

Université de Montréal

**La thérapie cellulaire à l'aide des cellules souches mésenchymateuses**

*La livraison non-invasive pour guérir le myocarde infarci.*

*Par*

Celia SID-OTMANE

Département de pharmacologie et physiologie, Faculté de médecine

Thèse présentée en vue de l'obtention du grade de Doctorat

En pharmacologie

Décembre 2019

© Celia SID-OTMANE, 2019



Université de Montréal

Département de pharmacologie et physiologie. Faculté de Médecine.

---

*Cette thèse intitulée*

**La thérapie cellulaire à l'aide des cellules souches mésenchymateuses**

La livraison non-invasive pour guérir le myocarde infarcté

*Présenté par*

**Celia SID-OTMANE**

*A été évalué(e) par un jury composé des personnes suivantes*

**Guy Rousseau**

Président-rapporteur

**Hung Q Ly**

Directeur de recherche

**Samer Mansour**

Membre du jury

**Nicoletta Eliopoulos**

Examineur externe



## Résumé

La thérapie cellulaire est au centre de la médecine régénérative, une nouvelle avenue thérapeutique en constante évolution depuis les 2 dernières décennies, particulièrement pour les maladies touchant les organes avec très faible potentiel de régénération. Parmi les nombreuses populations de cellules souches identifiées jusqu'à présent, les cellules souches mésenchymateuses (MSC) offrent plusieurs avantages, notamment en cardiopathie ischémique. Les MSC originalement isolées de la moelle osseuse (MO) sont à présent isolées de plusieurs autres organes dont le tissu adipeux (cellules souches mésenchymateuses dérivées du tissu adipeux ASC), un organe facile d'accès et disponible en grande quantité chez l'humain. Les évidences précliniques et cliniques des MSC et ASC pointent vers une efficacité thérapeutique qui demeure limitée et nécessite une optimisation pour atteindre le potentiel de guérison et de réparation myocardique post injure ischémique. Malgré un potentiel de différenciation *in vitro* et *in vivo*, l'effet thérapeutique des cellules souches est lié aux nombreux médiateurs constituant leur sécrétome. Ainsi, afin d'optimiser l'impact thérapeutique, plusieurs méthodes ont été utilisées pour enrichir le sécrétome. Une de ces méthodes est la culture des cellules souches sous forme 3-D. Nous avons donc testé le potentiel thérapeutique des ASC sous forme de monocouche (ML pour Monolayer) et sous forme de sphéroïdes (SB pour spheroid bodies) dans deux modèles animaux différents. Ceci a été fait en testant l'efficacité d'une transplantation à distance sous cutanée. En utilisant un modèle de péritonite, les ASC sous forme SB et ML ont démontré un effet antiinflammatoire en réduisant l'infiltration de cellules inflammatoires, plus spécifiquement les neutrophiles et les macrophages. Dans un modèle d'ischémie reperfusion (I/R) du myocarde chez le rat, les ASC sous forme ML et SB ont diminué la cicatrice du myocarde. Les deux formes injectées ont réduit la présence de macrophages dans le myocarde, augmenté les cellules progénitrices endogènes c-kit<sup>+</sup> ainsi que la densité vasculaire. Les SB ont démontré un impact plus significatif sur certains paramètres évalués tels la densité vasculaire et le recrutement de cellules progénitrices endogènes c-kit<sup>+</sup>. En conclusion, ces deux études ont permis de démontrer un

potentiel pro-guérison des cellules souches, par l'entremise d'un effet endocrinien anti-inflammatoire.

**Mots-clés** : Cellules souches adipeuses, sphéroïde, inflammation, thérapie, endocrine, ischémie-reperfusion du myocarde.

## Abstract

The therapeutic potential of regenerative medicine and cell-based strategies have been in constant evolution for the last 2 decades, especially for the repair and healing of organs with minimal regenerative capacity such as the heart. Mesenchymal stem cells (MSC) represent a population of stem cells with great advantages. First isolated from bone marrow, they can now be readily isolated from different organs including adipose tissue. Adipose derived stem cells (ASC) are easily accessible, which is of great interest for clinical application. Beside their differentiation potential, the main therapeutic impact attributed to MSC and ASC has been through their secreted mediators i.e. via a paracrine phenomenon. Different strategies have been used to enhance the therapeutic impact of ASC, one of which consists of enriching the latter's secretome by producing 3-D structures such as spheroid bodies. Monolayer (ML) and spheroid bodies (SB) were both used in two different animal models through remote (subcutaneous) transplantation. First, on a rat peritonitis model that proved that subcutaneous injection of the two forms reduced inflammation through decreased neutrophil and macrophage infiltration. Second, ML and SB were remotely transplanted on a rat myocardial ischemia reperfusion (I/R) model. The two forms reduced infarct scar, reduced macrophages, increased endogenous progenitor c-kit<sup>+</sup> cells and enhanced vascular density in the infarct and peri-infarct area. SBs showed better impact on vascularization and endogenous progenitor cells recruitment compared to ML. Briefly, our studies demonstrated the efficacy of a remote ASC transplantation through an endocrine-like effect against inflammation, collagen deposition and vascularization.

**Keywords** : Adipose Stem Cells, Spheroid bodies, Inflammation, Therapeutic, Endocrine, myocardial ischemia-reperfusion.

# Table des matières

<b>Résumé.....</b>	<b>5</b>
<b>Abstract.....</b>	<b>7</b>
<b>Table des matières.....</b>	<b>8</b>
<b>Liste des tableaux.....</b>	<b>12</b>
<b>Liste des figures.....</b>	<b>13</b>
<b>Liste des sigles et abréviations.....</b>	<b>14</b>
<b>Remerciements.....</b>	<b>19</b>
<b>Avant-Propos.....</b>	<b>21</b>
<b>Chapitre 1 : Les différents types de cellules pour la thérapie cellulaire.....</b>	<b>23</b>
<b>1.1 Cellules souches embryonnaires (ESC).....</b>	<b>24</b>
1.1.1 Découverte et historique.....	24
1.1.2 Caractéristiques.....	25
1.1.3 Usage clinique.....	25
<b>1.2 Cellules souches pluripotentes induites (iPSC).....</b>	<b>26</b>
1.2.1 Découverte et historique.....	26
1.2.2 Caractérisation.....	26
1.2.3 Usage clinique.....	27
<b>1.3 Cellules souches hématopoïétiques (HSC).....</b>	<b>29</b>
1.3.1 Découverte et historique.....	29
1.3.2 Caractérisation.....	29
1.3.3 Usage clinique.....	30
<b>1.4 Cellules souches mésenchymateuses (MSCs).....</b>	<b>32</b>
1.4.1 Découverte et historique.....	32
1.4.2 Caractérisation.....	32
1.4.3 Usage clinique.....	33
<b>1.5 Cellules souches mésenchymateuses adipeuses (ASCs).....</b>	<b>34</b>



1.5.1	Découverte et historique.....	34
1.5.2	Caractérisation .....	34
1.5.3	Usage clinique .....	35
<b>1.6</b>	<b>Cellules progénitrices cardiaques (CPC) .....</b>	<b>36</b>
1.6.1	Découverte et historique.....	36
1.6.2	Caractérisation .....	36
1.6.3	Usage clinique .....	37
<b>1.7</b>	<b>Les mécanismes de réparation/régénération du myocarde induit par les cellules souches mésenchymateuses.....</b>	<b>37</b>
<b>Chapitre 2 : Les cellules souches mésenchymateuses du tissu adipeux.....</b>		<b>39</b>
<b>2.1</b>	<b>Le tissu adipeux .....</b>	<b>39</b>
<b>2.2</b>	<b>La niche des ASCs .....</b>	<b>40</b>
<b>2.3</b>	<b>Différenciation des ASCs .....</b>	<b>43</b>
2.3.1	Mésoderme .....	43
2.3.2	Ectoderme .....	45
2.3.3	Endoderme .....	45
<b>2.4</b>	<b>Les facteurs responsables des effets trophiques.....</b>	<b>46</b>
2.4.1	Facteurs anti-inflammatoires .....	47
2.4.2	Facteurs de croissance .....	47
2.4.3	Cytokines .....	48
2.4.4	Exosomes.....	48
<b>2.5</b>	<b>Propriétés des cellules souches mésenchymateuses du tissu adipeux .....</b>	<b>49</b>
2.5.1	Angiogenèse .....	49
2.5.2	Immunorégulation.....	50
2.5.3	Apoptose .....	53
<b>Chapitre 3 : L'application clinique des cellules souches mésenchymateuses.....</b>		<b>55</b>
<b>3.1</b>	<b>Rejet du greffon aigu/chronique .....</b>	<b>55</b>
<b>3.2</b>	<b>Sclérose en Plaque (SEP) .....</b>	<b>56</b>
<b>3.3</b>	<b>Arthrose et Arthrite Rhumatoïde .....</b>	<b>57</b>
<b>3.4</b>	<b>Cardiopathies ischémiques.....</b>	<b>58</b>

<b>Chapitre 4 : Les enjeux de la transplantation de cellules souches.....</b>	<b>63</b>
4.1 La source.....	63
4.2 Le dosage.....	64
4.3 La méthode de livraison.....	64
4.4 La période d'administration.....	66
4.5 Méthode d'évaluation.....	67
4.6 Stratégies d'optimisation de l'efficacité thérapeutique des ASCs.....	68
4.6.1 Modification génétique.....	69
4.6.2 Préconditionnement protéique ou pharmacologique.....	70
4.6.3 Préconditionnement mécanique.....	70
<b>Chapitre 5 : L'inflammation.....</b>	<b>73</b>
5.1 Les principaux acteurs de l'inflammation.....	74
5.1.1 Les neutrophiles.....	74
5.1.2 Les monocytes.....	75
5.1.3 Les lymphocytes.....	75
5.2 L'implication de l'inflammation dans l'infarctus du myocarde.....	76
<b>Objectifs et hypothèses.....</b>	<b>81</b>
<b>Chapitre 6 : Manuscrit #1.....</b>	<b>83</b>
6.1 Mise en contexte.....	83
<b>Chapitre 7 : Manuscrit #2.....</b>	<b>111</b>
7.1 Mise en contexte.....	111
<b>Chapitre 8 : Manuscrit #3.....</b>	<b>143</b>
8.1 Mise en contexte.....	143
<b>Chapitre 9 : Discussion.....</b>	<b>183</b>
9.1 L'interrelation des ASCs avec les cellules inflammatoires.....	184
9.2 La stimulation de mécanismes de réparation endogènes.....	186

9.3	La thérapie cellulaire à l'ère de la 3-D.....	187
9.4	L'axe endocrinien pour la régénération du myocarde.....	189
9.5	Limitations.....	190
9.6	L'avenir de la thérapie cellulaire cardiaque .....	192
<b>Chapitre 10 : Conclusion.....</b>		<b>194</b>
<b>Références bibliographiques .....</b>		<b>195</b>
<b>Annexe 1 : Manuscrit #4.....</b>		<b>241</b>
	Mise en contexte.....	241

## Liste des tableaux

Tableau 1. Classification des cellules souches et progénitrices selon leur source et leur potentiel de différenciation.....	24
Tableau 2. Résumé des caractéristiques phénotypiques, clonales et des applications des MSCs de la MO et des ASCs.....	42
Tableau 3. Les cellules inflammatoires, leurs fonctions et les médiateurs relâchés lors de la réparation tissulaire.....	76

## Liste des figures

Figure 1.	Les cellules pluripotentes induites et leur utilité en thérapie cellulaire. ....	28
Figure 2.	Régulation et maintien des cellules souches hématopoïétiques (HSC) dans leurs niches dans la moelle osseuse. ....	31
Figure 3.	Composition du tissu adipeux et isolation des ASC à partir de liposuccion. ....	40
Figure 4.	Potentiel de différenciation des cellules souches mésenchymateuses. ....	46
Figure 5.	Les mécanismes d'immunorégulation des MSC/ASC impliquent les cellules de l'immunité innée et acquise. ....	53
Figure 6.	Les effets trophiques des cellules souches mésenchymateuses (MSC/ASC) suite à leur transplantation en cas d'infarctus du myocarde. ....	60
Figure 7.	Les enjeux clés à surmonter pour une translation efficace de la thérapie cellulaire vers la clinique. ....	68
Figure 8.	Les différents acteurs de l'inflammation post infarctus du myocarde. ....	79
Figure 9.	Résumé des objectifs des projets de thèse sur les différents modèles animaux utilisés. ....	82

## Liste des sigles et abréviations

Akt	Protéine kinase B
ARNm	ARN messenger
ASCs	Cellules souches mésenchymateuses dérivées du tissu adipeux
ATHENA	Autologous adipose-derived regenerative cells for refractory chronic myocardial ischemia with ventricular dysfunction.
ADIPOA	Adipose Derived Stromal Cells for OsteoArthritis
BAD	Bcl-2 antagonist of cell death
Bax	Bcl-2 associated x protein
Bcl-2	B-cell lymphoma 2
BDNF	Brain derived neurotrophic factor
BRCP	Breast cancer resistance protein
CADUCEUS	CARDiosphere-Derived aUtologous stem CELls to reverse ventricular dysfunction
C-CURE	Cardiopoietic stem cell therapy in heart failure
CD	Dendritic cell
CE	Endothelial cell
CM	Cardiomyocyte
CPC	Cardiac progenitor cell
CXCL4	CXC chemokine ligand 4
CXCR4	CXC chemokine receptor 4
DAMP	Danger associated molecular pattern

EAE	Encephalomyelitis
ECM	Extracellular matrix
ESC	Embryonic stem cell
FGF-2	Fibroblast growth factor 2
G-CSF	Granulocyte colony stimulating factor
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Hydrogen peroxide
HGF	Hepatocyte growth factor
HIF-1 $\alpha$	Hypoxia induced factor 1 $\alpha$
HLA	Human leukocyte antigen
HSC	Hematopoietic stem cell
ICAM	Intercellular adhesion molecule
IDO	Indolamine 2,3-dioxygenase
IFN $\gamma$	Interferon gamma
IGF-1	Insulin-like growth factor 1
IKK	I $\kappa$ B kinase
IL-6/8/10	interleukine 6/8/10
iNOS	Inducible nitric oxide synthase
iPSC	Induced pluripotent stem cell
Isl-1	Insulin gene enhancer protein 1
KLF4	Kruppel like factor

LIF	Leukemia inhibitory factor
M1	Macrophages pro-inflammatoires
M2	Macrophages anti-inflammatoires
MCP-1	Monocyte chemoattractant protein 1
MEF-2	Myocyte enhancer factor 2
MHC II	Major histocompatibility complex II
miARN	micro ARN
MK	Megakaryocyte
ML	Monocouche
MO-MSC	Cellules souches mésenchymateuses de la moelle osseuse
MPO	Myeloperoxidase
MyoD	Myoblast determination protein
NLR	Nod like receptor
NFκβ	Nuclear factor kappa beta
Oct-4	Octamer binding transcription factor 4
PDGF	Platelet derived growth factor
PGE2	Prostaglandin E2
PRECISE	Prospective Randomized trial of the optimal Evaluation of Cardiac Symptoms and Revascularization.
RAGE	Receptor for advanced glycation endproducts
ROS	Reactive oxygen species
SB	Spheroïd Bodies



SCF	Stem cell factor
Sca-1	Stem cell antigen 1
SDF1- $\alpha$	Stromal cell derived factor 1 $\alpha$
SEP	Sclérose en plaque
$\alpha$ -SMA	$\alpha$ -smooth muscle actin
SNC	Système nerveux central
Sox-2	Sex determining region y box 2
SP	Side population
SSEA	Stage specific embryonic antigen
SVF	Stromal vascular fraction
TGF-B	Transforming growth factor beta
Th1/17	T helper 1/17
TLR	Toll like receptor
TNF $\alpha$	Tumor necrosis factor $\alpha$
Treg	Cellule T régulatrice
TSG-6	TNF $\alpha$ stimulated gene 6
VCAM	Vascular cell adhesion molecule
VEGF	Vascular endothelial growth factor
UCP-1	Uncoupling protein 1



## Remerciements

J'aimerais en premier lieu remercier mon directeur, Dr Hung Ly, pour son encouragement constant et son positivisme qui a certainement contribué à l'achèvement de cette thèse. J'aimerais également remercier particulièrement Natacha Duquette, pour sa grande disponibilité pour les chirurgies. Elle mérite toute ma gratitude pour le temps qu'elle m'a accordé, alors que le modèle animal exigeait 45 minutes d'attente par rat en ischémie. Malgré la pénibilité des semaines de 4 jours de chirurgies, je garde ces longues journées en souvenir pour les nombreuses discussions et les partages de moments de vie que nous avons eu.

J'aimerais également offrir ma reconnaissance à Marie-Élaine Clavet, une ressource importante pour tout ce qui a trait aux analyses histopathologiques. Plus qu'une référence en immunologie, je garderais en souvenir nos nombreux échanges thérapeutiques sur mon caractère si particulier! Un merci également à Valérie Pedneault-Gagnon, qui était là au tout début de mon doctorat et qui s'est notamment occupé de toute la caractérisation des cellules. Il me faudrait plus d'une page pour nommer tous ceux que j'ai côtoyé à l'institut et avec qui j'ai passé des moments agréables (Anthony, Louis, Emma, Nour, Dr Sirois).

En deuxième lieu, je voudrais remercier tous les membres du jury de thèse qui ont bien voulu consacrer du temps à la correction et à l'évaluation de cette thèse. Merci pour votre disponibilité.

Enfin, un merci chaleureux aux membres de mon entourage. À mes parents qui ont toujours valorisé les études et l'ambition, et qui n'ont jamais cessé de m'encourager. À ma copine/âme-sœur, bientôt Docteure également, Hasna Maachi, je n'aurais probablement pas été au bout de cette thèse si je ne savais pas que toi aussi, tu galérais à l'autre bout de Montréal pour finir la tienne. On en rira dans 10 ans de toute la détresse que nous avons partagé! Le meilleur pour la fin, je voudrais remercier mon cher et tendre mari, Dieu sait qu'il a dû payer les pots cassés d'une journée de laboratoire avec un ELISA ou un western qui ne donne ABSOLUMENT RIEN. Je le remercie pour sa patience, son dévouement et sa ténacité, tout ça à plus de 6000km de distance l'un de l'autre. On est bon, j'en suis fière. À présent, thèse finie, que la vraie vie commence!



## Avant-Propos

Le besoin de régénérer ou réparer un tissu lésé est plus que jamais au cœur des préoccupations scientifiques des dernières années, notamment pour contrer les maladies dégénératives, les maladies liées au vieillissement ou les défauts congénitaux. Il existe une limite thérapeutique à la défaillance d'un organe ayant peu ou pas de capacité de régénération tel que le cœur ou le pancréas. Une guérison totale n'est atteinte que par une transplantation d'organe, un processus compliqué par la faible disponibilité de donneurs et la limite immunologique liée à la possibilité de rejet (Bacakova et col., 2018).

Le prélèvement et l'usage de cellules différenciées pour le remplacement d'un tissu serait une solution efficiente et rapide, puisque ces cellules sont déjà organisées pour la production de matrice extracellulaire avec le phénotype désiré, et le fonctionnement biologique souhaité. Ces cellules peuvent provenir d'un donneur (allogénique) ou du patient lui-même (autologue), ce qui est préférable pour éviter le rejet par le système immunitaire et l'usage d'immunosuppresseurs. Toutefois, autre que pour le système hématopoïétique, la quantité de cellules pouvant être recueillie est faible et leur pouvoir d'expansion et de prolifération *in vitro* est restreint (Ikada, 2006). C'est suite à cette limitation que la science s'est tournée vers les cellules souches pour leur capacité de prolifération et de différenciation en un large spectre de phénotypes. La médecine régénérative a pris son envol ces dernières années avec la caractérisation du potentiel thérapeutique des cellules souches. Au stade préclinique, les preuves abondent pour différentes populations de cellules en partant des cellules souches embryonnaires pluripotentes, aux cellules souches multipotentes adultes qu'on peut retrouver dans plusieurs organes ou tissus (Bacakova et col., 2018).

Plusieurs essais cliniques ont vu le jour explorant les différentes populations de cellules souches. Les cellules souches mésenchymateuses (MSC) représentent la population de cellules faisant l'objet du plus grand nombre d'essais cliniques (Trounson & McDonald, 2015). Plusieurs résultats précliniques et cliniques ont permis d'accroître les données sur l'efficacité de traitements à base de MSC.

Leur faible immunogénicité permettant un usage allogénique, et leur influence trophique sur la réparation tissulaire les a rendues des candidates prometteuses pour une translation vers la recherche clinique. Les mécanismes d'action thérapeutiques explorés sont, soit le remplacement des cellules perdues par différenciation des MSC, ou par une activité paracrine procurant un pouvoir supplémentaire aux cellules encore présentes afin de promouvoir la guérison tissulaire. Les MSC sont impliquées dans plusieurs processus physiologiques et pathologiques tels que l'homéostasie cellulaire, le vieillissement et les maladies inflammatoires. Il existe une grande hétérogénéité dans la définition et la caractérisation des MSC et une grande variété de sources pour leur isolation (Bianco, 2014). Une combinaison de marqueurs et de caractéristiques physiques permet leur identification.

