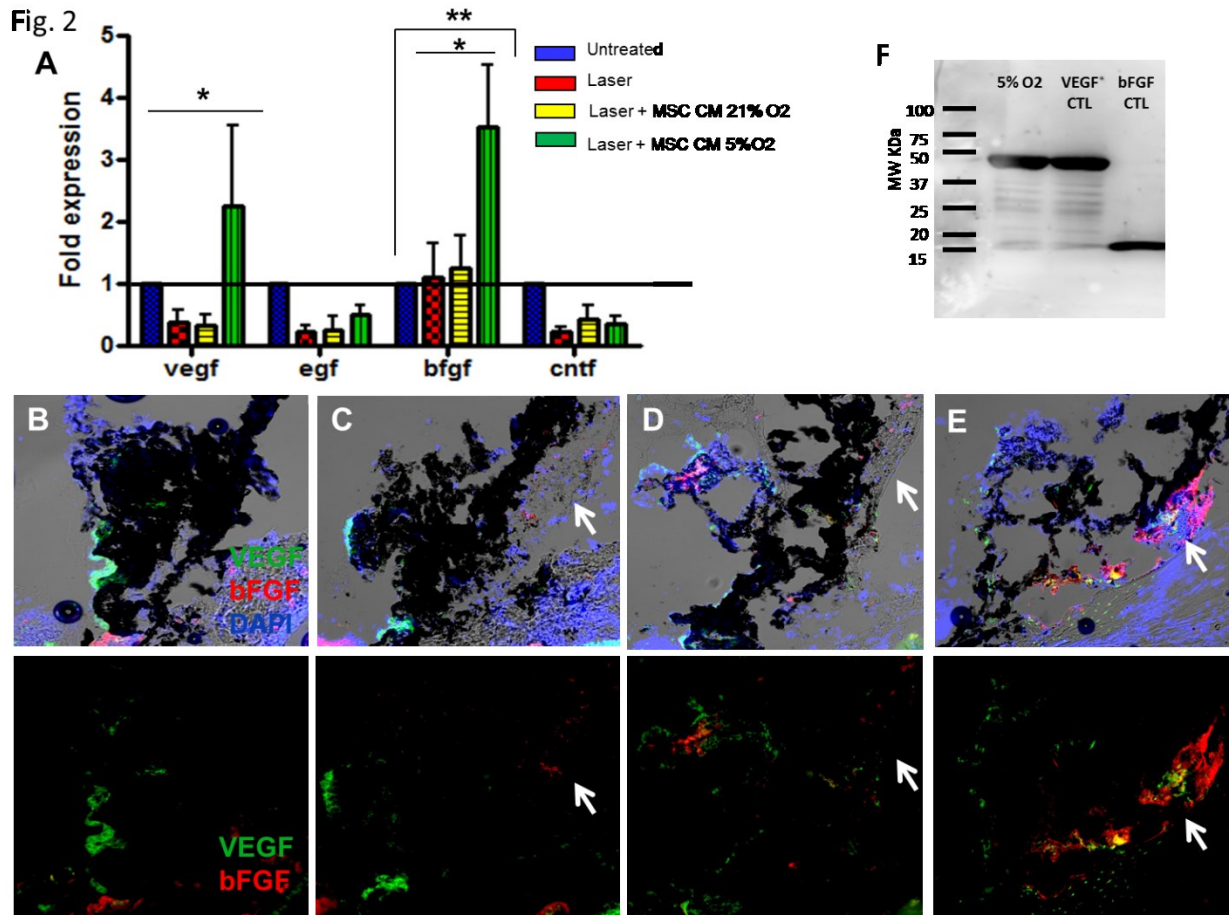


Figure 2. MSC-CM induces production of endogenous growth factors in the treated eye. Growth factor production was measured in eyes that were either untreated or exposed to laser only, laser and MSC-CM 21% O₂ or laser and MSC-CM 5% O₂. All results were normalised according to growth factor production observed in untreated eyes. Growth factors were measured using QPCR (**A**) and results are expressed as mean±SEM of eight independent experiments, each with two isolated ciliary bodies per group. bFGF (red) and VEGF (green) expression was confirmed using immunofluorescence (**B-E N=3**). Upper panels correspond to tissue staining with VEGF, bFGF and DAPI (blue), while lower panels represent VEGF and bFGF only. **F**) bFGF and VEGF presence in MSC-CM 5% O₂ was confirmed using western blot.

Fig. 3

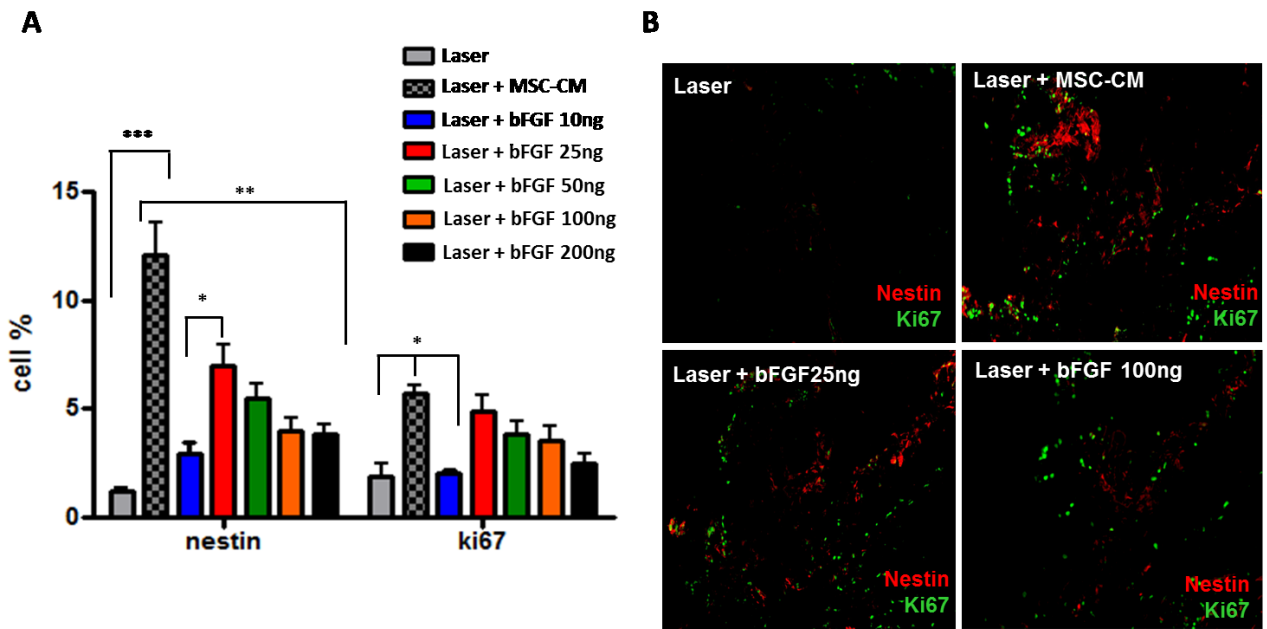


Figure 3. Injection of bFGF partially replicates MSC-CM injection. A) Graphs Nestin and Ki67 expressing cells in eyes receiving laser only, laser and MSC-CM 21% O₂ or laser and MSC-CM 5% O₂. B) Pictures are representative examples of each group. Results are expressed as mean±SEM of three independent experiments, each with two animals per group. Numbers indicate the percentage of positive cells found in the area composed of the ciliary body, the TM, and a limited portion of the iris. Nestin (Red) Ki67 (Green) and DAPI (Blue)

Fig. 4

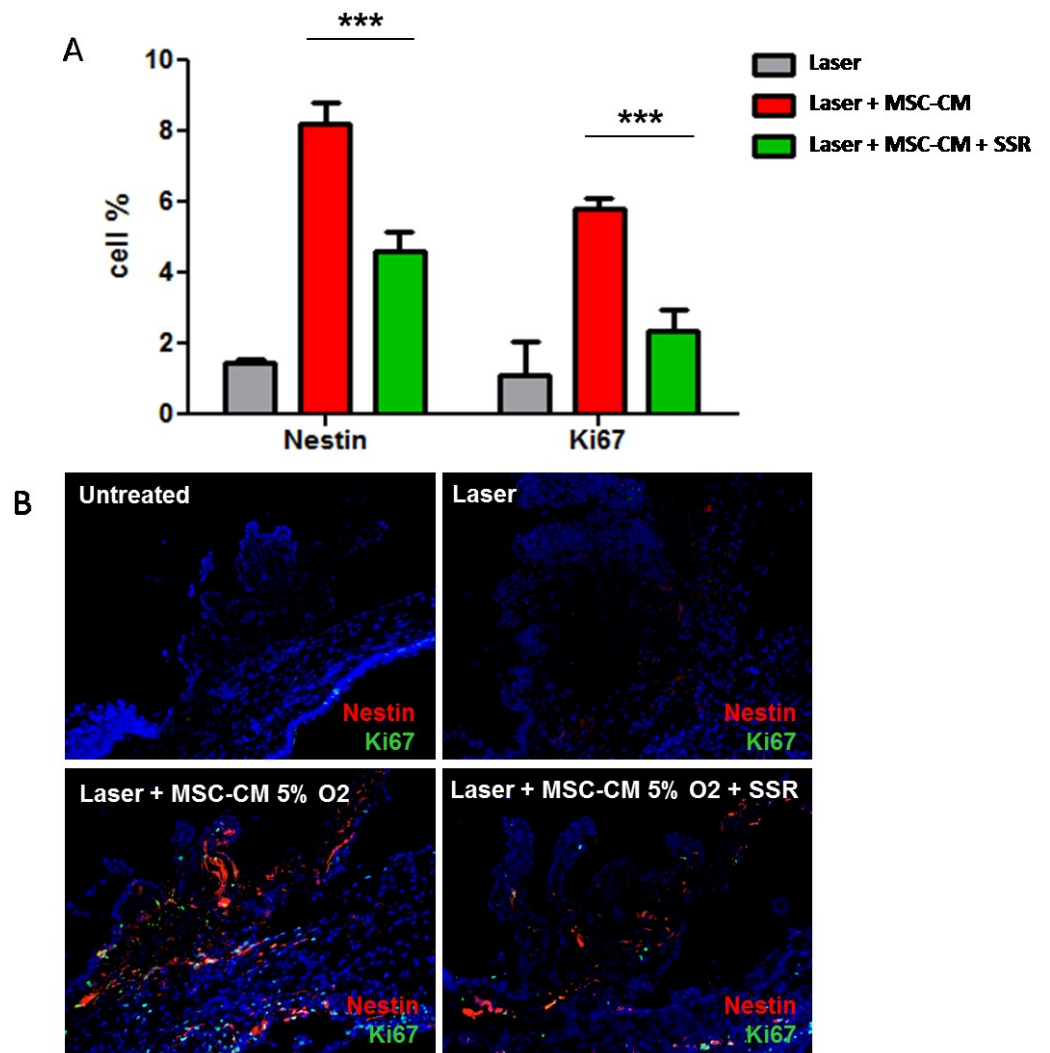


Figure 4. Blocking FGF receptors inhibits progenitor cell activation. **A)** Graphs represent compilation of nestin and Ki67 expressing cells with and without addition of the SSR blocking agent. Results are expressed as mean \pm SEM of two independent experiments, each with three animals per group **B)** Pictures are representative examples of each group. Nestin (Red) Ki67 (Green) and DAPI (Blue).

Fig. 5

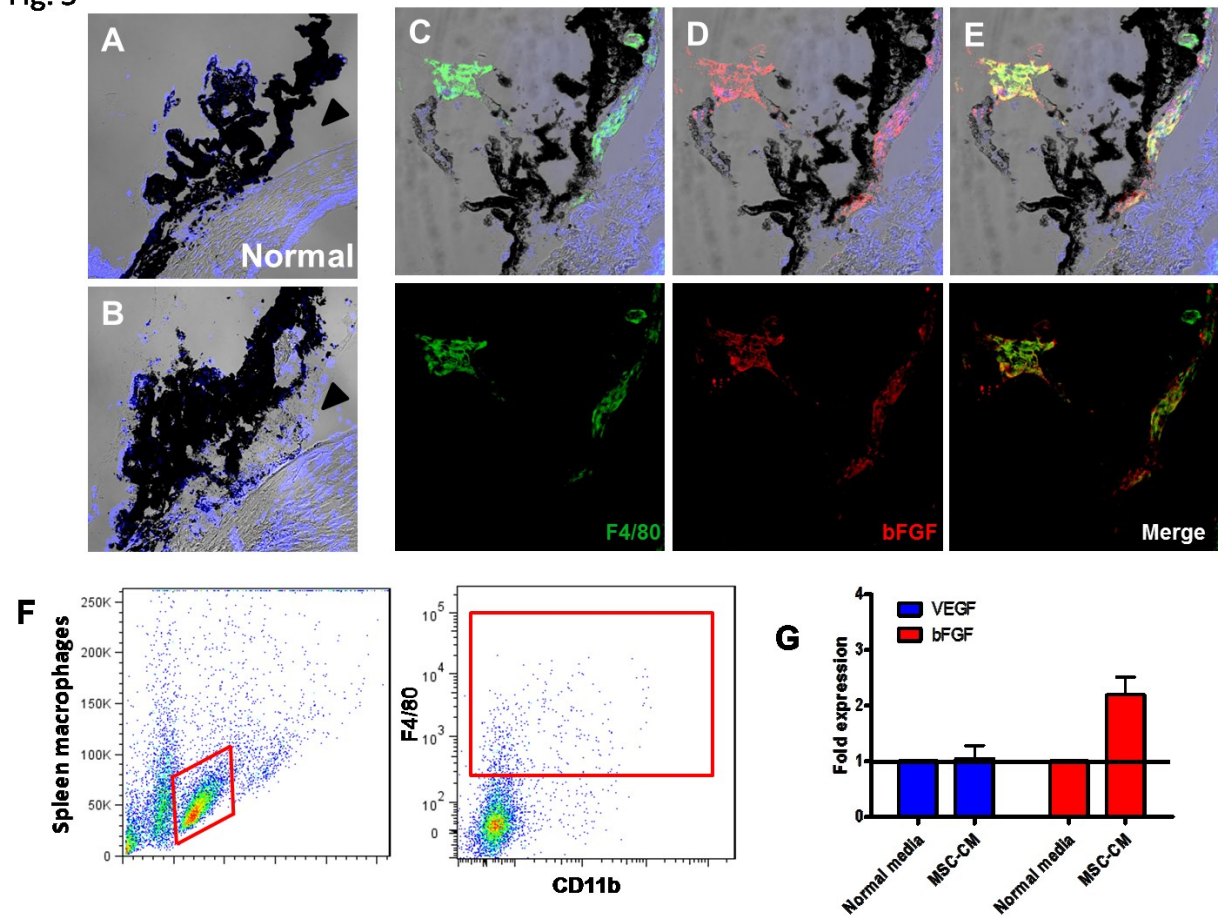


Figure 5. Macrophages are responsible for bFGF production. (A-E) Light microscopy and immunofluorescent pictures of the trabecular meshwork area in either **A**) Normal eye **B**) Laser damaged eye or **C-E**) Laser + MSC-CM. **(F-G)** Rat macrophages were isolated from the spleen using flow cytometry targeting F4/80 positive cells **(F)**. Sorted cells were analysed by TaqMan PCR for growth factor expression after 24h exposure to MSC-CM **(G)**.

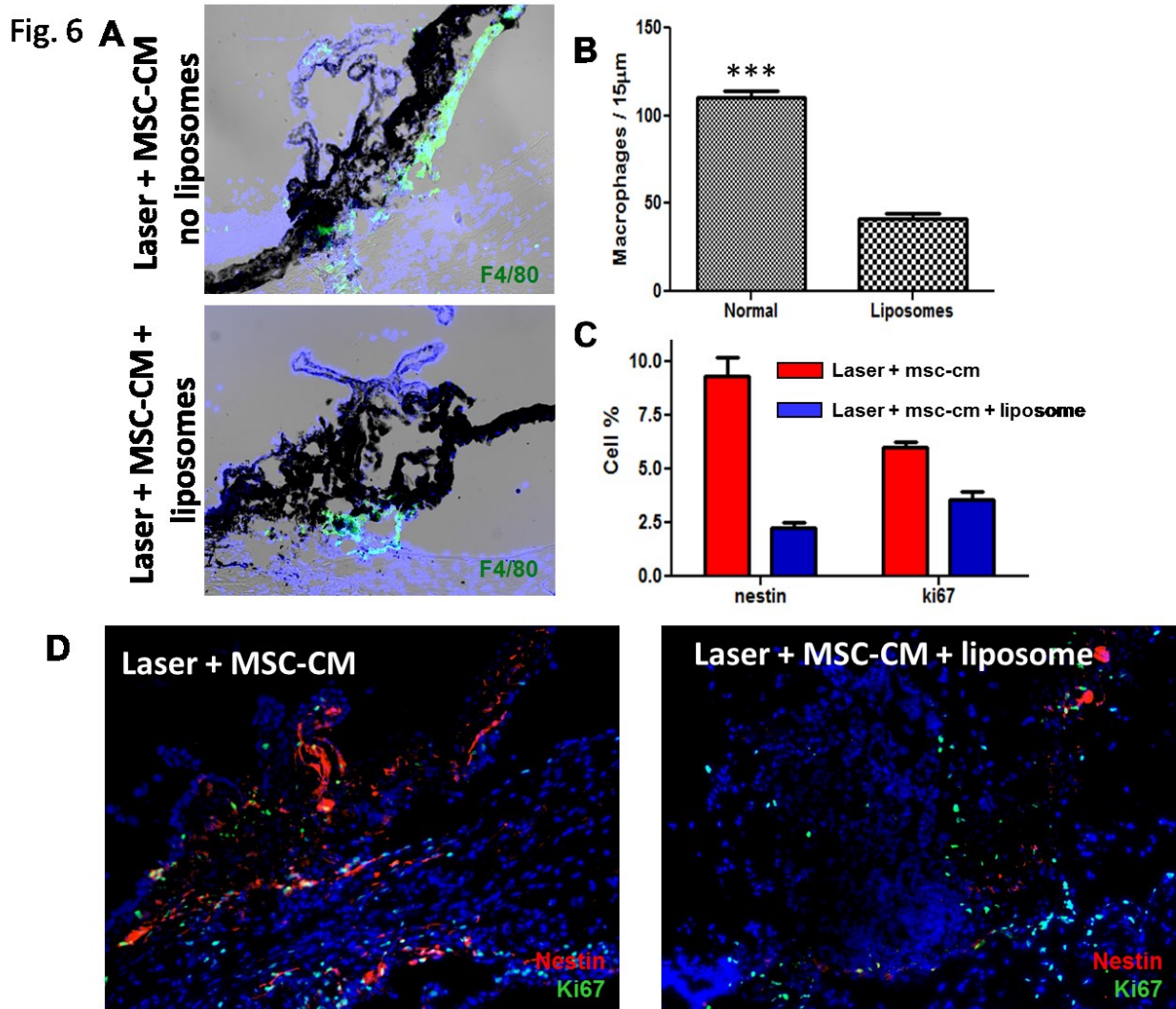


Figure 6. Macrophage elimination inhibits progenitor cell reactivation. All results are expressed as mean±SEM of three independent experiments, each with two animals per group. **A)** Light microscopy and immunofluorescent pictures of the trabecular meshwork area in a laser + MSC-CM group treated with or without liposomes. **B)** Total number of macrophages observed in a 15µm histological section. **C-D)** Graphs represent compilation of nestin and Ki67 expressing cells based on the treatment received, while pictures are representative images of each condition.