Le tissu adipeux représente une source attrayante de MSC grâce à une facilité d'accès et à une disponibilité en quantité sans grand inconfort imposé aux patients, comparativement à la moelle osseuse. Une grande variété de facteurs solubles est sécrétée par ces cellules constituant le sécrétome, qui est considéré comme principal acteur dans leur processus de guérison. Le rôle majeur prépondérant du sécrétome est confirmé tant par les données précliniques que cliniques (Mizuno et col., 2012). Il est important de préciser que ces fonctions paracrines ne sont pas encore optimisées dans les modèles animaux pour maximiser leurs effets thérapeutiques en clinique. Plusieurs défis doivent être adressés en recherche fondamentale et translationnelle afin de combler les lacunes quant à la description précise des cellules, l'enrichissement de leur sécrétome, la recherche de la dose efficace et sécuritaire, le moyen d'administration, la fenêtre de temps idéale pour leur transplantation, et leur survie dans le milieu d'accueil. Ces points seront abordés séquentiellement dans cette thèse.

# Chapitre 1 : Les différents types de cellules pour la thérapie cellulaire

Les dernières décennies ont permis d'acquérir un savoir important sur la thérapie cellulaire et les processus gouvernant le développement morphologique des tissus et organes, leur fonctionnement et leur réparation après une injure tissulaire. Une définition spécifique et précise des différents types cellulaires permettra de comprendre leurs propriétés.

Les cellules souches sont des unités d'organisation des systèmes biologiques responsables de la régénération et du développement des tissus et organes. Les cellules souches sont non différenciées avec un potentiel clonogénique, capables de s'auto-renouveler et de se différencier en multiples lignées cellulaires. La cellule souche diffère de la cellule progénitrice car cette dernière ne possède pas la capacité de s'auto-renouveler, en plus d'une différenciation limitée à un type cellulaire. En effet, les cellules souches peuvent être pluripotentes et générer toutes les cellules des trois lignées germinales (endoderme, mésoderme et ectoderme) alors qu'une cellule multipotente peut se différencier en plusieurs cellules sans la capacité de générer tous les tissus (Dulak et col., 2015). Les cellules souches proviennent principalement de 4 sources : le tissu embryonnaire, le tissu fœtal (soit du fœtus ou du cordon ombilical), le tissu adulte comme le tissu adipeux ou la moelle osseuse et les cellules somatiques différenciées puis reprogrammées génétiquement appelées cellules souches pluripotentes induites ou *induced pluripotent stem cells* (iPSC) (Tableau 1). La transplantation de cellules souches offre une alternative thérapeutique à plusieurs maladies et injures touchant des organes avec un faible potentiel de régénération.

**Tableau 1. Classification des cellules souches et progénitrices selon leur source et leur potentiel de différenciation.**

<b>Cellules souches</b>	Source	Potence
<b>Embryonnaires</b>	Blastocyte	Pluripotente
<b>Fœtales</b>	Fœtus, Placenta Cordon ombilical et sang du cordon	Multipotente Multipotente
<b>Adultes</b>	Moelle osseuse, tissu adipeux, derme, cœur, foie et plusieurs autres organes	Multipotente
<b>Induites</b>	Cellules somatiques différenciées	Pluripotente

## **1.1 Cellules souches embryonnaires (ESC)**

### **1.1.1 Découverte et historique**

Elles ont été isolées en premier de la masse cellulaire interne d'un blastocyte murin en 1981 (embryon de 5 jours) (Martin, 1981). L'étude extensive de ces cellules dérivées de la souris a permis, en 1998 de pouvoir isoler des cellules embryonnaires humaines à partir d'un lègue à la recherche, d'embryons obtenus par fertilisation in vitro (Hipp & Atala, 2008; Thomson et col., 1998). Leur découverte a soulevé des préoccupations au plan éthique avec des critiques des communautés religieuses, principalement sur la destruction d'embryons, considérés comme des entités humaines. Les États-Unis ont même limité la recherche sur les ESC en 2001 (Cyranski, 2018). Toutefois, la communauté scientifique a été emballée par l'ampleur de cette découverte et l'impact que cela pouvait avoir sur la compréhension du développement biologique, et sur la différenciation cellulaire, mais principalement sur la possibilité de modeler différentes maladies grâce à la manipulation de gènes ciblés sur cellules germinales (Robinton & Daley, 2012).



### 1.1.2 Caractéristiques

La première distinction caractéristique des ESC est leur auto-renouvellement sans limite ou leur immortalité, ressemblant d'ailleurs aux cellules cancéreuses. Elles sont caractérisées par leur capacité à générer des clones, une capacité reliée à l'activité de la télomérase. Il s'agit de cellules pluripotentes pouvant se différencier et générer n'importe quel tissu ou organe somatique du mésoderme, ectoderme ou endoderme. Elles sont identifiées par l'expression de l'antigène embryonnaire SSEA (stage-specific embryonic antigen) ainsi que des facteurs de transcription Nanog et oct-4 (octamer binding transcription factor) (Robinton & Daley, 2012).

### 1.1.3 Usage clinique

L'obstacle majeure à leur utilisation sécuritaire en clinique est la réaction immunitaire de rejet et la formation de tératome ou terato-carcinome *in vivo* (Trounson & McDonald, 2015). La première transplantation de ESC humaines a été faite sur un patient en octobre 2010, seulement 12 ans après la découverte des cellules, pour traiter une lésion de la colonne vertébrale. L'essai clinique a été parrainé par une compagnie en Californie (Geron) et a inclut 5 personnes. Aucun effet indésirable n'a été rapporté mais le manque d'amélioration physique a forcé la compagnie à abroger l'essai (Ilic & Ogilvie, 2017). La dégénérescence maculaire de la rétine est probablement la maladie qui va démontrer un certain succès des ESC en clinique. L'accessibilité à l'espace sous-rétinal avec des méthodes minimalement invasives, et l'immuno-privilege de cet espace fait de l'œil l'organe idéal pour recevoir un traitement à base de ESC humaines. De plus, la facilité de surveillance de la domiciliation cellulaire avec des méthodes non-invasives facilite leur usage dans ce domaine. Les résultats de suivi préliminaire sont positifs mais doivent être confirmés à plus long terme (Schwartz et col., 2012; W. K. Song et col., 2015). D'autres études cliniques sont également initiées pour le traitement du diabète de type 1, ainsi que pour traiter le parkinson

avec des neurones dérivés des ESC pour remplacer les neurones produisant la dopamine (Cyranoski, 2018; Ilic & Ogilvie, 2017).

## **1.2 Cellules souches pluripotentes induites (iPSC)**

### **1.2.1 Découverte et historique**

Leur découverte a été faite en 2006 par le Dr Yamanaka, lauréat du prix Nobel de médecine en 2012, et Takahashi (Takahashi & Yamanaka, 2006). Alors que le clonage par transfert de noyau d'une cellule somatique vers la cellule souche embryonnaire a encore fait face à des blocages éthiques, de larges connaissances ont été acquises quant aux mécanismes de pluripotence associés aux ESC. Ce progrès a donné lieu à la découverte des iPSC par les deux chercheurs. Ils ont ainsi co-exprimé 4 gènes dans des fibroblastes murins après un criblage de 24 gènes reliés à la pluripotence des ESC. Cette manipulation génétique permettant une reprogrammation a complètement chamboulé les idées fondamentales sur l'identité cellulaire. Cette capacité de reprogrammation cellulaire a ensuite été décrite pour plusieurs autres cellules humaines incluant les fibroblastes (I. H. Park et col., 2008), les cellules bêta du pancréas (Stadtfield et col., 2008), les cellules souches neurales (Eminli et col., 2008), les hépatocytes (Aoi et col., 2008), les keratinocytes (Maherali et col., 2008) et les cellules souches adipeuses (N. Sun et col., 2009).

### **1.2.2 Caractérisation**

Il s'agit d'une population de cellules pluripotentes obtenues suite à une co-expression des 4 facteurs de transcription OCT4, SOX2, KLF4 et C-MYC dans des fibroblastes murins adultes. En plus de ces quatre facteurs, plusieurs autres gènes liés à la pluripotence sont exprimés aux mêmes niveaux que les ESC incluant Nanog et SSEA1. Indépendamment de la méthode de dérivation

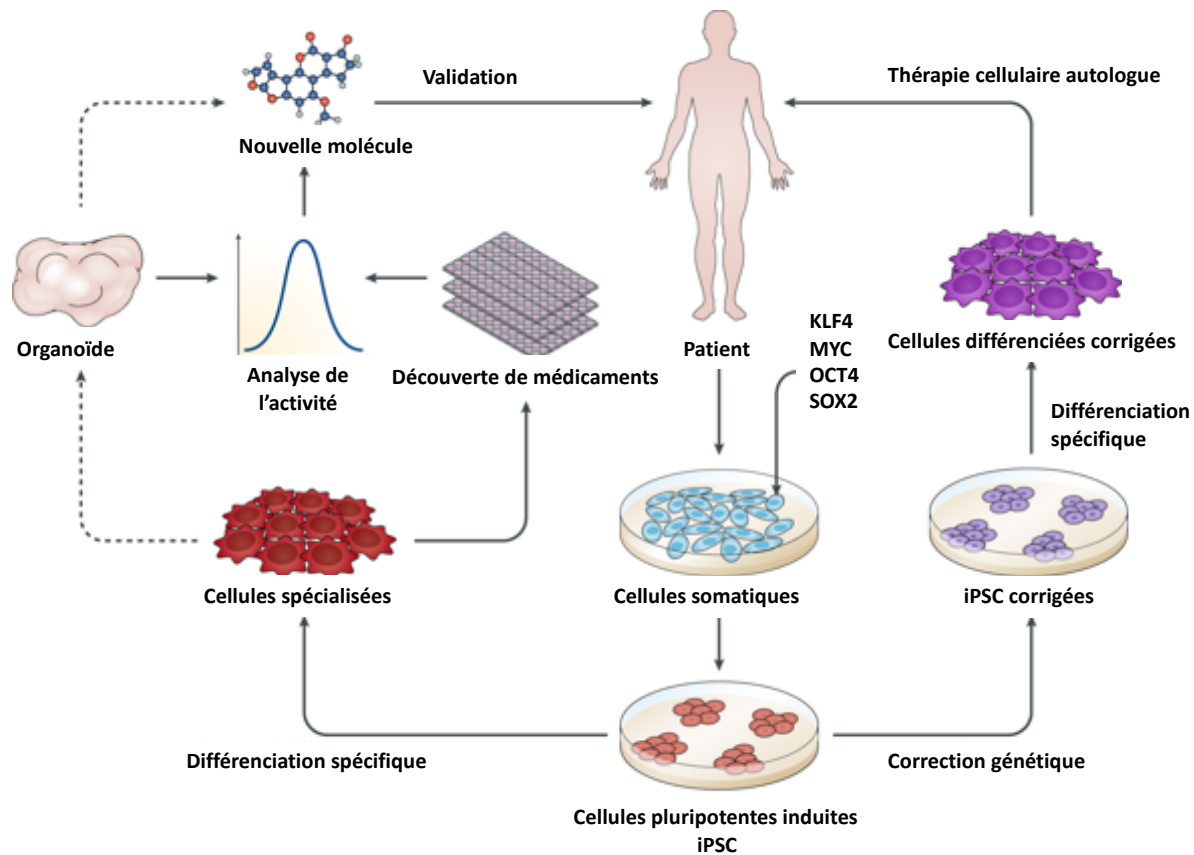
utilisée pour obtenir les iPSC, elles gardent les caractéristiques clés des ESC avec une capacité de prolifération sans limite, et le pouvoir de générer des cellules des trois couches embryonnaires germinales (Robinton & Daley, 2012). Une caractérisation minutieuse de leur génétique et de leur potentiel de différenciation est nécessaire pour l'appellation de « pluripotente ». Un des essais les plus fréquemment utilisés pour les iPSC humaines est la formation de tératome *in vivo*, où l'injection sous-cutanée ou intramusculaire dans une souris immunodéficente, produit des tumeurs caractérisées par des éléments des trois couches germinales, démontrant leur capacité de différenciation spontanée (Lensch et col., 2007). Les études subséquentes ont démontré qu'il existait des différences entre les iPSC et les ESC, notamment le fait que les iPSC gardaient une mémoire épigénétique reflétant l'origine de la cellule reprogrammée (K. Kim et col., 2010).

Les iPSC humaines sont depuis 2007 un outil indispensable dans le domaine de la biologie cellulaire et de la médecine régénérative (Figure 1). En fait, elles sont appliquées à présent pour modéliser plusieurs maladies et tester l'efficacité et la toxicité des médicaments *in vitro*. De plus, un grand avantage de cet usage vient de la possibilité d'utiliser des iPSC spécifiques provenant de patients avec des maladies spécifiques, dans un but ultime de développer la médecine personnalisée (Shi et col., 2017).

### **1.2.3 Usage clinique**

Le Dr Takahashi est le premier à avoir utilisé les iPSC en clinique pour traiter la dégénérescence maculaire. Les iPSC ont été différenciées en cellules d'épithélium pigmentaire de la rétine (retinal pigmented epithelial cells RPE) et une fine couche de cellules a été chirurgicalement transplantée sur un patient. Le suivi après un an a démontré des avantages thérapeutiques avec aucun effet néfaste (Mandai et col., 2017). L'essai clinique a été arrêté à cause de la découverte de mutations génétiques dans les iPSC du deuxième patient, mais devrait reprendre incessamment. D'autres essais cliniques sont entamés avec les iPSC pour traiter la dégénérescence maculaire, mais aussi le parkinson et les maladies cardiovasculaires sévères telle que l'insuffisance cardiaque sévère (Trounson & DeWitt, 2016). Cependant l'usage clinique des iPSC de façon routinière se bute à

l'obstacle principal de la tumorigénicité. Il est donc important de raffiner et procéder à un dépistage pour toute altération génique des produits dérivés des iPSC avant usage clinique (Lund et col., 2012).



**Figure 1. Les cellules pluripotentes induites et leur utilité en thérapie cellulaire.**

*La reprogrammation des cellules somatiques avec les 4 gènes KLF4, MYC, OCT4 et SOX2 induit la pluripotence. Une correction génétique sur les iPSC peut se faire si le patient a une maladie génétique. Leur différenciation après correction permet une transplantation autologue chez le même patient. Sinon, les cellules sont utilisées avec le gène délétère pour la découverte de nouvelles molécules et donc de nouvelles stratégies thérapeutiques. Adaptée de (Rowe & Daley, 2019).*

## **1.3 Cellules souches hématopoïétiques (HSC)**

### **1.3.1 Découverte et historique**

La découverte des HSC a débuté dans les années 60 avec des expériences de transplantation syngénique de moelle osseuse dans des souris irradiées (Ng & Alexander, 2017). Les chercheurs ont découvert que cette transplantation offrait une protection contre l'irradiation létale, en reconstituant le système hématopoïétique de la souris récipiendaire (Becker et col., 1963). Des colonies avec de multiples lignées hématopoïétiques dérivées du donneur ont été retrouvées dans la rate de la souris récipiendaire. Dans ces colonies, il y avait des cellules avec une capacité de générer différentes lignées cellulaires hématopoïétiques, et de s'auto-renouveler ; deux caractéristiques importantes dans l'identité des HSC (Siminovitch et col., 1963).

### **1.3.2 Caractérisation**

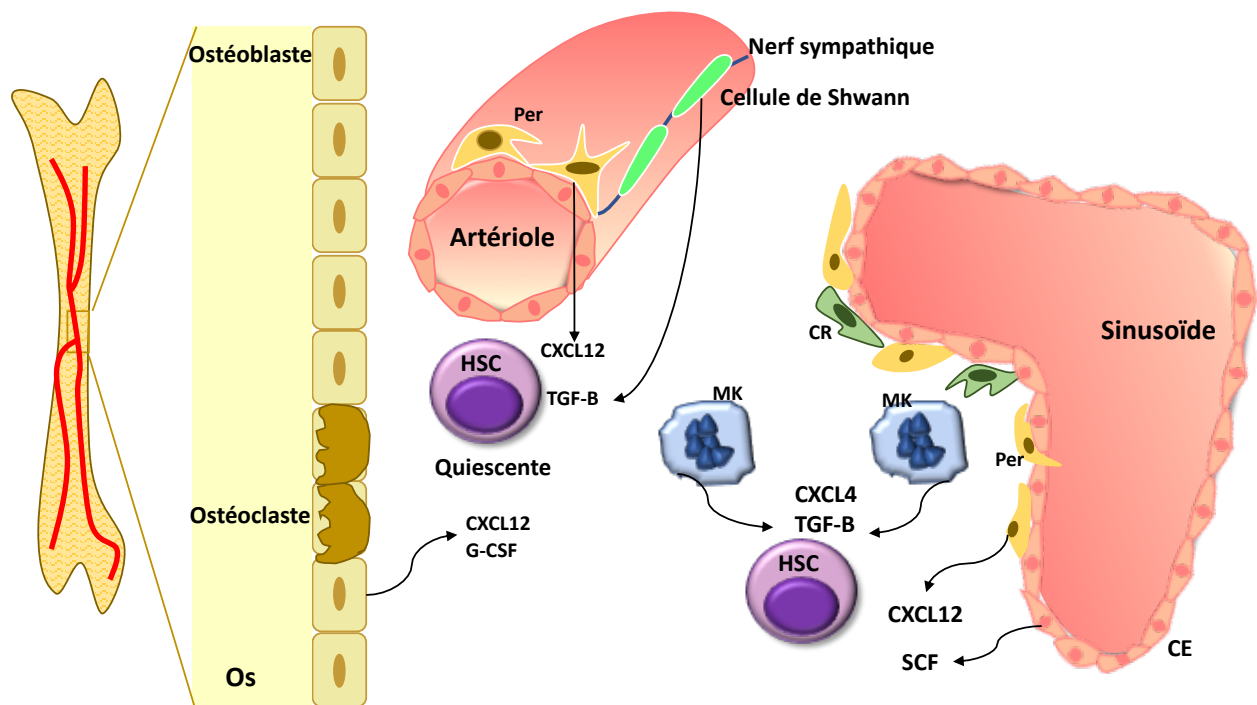
Des stratégies de séparation ont été requises pour pouvoir isoler les HSC des autres composants cellulaires de la moelle osseuse. Les HSC sont présentes dans la moelle osseuse à hauteur d'une cellule sur 10 000 (Ng & Alexander, 2017). Elles représentent la population la plus caractérisée, responsable de l'hématopoïèse avec la possibilité de générer tous les types cellulaires de la circulation périphérique incluant les érythrocytes, les leucocytes et les thrombocytes. Les études récentes démontrent que la majorité des HSC se retrouvent dans la région endostéale qui est très vascularisée (Nombela-Arrieta et col., 2013). Chez l'adulte, les HSC sont dans un état de quiescence, ce qui les protège de la génotoxicité et assure leur capacité de repopulation du système sanguin. Le microenvironnement est un facteur crucial pour réguler leur entrée dans le cycle cellulaire. De ce fait, il y a eu identification de deux niches HSC, soit la niche artériolaire et la niche mégacaryocyte du sinusoiide veineux (Figure 2) (Boulais & Frenette, 2015). La présence des cellules endothéliales et des péricytes au niveau des artérioles est primordial pour le maintien de leur état de quiescence avec sécrétion notamment du facteur de cellule souche SCF (stem cell

factor) (Calvi & Link, 2015). La présence des ostéoblastes est également importante dans la régulation des HSC dans l'endostéum avec la sécrétion de cytokines telles que le G-CSF (granulocyte colony stimulating factor), la thrombopoïétine, l'angiopoïétine et le CXCL12. La niche mégacaryocyte du sinusöide veineux est désignée ainsi à cause d'une présence accrue de mégacaryocytes. Chez la souris, 20% des HSC se retrouvent proches des mégacaryocytes (Bruns et col., 2014; Zhao et col., 2014). Ils secrètent le TGF- $\beta$  et le CXCL4 pour la rétention des HSC dans la niche et restreindre leur prolifération. La mobilisation des HSC vers la circulation périphérique est induite suite à une stimulation par des cytokines, la plus caractérisée étant le G-CSF. En bloquant l'expression de CXCL12 sur les cellules mésenchymateuses et endothéliales, le G-CSF empêche la liaison au CXCR4 des HSC et leur rétention dans la moelle (Calvi & Link, 2015).

### **1.3.3 Usage clinique**

Leur transplantation peut se faire de façon autologue ou allogénique sur des patients avec des maladies auto-immunes, ou pour reconstituer la lignée de cellules hématopoïétiques et le système de défense immunitaire, comme chez les patients cancéreux (Aggarwal et col., 2012). Isolées de la moelle osseuse, du sang de cordon ou mobilisées dans la circulation périphérique, elles sont utiles contre les maladies hématopoïétiques et génétiques incluant l'immunodéficience et l'anémie héréditaire (Munoz et col., 2014). L'application clinique de la thérapie cellulaire qui a démontré le plus de succès est avec les HSC avec plus de 50 ans d'usage. Toutefois, leur usage en cas de transplantation allogénique nécessite une thérapie immunosuppressive. Malgré l'usage d'immunosuppresseurs, il existe un taux de rejet significatif de 30 à 40% des transplantations allogéniques de HSC (Flowers & Martin, 2015). Au niveau cardiaque, l'application des cellules souches hématopoïétiques a d'abord concerné les cellules mononuclées de la moelle osseuse (mononuclear cells MNC), population hétérogène contenant aussi bien les HSC que les cellules progénitrices endothéliales, et les MSC. Les résultats des essais avec les MNC ont été contestables puisque les premières études n'ont pas montré d'effets supérieurs au niveau de la fonction ventriculaire sur des patient subissant un pontage aorto-coronarien (Hendrikx et col., 2006; Patila

et col., 2014). Le groupe de Perin et coll. n'a également pas démontré de différence dans un essai plus récent sur des patients en insuffisance cardiaque après un suivi de 6 mois (Perin et col., 2012). Un essai non randomisé a démontré une amélioration de la fraction d'éjection suite à l'injection intramyocardique de HSC purifiées CD133+. Toutefois, un essai randomisé avec un design plus rigoureux utilisant ces mêmes HSC CD133+ n'a pas montré d'efficacité supérieure (Nasseri et col., 2014), résultat confirmé par un autre essai en 2016 avec l'essai IMPACT-CABG (Noiseux et col., 2016).



**Figure 2. Régulation et maintien des cellules souches hématopoïétiques (HSC) dans leurs niches dans la moelle osseuse.**

*Les HSC quiescentes se retrouvent dans la niche endostéale à côté des artérioles où le CXCL12 sécrété par les péricytes et le TGF- $\beta$  sécrété par les cellules de Schwann permettent leur maintien en état de quiescence. La niche mégacaryocyte se situe proche du sinusoire avec présence accrue de mégacaryocytes qui sécrètent le CXCL4 et TGF- $\beta$  pour contrôler la prolifération des HSC, alors que les péricytes et les cellules endothéliales assurent leur rétention avec le CXCL12 et SCF respectivement. De plus, la niche mégacaryocyte contient des cellules réticulaires CXCL12 (CR) qui participent à la rétention des HSC.*

## 1.4 Cellules souches mésenchymateuses (MSCs)

### 1.4.1 Découverte et historique

Ces cellules ont été isolées en premier de la moelle osseuse (MO) par Friedenstein, il y a plus de 40 ans, à partir de culture de cellules de cochon d'Inde (Friedenstein et col., 1970; Friedenstein et col., 1968). Un essai *in vitro* développé par Friedenstein et ses collègues (colony forming units fibroblasts CFU-F) a démontré la formation de colonies à partir de ces cellules. Le groupe est également le premier à démontrer que ces cellules étaient multipotentes et pouvaient générer plusieurs tissus d'origine mésodermique. Dans les années 1980, leur différenciation en ostéoblastes, chondrocytes et adipocytes a été décrite alors que leur différenciation myogénique a été décrite dans les années 1990 (Caplan, 1991). À la fin des années 90, la capacité de générer des tissus dérivés de l'ectoderme a aussi été rapportée alors qu'en début du 21ème siècle, une différenciation en cellules dérivées de l'endoderme et en cardiomyocytes a été décrite (Sato et col., 2005; Toma et col., 2002). Leur rôle primordial dans la moelle osseuse est de contrôler la niche des HSC. Une ablation des MSC a été démontrée comme responsable d'une abrogation de l'hématopoïèse (Raaijmakers et col., 2010).

### 1.4.2 Caractérisation

La société internationale pour le développement des thérapies cellulaires et géniques s'est entendue pour caractériser les MSC en se basant principalement sur trois critères : 1) leur capacité à adhérer au plastique en culture standard et leur morphologie ressemblant aux fibroblastes, 2) leur différenciation *in vitro* en ostéoblastes, chondrocytes et adipocytes et 3) l'expression de marqueurs de surface tel le CD90, CD105 et CD73 et l'absence de CD11b ou CD14,



CD19 ou CD79a, CD34, CD45 et HLA-DR (Dominici et col., 2006). Ces marqueurs sont décrits pour les MSC humaines alors qu'il a été prouvé qu'il existait une différence dans l'expression de ces marqueurs pour les MSC murins (Peister et col., 2004). De plus, avec l'expansion *in vitro* de ces cellules, certains marqueurs disparaissent alors que d'autres sont ré-exprimés, ce qui ne permet pas de définition sans équivoque de MSC. Ces cellules sont bien tolérées en transplantation allogénique puisqu'elles n'expriment pas le complexe majeur d'histocompatibilité de classe II (MHC II), le B7 et le CD40.

Un avantage important des MSC est leurs propriétés immunomodulatrices grâce à la sécrétion de facteurs solubles et grâce également à une interaction avec le système immunitaire inné et acquis (Shi et col., 2018). La sécrétion de différents médiateurs comme la prostaglandine PGE2, l'indolamine-2,3-dioxygénase IDO, le VEGF, le HGF et le NO participe aux effets immunosuppresseurs des MSC. Cette caractéristique particulièrement appréciée pour l'application clinique de ces cellules dans plusieurs maladies caractérisées par l'inflammation, sera discutée plus profondément dans le chapitre suivant.

### **1.4.3 Usage clinique**

Les études préliminaires ont montré une efficacité des MSC sur les maladies de rejet de greffe résistant aux stéroïdes, la sclérose en plaques, la sclérose latérale amyotrophique et la maladie de Crohn. Depuis ces données préliminaires, une hausse considérable des études cliniques utilisant les MSC a été observée, particulièrement sur des patients atteints de maladies auto-immunes ou en post-transplantation d'organe (Girdlestone, 2016). L'immunosuppression systémique avec injection de MSC de la moelle osseuse à hauteur de 1 million/Kg a été indiquée pour l'allo-transplantation de rein, car elle permettait de diminuer le rejet et la fibrose chez le receveur d'organe (Reinders et col., 2013; Reinders et col., 2015). Les MSC ont souvent été utilisées pour contrer le rejet du greffon mais aussi dans des maladies caractérisées par l'inflammation telles que la maladie de Crohn ou l'arthrite rhumatoïde, et les maladies cardiovasculaires, un sujet exploré en profondeur ultérieurement (Caplan & Correa, 2011).

## **1.5 Cellules souches mésenchymateuses adipeuses (ASCs)**

### **1.5.1 Découverte et historique**

En 2001, le groupe de Zuk et coll. a découvert une population de cellules multipotentes dérivées de tissus adipeux issus de liposuccion dans le cadre de la chirurgie esthétique. Suite à une digestion enzymatique du tissu adipeux, il y a eu récolte d'une fraction stromale vasculaire contenant un mélange de cellules incluant les globules rouges, les fibroblastes, les cellules endothéliales, les cellules musculaires lisses, les péricytes et les pré-adipocytes. La mise en culture de cette fraction cellulaire aboutit à l'élimination de plusieurs composantes cellulaires au bout de 24h, et à l'isolement d'une fraction adhérente de cellules qui démontraient une multipotence. Le groupe a ensuite démontré le potentiel de différenciation cellulaire de cette fraction de cellules. Le terme ASC a ensuite été adopté (P. Zuk, 2013).

### **1.5.2 Caractérisation**

Il s'agit de cellules souches adultes qui ont l'avantage d'être disponible facilement dû à l'accessibilité et à l'espace occupé par le tissu adipeux dans le corps. Il a été rapporté que les cellules souches mésenchymateuses sont 500 fois plus présentes dans le tissu adipeux que dans la même quantité de MO (Mizuno et col., 2012). Elles partagent les mêmes caractéristiques que les MSC de la moelle osseuse en exprimant des marqueurs tels que CD29, CD73, CD105 ou CD90, mais aussi en ayant la propriété d'adhérer au plastique en culture et de se différencier en chondrocytes, ostéocytes et adipocytes en présence de facteurs précis. Elles ont une capacité à proliférer plus rapidement et à retarder leur entrée en sénescence comparées aux MSC de la MO (Bacakova et col., 2018). Plusieurs groupes ont également décrit une plus grande activité

paracrine avec une expression plus élevée de l'ARN messager (ARNm) de VEGF-D, IGF-1 et IL-8 que les MSC de la MO ou du derme (Hsiao et col., 2012). Le traitement de la lésion de la colonne vertébrale avec les ASC a été plus efficace que les MSC de la MO chez le rat grâce à une meilleure migration et prolifération cellulaire, en plus d'une sécrétion plus importante de VEGF, BDNF et HGF par ces cellules (Zhou et col., 2013).

### **1.5.3 Usage clinique**

Malgré leur découverte récente en 2002, l'application clinique de ces cellules est déjà en cours en commençant dans le domaine de la reconstruction tissulaire et de l'esthétique. En accompagnant le transplant de tissu adipeux avec des ASC, les chercheurs ont pu augmenter la survie du greffon et réduire son atrophie post-opératoire dans des chirurgies esthétiques (Kokai et col., 2014). Leur pouvoir immunorégulateur a mené à leur usage comme stratégie thérapeutique potentielle dans des maladies inflammatoires et auto-immunes telles que la maladie de Crohn ou la Sclérose en plaques. Plusieurs autres applications cliniques des ASC sont en cours notamment en reconstruction osseuse, suite à des réussites telle la reconstruction maxillaire et la guérison d'une blessure au crane (Bacakova et col., 2018). Malgré des données prometteuses en phase préclinique sur différents modèles animaux, leur usage dans le domaine de la lutte contre le cancer demeure incertain. Ceci est dû au risque qu'elles puissent agir de support à l'apparition ou la progression de tumeurs compte tenu de leur sécrétion d'agents bioactifs (Mohr & Zwacka, 2018). Les ASC ont également été utilisées sur des patients diabétiques avec ischémie des membres inférieurs, où des injections intramusculaires de cellules amélioraient la revascularisation et la cicatrisation de blessures sur ces membres (Bura et col., 2014; H. C. Lee et col., 2012). Finalement, les essais cliniques avec les ASC en cardiopathie ischémique seront discutés dans le chapitre suivant. Les applications cliniques des ASC suivent celles des MSC dû à leur grande similitude mais l'avantage de l'accessibilité des ASC permet d'envisager plus de résultats cliniques dans les prochaines années.

## **1.6 Cellules progénitrices cardiaques (CPC)**

### **1.6.1 Découverte et historique**

Traditionnellement, le cœur est considéré comme un organe post-mitotique sans propriété de régénération. Ce dogme a toutefois été déconstruit avec la découverte d'un renouvellement de cardiomyocytes dans le cœur (Bergmann et col., 2009). Le groupe de Beltrami a été le premier à découvrir des cellules c-kit positives dans le cœur, capables de se différencier en cardiomyocytes, cellules endothéliales et cellules musculaires lisses (Beltrami et col., 2003). Plusieurs populations de cellules souches et progénitrices cardiaques ont été décrites dans la dernière décennie- à savoir les cardiosphères, les cellules sca-1 positives, les cellules Isl-1 positives (insulin gene enhancer protein) et les cellules SP (side population) (Bearzi et col., 2007; Ellison et col., 2013).

### **1.6.2 Caractérisation**

Ces cellules sont principalement retrouvées dans l'apex et l'oreillette du myocarde. Elles sont capable d'auto-renouvellement, produisent des clones et sont multipotentes. Les cellules SP, chez les rongeurs, expriment sca-1, CD34 et sont négatives pour c-kit, CD31 et CD45 avec l'expression de facteurs d'expression cardiaques MEF-2C, GATA 4 et Nkx2-5 (Chamuleau et col., 2009; S. X. Liang et col., 2010). Chez l'humain, une étude a démontré l'existence d'un pool de SP exprimant la protéine BCRP (Breast Cancer resistant protein) associée au cancer du sein (Emmert et col., 2013). Les cellules c-kit positives expriment les facteurs de transcription Nkx2.5, GATA 4 et GATA 5. Malgré une apparente utilité thérapeutique de ces cellules, elles sont peu nombreuses, voire rares au sein du myocarde humain et leur différenciation génère des cardiomyocytes immatures et déficientes en régulation calcique (Miyamoto et col., 2010). Les cellules sca-1 positives sont isolées uniquement à partir du myocarde de la souris alors qu'aucun homologue n'a été découvert chez l'humain (van de

Rijn et col., 1989). Les cellules isl-1 positives n'expriment pas c-kit et sca-1, mais leur utilité thérapeutique est discutable puisque leur nombre décline rapidement après la naissance. Une expansion *in vitro* est toutefois possible avec la régulation de ligands FGF (Laugwitz et col., 2005). Les cardiosphères sont des îlots de cellules adhérentes isolées par le groupe de Messina de biopsies de l'oreillette et du ventricule de spécimens humains et murins. Elles expriment c-kit, sca-1, CD31 et CD34 (Messina et col., 2004).

### **1.6.3 Usage clinique**

L'effet des cellules c-kit positives est généralement associé à leurs effets paracrins. Toutefois, du point de vue bio-ingénierie, l'isolation de cellules souches à partir du myocarde demeure compliquée. Le groupe de Makkar a utilisé les cardiosphères sur des patients 2 à 4 semaines après un infarctus du myocarde (essai clinique CADUCEUS). L'infusion intra-coronarienne n'a pas montré d'effets néfastes majeures (Makkar et col., 2012). La cicatrice a été réduite de façon significative avec présence de nouveau tissu sain. Cependant, aucun effet sur la fraction d'éjection ou le volume télé diastolique n'a été rapporté. Ceci est probablement lié à la faible quantité de cellules infusées et à leur taux de survie limité. Un autre essai clinique (SCIPIO) a cette fois-ci utilisé les cellules souches cardiaques c-kit positives sur des patients avec ischémie cardiomyopathique. Après 4 mois, la fraction d'éjection a été améliorée de manière statistiquement significative à 38,5% par rapport à 30,3% avant l'infusion de cellules (Bolli et col., 2011). L'infusion intra-coronarienne de ces cellules autologues demeure ainsi une approche prometteuse pour réduire la taille de l'infarctus, contrôler le remodelage néfaste et rétablir la fonction systolique dans un état post-infarctus.

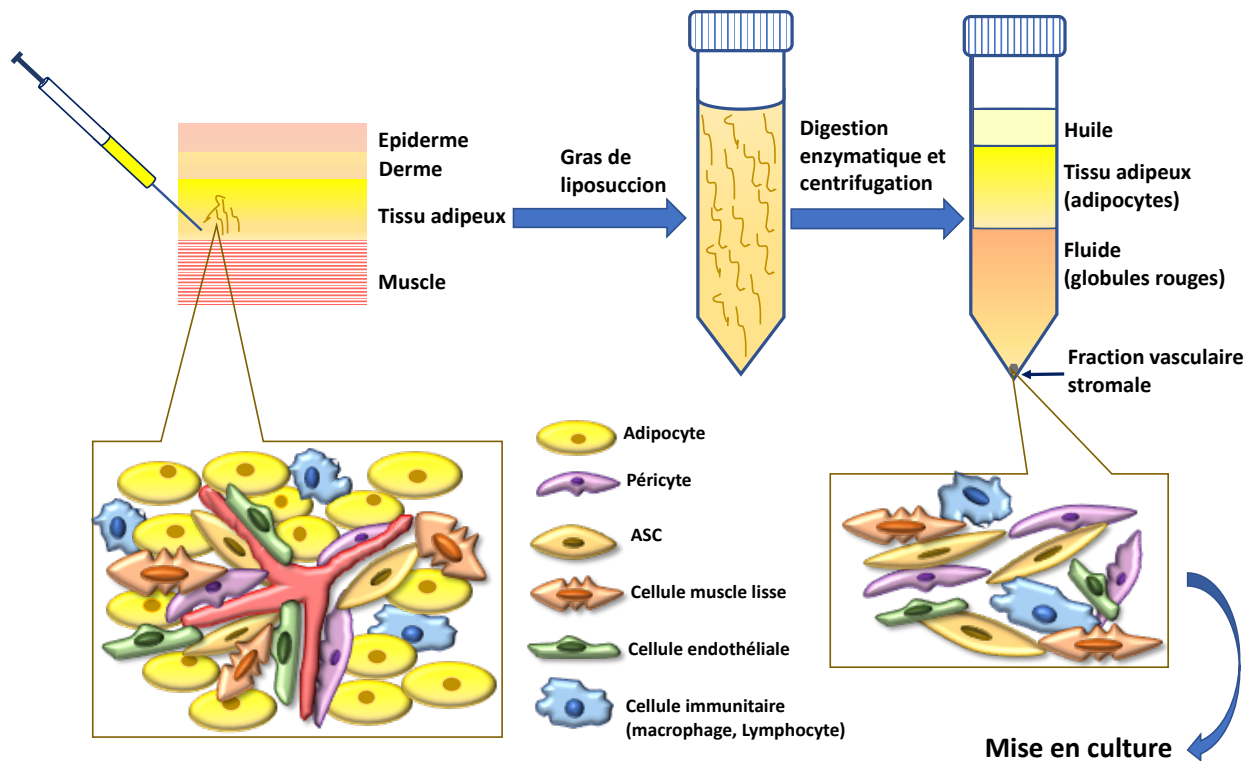
## **1.7 Les mécanismes de réparation/régénération du myocarde induit par les cellules souches mésenchymateuses**

Afin d'agir sur la réparation du tissu myocardique après injure ischémique, les cellules souches peuvent emprunter différents mécanismes. Le premier est relié à une de leurs propriétés intrinsèques, soit leur capacité de différenciation. Ainsi, pouvoir se différencier en cellules de lignée myogénique afin de remplacer les cellules perdues par apoptose et nécrose est un mécanisme de régénération. Un mécanisme de fusion avec les cardiomyocytes est également de mise dans certaines études (Noiseux et col., 2006). Toutefois, avec près d'un milliard de cellules perdues après l'injure ischémique, la différenciation et la contribution ultime au processus de réparation et de guérison des quelques millions de cellules souches transplantées demeurent minimes, surtout avec le faible taux de domiciliation reconnu. Le mécanisme parallèle et prépondérant à la différenciation et la fusion est plutôt relié à la sécrétion de facteurs induisant une action paracrine, et permettant de stimuler la réparation du tissu. Ces facteurs peuvent également agir en tant que messagers ou stimulateurs sur les cellules progénitrices endogènes pour les activer. Celles-ci peuvent à leur tour stimuler la réparation et/ou la guérison en induisant par exemple la vascularisation grâce à plusieurs facteurs. La néovascularisation est un mécanisme décisif impliqué dans la réparation myocardique après infarctus. Malgré la faible présence des cellules transplantées dans la structure vasculaire, plusieurs études ont montré une augmentation de la densité capillaire, suite à la transplantation de MSC ou du milieu de conditionnement (Bhang et col., 2014; J. H. Kim et col., 2013) prouvant que les cellules exerçaient un effet paracrin pro-angiogénique et arteriogénique. Les cellules souches transplantées ont également la possibilité de limiter l'apoptose des cardiomyocytes et des cellules vasculaires, et de faciliter la cicatrisation grâce à la production de plusieurs métalloprotéinases. Ainsi, grâce également à la relâche de facteurs impliqués dans la biogenèse de matrice extracellulaire, les MSC peuvent inhiber la fibrose (Mirotsov et col., 2011).

# Chapitre 2 : Les cellules souches mésenchymateuses du tissu adipeux.

## 2.1 Le tissu adipeux

Le tissu adipeux et son rôle physiologique n'étaient pas appréciés à leur juste mesure jusqu'à la découverte des adipokines, représentant toute protéine bioactive dérivée du tissu adipeux comme la leptine. À partir de ce moment, le tissu adipeux a été considéré comme un organe endocrinien. C'est un tissu qu'on retrouve distribué partout dans le corps humain incluant la moelle osseuse, les dépôts intra-articulaires, sous-cutanés et viscéraux, mais aussi sur des sites ectopiques intra hépatiques et intramusculaires (Trayhurn & Wood, 2005). Environ 90% du volume du tissu adipeux est constitué d'adipocytes et le reste représente la fraction vasculaire stromale (SVF) (Mizuno et col., 2012). Les adipocytes sont classifiés en adipocytes blancs ou bruns, tous deux sources d'énergie. Les blancs ont une fonction de sécrétion d'adipokines avec une morphologie caractérisée par la présence de larges vacuoles lipidiques. Les bruns sont, quant à eux, responsables de thermogénèse avec expression du gène Uncoupling Protein 1 (UCP1) de la membrane mitochondriale, avec une morphologie caractérisée par la présence de plusieurs petites vacuoles lipidiques (Gimble et col., 2013). La digestion du tissu par la collagénase bactérienne en présence de calcium permet la relâche des différentes composantes cellulaires. Une centrifugation différentielle permet d'isoler la partie blanche flottante contenant les adipocytes, de la SVF. Dans cette fraction, il y a les fibroblastes, les cellules endothéliales, les lymphocytes B et T, les macrophages, les cellules myéloïdes, les péricytes, les cellules musculaires lisses et les cellules souches mésenchymateuses adhérentes au plastique (Gimble et col., 2007). La mise en culture de cette fraction va permettre d'isoler les ASC, adhérentes au plastique, au bout de 4 à 6 jours (Figure 3).



**Figure 3. Composition du tissu adipeux et isolation des ASCs à partir de liposuction.**

*Les adipocytes constituent 90% du tissu. La digestion du tissu avec la collagénase permet de séparer les différentes composantes. Les péricytes et les cellules endothéliales se retrouvent près de la vasculature avec les ASCs. On y retrouve aussi les cellules du système immunitaire.*

## 2.2 La niche des ASCs

Ces cellules souches résident dans un environnement particulier qui peut contrôler son comportement telle sa différenciation, sa prolifération et son apoptose. Plusieurs études ont suggéré que la niche des ASCs était dans le système vasculaire du tissu adipeux (P. Zuk, 2013). D'autres investigations ont plutôt considéré les ASCs comme des péricytes localisés dans la vasculature du tissu adipeux, dû à l'expression de CD146 et 3G5, marqueurs de péricytes. Tang et coll. ont rapporté avoir localisé ces cellules autour de vaisseaux sanguins (W. Tang et col., 2008). Les péricytes ont été décrites comme des cellules avec un pouvoir de multipotence semblable aux



cellules souches. Toutefois, l'expression de CD146 sur les ASCs demeure source de conflit entre les groupes de recherche, et l'absence de  $\alpha$ -SMA, également marqueur de péricytes, dans la majorité des populations d'ASCs isolées rend difficile une classification des ASCs en tant que péricytes. Les discordances dans les techniques d'isolation et la diversification des populations de cellules isolées dans la fraction vasculaire stromale du tissu adipeux expliquent cette controverse quant à l'expression de CD146 sur les ASCs (P. Zuk, 2013). Elles partagent toutefois à plus de 90% leur phénotype immunitaire avec les MSC de la MO, ainsi que plusieurs de leurs caractéristiques résumées dans le tableau 2, et discutées dans les chapitres subséquents.