Fig. 7

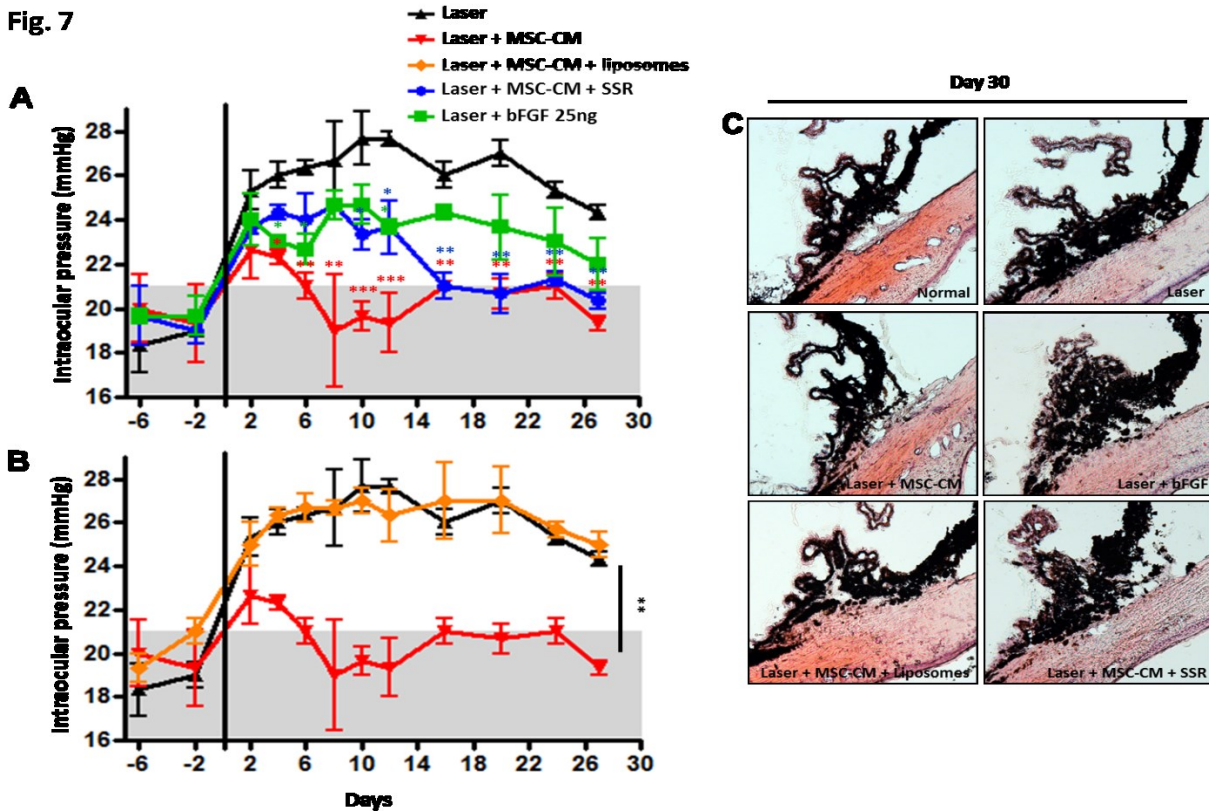


Figure 7. Macrophage numbers and bFGF alter the progression of IOP in a glaucoma model **A)** Laser damaged ocular anterior chambers were injected with 5% O₂ cultured MSC-CM in animals groups that received SSR treatment (blue) or received no additional treatment (red). Animals groups also received injection of 25ng bFGF (green) or did not receive any injection at all. **B)** Laser damaged ocular anterior chambers were also injected with 5% O₂ cultured MSC-CM in animals groups that received liposome injections (orange). The grey area represents IOP normal range (**A-B**). IOP was reported as mean±SEM of 2 experiments evaluating 3 animals per group. **C)** Representative images of hematoxylin-eosin (HE) staining at 20X and 40X of rat ocular anterior segment before (C: control) and 1 week after laser exposure alone or followed by MSC injection, as well as 4 weeks after laser damage alone or followed by MSC injection. CB: ciliary body; Co: Cornea; I: Iris; TM: Trabecular meshwork. Significance compared to laser control group: *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001.

Chapitre 4: Discussion



Tiré de www.phdcomics.com

Bien qu'il existe de multiples traitements pour le glaucome à angle ouvert, ces derniers ne peuvent que ralentir la progression de la maladie. Il n'existe aucune thérapie curative. La médication à vie ou des procédures chirurgicales complexes comportant des effets secondaires importants ne sont pas des solutions idéales pour améliorer la vision et assurer la qualité de vie du patient. Il n'existe pas non plus de méthode permettant de restaurer les parties endommagées de l'œil, que ce soit celles responsables de la maladie comme le trabéculum ou celles responsables des symptômes, comme la rétine et le nerf optique (302). La thérapie cellulaire pourrait donc être une alternative efficace en favorisant la régénération à long terme de l'œil.

4.1 Méthode d'induction du glaucome : la photocoagulation laser

La plupart des méthodes d'induction du glaucome dans les modèles animaux utilisent l'application quotidienne de dexaméthasone, ainsi que la sclérose ou cautérisation des veines épisclérales. Notre méthode d'induction du glaucome, la photocoagulation laser, a pour avantage d'être dérivée d'une technique déjà utilisée en clinique pour le traitement du glaucome soit la trabéculoplastie au laser (303). Cette technique utilise cependant un niveau d'énergie plus élevé afin d'induire un dommage au niveau de l'angle de l'œil ainsi qu'une dysfonction trabéculaire. Il est déjà connu que la photocoagulation laser, utilisant une énergie élevée, préserve des macrophages et induit une réaction de leur part (261). Ces derniers seront donc aussi préservés dans l'œil d'un patient lors de trabéculoplastie au laser, qui utilise une puissance plus faible du laser, et pourraient donc voir leur rôle modulé par l'ajout de facteurs paracrines des MSC. La photocoagulation laser favorise aussi la réaction des macrophages, car

elle peut engendrer une réaction inflammatoire associée à la relâche de TNF- α ou IL-1 (304). Nous pouvons donc postuler que la photocoagulation laser permet non seulement d'induire un glaucome chez l'animal, mais s'apparente au traitement laser conventionnellement employé en clinique, et induit des conditions immunologiques qui présentent plusieurs points de similarité.

Il est toutefois important de souligner les différences entre le glaucome induit par photocoagulation laser et le développement clinique de la maladie. Premièrement, la mort cellulaire présente au niveau du trabéculum lors du développement d'un glaucome chez l'humain est très lente et cause une baisse progressive du nombre de cellules étalée sur plusieurs années (232). À l'opposé, le traitement laser utilisé dans la présente étude entraîne la mort immédiate de milliers de cellules dans le TM. Nous avons observé l'importance du dommage cellulaire dans l'activation des cellules positives pour la nestine. Il est possible d'envisager que la grande quantité de facteurs libérés par les cellules mortes dans notre modèle pourrait entraîner une régénération tissulaire différente de celle observée suite à un glaucome chez l'humain. De plus, le glaucome est une maladie survenant essentiellement chez des personnes plus âgées (305). Il est connu que les capacités immunitaires et régénératrices, incluant la quantité de cellules progénitrices retrouvées *in situ*, diminuent avec l'âge (306). Dans ce contexte, la vitesse de guérison pourrait être plus lente chez un patient que dans notre modèle animal où les rats traités sont relativement jeunes (8 semaines).

4.2 Les MSC en thérapie cellulaire pour le glaucome : mécanismes d'action

L'un des principaux objectifs de tout traitement contre le glaucome est la diminution de la pression intraoculaire. Celle-ci est principalement régulée par le cycle de l'humeur aqueuse, qui entre dans l'œil par le corps ciliaire et en sort principalement par le trabéculum. Plusieurs études ont démontré que la dégénérescence du trabéculum est à l'origine de cette hausse de pression (307). Toutefois, les traitements actuels contournent le problème en diminuant plutôt la production d'humeur ou en lui créant de nouvelles voies de sortie (222, 308-310). Notre thérapie, quant à elle, vise directement la régénération du trabéculum de façon permanente ainsi que la récupération de ces fonctions.

Bien que différents groupes de recherche aient réussi à transdifférencier les MSC en certains tissus *in vitro*, des résultats semblables n'ont pas été observés *in vivo* (86, 296, 311). Nous avons initialement émis l'hypothèse que les MSC pouvaient s'implanter dans l'angle de l'œil et remplacer les cellules trabéculaires. Cette hypothèse était appuyée par certaines publications qui avaient démontré la capacité de transdifférenciation des MSC (312, 313). Les cellules de l'angle de la chambre antérieure étant partiellement d'origine mésodermale, une différenciation et un remplacement tissulaire semblaient possibles (314). Toutefois, nos résultats ont démontré que les MSC sont incapables de se différencier en cellules trabéculaires par contact (Article 1 Figure S2). De plus, les MSC injectées dans l'œil disparaissaient après 96h, probablement en lien avec une activité accrue de phagocytose par les macrophages migrant au site de lésion (Article 1 figure 2 et S3).

L'effet physiologique des MSC est cependant indéniable. En effet, la pression intraoculaire est rapidement retournée à normale suite à l'injection des MSC ou de ses possibles molécules effectrices, alors que les cellules d'origine médullaire ne pouvaient pas répliquer cet effet (Article 1, Figure 1-B). La baisse de pression, mesurée de façon externe par un Tonopen, est bel et bien due aux cellules injectées, et non à la méthode d'injection, comme en témoigne l'absence de changements dans nos groupes contrôle placebo (Article 1 Figure 1). Pour nous assurer que la baisse est bien due à une meilleure fonction du TM, et non pas à une baisse de production d'humeur aqueuse, nous avons aussi démontré une amélioration du débit de sortie vers le sang grâce à l'injection intraoculaire d'un isotope radioactif (Article 1 Figure S4). Ces résultats, combinés aux images d'histologie montrant une amélioration de l'apparence et du volume du trabéculum, ont prouvé l'impact positif de notre traitement sur la régénération tissulaire et sur la sortie de l'humeur aqueuse. De plus, bien que la hausse de pression observée n'était probablement pas de durée suffisante pour entraîner une hausse significative de la mort cellulaire au niveau de la rétine, les marquages TUNEL que nous avons effectués indiquent un effet protecteur anti-apoptotique de notre thérapie cellulaire sur les photorécepteurs (Article 1 Figure S5).

Selon plusieurs études, les cellules MSC pourraient exercer leur rôle régénératif en sécrétant des facteurs paracrines, et c'est ce que nous avons observé. Jusqu'à maintenant les MSC ont surtout été utilisées dans des modèles animaux de dégénération rétinienne (315). Leur injection sous-rétinienne ou intravitréale favorise la survie des photorécepteurs dans des cas induits de rétinite pigmentaire, d'ischémie de la rétine et de glaucome, le tout sans implantation à long terme des cellules. Leur utilisation dans la chambre antérieure a aussi

permis une meilleure régénération de la cornée dans des modèles de brûlures en diminuant l'inflammation et la néo-vascularisation (296, 316-318). Ces observations, conformes avec la capacité régénératrice des MSC, même en l'absence d'implantation tissulaire à long terme, supportent directement nos observations dans des cas de glaucome à angle ouvert. Les MSC sont des cellules qui s'adaptent rapidement à leur environnement et modulent la production de facteurs paracrines en fonction de certains paramètres physiologiques. Il est connu que les MSC sécrètent des molécules anti-inflammatoires en réaction à une réponse immunitaire forte, ou produisent des facteurs angiogéniques lorsqu'exposés à une basse concentration d'oxygène (319, 320). Nous avons démontré toute l'importance de ce conditionnement de plusieurs façons. Tout d'abord, lors de l'utilisation de cellules mésenchymateuses *in vivo*, nous avons pu observer l'apparition de cellules nestine⁺ uniquement dans la zone de l'œil ayant subi un dommage. De plus, il nous avons été surpris de retrouver une absence complète de cellules nestine⁺ suite à l'injection du même nombre de MSC dans un œil intact (Article 1 Figure 7). Ces résultats sous-entendent que les MSC réagissent au dommage tissulaire, et ne produisent pas de facteurs régénératifs de façon spontanée, mais doivent recevoir les stimuli nécessaires. Cela a aussi été observé lors de l'injection de différents milieux de culture conditionnés (MSC-CM) dans un œil endommagé. En effet, seul le MSC-CM obtenu à partir de cellules mises en culture à 5% d'oxygène exerce un effet régénératif efficace (Article 1 Figure 5). Bien que des facteurs sécrétés par les cellules de la zone de dommage elles-mêmes semblent potentialiser l'activation des cellules nestine⁺, l'absence d'effet du MSC-CM à 21% d'oxygène démontre l'importance du conditionnement et de la réaction des MSC à leur environnement.

Un autre point important à souligner est la différence temporelle que les différents traitements entraînent sur la régénération. En effet, l'injection de cellules souches entraîne un pic d'activation de nestine au jour 4 tandis que ce pic survient au jour 2 avec le MSC-CM 5% O₂ (Article 1 Figure 5). Ce délai reflète probablement le temps nécessaire aux MSC pour s'activer suite à l'exposition aux signaux présents dans leur environnement et commencer à produire les facteurs *de novo*. Cette étape serait réalisée *ex vivo* lors de l'incubation dans le milieu à 5% d'oxygène. Toutefois, cette différence de vitesse d'effet par le MSC-CM peut aussi être expliquée par la concentration du milieu requise après le temps de culture. En effet, le MSC-CM recueilli suite à 24 heures en culture de 1×10^6 MSC a été concentré à 40X pour permettre l'injection de facteurs produits par la totalité de la culture dans un espace restreint comme la chambre antérieure de l'œil. Bien que les expériences employant des cellules aient aussi été réalisées avec une injection de 1×10^6 MSC *in vivo*, leur nombre diminue rapidement et atteint environ 50 000 cellules dans l'angle oculaire en 48 heures (Article 1 Figure 2). Il est donc possible que les facteurs produits dans ces conditions baissent eux aussi en quantité dans le temps et ne soient pas représentatifs du sécrétum d'un million de cellules. Ceci pourrait donner un avantage à l'emploi de milieu conditionné ou surtout de facteurs isolés et devrait permettre de standardiser les quantités administrées et de faciliter leur usage lors d'une application clinique. Des produits ainsi bien caractérisés présentent l'avantage de faciliter leur acceptation au plan réglementaire et leur accès au plan clinique, puisque de tels produits pourraient être préparés à l'avance et seraient donc disponibles en tout temps.

Les mécanismes d'actions paracrines sont néanmoins très variables *in vivo*. Il est connu que les MSC peuvent produire plusieurs cytokines et facteurs de croissance importants pour la

régénération (VEGF, SCF, HGF, FGF, IGF) (59, 139, 155). D'autres facteurs produits par les MSC sont spécifiquement neurotrophiques (BDNF, CNTF, NGF) et pourraient favoriser la protection des tissus oculaires par l'activation des voies Ras et PI3K/AKT, l'activation de voies de signalisation ou de gènes de survie (Bcl-2, Bcl-x1, mcl-1) et l'inhibition de gènes favorisant l'apoptose (Bid, Bad, Bax) (139, 311, 321). Les MSC inhibent aussi la fibrose des tissus endommagés en diminuant la prolifération des fibroblastes et en modulant la production de TGF- β (157, 159). Par contre, leur modulation de l'angiogenèse dans l'œil laisse place à des résultats contradictoires. Les MSC sont connues pour leurs effets proangiogéniques dans des modèles d'ischémie (139). La sécrétion par les MSC de facteurs angiogéniques, comme VEGF, pourrait s'avérer problématique pour la guérison du glaucome. Lorsque produit à un niveau anormal, ce facteur est, en effet, responsable de nombreuses pathologies oculaires comme la néovascularisation de l'iris (rubeosis iridis), le glaucome à angle fermé, le détachement de la rétine et une perte de transparence de la cornée (221, 224). Toutefois, des groupes travaillant sur la rétinite pigmentaire ont plutôt remarqué une baisse de la densité des capillaires anormaux et de leur perméabilité suite à l'ajout de MSC. Le mécanisme permettant cette stabilisation n'est pas connu, mais est indépendant de VEGF et de l'angiopoiétine, normalement produit par les MSC (318). De plus des études portant sur la régénération de la cornée ont noté une baisse de la néovascularisation après l'utilisation de MSC par un mécanisme dépendant de TSP-1 (317). Il est aussi possible que des facteurs environnementaux affectent le sécrétum des MSC et causent des effets différents selon le site d'injection. Finalement, les MSC sont connues pour leur sécrétion de facteurs de croissance et de cytokines hautement anti-inflammatoires. Elles sont capables de favoriser un phénotype tolérogène chez les cellules présentatrices d'antigènes, une baisse de l'expansion et de

l'activation des cellules T et B, et une baisse de la production de facteurs inflammatoires et de dérivés réactifs de l'oxygène par les cellules immunitaires(110, 114). Une baisse de l'inflammation de la cornée par les MSC a permis une meilleure régénération de ce tissu suite à des brûlures, mais le potentiel anti-inflammatoire des MSC n'a pas été étudié dans d'autres contextes oculaires pour l'instant (322). Il est aussi possible que certaines molécules bioactives des MSCs affectent la régulation de la pression oculaire. PGE2, sécrété constitutivement par les MSC, est une molécule employée en clinique et augmente la sortie de l'humeur aqueuse de l'œil (110, 221). PGE2 agirait comme vasoconstricteur des fibres musculaires du TM, favorisant l'ouverture des canaux et la baisse de pression, ce qui ferait de cette molécule un effecteur intéressant, mais dépendant de la présence des MSC et de sa sécrétion constante pour maintenir son effet (323, 324)

Il a été démontré que les MSC peuvent activer des cellules progénitrices locales de l'œil, comme les cellules de Müller dans la rétine, qui pourraient alors participer à la régénération tissulaire (279, 318). Cette capacité d'action sur les cellules progénitrices pourrait être l'élément clé de la régénération tissulaire observée dans notre modèle. L'activation et la prolifération de cellules nestine +, et à plus faible échelle des cellules nestine/Pax6 +, survient très tôt dans le processus régénératif (Article 1 Figures 4-5 et Article 2 Figure 1). Durant cette période, ces cellules progénitrices prolifèrent activement pour former la base du nouveau tissu, et sont toujours présentes dans l'angle de l'œil un mois après création de la lésion (Article 1 figure 6). Dans ces conditions, les cellules marquées à l'EDU sont visibles non seulement au niveau du TM, mais aussi dans toute la zone endommagée. Ceci est contraire à ce que l'on peut observer dans un zone sans dommage, où les cellules

initialement EDU+ sont surtout retrouvées au niveau de la cornée et rapidement éliminées de l'organe. Bien qu'il n'ait pas encore été possible de démontrer directement que l'activation et la prolifération des cellules nestine+ soit à l'origine de la régénération tissulaire fonctionnelle, toutes les conditions contrôles ayant entraîné une baisse de l'activation et de la prolifération de ces cellules (MSC-CM 21% O₂, liposomes ciblant les macrophages, bloqueur FGFR ou l'injection d'une dose inappropriée de bFGF) ont mené à une régénération non-fonctionnelle ou à une absence de régénération.

4.3 Collaboration des macrophages dans la régénération

Les macrophages sont des joueurs importants du système immunitaire inné, et leur implication dans la régénération tissulaire est de plus en plus reconnue (174, 325). Selon le contexte, les macrophages peuvent mener à une diminution de l'inflammation et favoriser l'angiogenèse, mais de plus en plus d'études montrent qu'ils ont aussi un rôle dans la prolifération tissulaire et peuvent interagir avec des cellules progénitrices (164, 326). Ces cellules pourraient aussi avoir un rôle à jouer dans le traitement du glaucome. En effet, les macrophages migrent au niveau du TM après un traitement par trabéculoplastie laser et ils pourraient favoriser la réparation tissulaire en impliquant certains progéniteurs oculaires au niveau du corps ciliaire ou du trabéculum (130, 300, 327). Bien qu'une activation du profil anti-inflammatoire des macrophages puisse favoriser la régénération tissulaire, nous avons observé que les MSC pouvaient modifier leur profil sécrétoire d'une autre façon. Ainsi, nos résultats montrent que la production de facteurs endogènes, comme le bFGF et le VEGF, était augmentée suite à l'injection de MSC-CM 5% O₂. Cette augmentation est aussi influencée par

l'environnement inflammatoire ou d'autres cellules présentes *in vivo* puisque nous n'avons pas été en mesure de reproduire leur effet avec des macrophages isolés *in vitro*. bFGF est un facteur de croissance identifié dans d'autres modèles de régénération tissulaire (328, 329). Dans notre modèle, il permet de reproduire jusqu'à 50% de l'expression de nestine observée avec la combinaison de facteurs retrouvée dans le MSC-CM. Il génère aussi près de 90% de l'expression de Ki67, un marqueur de prolifération cellulaire, induite par le MSC-CM. D'un côté, le blocage de la famille de récepteurs FGF retarde la régénération tissulaire après l'injection de MSC-CM, mais ne l'empêche pas. Nous avons aussi remarqué que l'injection de ce seul facteur purifié a la capacité d'abaisser la pression intraoculaire. Toutefois, une injection unique de bFGF au temps 0 n'a pas été suffisante pour répliquer l'effet complet du MSC-CM 5%O₂ injecté au même moment. Il sera intéressant de déterminer si des injections répétées de bFGF pourraient augmenter son effet biologique et ultimement remplacer les macrophages. Nos résultats indiquent cependant qu'un ou plusieurs autres facteurs retrouvés dans le MSC-CM s'ajoutent au bFGF pour en augmenter l'effet. Néanmoins, l'effet engendré par le bFGF seul positionne ce dernier comme un facteur d'importance dans la réparation tissulaire.

Les macrophages seraient des candidats idéaux pour guider la réparation oculaire. Selon leur phénotype, ces cellules peuvent produire une grande variété de facteurs et ont une demi-vie *in situ* approximative entre 20 et 30 jours selon leur niveau et type d'activité (92, 171, 173, 330). Il a déjà été montré dans des modèles de dégénérescence rétinienne qu'ils peuvent sécréter plusieurs facteurs angiogéniques ou prolifératifs comme TGF- β , bFGF, TNF- α et IL-1 qui pourraient permettre une meilleure vascularisation de la rétine (331-334). Nous

avons montré que ces cellules représentent la pièce manquante entre les facteurs produits par les MSC et l'activation des cellules progénitrices du corps ciliaire. En effet, lorsque les macrophages sont temporairement éliminés de l'organisme par l'action des liposomes, on peut observer une disparition complète de l'effet régénératif. Bien que les macrophages reviennent éventuellement dans l'œil, ces nouvelles cellules n'auront pas été en contact avec le MSC-CM 5% O₂ et n'auront donc pas le phénotype requis pour favoriser l'apparition des cellules nestine⁺. Cette absence de régénération, combinée à l'effet partiel de bFGF, nous amène à conclure que les macrophages sont les principaux effecteurs de la régénération tissulaire via la production de plusieurs facteurs. Dans un phénomène similaire à celui des macrophages associés aux tumeurs, ces cellules migrent au site de lésion puis sont altérées par le sécrétum des cellules mésenchymateuses. Les macrophages vont par la suite demeurer dans la zone endommagée et produire des facteurs tels que le bFGF. Cette production est possiblement suffisante pour activer les cellules progénitrices présentes dans le TM ou le corps ciliaire et mener à une régénération fonctionnelle du trabéculum. Ceci pourrait aussi expliquer comment une seule injection de MSC-CM est suffisante pour induire une régénération rapide, tandis qu'une injection de bFGF capable de répliquer en partie l'activation des cellules progénitrices ne l'est pas.

4.4 Transfert vers la clinique

L'injection de facteurs régénératifs (MSC, MSC-CM 5%O₂, bFGF) dans un œil n'entraîne pas la même réaction selon que l'organe est intact ou endommagé. L'injection de ces facteurs, ou même de cellules mésenchymateuses directement dans un œil n'ayant subi

aucun dommage laser n'entraîne pratiquement aucune activation des cellules progénitrices. La situation diffère complètement dans un œil endommagé. Il est possible d'y observer un gradient d'activation des cellules nestine+, avec une plus forte activation dans le segment endommagé de l'œil que dans le segment intact. Selon nos travaux, cela est principalement dû à l'arrivée de macrophages dans la zone de lésion suite au dommage aigu. L'action combinée des facteurs paracrines des MSC et des macrophages sur les progéniteurs oculaires va mener à la régénération tissulaire. Ceci n'exclut cependant pas que d'autres facteurs puissent aussi catalyser cet effet.

Plusieurs des cas où l'on espère une percée de la médecine régénératrice impliquent soit des maladies chroniques (dysfonction rénale, hépatique, pulmonaire, maladie de Parkinson ou Alzheimer), soit des dommages aigus ne pouvant pas encore être traités rapidement avec des cellules souches faute de traitement hautement sécuritaire ou de disponibilité des cellules (par exemple, lors de dommages à la moelle épinière). De plus, ces lésions n'ont pas le même environnement tissulaire que dans notre modèle laser de glaucome. La phase aiguë étant passée, la quantité de signaux pro-inflammatoires y est moindre, les cellules immunitaires présentes ne sont pas exactement les mêmes et les cellules qui y meurent le font sur une échelle de plusieurs années ou ont déjà été remplacées par du tissu fibreux non fonctionnel. Plusieurs études impliquant des MSC n'ont démontré aucun ou peu d'impact sur la fonction de l'organe endommagé. Or un nombre important de ces études ont été réalisées dans des conditions de maladies subaiguës ou chroniques (335). La trabéculoplastie au laser, un des traitements les plus courants pour le glaucome, emploie le même type de laser que celui utilisé dans notre modèle de glaucome. Cette approche clinique permet de recréer un dommage aigu

de petite envergure et de le combiner avec l'injection de MSC, de MSC-CM ou de bFGF. Cette combinaison pourrait avoir un effet bénéfique de promotion de la régénération. Le dommage à lui seul induit un effet favorable sur les macrophages en permettant (i) leur migration à l'endroit précis qui nécessite réparation et (ii) la production locale de nouveaux facteurs (261). La trabéculoplastie au laser cause aussi l'élimination des cellules non fonctionnelles empêchant la croissance de nouveau tissu. Ce traitement a une durée d'efficacité moyenne de trois ans. L'addition d'une injection de MSC-CM à la trabéculoplastie au laser pourrait accroître l'effet des macrophages déjà stimulés par le laser et induire une meilleure régénération du trabéculum malade. Cela pourrait aussi augmenter la durée d'efficacité du traitement. Il serait donc extrêmement pertinent de développer une telle approche thérapeutique du glaucome. Il reste néanmoins à confirmer que l'intensité plus faible du laser employé en clinique générerait le même effet que celui observé dans notre modèle. Il sera aussi intéressant d'évaluer la technique de dommage au laser, en combinaison avec les MSC, comme moyen de stimuler la régénération tissulaire dans d'autres modèles de maladies ne présentant pas de dommage aigu. En effet, le laser permet de facilement contrôler l'importance et l'étendue de l'effet localisateur, tout en potentialisant l'effet des MSC.

Trois méthodes ont été employées pour activer la régénération oculaire dans notre modèle: l'injection de cellules, de milieu conditionné ou de bFGF. Plusieurs facteurs sont à considérer dans l'évaluation de la méthode qui sera la plus efficace en clinique. L'injection de bFGF pourrait induire la réponse la plus rapide en éliminant le besoin de tout intermédiaire. De plus, l'effet observé dans notre étude pourrait être amélioré par l'ajout d'autres facteurs régénératifs. Toutefois, il est clair que même une combinaison de facteurs efficaces

nécessiterait plusieurs injections afin d'obtenir un effet soutenu (336). En effet, la demi-vie de ces cytokines *in vivo* est courte et la clairance de l'humeur aqueuse est rapide (216, 337, 338). Il ne serait donc pas surprenant que les cytokines injectées soient éliminées quelques heures seulement après leur administration. L'utilisation de MSC-CM ou de cellules MSC elles-mêmes offre donc des solutions intéressantes à ce problème, ces deux stratégies ayant un effet direct ou indirect sur les macrophages produisant un effet à long terme. Bien que physiologiquement très appropriée, l'injection de MSC est l'option la plus lente. En effet, ces cellules doivent d'abord être activées, pour ensuite produire *in situ* les différents facteurs impliqués dans le recrutement et l'activation des macrophages au site de dommage. De plus, l'isolation ou l'expansion de MSC autologues nécessite du temps et un accès à une installation adaptée à leur manufacture. Nous avons toutefois observé que ces cellules avaient l'effet le plus précis, limitant l'activation des cellules progénitrices uniquement à la zone lésée. Ceci justifie de déterminer si des MSC allogéniques pourraient générer le même effet que des MSC autologues. En effet, les MSC pourraient potentiellement être utilisées sans égard à la compatibilité au niveau du complexe majeur d'histocompatibilité et donc servir de cellules donneuses universelles (339-341). Dans un tel contexte, leur utilisation pourrait s'étendre rapidement et offrir une solution autant aux problèmes techniques que financiers.

Le sécrétum des MSC pourrait se révéler une stratégie clinique encore plus simple, puisqu'il n'impliquerait que des facteurs solubles. De plus, les facteurs présents dans ce milieu agissent plus rapidement que les MSC et ont une influence sur plusieurs voies menant à des mécanismes régénératifs au long terme. Ce sécrétum pourrait aussi être produit à faible coût et distribué à l'avance dans tous les centres. L'œil est aussi une zone de privilège immun

favorisant la tolérance face à des antigènes étrangers (342). Cette aptitude, combinée aux facteurs immunosuppresseurs des MSC, permet d'envisager l'entreposage des facteurs provenant de MSC allogéniques et les conserver pour injection dans des patients quasi sans risque d'une réaction inflammatoire. Sachant que les macrophages font le lien entre les MSC et les cellules progénitrices, il serait aussi intéressant d'isoler le ou les facteurs responsables de leur changement de phénotype, ce qui permettrait d'avoir des réactifs précis « *off the shelf* » qui favoriseraient la régénération d'un tissu en une seule injection.

4.5 Modèle proposé des mécanismes de régénération par les MSC

L'étude du potentiel thérapeutique et de la mécanistique des MSC dans une thérapie pour le glaucome nous a permis de mieux comprendre les rôles de ces cellules dans la régénération tissulaire. La Figure 6 présentée ci-dessous tente de résumer l'ensemble des nouvelles connaissances sur les MSC et leur contribution à la médecine régénérative que les présentes études nous ont permis d'acquérir. Il est à noter que plusieurs mécanismes restent encore à élucider ou à approfondir pour reconstituer parfaitement la séquence des événements ainsi que les médiateurs impliqués dans la régénération tissulaire. Les mécanismes identifiés dans ce travail représentent cependant des étapes cruciales du phénomène et mettent en contexte des joueurs et interactions cellulaires auparavant inconnus. Ces avancées devraient avoir un impact significatif sur plusieurs autres maladies aiguës et chroniques.

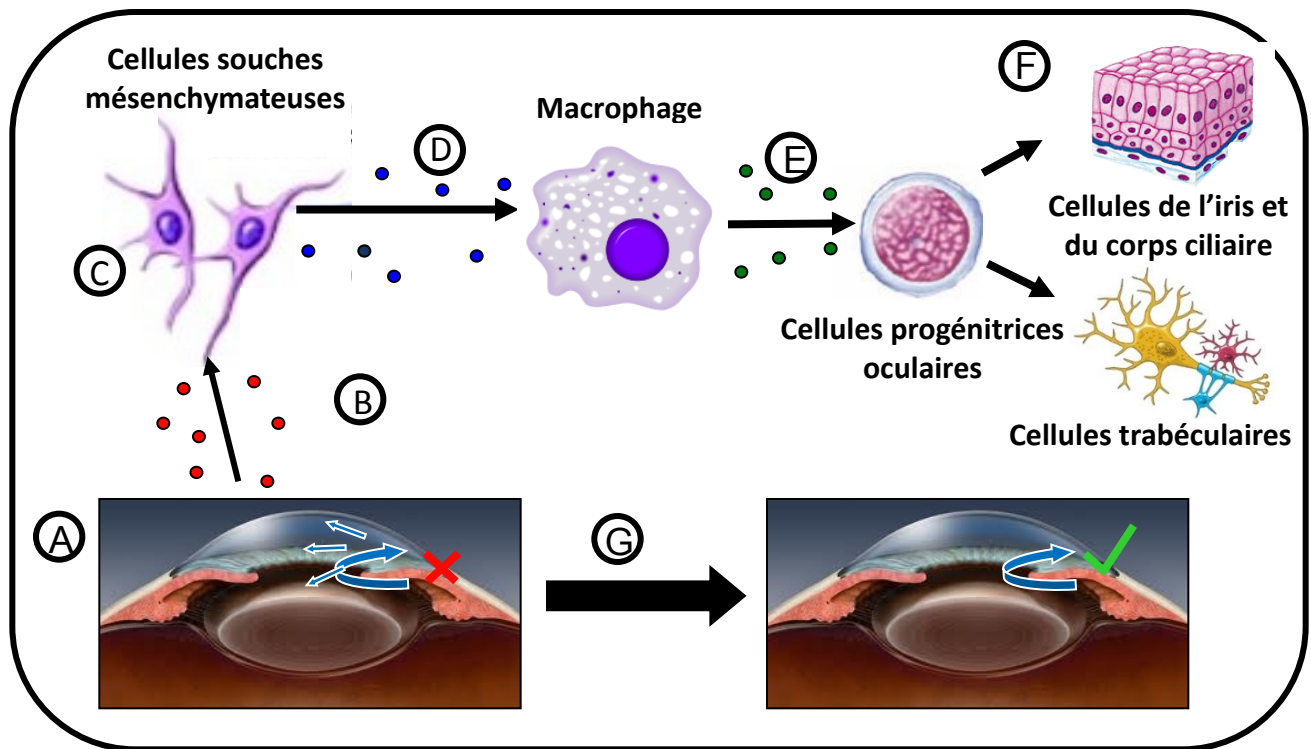


Figure 7. Modèle représentant la régénération du trabéculum suite à la thérapie cellulaire par des MSC.