**Tableau 2. Résumé des caractéristiques phénotypiques, clonales et des applications des MSCs de la MO et des ASCs.**

	<b>MO-MSC</b>	<b>ASC</b>
<b>Isolation</b>	Ponction osseuse : inconfort du patient	Liposuction : facilité d'accès sans inconfort
<b>Rendement d'isolation</b>	0.001 à 0.01% des cellules totales de la moelle osseuse	500 fois plus à partir d'une quantité équivalente de moelle osseuse
<b>Immunophénotype</b>	CD90, CD105, CD73, CD29, CD146 Absence de CD34  Expression de CD106 Expression de CD271	CD90, CD105, CD73, CD29, CD146 CD34 exprimé sur cellules fraîchement isolées Expression CD49d Expression CD54
<b>Prolifération</b>	Senescence fréquente	Prolifération plus importante Senescence plus faible
<b>Différenciation</b>	Tri-différenciation	Tri-différenciation Adipogénique +
<b>Applications</b>	Cardiopathie ischémique Lésions de la peau Rejet du greffon Maladies immunitaires (Crohn, sclérose en plaque) Ischémie cérébrale	Cardiopathie ischémique Chirurgie plastique Rejet du greffon (plus récent) Maladies immunitaires (Crohn, sclérose en plaque)

## 2.3 Différenciation des ASCs

### 2.3.1 Mésoderme

En 2002, après avoir décrit les ASCs, Zuk et coll. ont approfondi leur caractérisation par la différenciation ostéogénique, adipogénique et chondrogénique par immunofluorescence, PCR et essais fonctionnels (P. A. Zuk et col., 2002). Depuis, plusieurs autres groupes ont décrit leur différenciation sous diverses conditions avec dexaméthasone, hypoxie ou cocktail de facteurs et hormones (Behr et col., 2011; Merceron et col., 2010; J. S. Park et col., 2011). La différenciation adipogénique se fait dans un milieu DMEM supplémenté de dexaméthasone, indométacine, hydrocortisone et insuline. La différenciation est ensuite évaluée suite à la coloration par Oil Red O dévoilant des vacuoles lipidiques dans les cellules (Figure 4B) (Naderi et col., 2014). La différenciation ostéogénique se fait dans un milieu contenant du dexaméthasone, l'acide ascorbique, le  $\beta$ -glycérophosphate, la glutamine et la vitamine D3 pour 14 jours. Une coloration à l'alizarine rouge S permet ensuite de visualiser les dépôts de calcium (Figure 4B). La présence de phosphatase alcaline, de la protéine pour la morphogénèse osseuse BMP 2 (bone morphogenic protein 2) et de l'ostéocalcine ont également été rapportés. *In vivo*, la première description de la formation de l'os à partir d'ASCs humaines pré-stimulées a été faite en 2004 avec description histologique d'ostéoïdes avec présence de ASCs dans la nouvelle structure (Hicok et col., 2004). D'autres preuves ont suivi avec en 2007, la documentation de la guérison de la boîte crânienne de chiens avec injection de ASCs induites avec la dexaméthasone (L. Cui, Liu, et col., 2007). Il existe cependant une divergence sur l'usage de ASCs pré-stimulées ou natives pour induire la régénération de l'os, car plusieurs autres études ont démontré la guérison de dommages osseux en utilisant des ASC sans prétraitement (Cowan et col., 2004; Levi et col., 2010).

La différenciation chondrogénique est plutôt dépendante de la famille de TGF- $\beta$ . Une des études pionnières a été l'implantation de ASCs humaines prétraitées avec du TGF- $\beta$ 1, en intramusculaire dans des souris «nude», et l'observation subséquente de cartilage (Dragoo et col., 2003). Plusieurs autres groupes ont montré la génération de cartilage avec des ASCs prétraitées, ou sous

forme de structures 3-D sur des matrices en implantation sous cutanée (Im et col., 2011; Mehlhorn et col., 2009).

De façon plus étendue, les ASCs ont également démontré une différenciation en muscle squelettique avec expression de marqueurs tels MyoD1, myogénine et myosine, concordant avec le phénotype de myoblaste (P. A. Zuk et col., 2002). Toutefois, les groupes n'ont pu démontrer une contractilité des cellules différenciées. Le groupe de Rodriguez a été premier à démontrer qu'une xéno greffe de ASCs humaines sur des souris MDX mimant la maladie de dystrophie musculaire de Duchenne, aboutissait à une élévation de l'expression de dystrophine humaine dans le muscle injecté et adjacent, en absence de cellules inflammatoires murines (Rodriguez et col., 2005). Les ASCs pré-induites et injectées dans des souris MDX étaient préférentiellement dirigées vers le muscle lésé pour se différencier et produire MyoD, la myogénine, la myosine et la dystrophine dans un autre rapport (Liu et col., 2007).

Une différenciation en muscle lisse a aussi été observée grâce notamment à la stimulation mécanique sur matrices en nanofibres de plastique. Après injection des ASCs humaines sur souris et rats, il y a eu confirmation d'incorporation des cellules souches dans le muscle lisse de la vessie et de leur différenciation en cellules musculaires lisses (Lin et col., 2010; R. Zhang et col., 2012). La capacité de prolifération et d'adhésion des cellules musculaires lisses dérivées des ASCs sur des greffons acellulaires, ainsi que la confirmation de contraction permet d'envisager l'usage des ASCs dans la reconstruction vasculaire (Harris et col., 2011).

La différenciation cardiomyogénique a également été rapportée. La première description étant avec la culture des ASCs en présence de 5-azacytidine, qui induit la production de myotubes capables de contracter et l'expression de myosine et actinine. Un groupe de Singapour a démontré une contractilité et l'expression de marqueurs cardiaques au niveau protéique et génique dans des ASCs traitées à l'azacytidine (Rangappa et col., 2003). D'autres études ont confirmé ce potentiel sur des ASCs humaines et murines. La transplantation *in vivo* de cardiomyoblastes dérivés des ASCs humaines a amélioré la fonction cardiaque avec développement de cellules humaines exprimant  $\alpha$ -actine cardiaque avec les facteurs de transcription cardiaques GATA4 et Nkx2.5 (Okura et col., 2012).

### **2.3.2 Ectoderme**

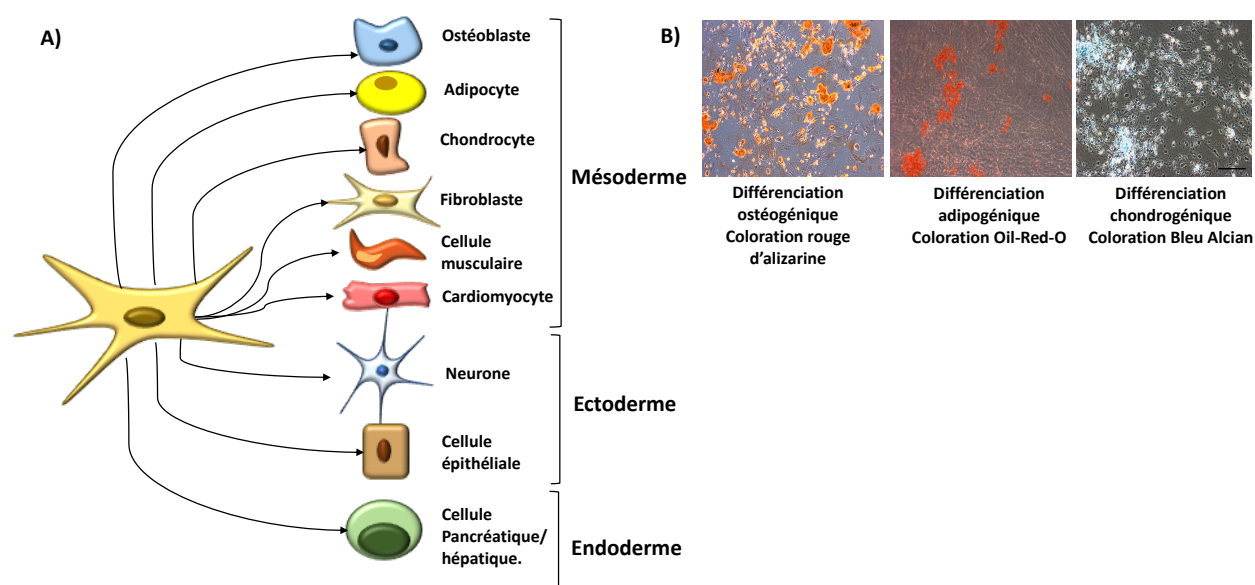
Le groupe de Zuk et coll. a également mentionné la présence de marqueurs neuronaux en plus des marqueurs mésodermiques en 2002 sur les ASCs stimulées, incluant la nestine, la protéine nucléaire spécifique aux neurones NeuN et l'énolase spécifique aux neurones. Ces marqueurs ont été décrits précédemment dans la différenciation potentielle des MSCs de la MO en tissu ectodermique. Alors qu'en premier lieu, l'usage de  $\beta$ -mercaptoéthanol a été nécessaire pour induire des caractéristiques neuronales, des études additionnelles ont montré cette induction par d'autres agents tels que l'acide valproïque, l'insuline et l'hydrocortisone. Ils ont montré que ces cellules exprimaient des marqueurs neuronaux mais aussi gliaux (Arboleda et col., 2011; Jang et col., 2010). La différenciation des ASCs humaines en neurones moteurs a également été décrite, offrant un potentiel à utiliser les ASCs pour les maladies atteignant les neurones moteurs (Liqing et col., 2011). Toutefois, l'expression de gènes n'est pas suffisante pour confirmer le potentiel, et c'est pour cette raison que certains groupes documentent une activité électrophysiologique avec identification de courants potassiques et sodiques (Anghileri et col., 2008).

La génération de cellules épithéliales à partir des ASCs humaines a été décrite depuis quelques années, avec expression de cytokératine 18 et réduction de l'expression de vimentine après exposition à l'acide rétinoïque. L'expression de plusieurs autres marqueurs épithéliaux a été rapportée lors de la culture des ASCs sur des gels de fibrine ou en 3-D, émettant la possibilité d'utiliser ces cellules pour la régénération de la peau (Brzoska et col., 2005; Du et col., 2010).

### **2.3.3 Endoderme**

La possibilité de se différencier en tissu ectodermique en plus de la différenciation mésodermique souligne le potentiel des ASCs à avoir un comportement ressemblant aux ESC en se différenciant également en tissu endodermique. Des preuves de différenciation en cellules hépatiques et pancréatiques ont été obtenues par plusieurs groupes avec expression de marqueurs et

hormones telles l'insuline ou le glucagon. *In vivo*, des études ont confirmé la suppression des dommages aux îlots pancréatiques et le rétablissement de la glycémie dans des modèles diabétiques avec injection des ASCs (Bassi et col., 2012; Y. Y. Li et col., 2012). Du point de vue de la régénération du foie, la différenciation hépatique a été démontrée *in vitro* avec confirmation de l'augmentation des niveaux d'albumine (Banas et col., 2009) et plusieurs autres marqueurs incluant  $\alpha$ 2-macroglobuline, le complément C3, le cytochrome P450 et l'apolipoprotéine E (Bonora-Centelles et col., 2009).



**Figure 4. Potentiel de différenciation des cellules souches mésenchymateuses.**

A) Différenciation en cellules des trois couches germinales démontrée dans la littérature. B) Différenciation effectuée au sein de notre laboratoire des ASCs humaines en tissu mésodermique soit ostéogénique, adipogénique et chondrogénique. Magnification 100X. Barre d'échelle 100  $\mu$ m.

## 2.4 Les facteurs responsables des effets trophiques

Le sécrétome des ASCs est considéré comme le principal acteur dans les effets pro-guérison de ces cellules. Ce sécrétome des ASCs est varié et contient des facteurs anti-inflammatoires, des facteurs de croissance, des cytokines et des exosomes. Récemment, plus de 340 facteurs différents ont été identifiés au sein du sécrétome des ASCs par spectroscopie de masse (Riis et col., 2016).

#### **2.4.1 Facteurs anti-inflammatoires**

L'immunomodulation médiée par les ASCs vient d'une variété de facteurs sécrétés. Les cellules secrètent des enzymes comme la synthétase de monoxyde d'azote inducible iNOS, l'indolamine-2,3-dioxygénase IDO et la prostaglandine PGE<sub>2</sub>, qui participent à la régulation des cellules immunitaires (X. Li et col., 2019). Les ASCs secrètent également le TSG-6, une protéine de 30 KDa découverte suite à la stimulation par le TNF $\alpha$  (Wisniewski & Vilcek, 2004). Il a été lié à l'effet anti-inflammatoire prodigué par les ASCs sur la pancréatite aiguë et la maladie inflammatoire de l'intestin (Q. Li et col., 2018; W.-J. Song et col., 2017). Dans un modèle de colite, le groupe a décrit un mécanisme impliquant le TSG-6 dans la polarisation des macrophages vers un phénotype anti-inflammatoire (W.-J. Song et col., 2017).

#### **2.4.2 Facteurs de croissance**

Le VEGF, HGF, PDGF, IGF-1, bFGF ne sont que quelques exemples de facteurs retrouvés en grande quantité dans le milieu de culture des cellules. Le VEGF et PDGF sont impliqués dans la stimulation des cellules endothéliales afin d'activer le processus de néoangiogenèse. La culture des ASCs en hypoxie a augmenté la quantité de VEGF et bFGF dans le milieu de culture, ce qui a accéléré la guérison tissulaire dans plusieurs rapports (Kakudo et col., 2015; E. Y. Lee et col., 2009). La sécrétion de VEGF, HGF et TGF- $\beta$  a été liée à des effets angiogéniques et neurogéniques dans

certaines rapports (Dubey et col., 2018). Une étude a aussi démontré que la sécrétion de VEGF et HGF était constitutive chez les ASCs humaines, les facteurs étant présents sans stimulation inflammatoire ou hypoxique (Rehman et col., 2004).

### **2.4.3 Cytokines**

En général, le profil sécrétoire de cytokines des ASCs demeure similaire aux MSC de la moelle osseuse. En dehors de VEGF, TGF- $\beta$  ou PDGF, considérés comme des cytokines également, les ASCs secrètent les interleukine 6, 8 et 10 (IL-6, IL-8 et IL-10) et la monocyte chemoattractant protein 1 (MCP-1) (Kilroy et col., 2007). Il a été démontré que la présence de IL-6 et IL-8 dans le milieu de conditionnement n'était pas forcément reliée à la stimulation pro-inflammatoire par le LPS (lipopolysaccharide) (Mussano et col., 2017). La littérature scientifique est consensuelle quant à la présence constitutive de IL-6 dans le sécrétome (C. K. Chan et col., 2012; Ivanova-Todorova et col., 2009). La présence de IL-10 dans le sécrétome est réfutée par certains groupes. Ils attribuent aux cellules un rôle de stimulateur de sécrétion de IL-10 par les cellules immunitaires (Eggenhofer et col., 2014).

### **2.4.4 Exosomes**

Les exosomes sont des vésicules extracellulaires formées à partir de la fusion de corps multi vésiculaires avec la membrane plasmique avec des tailles variant de 30 à 100nm. Ils servent d'intermédiaires pour le transfert de protéines et de matériel génétique dans les interactions cellule à cellule (Sahoo & Losordo, 2014). Ils peuvent donc intervenir dans le mécanisme de réparation grâce à leur contenu en facteurs ou miARN et ARNm. Il existe une hétérogénéité du contenu des exosomes selon la source de cellule souches mésenchymateuses, soit la moelle osseuse ou le tissu adipeux entre autres. L'implication des exosomes dans le potentiel



thérapeutique des ASCs dans des modèles d'injure rénale, d'ischémie reperfusion du myocarde et d'injure hépatique a été bien documentée (X. Cui et col., 2017; Xu et col., 2019).

## **2.5 Propriétés des cellules souches mésenchymateuses du tissu adipeux**

Tel que mentionné précédemment, la variété des facteurs et cytokines relâchés par les MSC et les ASCs implique donc une pléiotropie dans les effets qu'elles peuvent générer en situation physiologique ou pathologique. Leur fonction d'immunorégulation offre le potentiel thérapeutique le plus remarquable et une compréhension approfondie permettrait leur usage sur de nombreuses pathologies caractérisées par de l'inflammation. Des capacités à augmenter l'angiogenèse et à réguler l'apoptose amplifient leur importance thérapeutique.

### **2.5.1 Angiogenèse**

Le sécrétome des MSCs et des ASCs contient du VEGF, du MCP-1 et bFGF, tous des facteurs impliqués dans l'angiogenèse. Plusieurs expériences in vitro ont décrit l'impact du sécrétome des MSC sur la prolifération endothéliale et le développement de capillaires (Boomsma & Geenen, 2012; Kinnaird et col., 2004). Les ASCs peuvent également se différencier et acquérir les caractéristiques de cellules endothéliales en culture sur des matrices semi-solides tel le matrigel. Une expression spontanée de CD31, marqueur de cellules endothéliales, a été observée sur des ASCs cultivées en présence de supplément IGF et VEGF (Miranville et col., 2004; Planat-Benard et col., 2004). Toutefois, la différenciation directe en cellule endothéliale est relativement rare selon une étude dans un modèle d'infarctus du myocarde chez le rat. Les auteurs ont évalué à moins de 1% la différenciation alors qu'une augmentation de la densité capillaire de 28% a été observée.

L'effet de néo-vascularisation a été plutôt attribué à la relâche de cytokines et leurs effets paracrins (L. Wang et col., 2009). L'amélioration de la fonction cardiaque a été observée avec injection transendocardiaque d'ASCs accompagnée d'angiogenèse et vasculogenèse (Mazo et col., 2012). Dans un modèle porcin d'infarctus aigu du myocarde, l'injection d'ASCs 15 minutes après reperfusion a démontré une grande efficacité à augmenter la néo-vascularisation et l'expression de VEGF comparé à une injection tardive 1 semaine post reperfusion (Rigol et col., 2014). Ce même constat a été rapporté sur des modèles d'ischémie reperfusion au niveau du poumon et des reins (Furuichi et col., 2012; C. K. Sun et col., 2011).

L'importance du facteur VEGF et de sa signalisation dans le processus de différenciation a été mise de l'avant (Ball et col., 2007; Gomes et col., 2013; N. Wang et col., 2013) mais l'acquisition de toutes les caractéristiques phénotypiques et fonctionnelles des cellules endothéliales lors de la différenciation des ASCs demeure un domaine à approfondir. Des niveaux plus élevés de VEGF dans le plasma ont été observés lors du traitement par les ASCs dans un modèle murin diabétique avec ischémie du membre inférieur (E. K. Kim et col., 2011). Le milieu conditionné obtenu de la culture des ASCs en hypoxie contient des niveaux élevés de VEGF, HGF et TGF- $\beta$ , ces facteurs ayant eu comme impact d'augmenter la prolifération des cellules endothéliales et de réduire leur apoptose (Rehman et col., 2004). L'injection de ASCs pré-traitées avec un ARN interférant ARNi contre VEGF pour traiter le syndrome du petit foie a résulté en une perturbation de la microcirculation et des fonctions hépatiques du greffon (Ma et col., 2012). La contribution d'autres facteurs notamment le HGF et le SDF-1 $\alpha$  ne doit pas être minimisée dans le rôle angiogénique des ASCs alors qu'un ARNi contre HGF réduisait la revascularisation induite par les ASCs (Cai et col., 2007) et le SDF-1 $\alpha$  a été décrit comme acteur dans la vascularisation myocardique (Ii et col., 2011). Une combinaison de différenciation en cellule endothéliale et des actions paracrines permettent aux ASCs de stimuler la vasculogenèse lors de la régénération tissulaire.

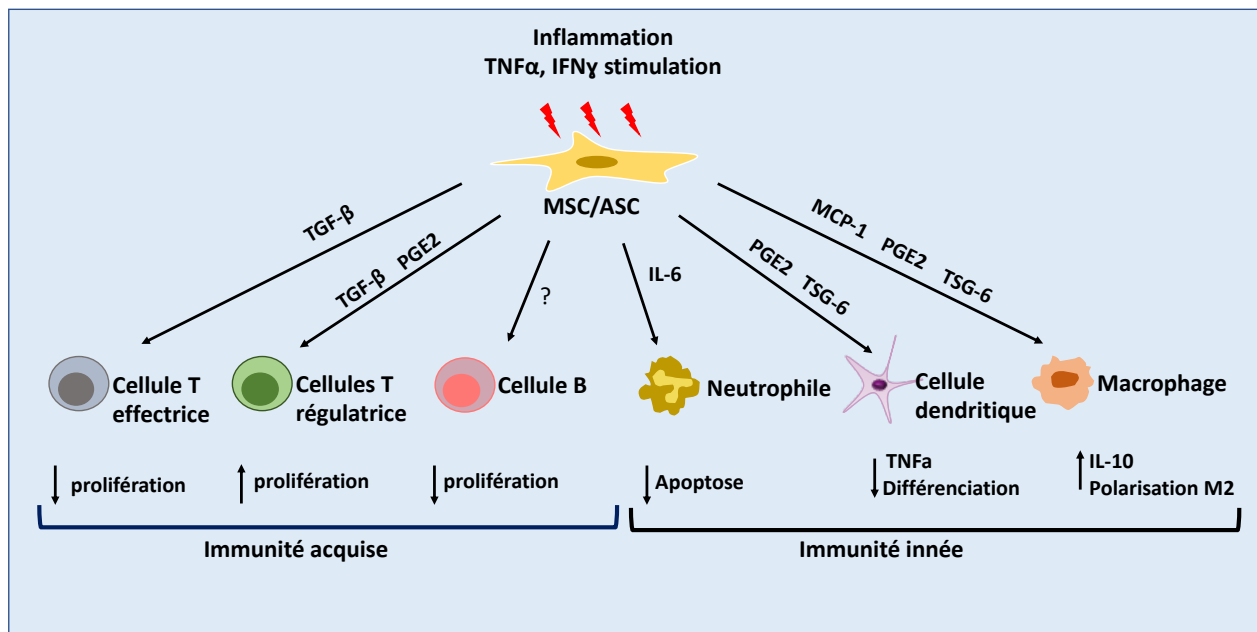
### **2.5.2 Immunorégulation**

La première description d'immunosuppression attribuée aux MSC a été faite avec un modèle de greffe de peau de primate, où l'utilisation allogénique, i.e. de cellules d'un tiers parti, offrait les avantages thérapeutiques similaires aux cellules du donneur de peau (Bartholomew et col., 2002). Ceci a transformé la logistique dans le calcul des coûts pour l'usage des MSC en thérapie, puisque leur disponibilité ne serait pas limitée à une récolte du patient et à l'attente de leur expansion. Les transplantations allogéniques sont envisageables car les cellules expriment faiblement les protéines HLA de classe I, et les niveaux de HLA classe II sont encore plus négligeables. Cette caractéristique procure l'opportunité de développer une banque de cellules accessibles dans l'immédiat (Girdlestone, 2016).

L'origine tissulaire des cellules souches stromales pour une transplantation allogénique peut influencer la réponse immunitaire initiée, puisqu'il a été démontré que les ASCs induisaient une moindre réaction cytotoxique par les cellules T que les MSC de la moelle osseuse (Roemeling-van Rhijn et col., 2013). Les mécanismes qui sous-tendent le potentiel immunosuppresseur de ces cellules ont été largement explorés *in vitro* avec des différences selon l'espèce. Les cellules humaines passent par l'enzyme indolamine-2,3-dioxygénase (IDO) pour inhiber la prolifération des cellules T alors que les cellules murines utilisent la synthétase de monoxyde d'azote inducible iNOS. Des facteurs tels que le TSG-6 et la prostaglandine participent également à l'immunosuppression (Girdlestone, 2016). Une expérience *in vitro* a montré qu'après une coculture avec des monocytes non stimulés dérivés de la circulation, les ASCs ont augmenté la prolifération de cellules T régulatrices CD25 positives, ce qui en retour a supprimé la réponse immunitaire (Crop et col., 2010). La réponse immunitaire de l'hôte suite à une transplantation de ASCs a été étudiée. Il y a eu augmentation de cellules T régulatrices dans un modèle *in vivo*, d'allo-transplantation du membre inférieur et d'arthrite rhumatoïde (Gonzalez et col., 2009b; Kuo et col., 2017).

Des travaux *in vitro* ont rapidement identifiés des médiateurs inflammatoires dans le sécrétome des ASCs humaines incluant IL-6, IL-8, MCP-1, G-CSF (Banas et col., 2008). L'immunosuppression médiée par les ASCs a été largement explorée aussi avec la réaction mixte lymphocytaire prouvant l'inhibition de l'activation des cellules T CD4+ (Puissant et col., 2005; Wolbank et col., 2007). L'injection systémique de ASCs réduisait l'infiltration de cellules inflammatoires dans des modèles

*in vivo* murins d'allergie, d'emphysème et d'accident vasculaire cérébral (Cho & Roh, 2010; J. M. Kim et col., 2007). Le fondement de ces actions immunosuppressives n'a été élucidé que partiellement. Toutefois, l'implication de la cytokine anti-inflammatoire IL-10 est rapportée par plusieurs groupes sur des modèles d'arthrite rhumatoïde (Gonzalez-Rey et col., 2010), de colite expérimentale (Gonzalez et col., 2009a) ou de transplantation de foie (Wan et col., 2008). Aussi, dans un modèle de septicémie, les ASCs ont induit une modification du phénotype des monocytes en réduisant TNF $\alpha$  et en augmentant IL-10, un mécanisme dépendant de la prostaglandine E2 et de la cyclooxygénase-2 (Qiu et col., 2017). Toutefois, certains rapports contestent la présence de IL-10 dans le sécrétome, sauf en cas de stimulation spécifique avec un microenvironnement avec des cytokines comme TNF $\alpha$  et IFN $\gamma$ . Le rôle des cellules dans l'augmentation de IL-10 est plus difficile à contester puisque plusieurs démontrent une augmentation de la sécrétion de la cytokine par les monocytes ou les lymphocytes T (Shi et col., 2018). L'inhibition de la prostaglandine E2 par l'indométacine abolissait l'immunosuppression induite par les ASCs (L. Cui, Yin, et col., 2007) tout comme l'incubation avec un anticorps neutralisant IL-6 ou LIF, facteur d'inhibition de la leucémie (Djouad et col., 2007; Najar et col., 2010). Les mécanismes précis demeurent controversés pour expliquer la médiation de l'immunosuppression des ASCs mais cette fonction leur procure un grand intérêt pour un usage en transplantation xénogénique en régénération tissulaire (Figure 5).



**Figure 5. Les mécanismes d'immunorégulation des MSCs/ASCs impliquent les cellules de l'immunité innée et acquise.**

*Les ASCs en réponse à un stimulus inflammatoire sécrètent des facteurs qui induisent la polarisation des macrophages vers M2, ce qui augmente les niveaux de IL-10 dans l'environnement. Les cellules régulent la différenciation des cellules dendritiques vers un phénotype anti-inflammatoire et diminuent le TNFα. IL-6 dans le secretome agit sur les neutrophiles et diminue leur apoptose. Au niveau de l'immunité acquise, les ASCs réduisent la prolifération des cellules B et T effectrices et augmentent celle des Treg.*

### **2.5.3 Apoptose**

Plusieurs groupes ont montré un effet anti-apoptotique des cellules souches stromales lorsqu'appliquées sur un organe ou des cellules. Certaines expériences ont montré une implication de la kinase Akt par une réduction de ses niveaux d'expression et de sa phosphorylation avec inactivation de la protéine apoptotique BAD (Eliopoulos et col., 2010; Yagi et col., 2010). De plus, les cellules souches stromales parviennent à renverser l'apoptose des cardiomyoblastes, des neurones et des fibroblastes suite à une injure d'origine ischémique (Cselenyak et col., 2010; S. Y. Kim et col., 2012; N. Li et col., 2010).

Plus spécifiquement, l'effet anti-apoptotique des ASCs a été lié à la sécrétion d'ARNm et miARN dans les exosomes (K. Wang et col., 2017). Le traitement avec les exosomes dérivés des ASCs sur des cellules motoneurones a également montré un effet anti-apoptotique par diminution des protéines pro-apoptotiques Bax et caspase 3 clivée et une augmentation de la protéine anti-apoptotique Bcl-2 (Bonafede et col., 2019).



## **Chapitre 3 : L'application clinique des cellules souches mésenchymateuses**

Pour une application clinique, les cellules souches doivent respecter des critères afin de faciliter cette transition. L'idéal serait d'abord la présence de ces cellules en quantités abondantes et leur obtention par des procédures minimalement invasives pour accommoder le patient. Leur transplantation autologue ou allogénique doit être sécuritaire pour le patient récipiendaire. La sécurité en essai clinique a été démontré autant pour les MSCs que les ASCs. Toutefois, il est toujours difficile d'atteindre des pourcentages de rétention significatifs lors de la transplantation cellulaire et encore plus ardu d'obtenir une domiciliation à long terme (Banerjee et col., 2018). Les ASCs offrent l'avantage de leur disponibilité combinée à une plus grande simplicité d'isolation en clinique, de même qu'un moindre inconfort pour le patient lors du prélèvement. Les ASCs ont été particulièrement utilisées en chirurgie plastique, que ce soit pour la reconstruction tissulaire ou le renforcement de tissu mou comme l'augmentation mammaire ou la lipoatrophie faciale (Yoshimura et col., 2010; Yoshimura et col., 2008). Dans cette section, des exemples de la transition du laboratoire à la clinique des ASCs pour certaines conditions médicales seront discutés.

### **3.1 Rejet du greffon aigu/chronique**

Tel que mentionné dans le premier chapitre, la transplantation allogénique de cellules souches hématopoïétiques est un traitement potentiellement curatif pour plusieurs conditions affectants le système hématopoïétique, que ce soit des maladies de nature maligne ou pas. Toutefois, ces transplantations sont associées à de la mortalité et morbidité à cause de la maladie du greffon (Baron et col., 2004). La manifestation clinique de cette maladie ressemble aux maladies auto-

immunes sévères. Les corticostéroïdes représentent la thérapie de choix mais seulement 60 à 70% des patients répondent au traitement (Amorin et col., 2014).

L'application clinique des MSC sur la maladie du greffon a connu une des ascensions les plus fulgurantes que pour n'importe quelle maladie reliée à l'immunité et l'inflammation. Ceci est fortement lié au succès clinique d'un cas pédiatrique rapporté avec un sévère rejet du greffon infusé avec des MSC haplo-identiques (Le Blanc et col., 2004). Malheureusement, les résultats des essais cliniques subséquents n'ont pas permis de décrire des effets thérapeutiques marqués. Une méta-analyse a confirmé l'étendue de l'hétérogénéité des études, que ce soit au niveau de la sélection des patients ou au niveau de la sélection des cellules (Rizk et col., 2016). Pour une compréhension plus approfondie de la pathophysiologie de cette maladie, plusieurs modèles animaux, particulièrement murins, ont étudié l'infusion de MSC de souris ou humaines (Robles et col., 2015; Tobin et col., 2013). C'est à partir de ces études que la description du rôle de PGE2 et de NO a été faite (Auletta et col., 2015; Ren et col., 2008).

Fang et coll. ont été les premiers à utiliser l'infusion intraveineuse d'ASCs allogéniques dérivées de donneurs sains sur des cas de rejets du greffon résistants aux stéroïdes. Ils ont observé un effet thérapeutique avec un suivi de 40 mois et n'ont pas rapporté d'effets néfastes (Fang et col., 2007).

## **3.2 Sclérose en Plaque (SEP)**

Il s'agit d'une maladie inflammatoire caractérisée par une démyélinisation des nerfs du système nerveux central (SNC). Ceci conduit à des dommages neuronaux et à une dysfonction dans la conduction de l'influx nerveux. Le modèle murin d'encéphalomyélite auto-immune expérimentale (EAE) reproduit cette maladie avec immunisation spécifique à l'aide d'un peptide de protéines de myéline. Les lymphocytes CD4 (Th17) sécrétant IL-17A et Th1 sont impliqués dans la pathogénèse de la maladie auto-immune. Des études *in vitro* et *in vivo* ont montré que les MSC supprimaient la prolifération et l'infiltration des cellules Th1 et Th17 auto-réactives (Lanz et col., 2010; Sajic et col., 2012; Zappia et col., 2005). D'autres chercheurs ont montré que la génération



de cellules T régulatrices *in vivo* permettait de réduire la symptomatologie (Luz-Crawford et col., 2013). Uccelli et coll. ont démontré que l'infusion intraveineuse de MSC avant le développement de la maladie chez la souris bloquait l'initiation de la SEP alors que l'injection au pic réduisait sa sévérité (Uccelli et col., 2012). L'infusion intraveineuse de MSC humaines a montré un rétablissement fonctionnel pour une longue période avec présence de MSC dans le SNC pendant quelques jours (Bai et col., 2012). Toutefois, la présence de cellules au sein du SNC pour une efficacité n'est pas assurée, puisque la quantité retrouvée est minime et le mécanisme dépendrait plutôt d'une modulation de la réponse immunitaire périphérique (Gerdoni et col., 2007).

Des essais cliniques de phase 1 et 2 ont vu le jour basés sur les résultats précliniques prometteurs. La plupart utilisent une injection intraveineuse ou intrathécale de  $2 \times 10^6$  MSC/Kg (L. T. Wang et col., 2016). Quelques effets bénéfiques ont été rapportés mais les résultats sont somme toute décevants, en comparaison aux résultats observés dans les modèles animaux (Connick et col., 2012; Karussis et col., 2010). La difficulté à identifier des critères d'amélioration de la condition des patients, par exemple l'évaluation du nombre de rechute chez les patients avec la forme cyclique ou récidivante de la SEP, représente un blocage pour la translation des résultats en clinique. De plus, l'administration d'un agent anti-inflammatoire en concomitance avec l'infusion de MSC ne permet pas de corrélérer une baisse de rechute avec le traitement aux cellules souches. Un essai clinique sur des patients avec névrite optique a montré des effets bénéfiques qui toutefois restent transitoires (Connick et col., 2012). En inhibant la réponse inflammatoire et auto-immune médiée par les Th1, les ASCs peuvent induire une tolérance immunitaire (Bowles et col., 2018).

En 2009, un petit essai sur 3 patients de multiples infusions intraveineuses et intrathécales de cellules de la fraction stromale vasculaire du tissu adipeux a rapporté une absence d'effets néfastes avec amélioration symptomatique dans les 3 mois suivants (Riordan et col., 2009).

### **3.3 Arthrose et Arthrite Rhumatoïde**

Sachant que les MSCs et ASCs sont des progénitrices endogènes de cartilage, il est intuitif de prétendre à un effet thérapeutique pour les maladies touchant le cartilage. L'arthrose est une maladie progressive avec des dommages irréversibles qui implique les cellules de l'immunité innée et acquise. Plusieurs études sur le modèle murin d'arthrite ont montré une atténuation de l'inflammation et réparation tissulaire avec infusion de MSCs (Augello et col., 2007). La démonstration de cet effet a échoué à localiser les MSCs dans les articulations, privilégiant alors un mécanisme dépendant d'une atténuation de la réaction immunitaire par effet trophique. Une modulation de la prolifération de cellules T et activation de cellules T régulatrices (Treg) est impliquée dans l'effet thérapeutique observé (Augello et col., 2007; Gonzalez et col., 2009b; Gonzalez-Rey et col., 2010). Plusieurs groupes ont tenté d'élucider les mécanismes de cet effet, montrant notamment une mobilisation de Treg vers les ganglions lymphatiques drainants et une augmentation de cellules Th17 produisant IL-10 (Lopez-Santalla et col., 2015; Luz-Crawford et col., 2015). Des études cliniques ont montré la sécurité et la faisabilité de l'infusion de MSC, avec amélioration clinique transitoire (J. Liang et col., 2012; L. Wang et col., 2013). Un essai clinique randomisé a récemment montré qu'une infusion intraveineuse de ASCs à des patients avec l'arthrite rhumatoïde réfractaire était sécuritaire, sans signe de toxicité avec des effets cliniques bénéfiques. Toutefois, ces bénéfices n'étaient pas persistants après 3 mois, suggérant l'importance d'une répétition de l'administration de cellules. Des signes de sensibilisation contre les cellules allogéniques ont toutefois été remarquées, suggérant une attention à une possible réaction en cas d'infusions répétées (Alvaro-Gracia et col., 2017). Dans l'essai ADIPOA, une dose de 2 millions de cellules a amélioré la douleur chez les patients avec ostéoarthrite du genou (Pers et col., 2016).

### **3.4 Cardiopathies ischémiques**

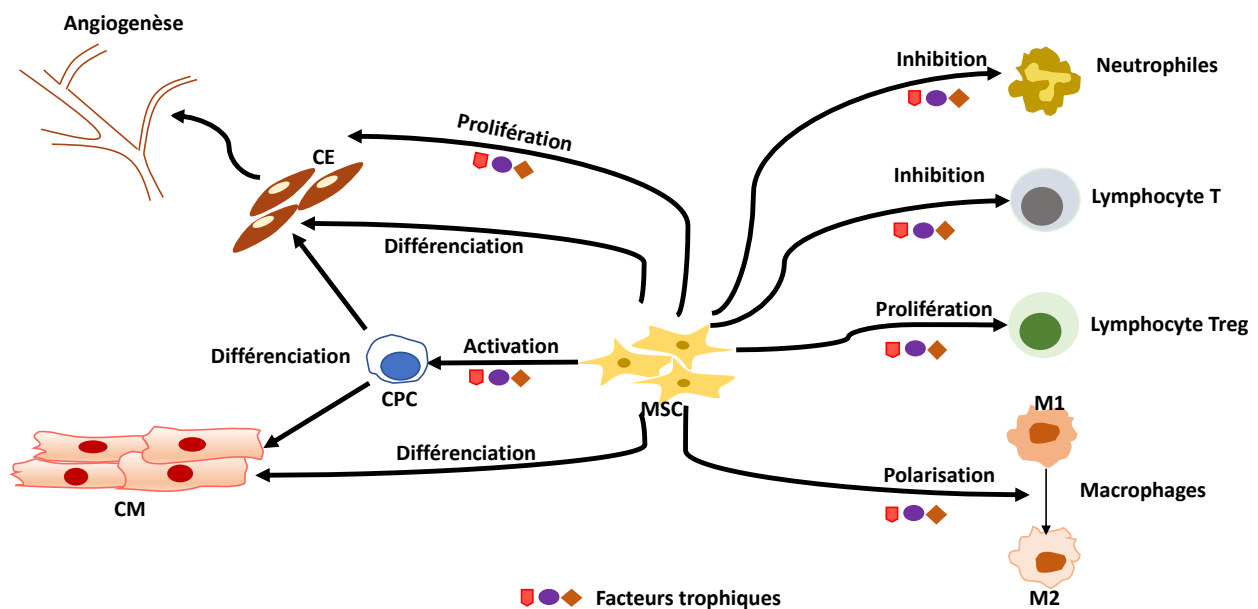
Ces maladies demeurent la première cause de mortalité à l'échelle mondiale malgré les avancées thérapeutiques. L'infarctus du myocarde déclenche une série de changements cellulaires et moléculaires aboutissant à l'apoptose, la nécrose, l'hypertrophie des cardiomyocytes, la fibrose

interstitielle, l'inflammation et à du remodelage pathologique. Les stratégies thérapeutiques contemporaines en post infarctus ont pour objectif d'améliorer la fonction contractile et enrayer le remodelage ventriculaire néfaste afin de réduire la mortalité (Ranganath et col., 2012). Pour empêcher la progression vers l'insuffisance cardiaque, la stratégie à adopter doit prendre en considération la régénération tissulaire et l'inhibition du remodelage pathologique (Wollert & Drexler, 2010). Des preuves de différenciation des cellules souches en cardiomyocytes *in vivo* et de fusion avec des cardiomyocytes du myocarde ont été rapportées (Noiseux et col., 2006; Toma et col., 2002). Shake et coll. ont démontré que les MSC transplantées dans le myocarde porcin en post-infarctus exprimaient des marqueurs cardiaques tels que la troponine I, la chaîne lourde de myosine, l' $\alpha$ -actine et la tropomyosine au bout de deux semaines après injection (Shake et col., 2002). Toutefois, ces événements étant peu fréquents avec un faible pourcentage de domiciliation dans le cœur, l'explication des effets bénéfiques observés passe plutôt par les facteurs paracrins sécrétés par les cellules transplantées.

Un premier essai clinique utilisant les MSC humaines en infarctus du myocarde a démontré la sécurité et la faisabilité tout en faisant allusion à une efficacité provisoire (Hare et col., 2009). L'efficacité est encore une fois liée à une immuno-modulation et à des effets trophiques, plutôt que par un remplacement de cardiomyocytes perdus. Toutefois, les modèles précliniques n'ont pas encore généré assez de données permettant une compréhension approfondie des effets trophiques afin de maximiser l'impact en clinique.

Le sécrétome contient des cytokines et des facteurs ayant des effets anti-inflammatoires, anti-fibrotiques, anti-apoptotiques et angiogéniques (Bartosh et col., 2010; R. H. Lee et col., 2009; Shabbir et col., 2009). Des investigations pour élucider les mécanismes d'actions ont été nombreuses au fil du temps. Les MSC induisent une protection des cardiomyocytes contre l'apoptose et promeuvent la survie à travers des mécanismes impliquant l'activation de PKC, PI3K/Akt, NF $\kappa$ B et STAT3 (Gnecchi et col., 2008; Mirosou et col., 2011). Dans l'étude C-CURE, les MSC ont été préconditionnées avec un cocktail de cytokines cardiogéniques préalablement à leur application. Une amélioration de la fraction d'éjection, du volume télé-systolique et de la qualité de vie générale a été rapportée après un suivi de 2 ans (Bartunek et col., 2013).