A) Dommage initial au trabéculum entraînant la relâche de facteurs inflammatoires. B) Les facteurs inflammatoires entraînent la migration de monocytes/macrophages dans la zone de lésion. C) Les facteurs inflammatoires activent la production de cytokines et de facteurs de croissance chez les MSC. D) Les facteurs produits par les MSC modifient les macrophages afin qu'ils acquièrent un phénotype anti-inflammatoire. E) Le sécrétum des macrophages est altéré. On observe une hausse de la production de bFGF. F) L'arrivée de nouveaux facteurs de croissance dont le bFGF active la prolifération de cellules progénitrices oculaires nestine⁺. Ces dernières vont remplacer le tissu endommagé et restaurer la fonction du trabéculum. G) Retour à la normale de la pression intraoculaire

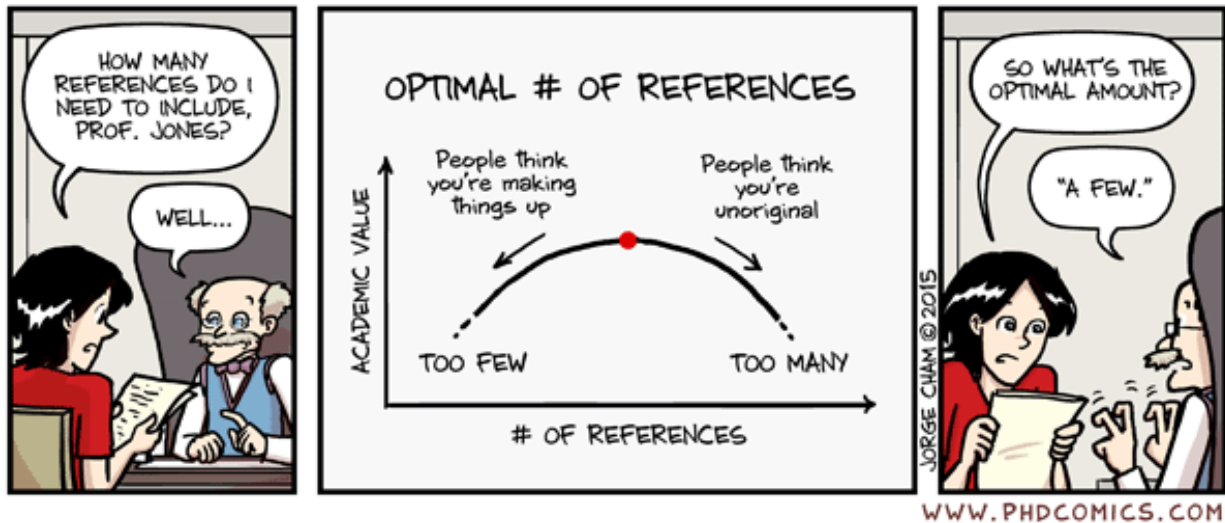
Conclusion

En résumé, les résultats présentés dans cette thèse mettent en lumière plusieurs éléments importants pour la médecine régénérative et la compréhension du fonctionnement des MSC. Premièrement, nous avons démontré que des cellules de la moelle osseuse permettent de réparer le trabéculum dans un modèle de glaucome *in vivo* induit par photocoagulation laser. Parmi les cellules médullaires, nous avons identifié les MSC comme cellules médiant cet effet, ce qui ouvre la voie à leur utilisation dans le traitement du glaucome à angle ouvert. D'autre part, nous avons montré que les MSC n'agissent pas seules dans cette régénération tissulaire et nécessitent l'aide d'un intermédiaire cellulaire : les macrophages. La conversion des macrophages vers un phénotype régénératif suite à l'exposition à des facteurs paracrines des MSC pourrait expliquer l'effet positif observé dans plusieurs modèles de dommages tissulaires. De plus, l'identification du facteur clé bFGF, capable d'activer des cellules progénitrices oculaires, est un grand pas dans la compréhension des étapes de la régénération oculaire. Nous postulons aussi que ces effets peuvent être étendus au traitement de plusieurs conditions médicales aiguës ou chroniques. Les approches utilisées dans ce travail devraient faciliter l'identification d'autres facteurs de régénération tissulaire.

L'utilisation des MSC en thérapie cellulaire pour le glaucome fournit des perspectives plus larges que la médecine actuelle qui « soigne ». Elle ouvre en effet la porte à la médecine régénérative qui « guérit » le glaucome. La présence presque quasi systémique des MSC dans le corps laisse imaginer la portée d'une telle méthodologie : la possibilité de régénérer différents tissus et de fournir ainsi à un grand nombre de maladies dégénératives une

alternative thérapeutique efficace, durable, voire permanente, sans toxicité ou résistance à long terme. Une médecine sans médicaments, probablement notre médecine de demain.

Bibliographie



Tiré de www.phdcomics.com

1. Perruccio AV, Badley EM, Trope GE. Self-reported glaucoma in Canada: findings from population-based surveys, 1994-2003. *Canadian journal of ophthalmology Journal canadien d'ophtalmologie*. 2007;42(2):219-26. Epub 2007/03/30.
2. Cook C, Foster P. Epidemiology of glaucoma: what's new? *Canadian journal of ophthalmology Journal canadien d'ophtalmologie*. 2012;47(3):223-6. Epub 2012/06/13.
3. Hernigou P. Bone transplantation and tissue engineering, part IV. Mesenchymal stem cells: history in orthopedic surgery from Cohnheim and Goujon to the Nobel Prize of Yamanaka. *International orthopaedics*. 2015;39(4):807-17. Epub 2015/03/10.
4. Kumar R, Sharma A, Pattnaik AK, Varadwaj PK. Stem cells: An overview with respect to cardiovascular and renal disease. *Journal of natural science, biology, and medicine*. 2010;1(1):43-52. Epub 2010/07/01.
5. Till JE, Mc CE. A direct measurement of the radiation sensitivity of normal mouse bone marrow cells. *Radiation research*. 1961;14:213-22. Epub 1961/02/01.
6. Siminovitch L, McCulloch EA, Till JE. The Distribution of Colony-Forming Cells among Spleen Colonies. *J Cell Physiol*. 1963;62:327-36. Epub 1963/12/01.
7. Friedenstein AJ, Deriglasova UF, Kulagina NN, Panasuk AF, Rudakowa SF, Luria EA, et al. Precursors for fibroblasts in different populations of hematopoietic cells as detected by the in vitro colony assay method. *Exp Hematol*. 1974;2(2):83-92. Epub 1974/01/01.
8. Evans MJ, Kaufman MH. Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. *Nature*. 1981;292(5819):154-6. Epub 1981/07/09.

9. Reynolds BA, Weiss S. Generation of neurons and astrocytes from isolated cells of the adult mammalian central nervous system. *Science*. 1992;255(5052):1707-10. Epub 1992/03/27.
10. Tropepe V, Coles BL, Chiasson BJ, Horsford DJ, Elia AJ, McInnes RR, et al. Retinal stem cells in the adult mammalian eye. *Science*. 2000;287(5460):2032-6. Epub 2000/03/17.
11. Gardner RL. Stem cells: potency, plasticity and public perception. *Journal of anatomy*. 2002;200(Pt 3):277-82. Epub 2002/05/30.
12. Mitalipov S, Wolf D. Totipotency, pluripotency and nuclear reprogramming. *Advances in biochemical engineering/biotechnology*. 2009;114:185-99. Epub 2009/04/04.
13. O'Connor TP, Crystal RG. Genetic medicines: treatment strategies for hereditary disorders. *Nature reviews Genetics*. 2006;7(4):261-76. Epub 2006/03/18.
14. Cohen DE, Melton D. Turning straw into gold: directing cell fate for regenerative medicine. *Nature reviews Genetics*. 2011;12(4):243-52. Epub 2011/03/10.
15. Osakada F, Ikeda H, Sasai Y, Takahashi M. Stepwise differentiation of pluripotent stem cells into retinal cells. *Nature protocols*. 2009;4(6):811-24. Epub 2009/05/16.
16. Laflamme MA, Murry CE. Heart regeneration. *Nature*. 2011;473(7347):326-35. Epub 2011/05/20.
17. Rao RR, Johnson AV, Stice SL. Cell surface markers in human embryonic stem cells. *Methods Mol Biol*. 2007;407:51-61. Epub 2008/05/06.
18. Kolle G, Ho M, Zhou Q, Chy HS, Krishnan K, Cloonan N, et al. Identification of human embryonic stem cell surface markers by combined membrane-polysome translation state array analysis and immunotranscriptional profiling. *Stem Cells*. 2009;27(10):2446-56. Epub 2009/08/04.
19. Wang Z, Oron E, Nelson B, Razis S, Ivanova N. Distinct lineage specification roles for NANOG, OCT4, and SOX2 in human embryonic stem cells. *Cell Stem Cell*. 2012;10(4):440-54. Epub 2012/04/10.
20. Lachmann N, Ackermann M, Frenzel E, Liebhaber S, Brenning S, Happel C, et al. Large-scale hematopoietic differentiation of human induced pluripotent stem cells provides granulocytes or macrophages for cell replacement therapies. *Stem cell reports*. 2015;4(2):282-96. Epub 2015/02/15.
21. Blum B, Bar-Nur O, Golan-Lev T, Benvenisty N. The anti-apoptotic gene survivin contributes to teratoma formation by human embryonic stem cells. *Nature biotechnology*. 2009;27(3):281-7. Epub 2009/03/03.
22. Rong Z, Wang M, Hu Z, Stradner M, Zhu S, Kong H, et al. An effective approach to prevent immune rejection of human ESC-derived allografts. *Cell Stem Cell*. 2014;14(1):121-30. Epub 2014/01/07.
23. Lo B, Parham L. Ethical issues in stem cell research. *Endocrine reviews*. 2009;30(3):204-13. Epub 2009/04/16.
24. Takahashi K, Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell*. 2006;126(4):663-76. Epub 2006/08/15.
25. Takahashi K, Tanabe K, Ohnuki M, Narita M, Ichisaka T, Tomoda K, et al. Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell*. 2007;131(5):861-72. Epub 2007/11/24.
26. Tonge PD, Corso AJ, Monetti C, Hussein SM, Puri MC, Michael IP, et al. Divergent reprogramming routes lead to alternative stem-cell states. *Nature*. 2014;516(7530):192-7. Epub 2014/12/17.

27. Buchholz DE, Hikita ST, Rowland TJ, Friedrich AM, Hinman CR, Johnson LV, et al. Derivation of functional retinal pigmented epithelium from induced pluripotent stem cells. *Stem Cells*. 2009;27(10):2427-34. Epub 2009/08/07.
28. Bilic J, Izpisua Belmonte JC. Concise review: Induced pluripotent stem cells versus embryonic stem cells: close enough or yet too far apart? *Stem Cells*. 2012;30(1):33-41. Epub 2012/01/04.
29. Grskovic M, Javaherian A, Strulovici B, Daley GQ. Induced pluripotent stem cells--opportunities for disease modelling and drug discovery. *Nature reviews Drug discovery*. 2011;10(12):915-29. Epub 2011/11/15.
30. Ebert AD, Yu J, Rose FF, Jr., Mattis VB, Lorson CL, Thomson JA, et al. Induced pluripotent stem cells from a spinal muscular atrophy patient. *Nature*. 2009;457(7227):277-80. Epub 2008/12/23.
31. Lee G, Studer L. Modelling familial dysautonomia in human induced pluripotent stem cells. *Philosophical transactions of the Royal Society of London Series B, Biological sciences*. 2011;366(1575):2286-96. Epub 2011/07/06.
32. Rezza A, Sennett R, Rendl M. Adult stem cell niches: cellular and molecular components. *Current topics in developmental biology*. 2014;107:333-72. Epub 2014/01/21.
33. Barker N, van Es JH, Kuipers J, Kujala P, van den Born M, Cozijnsen M, et al. Identification of stem cells in small intestine and colon by marker gene *Lgr5*. *Nature*. 2007;449(7165):1003-7. Epub 2007/10/16.
34. Greco V, Chen T, Rendl M, Schober M, Pasolli HA, Stokes N, et al. A two-step mechanism for stem cell activation during hair regeneration. *Cell Stem Cell*. 2009;4(2):155-69. Epub 2009/02/10.
35. Takizawa H, Regoes RR, Boddupalli CS, Bonhoeffer S, Manz MG. Dynamic variation in cycling of hematopoietic stem cells in steady state and inflammation. *The Journal of experimental medicine*. 2011;208(2):273-84. Epub 2011/02/09.
36. Lugert S, Basak O, Knuckles P, Haussler U, Fabel K, Gotz M, et al. Quiescent and active hippocampal neural stem cells with distinct morphologies respond selectively to physiological and pathological stimuli and aging. *Cell Stem Cell*. 2010;6(5):445-56. Epub 2010/05/11.
37. Furuyama K, Kawaguchi Y, Akiyama H, Horiguchi M, Kodama S, Kuhara T, et al. Continuous cell supply from a Sox9-expressing progenitor zone in adult liver, exocrine pancreas and intestine. *Nature genetics*. 2011;43(1):34-41. Epub 2010/11/30.
38. Yamazaki S, Iwama A, Takayanagi S, Eto K, Ema H, Nakauchi H. TGF-beta as a candidate bone marrow niche signal to induce hematopoietic stem cell hibernation. *Blood*. 2009;113(6):1250-6. Epub 2008/10/24.
39. Breunig JJ, Silbereis J, Vaccarino FM, Sestan N, Rakic P. Notch regulates cell fate and dendrite morphology of newborn neurons in the postnatal dentate gyrus. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007;104(51):20558-63. Epub 2007/12/14.
40. Farin HF, Van Es JH, Clevers H. Redundant sources of Wnt regulate intestinal stem cells and promote formation of Paneth cells. *Gastroenterology*. 2012;143(6):1518-29 e7. Epub 2012/08/28.
41. Casanova-Acebes M, Pitaval C, Weiss LA, Nombela-Arrieta C, Chevre R, N AG, et al. Rhythmic modulation of the hematopoietic niche through neutrophil clearance. *Cell*. 2013;153(5):1025-35. Epub 2013/05/28.

42. Kindler V. Postnatal stem cell survival: does the niche, a rare harbor where to resist the ebb tide of differentiation, also provide lineage-specific instructions? *Journal of leukocyte biology*. 2005;78(4):836-44. Epub 2005/10/04.
43. Shono Y, Ueha S, Wang Y, Abe J, Kurachi M, Matsuno Y, et al. Bone marrow graft-versus-host disease: early destruction of hematopoietic niche after MHC-mismatched hematopoietic stem cell transplantation. *Blood*. 2010;115(26):5401-11. Epub 2010/04/01.
44. Yao Y, Song X, Cheng H, Tang G, Hu X, Zhou H, et al. Dysfunction of bone marrow vascular niche in acute graft-versus-host disease after MHC-haploidentical bone marrow transplantation. *PLoS One*. 2014;9(8):e104607. Epub 2014/08/15.
45. Gauthier SD, Leboeuf D, Manuguerra-Gagne R, Gaboury L, Guimond M. Stromal-Derived Factor-1alpha and Interleukin-7 Treatment Improves Homeostatic Proliferation of Naive CD4 T Cells after Allogeneic Stem Cell Transplantation. *Biology of blood and marrow transplantation : journal of the American Society for Blood and Marrow Transplantation*. 2015. Epub 2015/07/08.
46. Hsu YC, Li L, Fuchs E. Emerging interactions between skin stem cells and their niches. *Nat Med*. 2014;20(8):847-56. Epub 2014/08/08.
47. Ding L, Morrison SJ. Haematopoietic stem cells and early lymphoid progenitors occupy distinct bone marrow niches. *Nature*. 2013;495(7440):231-5. Epub 2013/02/26.
48. Kosinski C, Li VS, Chan AS, Zhang J, Ho C, Tsui WY, et al. Gene expression patterns of human colon tops and basal crypts and BMP antagonists as intestinal stem cell niche factors. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007;104(39):15418-23. Epub 2007/09/21.
49. Oshimori N, Fuchs E. Paracrine TGF-beta signaling counterbalances BMP-mediated repression in hair follicle stem cell activation. *Cell Stem Cell*. 2012;10(1):63-75. Epub 2012/01/10.
50. Chen S, Lewallen M, Xie T. Adhesion in the stem cell niche: biological roles and regulation. *Development*. 2013;140(2):255-65. Epub 2012/12/20.
51. Yin H, Price F, Rudnicki MA. Satellite cells and the muscle stem cell niche. *Physiological reviews*. 2013;93(1):23-67. Epub 2013/01/11.
52. Baraniak PR, McDevitt TC. Stem cell paracrine actions and tissue regeneration. *Regenerative medicine*. 2010;5(1):121-43. Epub 2009/12/19.
53. Mendez-Ferrer S, Chow A, Merad M, Frenette PS. Circadian rhythms influence hematopoietic stem cells. *Current opinion in hematology*. 2009;16(4):235-42. Epub 2009/05/07.
54. Chong JJ, Yang X, Don CW, Minami E, Liu YW, Weyers JJ, et al. Human embryonic-stem-cell-derived cardiomyocytes regenerate non-human primate hearts. *Nature*. 2014;510(7504):273-7. Epub 2014/04/30.
55. Tanaka T, Yokoi T, Tamalu F, Watanabe S, Nishina S, Azuma N. Generation of retinal ganglion cells with functional axons from human induced pluripotent stem cells. *Scientific reports*. 2015;5:8344. Epub 2015/02/11.
56. Gupta PK, Das AK, Chullikana A, Majumdar AS. Mesenchymal stem cells for cartilage repair in osteoarthritis. *Stem cell research & therapy*. 2012;3(4):25. Epub 2012/07/11.
57. Rama P, Matuska S, Paganoni G, Spinelli A, De Luca M, Pellegrini G. Limbal stem-cell therapy and long-term corneal regeneration. *N Engl J Med*. 2010;363(2):147-55. Epub 2010/06/25.

58. Breems DA, Blokland EA, Siebel KE, Mayen AE, Engels LJ, Ploemacher RE. Stroma-contact prevents loss of hematopoietic stem cell quality during ex vivo expansion of CD34+ mobilized peripheral blood stem cells. *Blood*. 1998;91(1):111-7. Epub 1998/02/07.
59. Uccelli A, Moretta L, Pistoia V. Mesenchymal stem cells in health and disease. *Nat Rev Immunol*. 2008;8(9):726-36. Epub 2009/01/28.
60. Li J, Imitola J, Snyder EY, Sidman RL. Neural stem cells rescue nervous purkinje neurons by restoring molecular homeostasis of tissue plasminogen activator and downstream targets. *J Neurosci*. 2006;26(30):7839-48. Epub 2006/07/28.
61. Corti S, Locatelli F, Papadimitriou D, Del Bo R, Nizzardo M, Nardini M, et al. Neural stem cells LewisX+ CXCR4+ modify disease progression in an amyotrophic lateral sclerosis model. *Brain : a journal of neurology*. 2007;130(Pt 5):1289-305. Epub 2007/04/19.
62. Yang Z, von Ballmoos MW, Faessler D, Voelzmann J, Ortmann J, Diehm N, et al. Paracrine factors secreted by endothelial progenitor cells prevent oxidative stress-induced apoptosis of mature endothelial cells. *Atherosclerosis*. 2010;211(1):103-9. Epub 2010/03/17.
63. Singla DK, Lyons GE, Kamp TJ. Transplanted embryonic stem cells following mouse myocardial infarction inhibit apoptosis and cardiac remodeling. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2007;293(2):H1308-14. Epub 2007/04/10.
64. Mendez-Ferrer S, Michurina TV, Ferraro F, Mazloom AR, Macarthur BD, Lira SA, et al. Mesenchymal and haematopoietic stem cells form a unique bone marrow niche. *Nature*. 2010;466(7308):829-34. Epub 2010/08/13.
65. Russell KC, Phinney DG, Lacey MR, Barrilleaux BL, Meyertholen KE, O'Connor KC. In vitro high-capacity assay to quantify the clonal heterogeneity in trilineage potential of mesenchymal stem cells reveals a complex hierarchy of lineage commitment. *Stem Cells*. 2010;28(4):788-98. Epub 2010/02/04.
66. Ramakrishnan A, Torok-Storb B, Pillai MM. Primary marrow-derived stromal cells: isolation and manipulation. *Methods Mol Biol*. 2013;1035:75-101. Epub 2013/08/21.
67. Dominici M, Le Blanc K, Mueller I, Slaper-Cortenbach I, Marini F, Krause D, et al. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy*. 2006;8(4):315-7. Epub 2006/08/23.
68. Akiyama K, You YO, Yamaza T, Chen C, Tang L, Jin Y, et al. Characterization of bone marrow derived mesenchymal stem cells in suspension. *Stem cell research & therapy*. 2012;3(5):40. Epub 2012/10/23.
69. Takashima Y, Era T, Nakao K, Kondo S, Kasuga M, Smith AG, et al. Neuroepithelial cells supply an initial transient wave of MSC differentiation. *Cell*. 2007;129(7):1377-88. Epub 2007/07/03.
70. Nagoshi N, Shibata S, Kubota Y, Nakamura M, Nagai Y, Satoh E, et al. Ontogeny and multipotency of neural crest-derived stem cells in mouse bone marrow, dorsal root ganglia, and whisker pad. *Cell Stem Cell*. 2008;2(4):392-403. Epub 2008/04/10.
71. Slukvin, II, Vodyanik M. Endothelial origin of mesenchymal stem cells. *Cell Cycle*. 2011;10(9):1370-3. Epub 2011/03/30.
72. Crisan M, Yap S, Casteilla L, Chen CW, Corselli M, Park TS, et al. A perivascular origin for mesenchymal stem cells in multiple human organs. *Cell Stem Cell*. 2008;3(3):301-13. Epub 2008/09/13.

73. Gharibi B, Ghuman MS, Hughes FJ. Akt- and Erk-mediated regulation of proliferation and differentiation during PDGFRbeta-induced MSC self-renewal. *Journal of cellular and molecular medicine*. 2012;16(11):2789-801. Epub 2012/07/19.
74. Zhao L, Huang J, Zhang H, Wang Y, Matesic LE, Takahata M, et al. Tumor necrosis factor inhibits mesenchymal stem cell differentiation into osteoblasts via the ubiquitin E3 ligase Wwp1. *Stem Cells*. 2011;29(10):1601-10. Epub 2011/08/03.
75. Goldring SR, Goldring MB. Eating bone or adding it: the Wnt pathway decides. *Nat Med*. 2007;13(2):133-4. Epub 2007/02/10.
76. Takada I, Kouzmenko AP, Kato S. PPAR-gamma Signaling Crosstalk in Mesenchymal Stem Cells. *PPAR research*. 2010;2010. Epub 2010/08/14.
77. Rosen ED, MacDougald OA. Adipocyte differentiation from the inside out. *Nature reviews Molecular cell biology*. 2006;7(12):885-96. Epub 2006/12/02.
78. Hass R, Kasper C, Bohm S, Jacobs R. Different populations and sources of human mesenchymal stem cells (MSC): A comparison of adult and neonatal tissue-derived MSC. *Cell communication and signaling : CCS*. 2011;9:12. Epub 2011/05/17.
79. Zimmerlin L, Park TS, Zambidis ET, Donnenberg VS, Donnenberg AD. Mesenchymal stem cell secretome and regenerative therapy after cancer. *Biochimie*. 2013;95(12):2235-45. Epub 2013/06/12.
80. Hsieh JY, Wang HW, Chang SJ, Liao KH, Lee IH, Lin WS, et al. Mesenchymal stem cells from human umbilical cord express preferentially secreted factors related to neuroprotection, neurogenesis, and angiogenesis. *PLoS One*. 2013;8(8):e72604. Epub 2013/08/31.
81. Kolf CM, Cho E, Tuan RS. Mesenchymal stromal cells. *Biology of adult mesenchymal stem cells: regulation of niche, self-renewal and differentiation*. *Arthritis research & therapy*. 2007;9(1):204. Epub 2007/02/24.
82. Sharma S, Gurudutta GU, Satija NK, Pati S, Afrin F, Gupta P, et al. Stem cell c-KIT and HOXB4 genes: critical roles and mechanisms in self-renewal, proliferation, and differentiation. *Stem Cells Dev*. 2006;15(6):755-78. Epub 2007/01/27.
83. Mendez-Ferrer S, Frenette PS. Hematopoietic stem cell trafficking: regulated adhesion and attraction to bone marrow microenvironment. *Ann N Y Acad Sci*. 2007;1116:392-413. Epub 2007/12/18.
84. Mendez-Ferrer S, Battista M, Frenette PS. Cooperation of beta(2)- and beta(3)-adrenergic receptors in hematopoietic progenitor cell mobilization. *Ann N Y Acad Sci*. 2010;1192:139-44. Epub 2010/04/16.
85. Mendez-Ferrer S, Lucas D, Battista M, Frenette PS. Haematopoietic stem cell release is regulated by circadian oscillations. *Nature*. 2008;452(7186):442-7. Epub 2008/02/08.
86. Phinney DG, Prockop DJ. Concise review: mesenchymal stem/multipotent stromal cells: the state of transdifferentiation and modes of tissue repair--current views. *Stem Cells*. 2007;25(11):2896-902. Epub 2007/09/29.
87. Tögel F, Hu Z, Weiss K, Isaac J, Lange C, Westenfelder C. Administered mesenchymal stem cells protect against ischemic acute renal failure through differentiation-independent mechanisms. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2005;289(1):F31-42. Epub 2005/02/17.
88. Gneocchi M, He H, Noiseux N, Liang OD, Zhang L, Morello F, et al. Evidence supporting paracrine hypothesis for Akt-modified mesenchymal stem cell-mediated cardiac protection and functional improvement. *Faseb J*. 2006;20(6):661-9. Epub 2006/04/04.

89. Munoz JR, Stoutenger BR, Robinson AP, Spees JL, Prockop DJ. Human stem/progenitor cells from bone marrow promote neurogenesis of endogenous neural stem cells in the hippocampus of mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005;102(50):18171-6. Epub 2005/12/07.
90. Pittenger MF, Martin BJ. Mesenchymal stem cells and their potential as cardiac therapeutics. *Circ Res*. 2004;95(1):9-20. Epub 2004/07/10.
91. van Haaften T, Byrne R, Bonnet S, Rochefort GY, Akabutu J, Bouchentouf M, et al. Airway delivery of mesenchymal stem cells prevents arrested alveolar growth in neonatal lung injury in rats. *Am J Respir Crit Care Med*. 2009;180(11):1131-42. Epub 2009/08/29.
92. Chen L, Tredget EE, Wu PY, Wu Y. Paracrine factors of mesenchymal stem cells recruit macrophages and endothelial lineage cells and enhance wound healing. *PLoS One*. 2008;3(4):e1886. Epub 2008/04/03.
93. Wynn TA, Ramalingam TR. Mechanisms of fibrosis: therapeutic translation for fibrotic disease. *Nat Med*. 2012;18(7):1028-40. Epub 2012/07/10.
94. Gabay C, Kushner I. Acute-phase proteins and other systemic responses to inflammation. *N Engl J Med*. 1999;340(6):448-54. Epub 1999/02/11.
95. Boyman O, Sprent J. The role of interleukin-2 during homeostasis and activation of the immune system. *Nat Rev Immunol*. 2012;12(3):180-90. Epub 2012/02/22.
96. Dovi JV, He LK, DiPietro LA. Accelerated wound closure in neutrophil-depleted mice. *Journal of leukocyte biology*. 2003;73(4):448-55. Epub 2003/03/28.
97. Briggaman RA, Schechter NM, Fraki J, Lazarus GS. Degradation of the epidermal-dermal junction by proteolytic enzymes from human skin and human polymorphonuclear leukocytes. *The Journal of experimental medicine*. 1984;160(4):1027-42. Epub 1984/10/01.
98. Dovi JV, Szpaderska AM, DiPietro LA. Neutrophil function in the healing wound: adding insult to injury? *Thrombosis and haemostasis*. 2004;92(2):275-80. Epub 2004/07/23.
99. Li WY, Chong SS, Huang EY, Tuan TL. Plasminogen activator/plasmin system: a major player in wound healing? *Wound repair and regeneration : official publication of the Wound Healing Society [and] the European Tissue Repair Society*. 2003;11(4):239-47. Epub 2003/07/09.
100. Wilgus TA, Vodovotz Y, Vittadini E, Clubbs EA, Oberyszyn TM. Reduction of scar formation in full-thickness wounds with topical celecoxib treatment. *Wound repair and regeneration : official publication of the Wound Healing Society [and] the European Tissue Repair Society*. 2003;11(1):25-34. Epub 2003/02/13.
101. Uccelli A, Prockop DJ. Why should mesenchymal stem cells (MSCs) cure autoimmune diseases? *Curr Opin Immunol*. 2010;22(6):768-74. Epub 2010/11/26.
102. Stagg J. Immune regulation by mesenchymal stem cells: two sides to the coin. *Tissue Antigens*. 2007;69(1):1-9. Epub 2007/01/11.
103. Groh ME, Maitra B, Szekely E, Koc ON. Human mesenchymal stem cells require monocyte-mediated activation to suppress alloreactive T cells. *Exp Hematol*. 2005;33(8):928-34. Epub 2005/07/26.
104. Le Blanc K, Tammik L, Sundberg B, Haynesworth SE, Ringden O. Mesenchymal stem cells inhibit and stimulate mixed lymphocyte cultures and mitogenic responses independently of the major histocompatibility complex. *Scand J Immunol*. 2003;57(1):11-20. Epub 2003/01/25.

105. 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*. 2008;2(2):141-50. Epub 2008/03/29.
106. Raffaghello L, Bianchi G, Bertolotto M, Montecucco F, Busca A, Dallegri F, et al. Human mesenchymal stem cells inhibit neutrophil apoptosis: a model for neutrophil preservation in the bone marrow niche. *Stem Cells*. 2008;26(1):151-62. Epub 2007/10/13.
107. Djouad F, Charbonnier LM, Bouffi C, Louis-Plence P, Bony C, Apparailly F, et al. Mesenchymal stem cells inhibit the differentiation of dendritic cells through an interleukin-6-dependent mechanism. *Stem Cells*. 2007;25(8):2025-32. Epub 2007/05/19.
108. Chen L, Zhang W, Yue H, Han Q, Chen B, Shi M, et al. Effects of human mesenchymal stem cells on the differentiation of dendritic cells from CD34+ cells. *Stem Cells Dev*. 2007;16(5):719-31. Epub 2007/11/15.
109. Djouad F, Bouffi C, Ghannam S, Noel D, Jorgensen C. Mesenchymal stem cells: innovative therapeutic tools for rheumatic diseases. *Nat Rev Rheumatol*. 2009;5(7):392-9. Epub 2009/07/02.
110. Aggarwal S, Pittenger MF. Human mesenchymal stem cells modulate allogeneic immune cell responses. *Blood*. 2005;105(4):1815-22. Epub 2004/10/21.
111. Ge W, Jiang J, Arp J, Liu W, Garcia B, Wang H. Regulatory T-cell generation and kidney allograft tolerance induced by mesenchymal stem cells associated with indoleamine 2,3-dioxygenase expression. *Transplantation*. 2010;90(12):1312-20. Epub 2010/11/03.
112. Mezrich JD, Fechner JH, Zhang X, Johnson BP, Burlingham WJ, Bradfield CA. An interaction between kynurenine and the aryl hydrocarbon receptor can generate regulatory T cells. *J Immunol*. 2010;185(6):3190-8. Epub 2010/08/20.
113. Sakaguchi S, Powrie F. Emerging challenges in regulatory T cell function and biology. *Science*. 2007;317(5838):627-9. Epub 2007/08/04.
114. Sato K, Ozaki K, Oh I, Meguro A, Hatanaka K, Nagai T, et al. Nitric oxide plays a critical role in suppression of T-cell proliferation by mesenchymal stem cells. *Blood*. 2007;109(1):228-34. Epub 2006/09/21.
115. Bingisser RM, Tilbrook PA, Holt PG, Kees UR. Macrophage-derived nitric oxide regulates T cell activation via reversible disruption of the Jak3/STAT5 signaling pathway. *J Immunol*. 1998;160(12):5729-34. Epub 1998/06/24.
116. Castro-Manreza ME, Montesinos JJ. Immunoregulation by mesenchymal stem cells: biological aspects and clinical applications. *Journal of immunology research*. 2015;2015:394917. Epub 2015/05/12.
117. Novak ML, Koh TJ. Macrophage phenotypes during tissue repair. *Journal of leukocyte biology*. 2013;93(6):875-81. Epub 2013/03/19.
118. Tazuin S, Starnes TW, Becker FB, Lam PY, Huttenlocher A. Redox and Src family kinase signaling control leukocyte wound attraction and neutrophil reverse migration. *The Journal of cell biology*. 2014;207(5):589-98.
119. Brancato SK, Albina JE. Wound macrophages as key regulators of repair: origin, phenotype, and function. *The American journal of pathology*. 2011;178(1):19-25. Epub 2011/01/13.
120. Cho DI, Kim MR, Jeong HY, Jeong HC, Jeong MH, Yoon SH, et al. Mesenchymal stem cells reciprocally regulate the M1/M2 balance in mouse bone marrow-derived macrophages. *Experimental & molecular medicine*. 2014;46:e70. Epub 2014/01/11.

121. Boomsma RA, Geenen DL. Mesenchymal stem cells secrete multiple cytokines that promote angiogenesis and have contrasting effects on chemotaxis and apoptosis. *PLoS One*. 2012;7(4):e35685. Epub 2012/05/05.
122. Nemeth K, Leelahavanichkul A, Yuen PS, Mayer B, Parmelee A, Doi K, et al. Bone marrow stromal cells attenuate sepsis via prostaglandin E(2)-dependent reprogramming of host macrophages to increase their interleukin-10 production. *Nat Med*. 2009;15(1):42-9. Epub 2008/12/23.
123. Raja S, Byakod G, Pudakalkatti P. Growth factors in periodontal regeneration. *International journal of dental hygiene*. 2009;7(2):82-9. Epub 2009/05/06.
124. Doan PL, Himgurg HA, Helms K, Russell JL, Fixsen E, Quarmyne M, et al. Epidermal growth factor regulates hematopoietic regeneration after radiation injury. *Nat Med*. 2013;19(3):295-304. Epub 2013/02/05.
125. Xue F, Takahara T, Yata Y, Kuwabara Y, Shinno E, Nonome K, et al. Hepatocyte growth factor gene therapy accelerates regeneration in cirrhotic mouse livers after hepatectomy. *Gut*. 2003;52(5):694-700. Epub 2003/04/15.
126. Tilling L, Chowienczyk P, Clapp B. Progenitors in motion: mechanisms of mobilization of endothelial progenitor cells. *British journal of clinical pharmacology*. 2009;68(4):484-92. Epub 2009/10/22.
127. Blanpain C, Horsley V, Fuchs E. Epithelial stem cells: turning over new leaves. *Cell*. 2007;128(3):445-58. Epub 2007/02/10.
128. Ritsma L, Ellenbroek SI, Zomer A, Snippert HJ, de Sauvage FJ, Simons BD, et al. Intestinal crypt homeostasis revealed at single-stem-cell level by in vivo live imaging. *Nature*. 2014;507(7492):362-5. Epub 2014/02/18.
129. Jin K, Galvan V. Endogenous neural stem cells in the adult brain. *Journal of neuroimmune pharmacology : the official journal of the Society on NeuroImmune Pharmacology*. 2007;2(3):236-42. Epub 2007/11/28.
130. Dhamodaran K, Subramani M, Ponnalagu M, Shetty R, Das D. Ocular stem cells: a status update! *Stem cell research & therapy*. 2014;5(2):56. Epub 2014/08/27.
131. Bianco P, Robey PG, Simmons PJ. Mesenchymal stem cells: revisiting history, concepts, and assays. *Cell Stem Cell*. 2008;2(4):313-9. Epub 2008/04/10.
132. Linke A, Muller P, Nurzynska D, Casarsa C, Torella D, Nascimbene A, et al. Stem cells in the dog heart are self-renewing, clonogenic, and multipotent and regenerate infarcted myocardium, improving cardiac function. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005;102(25):8966-71. Epub 2005/06/14.
133. Hatzistergos KE, Quevedo H, Oskoue BN, Hu Q, Feigenbaum GS, Margitich IS, et al. Bone marrow mesenchymal stem cells stimulate cardiac stem cell proliferation and differentiation. *Circ Res*. 2010;107(7):913-22. Epub 2010/07/31.
134. Nakanishi C, Yamagishi M, Yamahara K, Hagino I, Mori H, Sawa Y, et al. Activation of cardiac progenitor cells through paracrine effects of mesenchymal stem cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 2008;374(1):11-6. Epub 2008/07/01.
135. Frenette PS, Pinho S, Lucas D, Scheiermann C. Mesenchymal stem cell: keystone of the hematopoietic stem cell niche and a stepping-stone for regenerative medicine. *Annual review of immunology*. 2013;31:285-316. Epub 2013/01/10.
136. Fischer AJ, McGuire CR, Dierks BD, Reh TA. Insulin and fibroblast growth factor 2 activate a neurogenic program in Muller glia of the chicken retina. *J Neurosci*. 2002;22(21):9387-98. Epub 2002/11/06.