Lors de l'essai clinique APOLLO utilisant les ASCs pour le traitement des patients avec infarctus du myocarde, les chercheurs ont observé une réduction de la cicatrice, une amélioration de la perfusion ainsi que des fonctions cardiaques (Houtgraaf et col., 2012). L'étude PRECISE a également démontré l'effet bénéfiques chez des patients avec cardiomyopathie ischémique chronique avec une augmentation de la contractilité et de la perfusion après une livraison de ASCs (Perin et col., 2014). L'étude ATHENA s'est intéressée aux patients n'étant pas éligibles à la revascularisation percutanée ou chirurgicale. L'administration des ASCs chez ces patients avec cardiomyopathie ischémique sévère a démontré une élévation de la fonction cardiaque et une amélioration de la perfusion (Henry et col., 2017). Ces effets positifs sont liés à la variété d'agents bioactifs sécrétée (Figure 6).



**Figure 6. Les effets trophiques des cellules souches mésenchymateuses (MSCs/ASCs) suite à leur transplantation en cas d'infarctus du myocarde.**

*Les cellules souches stromales peuvent se différencier en cardiomyocytes (CM) ou cellules endothéliales (CE) ou activer les cellules progénitrices cardiaques (CPC) grâce à la sécrétion de facteurs trophiques. L'effet immuno-régulateur est médié par plusieurs facteurs qui vont agir sur le recrutement de neutrophiles, la polarisation des macrophages M1 vers M2, l'inhibition des cellules T effectrices et l'augmentation des cellules T régulatrices (Treg).*

Il est important de garder en vue les différences anatomiques entre les modèles animaux, rongeurs ou plus gros animaux et l'humain. Les modèles animaux rongeurs ont une importance dans l'investigation des mécanismes pathophysiologies de l'infarctus du myocarde. L'extrapolation des données obtenues chez le rongeur doit toutefois être précautionneuse. Les modèles plus gros sont une étape obligatoire avant l'initiation des essais sur l'humain (Ibanez et col., 2015).

La plupart des données précliniques sont obtenues à partir d'animaux jeunes avec une circulation coronarienne normale soumis à une occlusion coronarienne. Dans un scénario clinique d'infarctus du myocarde, le patient a déjà une circulation coronarienne ayant subi des changements structuraux et fonctionnels avec plusieurs facteurs de risques et comorbidités comme l'âge, le diabète, l'hypertension ou l'hypercholestérolémie avec la présence de médicaments. Ainsi, aucun modèle animal ne peut récapituler ce scénario clinique. De plus, la chronologie des événements suivant l'occlusion coronarienne est très importante puisqu'une reperfusion au bout de 4-6 heures n'est certainement pas aussi efficace qu'une reperfusion après 30 minutes produite sur plusieurs modèles animaux. La transition des études précliniques vers l'application clinique demeure alors laborieuse et a généré d'ailleurs des résultats conflictuels (Ibanez et col., 2015).



# Chapitre 4 : Les enjeux de la transplantation de cellules souches

Malgré les résultats prometteurs obtenus au cours de la dernière décennie, un effort constant pour augmenter l'efficacité des MSCs et ASCs est nécessaire. Les effets bénéfiques dans les études précliniques sont plus importants et plus évidents que les effets observés en clinique. Il est donc primordial d'optimiser les conditions de transplantations et d'affiner les critères de sélection de la source des cellules, de la dose à administrer et de la méthode optimale de livraison (Figure 7).

La sécurité des MSC en clinique a été confirmée par plusieurs essais de phase I et II. Le risque de transformation et de promotion de la formation de tumeurs est très minime selon différentes études in vivo. Il y a toutefois une préoccupation en ce qui a trait aux effets inflammatoires et pro-thrombotiques suite aux injections intraveineuses (Wu et col., 2017).

## 4.1 La source

Tel que mentionné précédemment, les MSC peuvent être isolées de plusieurs tissus différents en plus de la moelle osseuse. Il y a le tissu adipeux, le placenta, le sang de cordon, les reins, le foie et les poumons. Il y a des lacunes dans les données disponibles quant aux performances des MSC provenant de divers tissus. Ainsi, il y a un manque de données comparant directement diverses sources de MSC pour établir un barème ou une hiérarchie, afin de mieux cibler quelle niche de cellules serait plus appropriée pour adresser une pathophysiologie particulière. Des MSC de différents tissus ont des capacités immuno-modulatrices différentes.

Un autre aspect à traiter en ce qui a trait à la source de cellules est de choisir entre les cellules autologues et allogéniques. Il est certain que la transplantation de cellules autologues est privilégiée en clinique puisque cela permet d'éviter toute réaction immunitaire. Toutefois, ce type de transplantation ne peut suffire les besoins cliniques, sachant qu'il faut du temps pour

l'expansion des cellules jusqu'à la quantité souhaitée, et que dans certaines conditions, cette préférence n'est pas envisageable.

De plus, les méthodes d'isolation des cellules à partir du tissu ne sont pas standardisées, d'où l'hétérogénéité des résultats en clinique. Le manque de marqueur spécifique permettant une ségrégation des cellules lors de leur isolation est contraignant. Même si certains marqueurs tels que CD271 ou l'antigène de cellule souche mésenchymateuse (*mesenchymal stem cell antigen-1*) semblent spécifiques, il n'y a pas eu de preuve que les cellules sélectionnées préservent leur pouvoir de prolifération et de différenciation (Nigro et col., 2018).

## 4.2 Le dosage

Établir la quantité optimale de cellules à injecter demeure encore un enjeu crucial. Des résultats récents de l'essai clinique TRIDENT comparant 2 doses de MSC allogéniques administrées à des patients avec cardiomyopathie ischémique, ont montré que les deux doses choisies, soit 20 et 100 millions, ont généré des effets bénéfiques sur la taille de l'infarctus. Toutefois, seuls les patients ayant reçu 100 millions de cellules ont vu une amélioration de la fraction d'éjection (Florea et col., 2017). Parallèlement, des résultats cliniques prometteurs ont été décrits chez des patients avec maladies inflammatoires telles que la maladie de Crohn, le rejet du greffon et la transplantation rénale ayant reçu  $0,5 \times 10^6$  à  $200 \times 10^6$  cellules (Forbes et col., 2014; Le Blanc et col., 2008; Tan et col., 2012). Il est aussi question de choisir entre l'administration d'une dose de cellules ou d'une stratégie avec multiples doses, considérant que les cellules persistent un très court laps de temps post-transplantation. Il est donc question de balancer la recherche de l'effet optimal et l'activation de l'immunité de l'hôte.

## 4.3 La méthode de livraison



L'injection intraveineuse semble sommairement la plus pratique des méthodes de livraison utilisées dans les essais cliniques en raison de la simplicité d'accéder à une veine en périphérie. Cette livraison systémique peut cependant réduire le nombre de cellules se rendant à destination vers le tissu ou l'organe lésé. En effet, il a été maintes fois prouvé que ces cellules se retrouvent bloquées dans le lit capillaire pulmonaire, empêchant leur mobilisation vers le site d'injure (R. H. Lee et col., 2009; Schrepfer et col., 2007). La grosseur des MSC explique principalement leur séquestration, puisque le diamètre capillaire est de l'ordre de 10-15µm et la dimension des MSC est plutôt de l'ordre de 15-30µm. Ceci est le résultat de l'effet premier passage. Chez l'animal ou chez l'humain, ce blocage est suivi ensuite d'une clairance des cellules et de leur présence dans la rate et le foie dans les heures et les jours suivants (Krueger et col., 2018). L'accumulation de cellules dans les poumons n'a pas empêché un effet anti-inflammatoire à distance grâce à la sécrétion de facteurs, entre autres le TSG-6, sur un modèle murin d'infarctus du myocarde (R. H. Lee et col., 2009).

L'autre possibilité est une livraison directe des cellules au site d'injure tissulaire. Cette méthode est envisageable pour une blessure sur la peau où une livraison topique est possible, mais une injure sur un organe interne est moins accessible et requiert donc à une méthode d'administration invasive (Sorrell & Caplan, 2010). L'injection intra-péritonéale de MSC encapsulées a bloqué l'inflammation et réduit la fibrose dans un modèle murin de maladie du foie (Meier et col., 2015). Une injection intra-péritonéale a également été utilisée dans un modèle murin de dystrophie musculaire et de maladie inflammatoire de l'intestin, toutes ont montré un effet positif (Castelo-Branco et col., 2012; J. Chan et col., 2007). L'injection sous-cutanée de MSC encapsulées a inhibé le rejet de greffon chez la souris (Zanotti et col., 2013). Ceci indique en effet qu'une injection localisée pouvait induire un effet systémique, suggérant ainsi que la production de facteurs solubles plutôt que la domiciliation des cellules au site d'injure, pouvait être suffisant pour un impact thérapeutique.

Au niveau myocardique, l'injection intracoronarienne (et donc localisée) a souvent été utilisé avec un niveau de sécurité satisfaisant. Elle comporte toutefois une petite période d'ischémie causée par l'inflation du ballon pour la distribution des cellules et éviter ainsi leur élimination par le flux sanguin. Il y a aussi la possibilité de causer une obstruction microvasculaire par les cellules

infusées et donc causer encore plus de nécrose à un myocarde déjà affaibli (Karantalis & Hare, 2015). Quelques études précliniques et cliniques ont démontré une efficacité plus significative de l'administration transendocardique par rapport à l'administration intracoronarienne (Kanelidis et col., 2017; Perin et col., 2008).

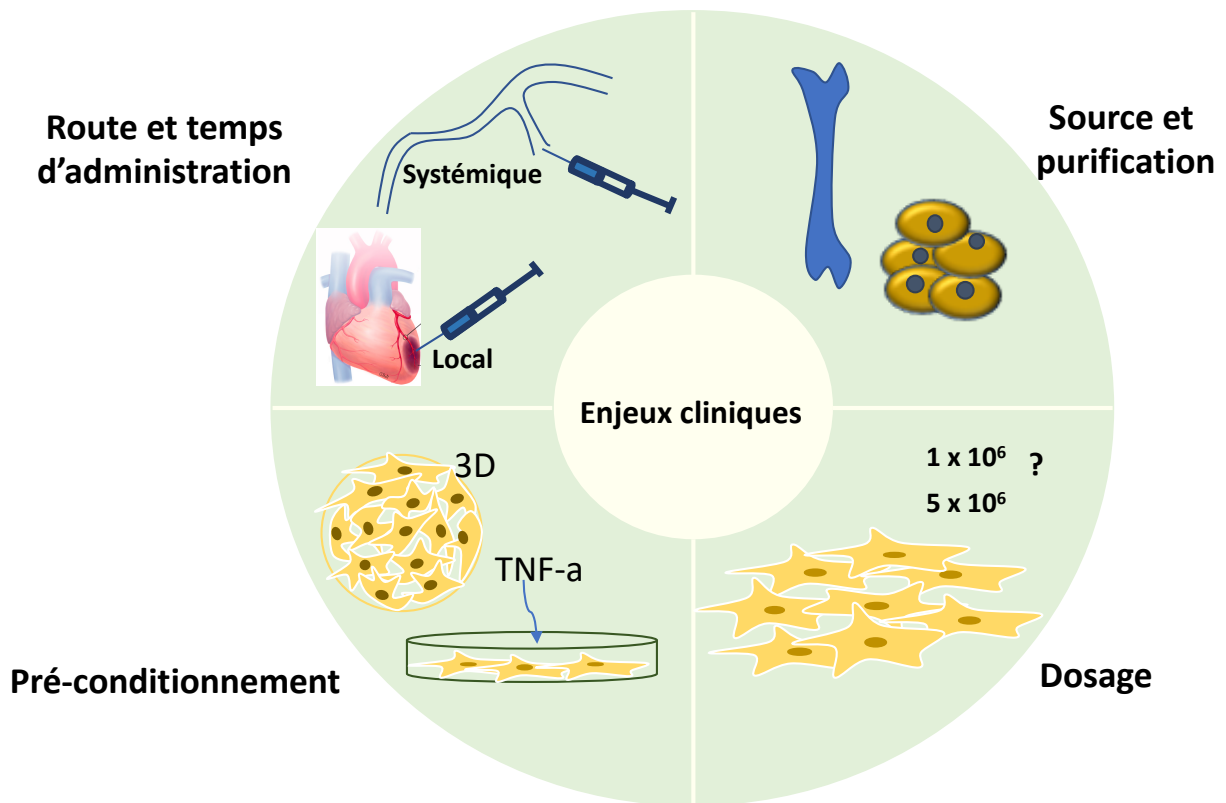
#### **4.4 La période d'administration**

Il s'agit là encore d'une variable importante à considérer, à savoir faut-il transplanter les cellules de façon précoce le plus tôt possible après l'injure, ou faut-il attendre un certain temps ? La question est de savoir s'il faut injecter malgré un microenvironnement perturbé et assurément toxique, ou attendre de dépasser la réaction inflammatoire aigue. Il est important de détecter la meilleure fenêtre de temps où mettre en place les cellules pour obtenir le meilleur effet thérapeutique. Dans certaines études cliniques sur le rejet du greffon, les MSC étaient inefficaces à induire un effet thérapeutique. Dans certains cas, les cellules ont accéléré le rejet du greffon, même en présence d'un immunosuppresseur (Cyclosporine A) (Inoue et col., 2006; Kuo et col., 2009). Ainsi, sous certaines conditions, l'activité immunosuppressive des MSC est inexistante, puisqu'il y a plutôt observation d'une augmentation de la réponse immunitaire. Par exemple, en présence de hautes doses de concanavaline A induisant un état inflammatoire élevé, les MSC ont eu une activité immunosuppressive importante alors qu'en présence de petites doses de concanavaline A, ou avec présence de IL-10, l'effet suppressif a été inhibé (Renner et col., 2009). Des études précédentes ont également décrit l'importance d'une inflammation sévère pour pouvoir stimuler les effets immunosuppresseurs des MSC. La protection conférée par celles-ci était moins efficace lorsque les MSC étaient injectées au même moment que la transplantation de moelle osseuse. Un effet thérapeutique était noté lorsque les MSC étaient injectées après l'occurrence de la maladie (Ren et col., 2008).

## 4.5 Méthode d'évaluation

Une grande désillusion a été créée relativement aux résultats modestes des essais cliniques de thérapie cellulaire. Jusqu'à présent, les résultats cliniques sont basés sur des essais avec un nombre restreint de patients. La transition de la thérapie cellulaire en clinique a été plus rapide que l'élucidation des mécanismes de fonctionnement permettant de prévoir quels paramètres cliniques à suivre pour déterminer l'efficacité de la thérapie (Banerjee et col., 2018). Les données précliniques ont démontré une augmentation de la fraction d'éjection de 7.5% alors que cette amélioration a été réduite en clinique entre 2 et 5%. De plus, ces valeurs dérivent de méta-analyses regroupant différents essais cliniques avec différents critères de sélection de patients et différentes populations de cellules (Afzal et col., 2015; Lu et col., 2016).

Le choix des marqueurs pour l'évaluation de l'efficacité thérapeutique est primordial. Alors que l'évaluation de la fraction d'éjection du ventricule gauche LVEF est un paramètre souvent évalué en essai clinique, il serait important de considérer la taille de l'infarctus comme critère d'évaluation fonctionnel clinique substitutif, paramètre permettant de prévoir les effets néfastes de l'infarctus et la progression vers l'insuffisance cardiaque (Larose et col., 2010). L'imagerie cardiaque par résonance magnétique est reconnue comme la méthode par excellence pour l'évaluation de la cicatrice cardiaque.



**Figure 7. Les enjeux clés à surmonter pour une translation efficace de la thérapie cellulaire vers la clinique.**

*La détermination de la source des cellules souches et la standardisation des processus d'isolement et de purification sont des défis cruciaux à surmonter pour optimiser leur efficacité clinique. La dose efficace et sécuritaire ainsi que le pré-conditionnement sont des paramètres à optimiser de même que le choix de la fenêtre de temps pour l'administration et la meilleure route à utiliser, soit systémique ou locale.*

#### **4.6 Stratégies d'optimisation de l'efficacité thérapeutique des ASCs**

Considérant les difficultés logistiques pour l'expansion des MSC pour leur usage clinique, du fait d'un besoin d'une grande quantité de cellules, il est important de développer des stratégies pour augmenter leur potentiel et outre passer cette limitation. Un enrichissement de leur sécrétome

est une avenue intéressante permettant de réduire la quantité de cellules à injecter. Ainsi, par différentes manipulations, que ce soit génétiques ou mécaniques, les MSC sont stimulées à produire en plus grandes quantités des facteurs angiogéniques, anti apoptotiques, anti-fibrotiques ou anti-inflammatoires.

#### **4.6.1 Modification génétique**

La thérapie génique offre un avantage en délivrant un gène thérapeutique dans des cellules déficientes en ce gène. Les MSCs et ASCs peuvent être conditionnées à exprimer un gène en particulier suite à une transfection, afin d'améliorer leur survie ou d'enrichir le sécrétome. Les MSC sur-exprimant Akt ont montré une élévation du niveau de transcrits des gènes impliqués dans la cytoprotection VEGF, HGF et IGF-1 in vitro. Lorsqu'implantées dans un modèle d'infarctus du myocarde chez le rat, il y a eu réduction de la cicatrice et amélioration de la fonction ventriculaire (1,42 fois plus que le contrôle) moins de 72h après la transplantation cellulaire (Gnecchi et col., 2006). D'autres facteurs ont été surexprimés dans les MSC incluant VEGF (Yang et col., 2010) IGF-1 (Haider et col., 2008) et SDF-1 $\alpha$  (J. Tang et col., 2010). Dans le cas des applications de ces cellules dans des modèles de maladies cardiovasculaires, ces MSCs modifiées ont montré un impact positif sur l'angiogenèse, la fraction d'éjection du ventricule gauche et la mobilisation de cellules c-kit et CD31 positives, avec réduction du remodelage ventriculaire principalement grâce aux effets paracrins.

Tout comme les MSC, les ASCs ont été manipulées génétiquement pour produire des facteurs précis dans leur sécrétome ou encore pour stimuler leur différenciation. Une transfection par adénovirus avec VEGF a été utilisée pour stimuler le développement vasculaire dans un modèle d'injure osseuse (Jabbarzadeh et col., 2008). Aussi, la transfection par le miARN miR-302 induit la prolifération et inhibe la mort cellulaire induite par le stress oxydant dans des ASCs humaines (J. Y. Kim et col., 2014). La transfection des ASCs peut même servir à délivrer une molécule oncolytique ou un médiateur tel que décrit dans une étude où la transfection des ASCs par le facteur TRAIL, induisant l'apoptose, a abouti à une diminution de la taille de la tumeur (Jing et

col., 2016). Cependant, les méthodes non-virales de transfection devraient être investiguées davantage et utilisées dû aux limitations quant à l'usage de virus pour l'introduction de gènes (Ranganath et col., 2012).

#### **4.6.2 Préconditionnement protéique ou pharmacologique**

La stimulation des MSC et ASCs par des facteurs ou des cytokines représente une méthode pour moduler leur effet paracrin. Des facteurs tels que le  $TNF\alpha$ , le  $SDF-1\alpha$  et le  $TGF-\beta$  ont stimulé les MSCs à produire plus de VEGF dans le milieu comparativement aux cellules non stimulées *in vitro*. Plutôt qu'administrer un seul facteur, des investigateurs ont étudié l'impact d'un cocktail de facteurs ou de cytokines (Pasha et col., 2008; M. Wang et col., 2007). Les ASCs ont été stimulées avec PDGF, facteur de croissance de plaquettes, et ont démontré une sécrétion plus importante de VEGF et FGF (Hye Kim et col., 2015). Un traitement pharmacologique des ASCs avec le rosuvastatin a augmenté la survie des cellules et leur effet angiogénique post-transplantation dans un modèle d'infarctus du myocarde chez le rat (Z. Zhang et col., 2013). D'autres agents ont été testés comme la vitamine C et E, la mélatonine ou le curcuma, tous ayant augmenté l'action paracrine avec des effets anti-inflammatoires, pro-angiogéniques et anti-stress oxydant. Le preconditionnement avec des antioxydants tel que le celastrol a montré des effets bénéfiques sur la cellule, principalement en activant les mécanismes de défense anti-stress physiologique et antioxydant. Des ASCs pré-traitées avec le sildénafil (Viagra) ont diminué l'apoptose des cardiomyocytes et la fibrose post infarctus à travers la sécrétion de VEGF et IGF (Hoke et col., 2012).

#### **4.6.3 Préconditionnement mécanique**

Ce type de conditionnement est accompli par la manipulation des conditions physiques du microenvironnement comme les forces de cisaillement, l'irradiation lumineuse, le changement

de température ou les constructions 3-D. Toutes ces méthodes ont montré des effets positifs sur le secrétome des cellules. Dans un modèle d'ischémie périphérique murin, les ASCs ayant subi une irradiation à faible intensité lumineuse ont contribué à la vascularisation de la zone ischémique, grâce à une sécrétion accrue de VEGF et bFGF (I. S. Park et col., 2017).

L'utilisation de la technique « hanging drop », ou de gouttes suspendues, permettant de générer des sphéroïdes est un autre exemple de préconditionnement physique. Le groupe de Potapova a ainsi observé une augmentation de 5 à 20 fois les niveaux de IL-11, VEGF et bFGF en comparaison au milieu de culture de cellules sous forme monocouche (Potapova et col., 2007). Une autre étude a montré que les sphéroïdes à base de MSC humaines sécrétaient jusqu'à 60 fois plus de TSG-6 que les monocouches (Bartosh et col., 2010). La formation de sphéroïdes à partir de MSC a augmenté la sécrétion de PGE-2, qui a dirigé la polarisation des macrophages d'un phénotype M1 pro-inflammatoire vers le phénotype M2 anti-inflammatoire (Ylostalo et col., 2012). Les sphéroïdes d'ASCs humaines démontraient une élévation des niveaux des facteurs pro-angiogéniques et anti-apoptotiques VEGF et HGF, avec une survie améliorée lors de leur transplantation intramusculaire dans le membre inférieur ischémique de souris (Bhang et col., 2011).

Une méthode alternative pour créer des structures 3-D sous forme de feuillets fait usage de surfaces régulées par la température où l'incubation des MSC est maintenue à 20°C pour une période de 40 minutes. Une telle méthode permet ainsi d'obtenir des feuillets de monocouches cellulaires (Miyahara et col., 2006). L'Équipe de Hamdi a utilisé les ASCs sous forme de « patchs » cellulaires organisés sur une matrice, ce qui a permis d'observer la réduction de la fibrose et l'augmentation de l'angiogenèse dans la région péri-infarctée, avec amélioration de la fonction cardiaque (Hamdi et col., 2014).

Finalement, la micro-encapsulation a été étudiée pour augmenter la rétention des ASCs implantées au sein d'un myocarde infarcté, avec par exemple le chitosan ou l'hydrogel. Ceci a permis d'augmenter la vasculogénèse et réduire la fibrose (Follin et col., 2015; Paul et col., 2012).





## Chapitre 5 : L'inflammation

L'inflammation est un processus fréquent auquel le corps humain se confronte car il est partiellement constitué de bactéries, en plus des pathogènes dans l'environnement. Cette combinaison est propice à l'initiation d'un processus inflammatoire en cas d'injure tissulaire. L'inflammation est initiée dans le but de limiter la propagation de l'infection et restreindre la région de l'injure. Ceci dans l'optique de restaurer l'hémostase tissulaire. En effet, une réponse efficace à un dommage tissulaire requiert un cheminement commençant par une inflammation et finissant par le remplacement du tissu et sa maturation. La résolution de la phase pro-inflammatoire est critique pour la reconstruction du tissu et sa réparation. Plusieurs types de cellules et de cytokines interviennent dans les mécanismes complexes reliés à l'inflammation. De plus, l'inflammation non résolue participe à la pathogenèse de plusieurs maladies telles que l'athérosclérose, le cancer, l'asthme ou l'arthrite rhumatoïde (Nathan & Ding, 2010). L'inflammation est un processus obligatoire que traverse le myocarde suite à une injure ischémique dû à la mort cellulaire et les dommages vasculaires. Il est donc important de saisir les différentes étapes et acteurs (Elvira Forte 2018).

La première étape de l'inflammation est la reconnaissance du pathogène ou du dommage tissulaire, qui sont constitués de motifs ou molécules généralement exprimés par les pathogènes, ou des signaux de nécrose. La reconnaissance est ensuite faite par des récepteurs transmembranaires (Toll-like receptors TLR ou NOD like receptors NLR). Ceci active ensuite une signalisation dépendante du facteur NFκB, présent de façon ubiquitaire et inactif par liaison avec la kinase IKK. Le fait de ne pas avoir besoin de synthèse protéique dû à la présence ubiquitaire de NFκB, rend le déclenchement de l'inflammation très rapide. Le facteur de transcription active ensuite plusieurs gènes pour produire des cytokines pro-inflammatoires. Avec l'aide de chimioattractants, ces cytokines vont faire appel à plusieurs cellules effectrices telles que les neutrophiles, les monocytes et les lymphocytes (Tableau 2) (Nathan & Ding, 2010).

## 5.1 Les principaux acteurs de l'inflammation

### 5.1.1 Les neutrophiles

Les leucocytes polymorphonucléaires, ou neutrophiles, sont les premiers répondants dans l'inflammation. En condition physiologique, les neutrophiles se retrouvent dans la moelle osseuse, la rate, le foie et les poumons (Kolaczkowska & Kubes, 2013). Ils sont continuellement générés à partir de précurseurs myéloïdes. Ils sont rapidement dépêchés au site d'injure dans le but d'éliminer par phagocytose le pathogène ou les débris cellulaires. Ils sont donc appelés par les signaux d'alarme communément nommé « DAMP » (*damage associated molecular pattern*), ainsi que par la sécrétion de cytokines et chimiokines, de médiateurs lipidiques et de composantes du complément. Les neutrophiles en circulation roulent sur la couche endothéliale en direction du site d'injure. Un phénomène possible grâce à la présence de plusieurs classes de molécules d'adhésion entre les neutrophiles et les cellules endothéliales (ICAM, VCAM). La liaison des intégrines des neutrophiles aux récepteurs sur l'endothélium permet une adhésion ferme et une stabilisation pour transmigrer. L'accumulation de neutrophiles crée un microenvironnement cytotoxique, dû entre autres à leur dégranulation qui relâche des protéases et des molécules hautement nocives, en plus de la production de stress oxydant. Ceci engendre un dommage sur les pathogènes mais aussi sur les cellules de l'hôte, affectant l'organisme (Eming et col., 2009). Les neutrophiles ont une durée de vie très courte et participent à la transition vers la résolution de l'inflammation par la relâche de médiateurs comme les résolvines et lipoxines, avec l'expression de signaux permettant leur déplétion du tissu par les monocytes (Bonaventura et col., 2016).

### 5.1.2 Les monocytes

De façon concomitante au recrutement des neutrophiles, les monocytes commencent également à infiltrer le site d'injure pour se différencier en monocytes matures ou macrophages tissulaires. Les monocytes de la circulation sanguine contribuent à hauteur de 10% du compte de leucocytes dans le sang chez la souris et chez l'humain (Sager et col., 2017). L'activation des macrophages tissulaires résulte en deux sous-types. Les macrophages issus de l'activation dite classique (M1) exercent une activité pro-inflammatoire, supprimant l'invasion de microorganismes. L'activation alternative produit les macrophages M2, qui sont plutôt réparateurs, impliqués dans la clairance des débris, l'angiogenèse et le remodelage tissulaire (Eming et col., 2009). Ils sécrètent IL-10, TGF- $\beta$  et VEGF entre autres. Des études ont également révélé la présence d'une quantité importante de macrophages résidents dans le myocarde. En condition physiologique, ils ont le phénotype des M2, contribuant à la maintenance de l'hémostase du tissu myocardique (Pinto et col., 2012). En réponse à un dommage dans le myocarde, ils activent le remodelage vasculaire à travers la sécrétion de IGF-1, qui active l'angiogenèse.

### 5.1.3 Les lymphocytes

Alors qu'en condition physiologique, la circulation des lymphocytes est strictement dirigée vers les organes lymphoïdes, en situation inflammatoire, les lymphocytes sont appelés vers le tissu. Dans le cas d'une blessure topique, les lymphocytes T sont les plus abondants de l'immunité acquise dépêchés au site. Ils participent à la maturation de la cicatrice. L'accumulation de lymphocytes est associée à une forte expression de MCP-1 (Eming et col., 2009).

En inflammation cardiaque, plusieurs classes de lymphocytes T ont été identifiés dans différents modèles d'infarctus du myocarde. Les lymphocytes T effectrices relâchent des médiateurs pro-inflammatoires, alors que les cellules régulatrices Treg contrebalancent avec des propriétés immunosuppressives. Ces actions protectrices des Treg sont liées à la sécrétion de médiateurs

mais aussi au contact direct cellule à cellule. Les Treg jouent un rôle important dans l'hémostase immunitaire (Frangogiannis, 2012).

**Tableau 3. Les cellules inflammatoires, leurs fonctions et les médiateurs relâchés lors de la réparation tissulaire.**

Type de cellule	Fonction	Médiateurs
Cellules polymorpho-nucléaires (Neutrophiles)	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Phagocytose des agents infectieux.</li> <li>- Activation des macrophages suite à leur phagocytose.</li> <li>- Amplification de la réponse inflammatoire.</li> <li>- Stimulation de la réponse de guérison</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- ROS (stress oxydant)</li> <li>- Protéases (Elastase, cathepsine G)</li> <li>- TNF<math>\alpha</math>, IL-6, IL-1<math>\beta</math></li> <li>- VEGF, IL-8</li> </ul>
Monocytes/Macrophages	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Phagocytose de PMN et fragments de tissus dégradés.</li> <li>- Amplification de la réponse inflammatoire</li> <li>- Propriétés anti-inflammatoires</li> <li>- Stimulation de la réponse de guérison (Angiogenèse)</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- TNF<math>\alpha</math>, IL-1<math>\beta</math>, IL-6</li> <li>- IL-10, TGF-<math>\beta</math>1</li> <li>- VEGF, bFGF, PDGF</li> </ul>
Lymphocytes T (effectrices et Treg)	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Régulation du remodelage</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- TNF-<math>\alpha</math>, IL-10, TGF-<math>\beta</math></li> </ul>

## 5.2 L'implication de l'inflammation dans l'infarctus du myocarde

En réponse à un dommage, le myocarde mammifère adulte se répare par cicatrisation dû à la perte de son potentiel régénérateur. La réparation du myocarde commence alors avec une phase inflammatoire intense avec infiltration de cellules immunitaires, suivie par une phase de prolifération et enfin la phase de remodelage ou maturation (Figure 8).

Suite à la privation d'oxygène et de nutriments due à une occlusion coronarienne, les cardiomyocytes meurent par nécrose de coagulation ou par apoptose. Ces cellules relâchent alors leur contenu intracellulaire, ce qui active les mécanismes d'immunité innée et ainsi la phase inflammatoire. Les fragments de matrice extracellulaire et de cellules nécrotiques agissent à titre de signaux d'alarme (DAMPs) qui activent les récepteur transmembranaires TLR, le système du complément ou le récepteur RAGE (*receptor for advanced glycation end-products*). L'identité exacte des signaux d'alarme reste inconnue, mais des études *in vitro* et *in vivo* ont montré que l'interleukine 1 $\alpha$  (IL-1 $\alpha$ ) agissait à titre de premier signal danger relâché par les cardiomyocytes nécrotiques. IL-1 $\alpha$  active les fibroblastes cardiaques qui deviennent pro-inflammatoires (Lugrin et col., 2015). L'activation des TLR converge vers la transduction du signal par NF $\kappa$ B pour la production de cytokines inflammatoires et chimiokines. Il y a eu démonstration également de relâche d'ARN et de miARN par les cardiomyocytes, qui agissent comme stimuli pro-inflammatoires (C. Chen et col., 2014).

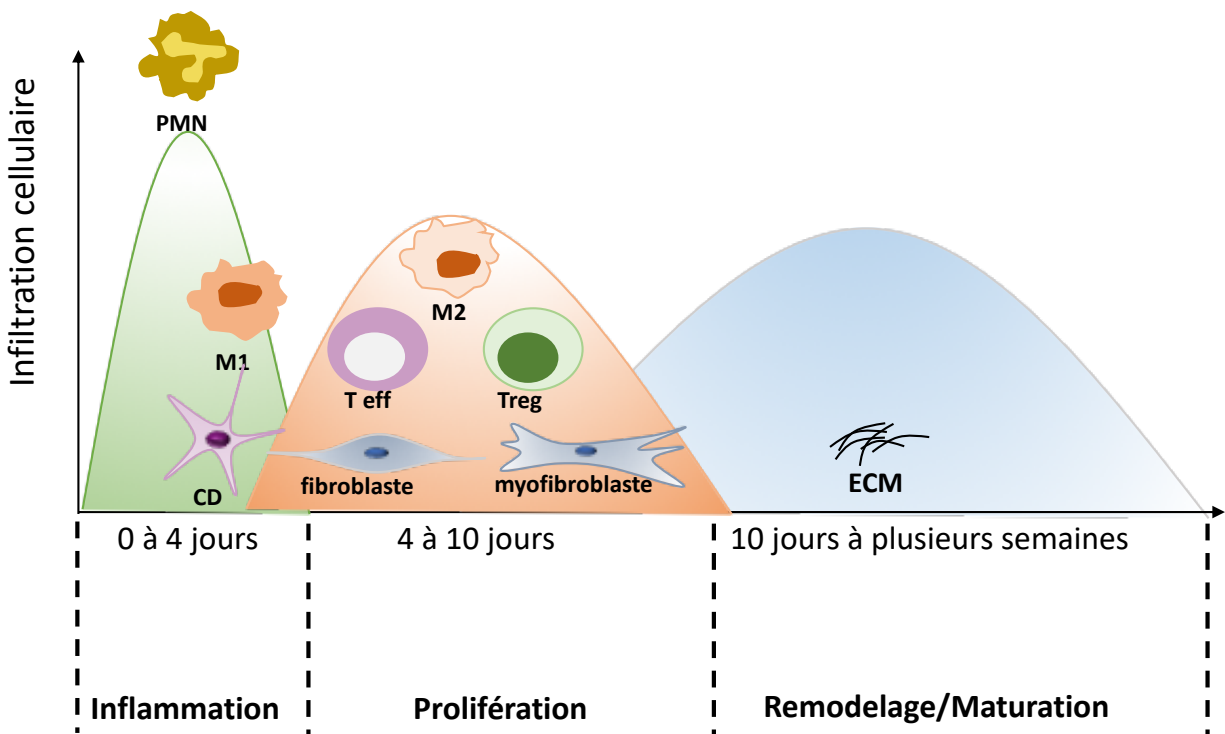
L'environnement cytotoxique avec présence de ROS (*reactive oxygen species*) et de cytokines pro-inflammatoires stimule la synthèse de molécules d'adhésion sur les cellules endothéliales, et une augmentation de l'expression des intégrines sur les leucocytes. Les neutrophiles sont premiers à arriver dans le myocarde suivi de peu par les cellules dendritiques. Les neutrophiles sont capturés et roulent sur l'endothélium grâce à l'interaction avec les molécules d'adhésion. Une fois stabilisés avec une ferme adhésion entre les intégrines et les molécules d'adhésion sur l'endothélium, ils transmigrent vers le tissu. Ils s'occupent ensuite de la clairance du myocarde des débris cellulaires. Dans les modèles murins, les neutrophiles sont éliminés au bout de 3 à 7 jours (Dewald et col., 2004). Ils subissent l'apoptose qui représente un mécanisme de résolution de l'inflammation. Ces neutrophiles apoptotiques lancent des signaux tels que l'annexine A1, permettant de faire appel aux monocytes phagocytaires pour nettoyer l'environnement.

Les macrophages, cellules phagocytaires par excellence, sont recrutés pour se débarrasser des neutrophiles apoptotiques. Ils sont recrutés non seulement de la moelle osseuse mais aussi de la rate, qui sert de réservoir pour déploiement rapide vers les sites inflammatoires. D'autres études ont également démontré la présence de macrophages résidents dans le tissu myocardique qui jouent un rôle important dans l'activation de l'inflammation. La prolifération des macrophages

résidents et le recrutement des monocytes de la circulation déclenchent la phase de prolifération (Sager et col., 2017). De plus, les macrophages secrètent des médiateurs tels que IL-10, le TGF- $\beta$  ou les résolvines, médiateurs lipidiques pour la résolution de l'inflammation. Deux phénotypes distincts ont été décrits dans l'inflammation post infarctus du myocarde tel que mentionné plus haut. Les signaux inflammatoires sont à leur maximum au jour 3 post-infarctus, où il y a début de recrutement des monocytes de la circulation qui se différencient de façon prédominante en macrophages pro inflammatoires (Nahrendorf et col., 2007). Les macrophages M1 secrètent des médiateurs pro-inflammatoires et les M2 secrètent des médiateurs anti-inflammatoires tels IL-10. Toutefois, cette polarisation M1/M2 est considérée comme simplifiée car l'environnement après un infarctus du myocarde est complexe avec l'expression de cytokines, chimiokines et facteurs de croissance avec une régulation spatio-temporelle changeante. Mosser et Edwards ont proposé qu'en plus des macrophages pro inflammatoires classiques, il existe des macrophages avec des fonctions réparatrices et régulatrices (Mosser & Edwards, 2008). Les macrophages dérivés de l'activation alternative M2 avec des propriétés anti-inflammatoires sont à leur pic aux jours 5 à 7 post infarctus dans les modèles murins (Lambert et col., 2008; Nahrendorf et col., 2007). Dans cet état inflammatoire, le myocarde est également infiltré de lymphocytes, démontrant l'implication de l'immunité acquise dans le processus de réparation du myocarde post-infarctus. Les cellules dendritiques participent d'ailleurs à leur recrutement en relâchant des médiateurs pro-inflammatoires. Après l'infarctus, les cellules T effectrices sont activées dans les ganglions lymphatiques proximaux, et commencent à coloniser le myocarde. Elles relâchent des médiateurs pro-inflammatoires alors que les lymphocytes T régulatrices (Tregs) ont des propriétés suppressives et surveillent l'intensité de la réponse immunitaire (Littman & Rudensky, 2010). Même si l'infiltration de lymphocytes T est faible, leur rôle demeure important dans la résolution de l'inflammation cardiaque.

Responsables de la matrice extracellulaire et résidant dans le myocarde, les fibroblastes cardiaques demeurent quiescents en absence de dommage. Mais suite à une injure, ils sont stimulés par les signaux d'alarme DAMPs pour relâcher des cytokines pro-inflammatoires (W. Chen & Frangogiannis, 2013). La conversion des fibroblastes en myofibroblastes, exprimant des fibres de stress et des protéines contractiles, est un marqueur de la phase proliférative. Le TGF- $\beta$

est un des facteurs principaux impliqués dans la différenciation vers les myofibroblastes. C'est aussi dans la phase proliférative que la néo-angiogenèse se fait grâce à la régulation par VEGF et SDF-1 $\alpha$ . Les dépôts de fibrine et fibronectine commencent à former une matrice extracellulaire provisoire pour commencer la cicatrisation du cœur, qui va culminer en une phase de maturation avec la stabilisation de la cicatrice pour éviter ainsi la rupture du myocarde.



**Figure 8. Les différents acteurs de l'inflammation post infarctus du myocarde.**

*Dans la phase aiguë post-infarctus, une réponse robuste de l'immunité innée et adaptative mène à l'appel de neutrophiles (PMN) et de cellules dendritiques (CD) qui activeront l'appel des lymphocytes T effectrices (Teff) mais aussi les T régulatrices (Treg). Viennent ensuite les macrophages sous leur phénotype pro-inflammatoires (M1) pour la clairance des neutrophiles apoptotiques et qui ensuite se polarisent vers (M2). Dans la phase de prolifération, l'activation des fibroblastes est suivie de leur transition vers le phénotype myofibroblastes afin de commencer la*

*cicatrisation. La phase finale est celle du remodelage avec formation d'une matrice extracellulaire (ECM) stabilisée.*

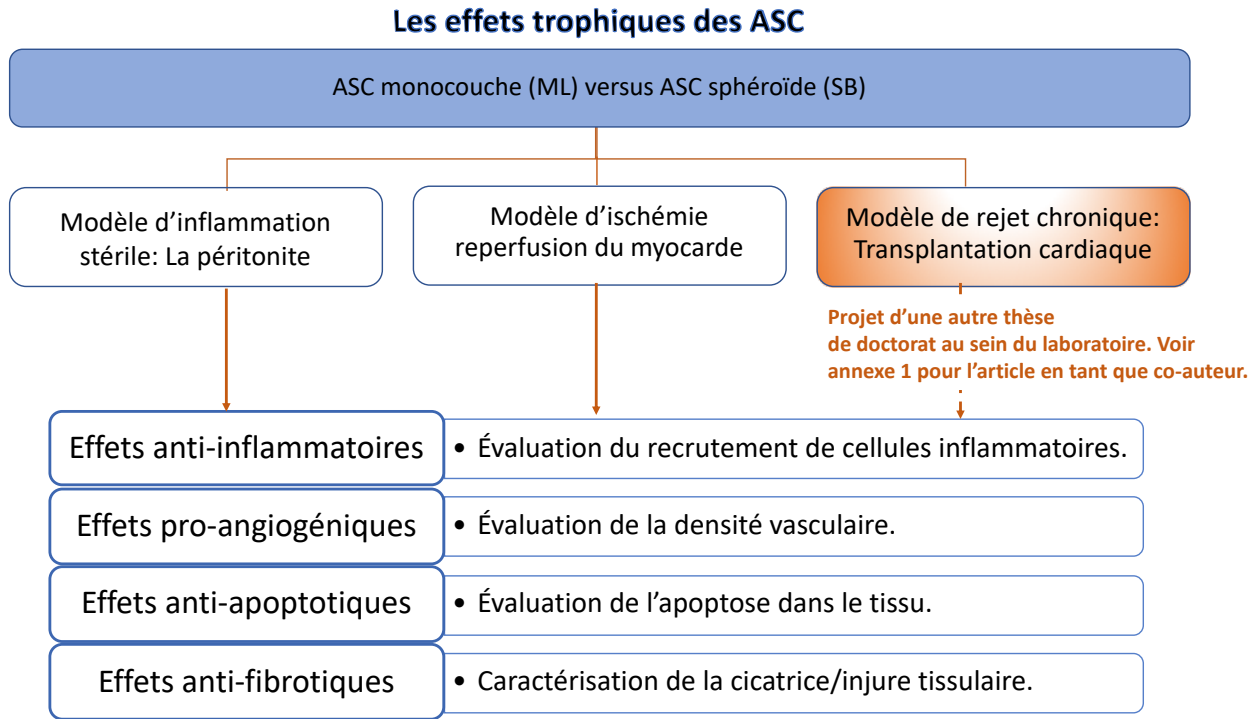


## Objectifs et hypothèses

Ce projet de doctorat est bâti autour de la recherche de nouvelles méthodes de traitement de l'infarctus aigu du myocarde de façon non invasive. Étant donné toute la littérature décrivant le riche sécrétome des MSCs et ASCs en facteurs de croissance, facteurs et cytokines anti-inflammatoires, pro-angiogéniques et anti-apoptotiques, nous avons voulu étudier un aspect nouveau de la guérison médiée par les ASCs i.e. l'effet endocrinien, et non les effets autocrins ou paracrins, bien décrits en association avec l'usage de cellules stromales. Ainsi, nous avons choisi d'investiguer à quel point le cocktail de médiateurs des ASCs pouvait promouvoir la guérison du myocarde infarci, sans que les cellules soient en contact direct avec le tissu lésé. Nous avons choisi de faire usage de cellules souches adipeuses humaines commercialisées.