137. Sousa-Nunes R, Yee LL, Gould AP. Fat cells reactivate quiescent neuroblasts via TOR and glial insulin relays in *Drosophila*. *Nature*. 2011;471(7339):508-12. Epub 2011/02/25.
138. Xu RH, Sampsel-Barron TL, Gu F, Root S, Peck RM, Pan G, et al. NANOG is a direct target of TGFbeta/activin-mediated SMAD signaling in human ESCs. *Cell Stem Cell*. 2008;3(2):196-206. Epub 2008/08/07.
139. Gneocchi M, Zhang Z, Ni A, Dzau VJ. Paracrine mechanisms in adult stem cell signaling and therapy. *Circ Res*. 2008;103(11):1204-19. Epub 2008/11/26.
140. Benzhi C, Limei Z, Ning W, Jiaqi L, Songling Z, Fanyu M, et al. Bone marrow mesenchymal stem cells upregulate transient outward potassium currents in postnatal rat ventricular myocytes. *J Mol Cell Cardiol*. 2009;47(1):41-8. Epub 2009/03/17.
141. Freestone NS, Ribaric S, Mason WT. The effect of insulin-like growth factor-1 on adult rat cardiac contractility. *Mol Cell Biochem*. 1996;163-164:223-9. Epub 1996/10/01.
142. Duerr RL, Huang S, Miraliakbar HR, Clark R, Chien KR, Ross J, Jr. Insulin-like growth factor-1 enhances ventricular hypertrophy and function during the onset of experimental cardiac failure. *J Clin Invest*. 1995;95(2):619-27. Epub 1995/02/01.
143. Weinberg RA. *The biology of cancer*. New York: Garland Science; 2007.
144. Kinnaird T, Stabile E, Burnett MS, Shou M, Lee CW, Barr S, et al. Local delivery of marrow-derived stromal cells augments collateral perfusion through paracrine mechanisms. *Circulation*. 2004;109(12):1543-9. Epub 2004/03/17.
145. Tang YL, Zhao Q, Zhang YC, Cheng L, Liu M, Shi J, et al. Autologous mesenchymal stem cell transplantation induce VEGF and neovascularization in ischemic myocardium. *Regul Pept*. 2004;117(1):3-10. Epub 2003/12/23.
146. Nagaya N, Fujii T, Iwase T, Ohgushi H, Itoh T, Uematsu M, et al. Intravenous administration of mesenchymal stem cells improves cardiac function in rats with acute myocardial infarction through angiogenesis and myogenesis. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2004;287(6):H2670-6. Epub 2004/07/31.
147. Tomita S, Mickle DA, Weisel RD, Jia ZQ, Tumiati LC, Allidina Y, et al. Improved heart function with myogenesis and angiogenesis after autologous porcine bone marrow stromal cell transplantation. *J Thorac Cardiovasc Surg*. 2002;123(6):1132-40. Epub 2002/06/14.
148. Sorrell JM, Baber MA, Caplan AI. Influence of adult mesenchymal stem cells on in vitro vascular formation. *Tissue Eng Part A*. 2009;15(7):1751-61. Epub 2009/02/07.
149. Sanz L, Santos-Valle P, Alonso-Camino V, Salas C, Serrano A, Vicario JL, et al. Long-term in vivo imaging of human angiogenesis: critical role of bone marrow-derived mesenchymal stem cells for the generation of durable blood vessels. *Microvasc Res*. 2008;75(3):308-14. Epub 2008/02/07.
150. Martin P, Leibovich SJ. Inflammatory cells during wound repair: the good, the bad and the ugly. *Trends in cell biology*. 2005;15(11):599-607. Epub 2005/10/06.
151. Li L, Zhang S, Zhang Y, Yu B, Xu Y, Guan Z. Paracrine action mediate the antifibrotic effect of transplanted mesenchymal stem cells in a rat model of global heart failure. *Mol Biol Rep*. 2009;36(4):725-31. Epub 2008/03/28.
152. Ortiz LA, Gambelli F, McBride C, Gaupp D, Baddoo M, Kaminski N, et al. Mesenchymal stem cell engraftment in lung is enhanced in response to bleomycin exposure and ameliorates its fibrotic effects. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003;100(14):8407-11. Epub 2003/06/20.

153. Ninichuk V, Gross O, Segerer S, Hoffmann R, Radomska E, Buchstaller A, et al. Multipotent mesenchymal stem cells reduce interstitial fibrosis but do not delay progression of chronic kidney disease in collagen4A3-deficient mice. *Kidney Int.* 2006;70(1):121-9. Epub 2006/05/26.
154. Chang YJ, Liu JW, Lin PC, Sun LY, Peng CW, Luo GH, et al. Mesenchymal stem cells facilitate recovery from chemically induced liver damage and decrease liver fibrosis. *Life Sci.* 2009;85(13-14):517-25. Epub 2009/08/19.
155. Meirelles Lda S, Fontes AM, Covas DT, Caplan AI. Mechanisms involved in the therapeutic properties of mesenchymal stem cells. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2009;20(5-6):419-27. Epub 2009/11/21.
156. Li L, Zhang Y, Li Y, Yu B, Xu Y, Zhao S, et al. Mesenchymal stem cell transplantation attenuates cardiac fibrosis associated with isoproterenol-induced global heart failure. *Transpl Int.* 2008;21(12):1181-9. Epub 2008/09/12.
157. Nakamura T, Matsumoto K, Mizuno S, Sawa Y, Matsuda H. Hepatocyte growth factor prevents tissue fibrosis, remodeling, and dysfunction in cardiomyopathic hamster hearts. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2005;288(5):H2131-9. Epub 2005/04/21.
158. Suga H, Eto H, Shigeura T, Inoue K, Aoi N, Kato H, et al. IFATS collection: Fibroblast growth factor-2-induced hepatocyte growth factor secretion by adipose-derived stromal cells inhibits postinjury fibrogenesis through a c-Jun N-terminal kinase-dependent mechanism. *Stem Cells.* 2009;27(1):238-49. Epub 2008/09/06.
159. Ohnishi S, Sumiyoshi H, Kitamura S, Nagaya N. Mesenchymal stem cells attenuate cardiac fibroblast proliferation and collagen synthesis through paracrine actions. *FEBS Lett.* 2007;581(21):3961-6. Epub 2007/07/31.
160. Sueblinvong V, Weiss DJ. Cell therapy approaches for lung diseases: current status. *Curr Opin Pharmacol.* 2009;9(3):268-73. Epub 2009/04/08.
161. Baertschiger RM, Serre-Beinier V, Morel P, Bosco D, Peyrou M, Clement S, et al. Fibrogenic potential of human multipotent mesenchymal stromal cells in injured liver. *PLoS One.* 2009;4(8):e6657. Epub 2009/08/18.
162. Shi C, Pamer EG. Monocyte recruitment during infection and inflammation. *Nat Rev Immunol.* 2011;11(11):762-74. Epub 2011/10/11.
163. Mirza R, DiPietro LA, Koh TJ. Selective and specific macrophage ablation is detrimental to wound healing in mice. *The American journal of pathology.* 2009;175(6):2454-62. Epub 2009/10/24.
164. Castellana D, Paus R, Perez-Moreno M. Macrophages contribute to the cyclic activation of adult hair follicle stem cells. *PLoS biology.* 2014;12(12):e1002002. Epub 2014/12/24.
165. Barrientos S, Stojadinovic O, Golinko MS, Brem H, Tomic-Canic M. Growth factors and cytokines in wound healing. *Wound repair and regeneration : official publication of the Wound Healing Society [and] the European Tissue Repair Society.* 2008;16(5):585-601. Epub 2009/01/09.
166. Diegelmann RF, Evans MC. Wound healing: an overview of acute, fibrotic and delayed healing. *Frontiers in bioscience : a journal and virtual library.* 2004;9:283-9. Epub 2004/02/10.
167. Shimojo M, Nakajima K, Takei N, Hamanoue M, Kohsaka S. Production of basic fibroblast growth factor in cultured rat brain microglia. *Neuroscience letters.* 1991;123(2):229-31. Epub 1991/02/25.

168. Ploeger DT, Hosper NA, Schipper M, Koerts JA, de Rond S, Bank RA. Cell plasticity in wound healing: paracrine factors of M1/ M2 polarized macrophages influence the phenotypical state of dermal fibroblasts. *Cell communication and signaling : CCS*. 2013;11(1):29. Epub 2013/04/23.
169. Mosser DM, Edwards JP. Exploring the full spectrum of macrophage activation. *Nat Rev Immunol*. 2008;8(12):958-69. Epub 2008/11/26.
170. Pinhal-Enfield G, Ramanathan M, Hasko G, Vogel SN, Salzman AL, Boons GJ, et al. An angiogenic switch in macrophages involving synergy between Toll-like receptors 2, 4, 7, and 9 and adenosine A(2A) receptors. *The American journal of pathology*. 2003;163(2):711-21. Epub 2003/07/24.
171. Daley JM, Brancato SK, Thomay AA, Reichner JS, Albina JE. The phenotype of murine wound macrophages. *Journal of leukocyte biology*. 2010;87(1):59-67. Epub 2010/01/07.
172. Fadok VA, Bratton DL, Konowal A, Freed PW, Westcott JY, Henson PM. Macrophages that have ingested apoptotic cells in vitro inhibit proinflammatory cytokine production through autocrine/paracrine mechanisms involving TGF-beta, PGE2, and PAF. *J Clin Invest*. 1998;101(4):890-8. Epub 1998/03/21.
173. Italiani P, Boraschi D. From Monocytes to M1/M2 Macrophages: Phenotypical vs. Functional Differentiation. *Frontiers in immunology*. 2014;5:514. Epub 2014/11/05.
174. Koh TJ, DiPietro LA. Inflammation and wound healing: the role of the macrophage. *Expert reviews in molecular medicine*. 2011;13:e23. Epub 2011/07/12.
175. Duffield JS, Park KM, Hsiao LL, Kelley VR, Scadden DT, Ichimura T, et al. Restoration of tubular epithelial cells during repair of the postischemic kidney occurs independently of bone marrow-derived stem cells. *J Clin Invest*. 2005;115(7):1743-55. Epub 2005/07/12.
176. Liew A, O'Brien T. Therapeutic potential for mesenchymal stem cell transplantation in critical limb ischemia. *Stem cell research & therapy*. 2012;3(4):28. Epub 2012/08/01.
177. Meier RP, Muller YD, Morel P, Gonelle-Gispert C, Buhler LH. Transplantation of mesenchymal stem cells for the treatment of liver diseases, is there enough evidence? *Stem cell research*. 2013;11(3):1348-64. Epub 2013/10/05.
178. Ljubic B, Milovanovic M, Volarevic V, Murray B, Bugarski D, Przyborski S, et al. Human mesenchymal stem cells creating an immunosuppressive environment and promote breast cancer in mice. *Scientific reports*. 2013;3:2298. Epub 2013/07/31.
179. De Boeck A, Pauwels P, Hensen K, Rummens JL, Westbroek W, Hendrix A, et al. Bone marrow-derived mesenchymal stem cells promote colorectal cancer progression through paracrine neuregulin 1/HER3 signalling. *Gut*. 2013;62(4):550-60. Epub 2012/04/27.
180. Nguyen BK, Maltais S, Perrault LP, Tanguay JF, Tardif JC, Stevens LM, et al. Improved function and myocardial repair of infarcted heart by intracoronary injection of mesenchymal stem cell-derived growth factors. *J Cardiovasc Transl Res*. 2010;3(5):547-58. Epub 2010/06/19.
181. Takahashi M, Li TS, Suzuki R, Kobayashi T, Ito H, Ikeda Y, et al. Cytokines produced by bone marrow cells can contribute to functional improvement of the infarcted heart by protecting cardiomyocytes from ischemic injury. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2006;291(2):H886-93. Epub 2006/04/11.

182. Spencer JA, Ferraro F, Roussakis E, Klein A, Wu J, Runnels JM, et al. Direct measurement of local oxygen concentration in the bone marrow of live animals. *Nature*. 2014;508(7495):269-73. Epub 2014/03/05.
183. Walter MN, Wright KT, Fuller HR, MacNeil S, Johnson WE. Mesenchymal stem cell-conditioned medium accelerates skin wound healing: an in vitro study of fibroblast and keratinocyte scratch assays. *Experimental cell research*. 2010;316(7):1271-81. Epub 2010/03/09.
184. Chen L, Xu Y, Zhao J, Zhang Z, Yang R, Xie J, et al. Conditioned medium from hypoxic bone marrow-derived mesenchymal stem cells enhances wound healing in mice. *PLoS One*. 2014;9(4):e96161. Epub 2014/05/02.
185. Noiseux N, Gneccchi M, Lopez-Illasaca M, Zhang L, Solomon SD, Deb A, et al. Mesenchymal stem cells overexpressing Akt dramatically repair infarcted myocardium and improve cardiac function despite infrequent cellular fusion or differentiation. *Mol Ther*. 2006;14(6):840-50. Epub 2006/09/13.
186. Lee RH, Pulin AA, Seo MJ, Kota DJ, Ylostalo J, Larson BL, et al. Intravenous hMSCs improve myocardial infarction in mice because cells embolized in lung are activated to secrete the anti-inflammatory protein TSG-6. *Cell Stem Cell*. 2009;5(1):54-63. Epub 2009/07/03.
187. Noiseux N, Borie M, Desnoyers A, Menaouar A, Stevens LM, Mansour S, et al. Preconditioning of stem cells by oxytocin to improve their therapeutic potential. *Endocrinology*. 2012;153(11):5361-72. Epub 2012/10/02.
188. Noiseux N, Marquis-Gravel G, Mansour S, Shahzad U, Stewart DJ, Yau TM. The current state of stem cell therapeutics: Canadian approaches in the international context. *The Canadian journal of cardiology*. 2014;30(11):1361-9. Epub 2014/09/25.
189. Rasulov MF, Vasilchenkov AV, Onishchenko NA, Krasheninnikov ME, Kravchenko VI, Gorshenin TL, et al. First experience of the use bone marrow mesenchymal stem cells for the treatment of a patient with deep skin burns. *Bulletin of experimental biology and medicine*. 2005;139(1):141-4. Epub 2005/09/06.
190. Lu D, Chen B, Liang Z, Deng W, Jiang Y, Li S, et al. Comparison of bone marrow mesenchymal stem cells with bone marrow-derived mononuclear cells for treatment of diabetic critical limb ischemia and foot ulcer: a double-blind, randomized, controlled trial. *Diabetes research and clinical practice*. 2011;92(1):26-36. Epub 2011/01/11.
191. Peng L, Xie DY, Lin BL, Liu J, Zhu HP, Xie C, et al. Autologous bone marrow mesenchymal stem cell transplantation in liver failure patients caused by hepatitis B: short-term and long-term outcomes. *Hepatology*. 2011;54(3):820-8. Epub 2011/05/25.
192. Kharaziha P, Hellstrom PM, Noorinayer B, Farzaneh F, Aghajani K, Jafari F, et al. Improvement of liver function in liver cirrhosis patients after autologous mesenchymal stem cell injection: a phase I-II clinical trial. *European journal of gastroenterology & hepatology*. 2009;21(10):1199-205. Epub 2009/05/21.
193. Humphreys BD, Bonventre JV. Mesenchymal stem cells in acute kidney injury. *Annual review of medicine*. 2008;59:311-25. Epub 2007/10/05.
194. Ortiz LA, Dutreil M, Fattman C, Pandey AC, Torres G, Go K, et al. Interleukin 1 receptor antagonist mediates the antiinflammatory and antifibrotic effect of mesenchymal stem cells during lung injury. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007;104(26):11002-7. Epub 2007/06/16.
195. Goodwin M, Sueblinvong V, Eisenhauer P, Ziats NP, LeClair L, Poynter ME, et al. Bone marrow-derived mesenchymal stromal cells inhibit Th2-mediated allergic airways inflammation in mice. *Stem Cells*. 2011;29(7):1137-48. Epub 2011/05/06.

196. Ionescu L, Byrne RN, van Haaften T, Vadivel A, Alphonse RS, Rey-Parra GJ, et al. Stem cell conditioned medium improves acute lung injury in mice: in vivo evidence for stem cell paracrine action. *American journal of physiology Lung cellular and molecular physiology*. 2012;303(11):L967-77. Epub 2012/10/02.
197. Le Blanc K, Gotherstrom C, Ringden O, Hassan M, McMahon R, Horwitz E, et al. Fetal mesenchymal stem-cell engraftment in bone after in utero transplantation in a patient with severe osteogenesis imperfecta. *Transplantation*. 2005;79(11):1607-14. Epub 2005/06/09.
198. Prasad VK, Lucas KG, Kleiner GI, Talano JA, Jacobsohn D, Broadwater G, et al. Efficacy and safety of ex vivo cultured adult human mesenchymal stem cells (Prochymal) in pediatric patients with severe refractory acute graft-versus-host disease in a compassionate use study. *Biology of blood and marrow transplantation : journal of the American Society for Blood and Marrow Transplantation*. 2011;17(4):534-41. Epub 2010/05/12.
199. Le Blanc K, Rasmusson I, Sundberg B, Gotherstrom C, Hassan M, Uzunel M, et al. Treatment of severe acute graft-versus-host disease with third party haploidentical mesenchymal stem cells. *Lancet*. 2004;363(9419):1439-41. Epub 2004/05/04.
200. Wu KH, Chan CK, Tsai C, Chang YH, Sieber M, Chiu TH, et al. Effective treatment of severe steroid-resistant acute graft-versus-host disease with umbilical cord-derived mesenchymal stem cells. *Transplantation*. 2011;91(12):1412-6. Epub 2011/04/16.
201. Eggenhofer E, Luk F, Dahlke MH, Hoogduijn MJ. The life and fate of mesenchymal stem cells. *Frontiers in immunology*. 2014;5:148. Epub 2014/06/07.
202. Wei X, Yang X, Han ZP, Qu FF, Shao L, Shi YF. Mesenchymal stem cells: a new trend for cell therapy. *Acta pharmacologica Sinica*. 2013;34(6):747-54. Epub 2013/06/06.
203. Sun L, Wang D, Liang J, Zhang H, Feng X, Wang H, et al. Umbilical cord mesenchymal stem cell transplantation in severe and refractory systemic lupus erythematosus. *Arthritis and rheumatism*. 2010;62(8):2467-75. Epub 2010/05/28.
204. Ciccocioppo R, Bernardo ME, Sgarella A, Maccario R, Avanzini MA, Ubezio C, et al. Autologous bone marrow-derived mesenchymal stromal cells in the treatment of fistulising Crohn's disease. *Gut*. 2011;60(6):788-98. Epub 2011/01/25.
205. Karussis D, Karageorgiou C, Vaknin-Dembinsky A, Gowda-Kurkalli B, Gomori JM, Kassis I, et al. Safety and immunological effects of mesenchymal stem cell transplantation in patients with multiple sclerosis and amyotrophic lateral sclerosis. *Archives of neurology*. 2010;67(10):1187-94. Epub 2010/10/13.
206. Reinders ME, de Fijter JW, Roelofs H, Bajema IM, de Vries DK, Schaapherder AF, et al. Autologous bone marrow-derived mesenchymal stromal cells for the treatment of allograft rejection after renal transplantation: results of a phase I study. *Stem cells translational medicine*. 2013;2(2):107-11. Epub 2013/01/26.
207. Casiraghi F, Azzollini N, Cassis P, Imberti B, Morigi M, Cugini D, et al. Pretransplant infusion of mesenchymal stem cells prolongs the survival of a semiallogeneic heart transplant through the generation of regulatory T cells. *J Immunol*. 2008;181(6):3933-46. Epub 2008/09/05.
208. Wang J, Freeman EE, Descovich D, Harasymowycz PJ, Kamdeu Fansi A, Li G, et al. Estimation of ocular rigidity in glaucoma using ocular pulse amplitude and pulsatile choroidal blood flow. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2013;54(3):1706-11. Epub 2013/01/26.
209. Mitchell P, Lee AJ, Rohtchina E, Wang JJ. Open-angle glaucoma and systemic hypertension: the blue mountains eye study. *J Glaucoma*. 2004;13(4):319-26. Epub 2004/07/01.

210. Marieb EN, Mitchell SJ, Zao PZ. Human anatomy & physiology laboratory manual. 10th ed. San Francisco: Pearson/Benjamin Cummings; 2011.
211. Coca-Prados M, Escribano J. New perspectives in aqueous humor secretion and in glaucoma: the ciliary body as a multifunctional neuroendocrine gland. *Prog Retin Eye Res.* 2007;26(3):239-62. Epub 2007/02/27.
212. Tamm ER, Fuchshofer R. What increases outflow resistance in primary open-angle glaucoma? *Surv Ophthalmol.* 2007;52 Suppl 2:S101-4. Epub 2007/12/06.
213. Gottanka J, Johnson DH, Grehn F, Lutjen-Drecoll E. Histologic findings in pigment dispersion syndrome and pigmentary glaucoma. *J Glaucoma.* 2006;15(2):142-51. Epub 2006/04/25.
214. Tamm ER. The trabecular meshwork outflow pathways: structural and functional aspects. *Exp Eye Res.* 2009;88(4):648-55. Epub 2009/02/26.
215. Acott TS, Kelley MJ. Extracellular matrix in the trabecular meshwork. *Exp Eye Res.* 2008;86(4):543-61. Epub 2008/03/04.
216. Goel M, Picciani RG, Lee RK, Bhattacharya SK. Aqueous humor dynamics: a review. *The open ophthalmology journal.* 2010;4:52-9. Epub 2011/02/05.
217. Johnstone MA, Grant WG. Pressure-dependent changes in structures of the aqueous outflow system of human and monkey eyes. *Am J Ophthalmol.* 1973;75(3):365-83. Epub 1973/03/01.
218. Grierson I, Lee WR. Pressure effects on flow channels in the lining endothelium of Schlemm's canal. A quantitative study by transmission electron microscopy. *Acta ophthalmologica.* 1978;56(6):935-52. Epub 1978/12/01.
219. Johnson DH, Richardson TM, Epstein DL. Trabecular meshwork recovery after phagocytic challenge. *Curr Eye Res.* 1989;8(11):1121-30. Epub 1989/11/01.
220. Johnson M. 'What controls aqueous humour outflow resistance?'. *Exp Eye Res.* 2006;82(4):545-57. Epub 2006/01/03.
221. Allingham RR, Shields MB. Shields' textbook of glaucoma. 5th ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2005. xiii, 702 p. p.
222. Weinreb RN, Aung T, Medeiros FA. The pathophysiology and treatment of glaucoma: a review. *Jama.* 2014;311(18):1901-11. Epub 2014/05/16.
223. Quigley HA. Open-angle glaucoma. *N Engl J Med.* 1993;328(15):1097-106. Epub 1993/04/15.
224. Shields MB, Tombran-Tink J, Barnstable CJ. Mechanisms of the glaucomas : disease processes and therapeutic modalities. Totowa, NJ: Humana Press : Springer distributor; 2008. xix, 762 p. p.
225. Jonas JB. Ophthalmodynamometry in eyes with dilated episcleral veins. *J Glaucoma.* 2003;12(3):285-7. Epub 2003/06/05.
226. Kwon YH, Fingert JH, Kuehn MH, Alward WL. Primary open-angle glaucoma. *N Engl J Med.* 2009;360(11):1113-24. Epub 2009/03/13.
227. Tektas OY, Lutjen-Drecoll E. Structural changes of the trabecular meshwork in different kinds of glaucoma. *Exp Eye Res.* 2009;88(4):769-75. Epub 2008/12/31.
228. Alvarado J, Murphy C, Juster R. Trabecular meshwork cellularity in primary open-angle glaucoma and nonglaucomatous normals. *Ophthalmology.* 1984;91(6):564-79. Epub 1984/06/01.

229. Calthorpe CM, Grierson I, Hitchings RA. Chemoattractants produced by ocular cells induce trabecular meshwork cell migration. *Int Ophthalmol*. 1991;15(3):185-91. Epub 1991/05/01.
230. Grierson I, Howes RC. Age-related depletion of the cell population in the human trabecular meshwork. *Eye (Lond)*. 1987;1 (Pt 2):204-10. Epub 1987/01/01.
231. Alvarado J, Murphy C, Polansky J, Juster R. Age-related changes in trabecular meshwork cellularity. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 1981;21(5):714-27. Epub 1981/11/01.
232. Baleriola J, Garcia-Feijoo J, Martinez-de-la-Casa JM, Fernandez-Cruz A, de la Rosa EJ, Fernandez-Durango R. Apoptosis in the trabecular meshwork of glaucomatous patients. *Mol Vis*. 2008;14:1513-6. Epub 2008/08/30.
233. Caballero M, Liton PB, Epstein DL, Gonzalez P. Proteasome inhibition by chronic oxidative stress in human trabecular meshwork cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 2003;308(2):346-52. Epub 2003/08/07.
234. De La Paz MA, Epstein DL. Effect of age on superoxide dismutase activity of human trabecular meshwork. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 1996;37(9):1849-53. Epub 1996/08/01.
235. John SW. Mechanistic insights into glaucoma provided by experimental genetics the cogan lecture. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2005;46(8):2649-61. Epub 2005/07/27.
236. Ethier CR, Kamm RD, Palaszewski BA, Johnson MC, Richardson TM. Calculations of flow resistance in the juxtacanalicular meshwork. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 1986;27(12):1741-50. Epub 1986/12/01.
237. Gottanka J, Johnson DH, Martus P, Lutjen-Drecoll E. Severity of optic nerve damage in eyes with POAG is correlated with changes in the trabecular meshwork. *J Glaucoma*. 1997;6(2):123-32. Epub 1997/04/01.
238. Gottanka J, Johnson DH, Martus P, Lutjen-Drecoll E. Beta-adrenergic blocker therapy and the trabecular meshwork. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol*. 2001;239(2):138-44. Epub 2001/05/25.
239. Rohen JW, Lutjen-Drecoll E, Flugel C, Meyer M, Grierson I. Ultrastructure of the trabecular meshwork in untreated cases of primary open-angle glaucoma (POAG). *Exp Eye Res*. 1993;56(6):683-92. Epub 1993/06/01.
240. Picht G, Welge-Luessen U, Grehn F, Lutjen-Drecoll E. Transforming growth factor beta 2 levels in the aqueous humor in different types of glaucoma and the relation to filtering bleb development. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol*. 2001;239(3):199-207. Epub 2001/06/19.
241. Tripathi RC, Li J, Chan WF, Tripathi BJ. Aqueous humor in glaucomatous eyes contains an increased level of TGF-beta 2. *Exp Eye Res*. 1994;59(6):723-7. Epub 1994/12/01.
242. Yu AL, Birke K, Moriniere J, Welge-Lussen U. TGF- β 2 induces senescence-associated changes in human trabecular meshwork cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2010;51(11):5718-23. Epub 2010/06/18.
243. Welge-Lussen U, May CA, Lutjen-Drecoll E. Induction of tissue transglutaminase in the trabecular meshwork by TGF-beta1 and TGF-beta2. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2000;41(8):2229-38. Epub 2000/07/13.
244. Luna C, Li G, Qiu J, Epstein DL, Gonzalez P. Role of miR-29b on the regulation of the extracellular matrix in human trabecular meshwork cells under chronic oxidative stress. *Mol Vis*. 2009;15:2488-97. Epub 2009/12/04.
245. Challa P. Glaucoma genetics. *Int Ophthalmol Clin*. 2008;48(4):73-94. Epub 2008/10/22.

246. Stone EM, Fingert JH, Alward WL, Nguyen TD, Polansky JR, Sunden SL, et al. Identification of a gene that causes primary open angle glaucoma. *Science*. 1997;275(5300):668-70. Epub 1997/01/31.
247. Joe MK, Sohn S, Hur W, Moon Y, Choi YR, Kee C. Accumulation of mutant myocilins in ER leads to ER stress and potential cytotoxicity in human trabecular meshwork cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 2003;312(3):592-600. Epub 2003/12/19.
248. Jacobson N, Andrews M, Shepard AR, Nishimura D, Searby C, Fingert JH, et al. Non-secretion of mutant proteins of the glaucoma gene myocilin in cultured trabecular meshwork cells and in aqueous humor. *Hum Mol Genet*. 2001;10(2):117-25. Epub 2001/01/12.
249. Wiggs JL, Vollrath D. Molecular and clinical evaluation of a patient hemizygous for TIGR/MYOC. *Arch Ophthalmol*. 2001;119(11):1674-8. Epub 2001/11/16.
250. Kersey JP, Broadway DC. Corticosteroid-induced glaucoma: a review of the literature. *Eye (Lond)*. 2006;20(4):407-16. Epub 2005/05/07.
251. Rezaie T, Child A, Hitchings R, Brice G, Miller L, Coca-Prados M, et al. Adult-onset primary open-angle glaucoma caused by mutations in optineurin. *Science*. 2002;295(5557):1077-9. Epub 2002/02/09.
252. Aung T, Rezaie T, Okada K, Viswanathan AC, Child AH, Brice G, et al. Clinical features and course of patients with glaucoma with the E50K mutation in the optineurin gene. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2005;46(8):2816-22. Epub 2005/07/27.
253. Yang J, Patil RV, Yu H, Gordon M, Wax MB. T cell subsets and sIL-2R/IL-2 levels in patients with glaucoma. *Am J Ophthalmol*. 2001;131(4):421-6. Epub 2001/04/09.
254. Naumann GO, Schlotzer-Schrehardt U, Kuchle M. Pseudoexfoliation syndrome for the comprehensive ophthalmologist. Intraocular and systemic manifestations. *Ophthalmology*. 1998;105(6):951-68. Epub 1998/06/17.
255. Ritch R, Shields MB. *The Secondary glaucomas*. St. Louis: C.V. Mosby; 1982. xii, 429 p. p.
256. Epstein DL, Freddo TF, Anderson PJ, Patterson MM, Bassett-Chu S. Experimental obstruction to aqueous outflow by pigment particles in living monkeys. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 1986;27(3):387-95. Epub 1986/03/01.
257. Weinreb RN. Uveoscleral outflow: the other outflow pathway. *J Glaucoma*. 2000;9(5):343-5. Epub 2000/10/20.
258. Gatton DD, Sagara T, Lindsey JD, Gabelt BT, Kaufman PL, Weinreb RN. Increased matrix metalloproteinases 1, 2, and 3 in the monkey uveoscleral outflow pathway after topical prostaglandin F(2 alpha)-isopropyl ester treatment. *Arch Ophthalmol*. 2001;119(8):1165-70. Epub 2001/08/14.
259. Sagara T, Gatton DD, Lindsey JD, Gabelt BT, Kaufman PL, Weinreb RN. Topical prostaglandin F2alpha treatment reduces collagen types I, III, and IV in the monkey uveoscleral outflow pathway. *Arch Ophthalmol*. 1999;117(6):794-801. Epub 1999/06/16.
260. Kaufman PL, Alm A, Adler FH. *Adler's physiology of the eye : clinical application*. 10th ed. St. Louis: Mosby; 2003. xvii, 876 p. p.
261. Alvarado JA, Katz LJ, Trivedi S, Shiferia AS. Monocyte modulation of aqueous outflow and recruitment to the trabecular meshwork following selective laser trabeculoplasty. *Arch Ophthalmol*. 2010;128(6):731-7. Epub 2010/06/16.
262. Odberg T, Sandvik L. The medium and long-term efficacy of primary argon laser trabeculoplasty in avoiding topical medication in open angle glaucoma. *Acta ophthalmologica Scandinavica*. 1999;77(2):176-81. Epub 1999/05/13.

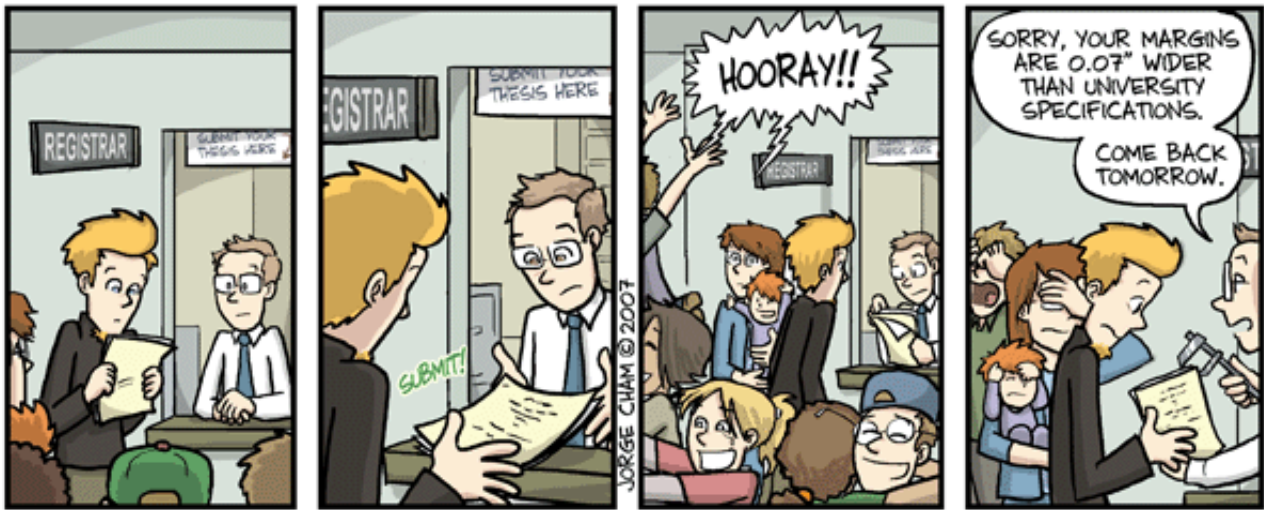
263. Grayson DK, Ritch R, Camras C, Lustgarten JS, Podos SM. Influence of treatment protocol on the long-term efficacy of argon laser trabeculoplasty. *J Glaucoma*. 1993;2(1):7-12. Epub 1993/04/01.
264. Gedde SJ, Schiffman JC, Feuer WJ, Herndon LW, Brandt JD, Budenz DL. Treatment outcomes in the Tube Versus Trabeculectomy (TVT) study after five years of follow-up. *Am J Ophthalmol*. 2012;153(5):789-803 e2. Epub 2012/01/17.
265. Idelson M, Alper R, Obolensky A, Ben-Shushan E, Hemo I, Yachimovich-Cohen N, et al. Directed differentiation of human embryonic stem cells into functional retinal pigment epithelium cells. *Cell Stem Cell*. 2009;5(4):396-408. Epub 2009/10/03.
266. Levin LA, Ritch R, Richards JE, Borrás T. Stem cell therapy for ocular disorders. *Arch Ophthalmol*. 2004;122(4):621-7. Epub 2004/04/14.
267. Marchetti V, Krohne TU, Friedlander DF, Friedlander M. Stemming vision loss with stem cells. *J Clin Invest*. 2010;120(9):3012-21. Epub 2010/09/03.
268. Secker GA, Daniels JT. Limbal epithelial stem cells of the cornea. *StemBook*. Cambridge (MA)2008.
269. Takacs L, Toth E, Berta A, Vereb G. Stem cells of the adult cornea: from cytometric markers to therapeutic applications. *Cytometry A*. 2009;75(1):54-66. Epub 2008/12/04.
270. Pellegrini G, Golisano O, Paterna P, Lambiase A, Bonini S, Rama P, et al. Location and clonal analysis of stem cells and their differentiated progeny in the human ocular surface. *The Journal of cell biology*. 1999;145(4):769-82. Epub 1999/05/20.
271. Holland EJ, Schwartz GS. The evolution of epithelial transplantation for severe ocular surface disease and a proposed classification system. *Cornea*. 1996;15(6):549-56. Epub 1996/11/01.
272. Pellegrini G, Traverso CE, Franzi AT, Zingirian M, Cancedda R, De Luca M. Long-term restoration of damaged corneal surfaces with autologous cultivated corneal epithelium. *Lancet*. 1997;349(9057):990-3. Epub 1997/04/05.
273. Jeganathan VS, Palanisamy M. Treatment viability of stem cells in ophthalmology. *Curr Opin Ophthalmol*. 2010;21(3):213-7. Epub 2010/04/16.
274. Ohta K, Ito A, Tanaka H. Neuronal stem/progenitor cells in the vertebrate eye. *Dev Growth Differ*. 2008;50(4):253-9. Epub 2008/03/14.
275. Xu H, Sta Iglesia DD, Kielczewski JL, Valenta DF, Pease ME, Zack DJ, et al. Characteristics of progenitor cells derived from adult ciliary body in mouse, rat, and human eyes. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2007;48(4):1674-82. Epub 2007/03/29.
276. Kelley MJ, Rose AY, Keller KE, Hessle H, Samples JR, Acott TS. Stem cells in the trabecular meshwork: present and future promises. *Exp Eye Res*. 2009;88(4):747-51. Epub 2008/12/09.
277. Abe T, Yoshida M, Yoshioka Y, Wakusawa R, Tokita-Ishikawa Y, Seto H, et al. Iris pigment epithelial cell transplantation for degenerative retinal diseases. *Prog Retin Eye Res*. 2007;26(3):302-21. Epub 2007/02/28.
278. Hu DN, Ritch R, McCormick SA, Pelton-Henrion K. Isolation and cultivation of human iris pigment epithelium. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 1992;33(8):2443-53. Epub 1992/07/01.
279. Abdouh M, Bernier G. In vivo reactivation of a quiescent cell population located in the ocular ciliary body of adult mammals. *Exp Eye Res*. 2006;83(1):153-64. Epub 2006/03/28.

280. Gonzalez P, Epstein DL, Luna C, Liton PB. Characterization of free-floating spheres from human trabecular meshwork (HTM) cell culture in vitro. *Exp Eye Res.* 2006;82(6):959-67. Epub 2005/11/29.
281. Martino G, Pluchino S. The therapeutic potential of neural stem cells. *Nat Rev Neurosci.* 2006;7(5):395-406. Epub 2006/06/09.
282. MacNeil A, Pearson RA, MacLaren RE, Smith AJ, Sowden JC, Ali RR. Comparative analysis of progenitor cells isolated from the iris, pars plana, and ciliary body of the adult porcine eye. *Stem Cells.* 2007;25(10):2430-8. Epub 2007/06/30.
283. Sun G, Asami M, Ohta H, Kosaka J, Kosaka M. Retinal stem/progenitor properties of iris pigment epithelial cells. *Dev Biol.* 2006;289(1):243-52. Epub 2005/11/29.
284. Asami M, Sun G, Yamaguchi M, Kosaka M. Multipotent cells from mammalian iris pigment epithelium. *Dev Biol.* 2007;304(1):433-46. Epub 2007/01/24.
285. Abe T, Yoshida M, Tomita H, Kano T, Sato M, Wada Y, et al. Auto iris pigment epithelial cell transplantation in patients with age-related macular degeneration: short-term results. *Tohoku J Exp Med.* 2000;191(1):7-20. Epub 2000/07/15.
286. Sheridan CM, Mason S, Pattwell DM, Kent D, Grierson I, Williams R. Replacement of the RPE monolayer. *Eye (Lond).* 2009;23(10):1910-5. Epub 2009/01/27.
287. Ballios BG, Clarke L, Coles BL, Shoichet MS, Van Der Kooy D. The adult retinal stem cell is a rare cell in the ciliary epithelium whose progeny can differentiate into photoreceptors. *Biology open.* 2012;1(3):237-46. Epub 2012/12/06.
288. Del Debbio CB, Peng X, Xiong H, Ahmad I. Adult ciliary epithelial stem cells generate functional neurons and differentiate into both early and late born retinal neurons under non-cell autonomous influences. *BMC neuroscience.* 2013;14:130. Epub 2013/10/24.
289. Du Y, Roh DS, Mann MM, Funderburgh ML, Funderburgh JL, Schuman JS. Multipotent stem cells from trabecular meshwork become phagocytic TM cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2012;53(3):1566-75. Epub 2012/02/03.
290. Johnson TV, DeKorver NW, Levasseur VA, Osborne A, Tassoni A, Lorber B, et al. Identification of retinal ganglion cell neuroprotection conferred by platelet-derived growth factor through analysis of the mesenchymal stem cell secretome. *Brain : a journal of neurology.* 2014;137(Pt 2):503-19. Epub 2013/11/02.
291. Emre E, Yuksel N, Duruksu G, Pirhan D, Subasi C, Erman G, et al. Neuroprotective effects of intravitreally transplanted adipose tissue and bone marrow-derived mesenchymal stem cells in an experimental ocular hypertension model. *Cytotherapy.* 2015;17(5):543-59. Epub 2015/01/27.
292. Hsu YC, Lee DC, Chiu IM. Neural stem cells, neural progenitors, and neurotrophic factors. *Cell Transplant.* 2007;16(2):133-50. Epub 2007/05/04.
293. Madhavan L, Ourednik V, Ourednik J. Neural stem/progenitor cells initiate the formation of cellular networks that provide neuroprotection by growth factor-modulated antioxidant expression. *Stem Cells.* 2008;26(1):254-65. Epub 2007/10/27.
294. Bull ND, Irvine KA, Franklin RJ, Martin KR. Transplanted oligodendrocyte precursor cells reduce neurodegeneration in a model of glaucoma. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2009;50(9):4244-53. Epub 2009/04/10.
295. Johnson TV, Martin KR. Cell transplantation approaches to retinal ganglion cell neuroprotection in glaucoma. *Curr Opin Pharmacol.* 2013;13(1):78-82. Epub 2012/09/04.

296. Johnson TV, Bull ND, Hunt DP, Marina N, Tomarev SI, Martin KR. Neuroprotective effects of intravitreal mesenchymal stem cell transplantation in experimental glaucoma. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2010;51(4):2051-9. Epub 2009/11/26.
297. Yu S, Tanabe T, Dezawa M, Ishikawa H, Yoshimura N. Effects of bone marrow stromal cell injection in an experimental glaucoma model. *Biochem Biophys Res Commun*. 2006;344(4):1071-9. Epub 2006/04/29.
298. Zhao T, Li Y, Tang L, Fan F, Jiang B. Protective effects of human umbilical cord blood stem cell intravitreal transplantation against optic nerve injury in rats. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol*. 2011;249(7):1021-8. Epub 2011/03/02.
299. Zwart I, Hill AJ, Al-Allaf F, Shah M, Girdlestone J, Sanusi AB, et al. Umbilical cord blood mesenchymal stromal cells are neuroprotective and promote regeneration in a rat optic tract model. *Experimental neurology*. 2009;216(2):439-48. Epub 2009/03/26.
300. London A, Itskovich E, Benhar I, Kalchenko V, Mack M, Jung S, et al. Neuroprotection and progenitor cell renewal in the injured adult murine retina requires healing monocyte-derived macrophages. *The Journal of experimental medicine*. 2011;208(1):23-39. Epub 2011/01/12.
301. Roubex C, Godefroy D, Mias C, Sapienza A, Riancho L, Degardin J, et al. Intraocular pressure reduction and neuroprotection conferred by bone marrow-derived mesenchymal stem cells in an animal model of glaucoma. *Stem cell research & therapy*. 2015;6:177. Epub 2015/09/18.
302. Canadian Ophthalmological Society evidence-based clinical practice guidelines for the management of glaucoma in the adult eye. *Canadian journal of ophthalmology Journal canadien d'ophtalmologie*. 2009;44 Suppl 1:S7-93. Epub 2009/06/06.
303. Bouhenni RA, Dunmire J, Sewell A, Edward DP. Animal models of glaucoma. *Journal of biomedicine & biotechnology*. 2012;2012:692609. Epub 2012/06/06.
304. Alvarado JA, Alvarado RG, Yeh RF, Franse-Carman L, Marcellino GR, Brownstein MJ. A new insight into the cellular regulation of aqueous outflow: how trabecular meshwork endothelial cells drive a mechanism that regulates the permeability of Schlemm's canal endothelial cells. *The British journal of ophthalmology*. 2005;89(11):1500-5. Epub 2005/10/20.
305. Rudnicka AR, Mt-Isa S, Owen CG, Cook DG, Ashby D. Variations in primary open-angle glaucoma prevalence by age, gender, and race: a Bayesian meta-analysis. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2006;47(10):4254-61. Epub 2006/09/28.
306. Pekovic V, Hutchison CJ. Adult stem cell maintenance and tissue regeneration in the ageing context: the role for A-type lamins as intrinsic modulators of ageing in adult stem cells and their niches. *Journal of anatomy*. 2008;213(1):5-25. Epub 2008/07/22.
307. Sommer A, Tielsch JM, Katz J, Quigley HA, Gottsch JD, Javitt J, et al. Relationship between intraocular pressure and primary open angle glaucoma among white and black Americans. *The Baltimore Eye Survey*. *Arch Ophthalmol*. 1991;109(8):1090-5. Epub 1991/08/01.
308. Lachaine J, Hodge WG, Steffensen I, Murray C, Barnes D, Foerster V, et al. Prostaglandin analogues for ophthalmic use: a cost-effectiveness analysis. *Canadian journal of ophthalmology Journal canadien d'ophtalmologie*. 2008;43(1):33-41. Epub 2008/01/26.
309. Vass C, Hirn C, Sycha T, Findl O, Bauer P, Schmetterer L. Medical interventions for primary open angle glaucoma and ocular hypertension. *The Cochrane database of systematic reviews*. 2007(4):CD003167. Epub 2007/10/19.

310. Englert JA, Cox TA, Allingham RR, Shields MB. Argon vs diode laser trabeculoplasty. *Am J Ophthalmol*. 1997;124(5):627-31. Epub 1997/12/31.
311. Li N, Li XR, Yuan JQ. Effects of bone-marrow mesenchymal stem cells transplanted into vitreous cavity of rat injured by ischemia/reperfusion. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol*. 2009;247(4):503-14. Epub 2008/12/17.
312. Song L, Tuan RS. Transdifferentiation potential of human mesenchymal stem cells derived from bone marrow. *Faseb J*. 2004;18(9):980-2. Epub 2004/04/16.
313. Krabbe C, Zimmer J, Meyer M. Neural transdifferentiation of mesenchymal stem cells--a critical review. *APMIS : acta pathologica, microbiologica, et immunologica Scandinavica*. 2005;113(11-12):831-44. Epub 2006/02/17.
314. Sowden JC. Molecular and developmental mechanisms of anterior segment dysgenesis. *Eye (Lond)*. 2007;21(10):1310-8. Epub 2007/10/05.
315. Joe AW, Gregory-Evans K. Mesenchymal stem cells and potential applications in treating ocular disease. *Curr Eye Res*. 2010;35(11):941-52. Epub 2010/10/21.
316. Oh JY, Kim MK, Shin MS, Wee WR, Lee JH. Cytokine secretion by human mesenchymal stem cells cocultured with damaged corneal epithelial cells. *Cytokine*. 2009;46(1):100-3. Epub 2009/02/19.
317. Oh JY, Kim MK, Shin MS, Lee HJ, Ko JH, Wee WR, et al. The anti-inflammatory and anti-angiogenic role of mesenchymal stem cells in corneal wound healing following chemical injury. *Stem Cells*. 2008;26(4):1047-55. Epub 2008/01/15.
318. Wang S, Lu B, Girman S, Duan J, McFarland T, Zhang QS, et al. Non-invasive stem cell therapy in a rat model for retinal degeneration and vascular pathology. *PLoS One*. 2010;5(2):e9200. Epub 2010/02/20.
319. Pawitan JA. Prospect of stem cell conditioned medium in regenerative medicine. *BioMed research international*. 2014;2014:965849. Epub 2014/12/23.
320. Madrigal M, Rao KS, Riordan NH. A review of therapeutic effects of mesenchymal stem cell secretions and induction of secretory modification by different culture methods. *Journal of translational medicine*. 2014;12(1):260. Epub 2014/10/12.
321. Chalhoub N, Baker SJ. PTEN and the PI3-kinase pathway in cancer. *Annu Rev Pathol*. 2009;4:127-50. Epub 2008/09/05.
322. Ma Y, Xu Y, Xiao Z, Yang W, Zhang C, Song E, et al. Reconstruction of chemically burned rat corneal surface by bone marrow-derived human mesenchymal stem cells. *Stem Cells*. 2006;24(2):315-21. Epub 2005/08/20.
323. Webb JG, Shearer TW, Yates PW, Mukhin YV, Crosson CE. Bradykinin enhancement of PGE2 signalling in bovine trabecular meshwork cells. *Exp Eye Res*. 2003;76(3):283-9. Epub 2003/02/08.
324. Cracknell KP, Grierson I. Prostaglandin analogues in the anterior eye: their pressure lowering action and side effects. *Exp Eye Res*. 2009;88(4):786-91. Epub 2008/10/22.
325. Chazaud B. Macrophages: supportive cells for tissue repair and regeneration. *Immunobiology*. 2014;219(3):172-8. Epub 2013/10/02.
326. Ritter MR, Banin E, Moreno SK, Aguilar E, Dorrell MI, Friedlander M. Myeloid progenitors differentiate into microglia and promote vascular repair in a model of ischemic retinopathy. *J Clin Invest*. 2006;116(12):3266-76. Epub 2006/11/18.
327. Latina MA, Tumbocon JA. Selective laser trabeculoplasty: a new treatment option for open angle glaucoma. *Curr Opin Ophthalmol*. 2002;13(2):94-6. Epub 2002/03/07.

328. Werner S, Grose R. Regulation of wound healing by growth factors and cytokines. *Physiological reviews*. 2003;83(3):835-70. Epub 2003/07/05.
329. Uchi H, Igarashi A, Urabe K, Koga T, Nakayama J, Kawamori R, et al. Clinical efficacy of basic fibroblast growth factor (bFGF) for diabetic ulcer. *European journal of dermatology : EJD*. 2009;19(5):461-8. Epub 2009/07/30.
330. Freeman BJ, Roberts MS, Vogler CA, Nicholes A, Hofling AA, Sands MS. Behavior and therapeutic efficacy of beta-glucuronidase-positive mononuclear phagocytes in a murine model of mucopolysaccharidosis type VII. *Blood*. 1999;94(6):2142-50. Epub 1999/09/09.
331. Lu YZ, Lin CH, Cheng FC, Hsueh CM. Molecular mechanisms responsible for microglia-derived protection of Sprague-Dawley rat brain cells during in vitro ischemia. *Neurosci Lett*. 2005;373(2):159-64. Epub 2004/11/30.
332. Shimojo M, Nakajima K, Takei N, Hamanoue M, Kohsaka S. Production of basic fibroblast growth factor in cultured rat brain microglia. *Neurosci Lett*. 1991;123(2):229-31. Epub 1991/02/25.
333. Nagai A, Nakagawa E, Hatori K, Choi HB, McLarnon JG, Lee MA, et al. Generation and characterization of immortalized human microglial cell lines: expression of cytokines and chemokines. *Neurobiol Dis*. 2001;8(6):1057-68. Epub 2001/12/14.
334. Sapienza P, Joyal JS, Rivera JC, Kermorvant-Duchemin E, Sennlaub F, Hardy P, et al. Retinopathy of prematurity: understanding ischemic retinal vasculopathies at an extreme of life. *J Clin Invest*. 2010;120(9):3022-32. Epub 2010/09/03.
335. Ankrum J, Karp JM. Mesenchymal stem cell therapy: Two steps forward, one step back. *Trends in molecular medicine*. 2010;16(5):203-9. Epub 2010/03/26.
336. Losi P, Briganti E, Errico C, Lisella A, Sanguinetti E, Chiellini F, et al. Fibrin-based scaffold incorporating VEGF- and bFGF-loaded nanoparticles stimulates wound healing in diabetic mice. *Acta biomaterialia*. 2013;9(8):7814-21. Epub 2013/04/23.
337. Lazarous DF, Shou M, Stiber JA, Dadhanian DM, Thirumurti V, Hodge E, et al. Pharmacodynamics of basic fibroblast growth factor: route of administration determines myocardial and systemic distribution. *Cardiovascular research*. 1997;36(1):78-85. Epub 1998/02/12.
338. Mermoud A, Baerveldt G, Minckler DS, Prata JA, Jr., Rao NA. Aqueous humor dynamics in rats. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol*. 1996;234 Suppl 1:S198-203. Epub 1996/08/01.
339. Machado Cde V, Telles PD, Nascimento IL. Immunological characteristics of mesenchymal stem cells. *Revista brasileira de hematologia e hemoterapia*. 2013;35(1):62-7. Epub 2013/04/13.
340. Ryan JM, Barry FP, Murphy JM, Mahon BP. Mesenchymal stem cells avoid allogeneic rejection. *J Inflamm (Lond)*. 2005;2:8. Epub 2005/07/28.
341. Kim EJ, Kim N, Cho SG. The potential use of mesenchymal stem cells in hematopoietic stem cell transplantation. *Experimental & molecular medicine*. 2013;45:e2. Epub 2013/01/12.
342. Streilein JW. Ocular immune privilege: the eye takes a dim but practical view of immunity and inflammation. *Journal of leukocyte biology*. 2003;74(2):179-85. Epub 2003/07/30.



WWW.PHDCOMICS.COM

Tiré de www.phdcomics.com