Comme l'inflammation est un aspect primordial de la pathophysiologie de l'injure ischémique du myocarde, nous avons d'abord voulu tester l'efficacité de la transplantation distale des ASCs sur un modèle d'inflammation stérile aigu chez le rat. Nous avons émis comme prémisse que l'injection non invasive sous cutanée de ASCs pouvait promouvoir la guérison dans un modèle simple de péritonite. Comme une des stratégies d'optimisation de l'efficacité thérapeutique des ASCs est de produire des structures 3-D pour enrichir le sécrétome, nous avons utilisé les ASCs sous forme standard injectées en suspension, et sous forme de sphéroïdes. Les objectifs principaux étaient d'évaluer la structure tissulaire en réponse au traitement, l'infiltration par les neutrophiles et macrophages, et l'angiogenèse (Figure 9).

Le second modèle utilisé est un modèle de cardiopathie ischémique suite à l'ischémie reperfusion. Nous avons également en objectif de caractériser l'effet thérapeutique des ASCs sous la forme monocouche et sphéroïdale, et de comparer la transplantation directe à l'injection distale. La caractérisation de la cicatrice et la fonction myocardique sont effectuées. Il est aussi question de déterminer l'impact des cellules sur l'inflammation du myocarde et la vasculogenèse.



**Figure 9. Résumé des objectifs des projets de thèse sur les différents modèles animaux utilisés.**

## Chapitre 6 : Manuscrit #1

### 6.1 Mise en contexte

Tel que discuté dans les chapitres précédents, la richesse et la variété des facteurs sécrétés par les MSC et les ASCs a dirigé la discussion sur les effets thérapeutiques induits par ces médiateurs, plutôt que par la différenciation directe ainsi que le remplacement des cardiomyocytes lésés par des cellules souches. Les médiateurs sécrétés par les cellules souches peuvent agir sur la cellule elle-même à travers une signalisation autocrine, grâce à la disponibilité de récepteurs spécifiques à ces médiateurs. De plus, la littérature abonde de preuves précliniques et cliniques des effets paracrins des cellules sur la cardiopathie ischémique. L'activité paracrine est définie par une signalisation dépendante de facteurs ou cytokines diffusant sur une courte distance pour induire un impact.

Dans ce manuscrit, sous forme de revue, il y aura définition de ces deux types de signalisations et de leur importance dans les effets thérapeutiques des MSCs et ASCs sur la cardiopathie ischémique. De plus, il y aura discussion sur un troisième type de signalisation qui s'apparente à une activité endocrine, puisque la transplantation de cellules à distance a déjà mené à des effets bénéfiques. L'analogie avec le système endocrinien provient du fait que les médiateurs empruntent la circulation périphérique pour atteindre l'organe lésé, ressemblant à une hormone qui migre de son site de production vers son site d'action à distance.

Ce manuscrit est publié dans le *Journal Of Translational Medicine*, sep 2020

# Mesenchymal Stem Cell Mediates Cardiac Repair Through Autocrine, Paracrine and Endocrine Axes

Celia Sid-Otmane<sup>1,2</sup> • Louis P. Perrault, MD, PhD<sup>1,2,3</sup> • Hung Q. Ly\*, MD, MSc, FRCPC<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Department of Pharmacology and Physiology and Department of Medicine, *Université de Montréal*, QC, Canada.

<sup>2</sup>Research Centre, Montreal Heart Institute, *Université de Montréal*, Montréal, QC, Canada.

<sup>3</sup>Department of Cardiovascular Surgery, Montreal Heart Institute and *Université de Montréal*, Montreal, QC, Canada

**Short title:** MSC mediate cardiac repair through different axes

**Word count:** 6151 (from abstract to figure legends)

**\* Corresponding author**

Hung Q. Ly, MD, SM, FRCPC; Montreal Heart Institute; 5000 Belanger Street;

Montreal, Quebec H1T 1C8, Canada.

Tel: 1-514-376-3330, #2438

Email: [qh.ly@umontreal.ca](mailto:qh.ly@umontreal.ca).

## **Abstract**

In the past decade, despite key advances in therapeutic strategies following myocardial infarction, none can directly address the loss of cardiomyocytes following ischemic injury. Cardiac cell-based therapy is at the cornerstone of regenerative medicine that has shown potential for tissue repair. Mesenchymal stem cells (MSC) represent a strong candidate to heal the infarcted myocardium. While differentiation potential has been described as a possible avenue for MSC-based repair, their secreted mediators are responsible for the majority of the ascribed prohealing effects. MSC can either promote their own survival and proliferation through autocrine effect or secrete trophic factors that will act on adjacent cells through a paracrine effect. Prior studies have also documented beneficial effects even when MSCs were remotely delivered, much akin to an endocrine mechanism. This review aims to distinguish the paracrine activity of MSCs from an endocrine-like effect, where remotely transplanted cells can promote healing of the injured myocardium.

**Keywords:** Paracrine • Autocrine • Endocrine • Mesenchymal stem cells • Remote delivery

## **Background**

Ischemic heart disease (IHD) due to coronary artery disease remains a serious burden on health systems across Western countries. Medical advances and device-based therapies have impacted mortality and improved quality of life of such patients (1). These therapies are designed to rescue the ischemic but viable tissue only and fail to address the key molecular targets participating in the pathological cardiac remodeling (2). Cardiomyocytes being terminally differentiated with minimal regenerative ability (0,5-2%), cardiac transplantation remains the only true cure for failing hearts (3). However, the limited number of available donors limits the impact of such a therapeutic avenue. Tissue regeneration has emerged as a promising field of research using mainly cell-based therapy (4).

Embryonic and adult stem cells are capable of generating new tissue through differentiation into multiple lineages. Embryonic stem cells (ESC) isolated from the inner cell mass of blastocysts are pluripotent and capable of generating the three germinal layers (5). However ethical issues and teratoma formation limit their clinical use. Induced pluripotent stem cells (iPSC) have very similar characteristics to ESC where terminally differentiated cells have been used to generate pluripotent cells (6). Clinical translation of iPSC overcomes ethical issues related to ESC but security concerns with teratoma formation hinder their clinical use (7).

Of the adult stem cells, MSCs represent an interesting population that garnered increased interest for clinical translation in the past decade. First identified and isolated from bone marrow, stromal stem cells have now been isolated from various organs such as placenta, cord blood or adipose tissue (8). When isolated from adipose tissue, they are called adipose derived stem/stromal cells (ASCs) and have become attractive candidates for cell-based therapy as they are readily and more easily isolated while engendering minor donor discomfort, compared to their bone marrow

derived counterparts. Furthermore, adipose tissue offers higher quantities of stem cells compared to bone marrow (9). At first, the self-renewal and differentiation of stromal stem cells were the main reasons for their use in regenerative medicine. Moreover, their low immunogenicity and documented immunomodulatory properties (10) prompted the possibility to have a bank of cells available for allogenic transplantation for “off the shelf” use in various clinical conditions. The major limitation in their therapeutic efficacy however has been their low engraftment after transplantation (11). Nevertheless, in the last decade, conflicting results on engraftment percentage prompted a debate as to whether engraftment was mandatory to the therapeutic efficiency. It is very unlikely that the low engrafted rate of cells explains the reported therapeutic impact in both preclinical and clinical studies (12). The trophic and immunomodulatory properties of MSCs are now believed to be the main mechanism underpinning the therapeutic impact in preclinical studies (13). Unfortunately, there remains discrepancies between animal models and clinical studies that hamper the transition from bench to bedside. Unraveling key modulators in the secretome will promote successful clinical transition.

In order to heal after an ischemic episode, different processes need to act in concert (Fig.1). Cardiac cell-based therapy can either act directly through transdifferentiation and fusion to replenish the lost tissue or indirectly by promoting angiogenesis, immunoregulation and inhibiting apoptosis and fibrosis through released factors (14). Various clinical trials have been conducted using MSCs or ASCs in cardiovascular disease. Studies have examined both autologous and allogeneic cell transplantation (summarized in Table 1). The POSEIDON study concluded on comparable safety and efficacy between allogeneic and autologous MSCs (15). The PRECISE study was the first randomized placebo-controlled trial showing feasibility and safety of transendocardial administration of ASCs (16). Adverse effects have been rarely reported and cells

showed some efficacy in improving cardiac function. However, better knowledge of parameters such as delivery route, cell dosage and appropriate timing for administration can substantially improve effectiveness (17). Rushing translation to clinical application despite poor understanding of the biological mechanisms have yielded heterogeneous efficacy outcomes. Investigating the kinetics of cell or derived components delivery is still a challenge. There is a lack in defining the best scenario between early and late administration, balancing between risk of toxic microenvironment for the injected material early-on after reperfusion or massive tissue damage because of delayed administration. From clinical studies, it was demonstrated that the most efficient time window for treating myocardial infarction is within a week after reperfusion (18). More trials should follow this lead in order to confirm this time window.

### **Adipose Tissue Derived Stem/Stromal Cells**

ASCs were first discovered after their isolation from processed lipoaspirate by Zuk *et al.* in 2001 (19). ASCs share many properties with bone-marrow MSC including their tri-lineage differentiation and the production of a variety of mediators. ASCs contribute directly to the homeostasis, tissue reparation and cell renewal in the adipose tissue. The International Fat Applied Society reached a consensus in 2013 regarding the minimum phenotypic criteria to characterize ASCs as CD39+, CD73+, CD44+, CD105+, CD90+, CD45-, CD31- plastic adherent stem/stromal cells. The expression of certain surface markers such as CD34 may change throughout cell division, meaning that different subpopulations of ASCs may exist *in vivo* (20). They secrete factors that may inducing angiogenic and anti-apoptotic effects along with immunomodulatory properties. Therapeutic use of ASCs has thus far been promising in translational studies with encouraging data regarding safety and feasibility in clinical trials (21). The interest in ASCs rests less on their



differentiation capacity but rather on their ability to modulate their microenvironment by affecting injured cells through the release of a plethora of mediators.

### **Direct Mechanism for Cardiac Repair: Differentiation and Fusion**

The differentiation of MSCs/ASCs into cardiomyocytes, endothelial cells and vascular smooth muscle cells, the three main components of the cardiovascular system, have been previously been reported as achievable (22). More specifically, *in vivo* differentiation of ASCs into cardiomyocytes has been documented since its first description (23). After 3 weeks of treatment with 5-Azacytidine, cells showed spontaneous beating when observed under phase contrast microscope. Full phenotype characterisation showed positive staining for myosin heavy chain,  $\alpha$ -actinin and troponin I. The differentiation was maintained up to 2 months. Cardiomyogenesis was also shown on ASCs spontaneously, with a pacemaker activity documented in electrophysiological studies on early ASC culture. Nevertheless, 5-Azacytidine induced cardiomyogenic differentiation remains controversial as such findings were not reproducible. Key cardiac marker expression such as cardiac troponin I and T and sarcomeric  $\alpha$ -actinin as well as cardiac transcription factors GATA4 and Nkx2,5 were not detected (24).

Several studies have demonstrated *in vivo* engraftment and further differentiation into cardiomyocytes and endothelial cells after myocardial infarction (MI) (25, 26). Yoon *et al.* reported engraftment and transdifferentiation of intramyocardially transplanted MSCs into cardiomyocytes (27). Moreover, Valina *et al.* compared the intracoronary infusion of both BM-MSCs and ASCs on a porcine acute myocardial infarction (AMI) model. The group described similar efficacy of ASCs and BM-MSCs on cardiac function and angiogenesis but ASCs had better impact on LV

remodelling (28). This study also showed cell engraftment 4 weeks after transplantation with expression of endothelial cell markers CD31 and vWF in the engrafted cells. Fusion and mitochondrial transfer might also be another mechanism to cardiomyogenesis following ASCs transplantation (29). One study showed in a murine AMI model, fusion of ASCs with cardiomyocytes with expression of connexin 43 and troponin I (30). However, an important percentage of transplanted cells were lost through apoptosis or other mechanisms due to the harsh microenvironment in the infarcted area. Subsequently, it was also reported that a mild percentage of engraftment occurred without differentiation into cardiomyocytes, endothelial cells or smooth muscle cells (31). Thus, it is unlikely that the transdifferentiation or cellular fusion of the low level of engrafted cells could account for the improved cardiac function after stem cell delivery.

### **Autocrine Effects**

The autocrine activity of MSCs is induced by secreted factors acting on the stem cell itself. The majority of studies exploring the autocrine effects of MSCs are related to their differentiation capacity (32, 33). Mediators in the conditioned media influenced differentiation capacity of MSCs or ASCs through an autocrine loop (34, 35). For example, an autocrine signalling activity of VEGF-A was shown to influence osteogenic differentiation of human MSCs (36). Another group demonstrated the importance of released FGF-2 and HGF on stemness of MSCs (37). In addition, autocrine regulation has been described to influence immunomodulator mediators release. Stimulation of TLR3 on MSCs, which produced high levels of IL-6 and IL-8, upregulated TLR3 expression, hence inducing a positive feedback loop on IL-6 and IL-8 secretion (38). Furthermore, autocrine effects can enhance survival or proliferation of stem cells in a hostile microenvironment. Lee *et al.* proved that PGE-2 secreted by human umbilical cord blood MSCs and ASCs plays a

major role in maintenance of their self-renewal through EP2 receptor (39).

### **Paracrine Effects**

It is now widely accepted that the main benefits of MSC therapy are derived from the effects of secreted factors acting on neighboring cells through a paracrine phenomenon. The diversity in the secreted factors constituting the secretome has been described and key factors have been identified such as VEGF, HGF, IGF-1, SDF1 $\alpha$ , TGF- $\beta$  and TSG-6 (40-42). These mediators stimulate angiogenesis, inhibit apoptosis or modulate inflammatory pathways. Intramyocardial or intracoronary administration of stem cells are the routes for direct delivery that can permit paracrine effects on the injured myocardium. Bobi *et al.* used a porcine model of AMI and demonstrated increased gene expression of SDF-1 $\alpha$ , GM-CSF and VEGF early on after intracoronary ASC injection. Enhancement of neovascularization is one of the most important therapeutic approaches needed to limit complications from post ischemic injury. Pro-angiogenic, antiapoptotic and anti-inflammatory effects have been described in this study (43). Unfortunately, clinical studies used intracoronary administration of MSCs in acute myocardial infarction with contradictory findings, some showing improvements while others failed to report significant effects on either cardiac function or remodeling (44-46). Intracoronary infusion has been preferred for the specificity of cell delivery to the target area. Caution has been raised regarding use of this route of delivery which might be associated with microvascular embolization leading to no-reflow phenomena. Nonetheless, recent clinical trials recognized safety of intracoronary injection of up to 50 millions of large size stem cells if injected a few days after myocardial infarction (47, 48).

Intramyocardial delivery has been associated with limited cell retention and engraftment.

However, whether injected in the infarcted area or in the peri-infarcted zone, intramyocardial delivery of MSCs was able to ameliorate the infarct size. Perin *et al.* reported improved left ventricular ejection fraction (LVEF) and enhanced capillary density with transendocardial injection of allogenic MSCs in a canine AMI model (49). However, Rigol *et al.* found that intracoronary infusion of ASCs improved neovascularization in porcine MI model compared to transendocardial demonstrating some conflicting results (26).

Yang *et al.* also concluded that the cardioprotective effect attributable to ASCs was mainly due to paracrine effects. They compared human ASCs vs. ASC-conditioned medium in a mice model of MI and observed a reduced infarct size, reduced cardiomyocyte apoptosis and improved cardiac function by both treatments. These results illustrated the sufficient impact of a cocktail of mediators injected in the peri-infarcted area (50).

Extracellular vesicles (EVs) are now recognized as important intercellular messengers involved in transmission of biological signals including proteins, lipids and RNAs. Exosomes are one subgroup of EVs originating from the fusion of multivesicular bodies and plasma membrane of stem cells and are retrieved in the secretome of MSCs of different origins. They are particularly enriched with mRNAs or micro RNAs (miRNAs) and have been investigated in acute kidney injury and ischemic disease such as stroke and myocardial ischemia reperfusion injury (51). Some groups have experimented direct myocardial injection of MSC derived exosomes and observed reduced infarct size, preserved systolic/diastolic function and enhanced angiogenesis in a rat model of MI (52, 53). Based on some reports, MSC-derived exosomes are accountable for the cardioprotective effects as their depletion from the conditioned media suppressed this protection (53). This statement implies minor impact of cytokines and factors in the conditioned media of MSCs. It is presumed that exosomes are less prone to enzymatic degradation than the above-mentioned factors.

The exact components of the cargo of exosomes that provide cardioprotection are yet to be discovered and characterized. It is fundamental to investigate efficacy difference between injecting conditioned media or MSCs, knowing that the advantage of cell injection is the responsiveness to the specific microenvironment whereas secretome can't anticipate the pathological environment. It is even more complex knowing that some groups have demonstrated that not all exosomes are equivalent in their therapeutic impact (54, 55)

Endogenous cardiac progenitor cells in the myocardium are likely able to differentiate into cardiomyocytes, endothelial cells or smooth muscle cells to contribute to cardioprotection once activated. Given that their isolation and expansion is complex and still needs optimization for clinical application, stimulation and activation of endogenous progenitor cells by MSC secretome represents an advantage that can be exploited by cardiac cell therapy. Findings from *in vitro* and *in vivo* experiments have alluded to augmented differentiation and proliferation of cardiac progenitor cells through paracrine effects of MSCs (56, 57). Release of SDF-1 $\alpha$  and VEGF from transplanted MSCs and myocardial tissue was responsible for c-kit<sup>+</sup> cell mobilization from the heart itself and from bone marrow to the infarcted region (57).

### **Endocrine-like Effect**

An endocrine organ secretes hormones and factors that act at distance on other tissues. Factors need to circulate systemically to reach their specific receptors in order to intervene in their endocrine feedback loop. Aside from intracoronary and intramyocardial injections of MSCs discussed above, another route of delivery that has been tested in clinical trials is the intravenous injection, which is associated with ease of use and clinical translation. The pulmonary first pass effect has limited the

number of cells reaching the infarcted myocardium when injected intravenously. Homing to the damaged tissue is then limited by entrapment in microvasculature when using this systemic administration (58). Despite this seemingly disadvantageous side effect, Lee *et al.* have reported that entrapped MSCs in the lungs vasculature can induce therapeutic effects on the myocardium, reducing infarct size and improving cardiac function. These effects were attributed to various secreted factors but mainly TSG-6 (42). This report remains a key finding hinting to an endocrine-like effect induced by secreted factors following cardiac cell therapy.

Intramuscular administration of stem cells is another remote delivery method that has been investigated for cardiac repair. In a rat dilated cardiomyopathy model, an intramuscular injection of human umbilical cord derived stem cells significantly elevated LVEF and left ventricular fraction shortening. Levels of circulating HGF, LIF, GM-CSF and VEGF were increased as well as the myocardial expression of HGF, IGF-1 and VEGF without stem cell homing to myocardium. Moreover, intramuscular injection into skeletal muscle did not induce any inflammation or ulceration in the tissue (59). Intramuscularly administered MSC are largely trapped in the musculature without any detectable migration. A further advantage to the use of skeletal muscle as a repository for cell delivery is the ability to perform more than one injection without increased risk compared to more invasive methods. Remote delivery of MSCs into hind limb skeletal muscle has been found to improve ventricular function in a hamster heart failure model (60). Elevated levels of HGF, LIF and G/M CSF as well as increased circulating c-kit cells, CD31+ cells and CD133+ cells were detected. Investigators considered the existence of a crosstalk between injected MSCs and endogenous bone marrow cells that would elicit increased activation of cardiac c-kit cells, involved in the cardiac repair. This crosstalk describes the dynamic and functionally relevant signalling pathways involved in the stem cell cardiac repair. Activated cardiac progenitor cells can

further stimulate myocardial expression of paracrine factors.

Although subcutaneous MSC administration has been widely used in wound repair studies, its use in cardiac disease remains unexplored. Preda *et al.* hypothesized that a remote transplantation of ASCs transfected with heme oxygenase 1 could protect the heart from ischemia reperfusion injury. They reported that subcutaneously injected ASCs did not migrate systemically yet proliferated locally at the injection site. These genetically modified ASCs were able to improve cardiac functions post infarct despite their remote location from the site of injury (61). Thus, Pentraxin 3 was identified as a possible mediator, acting in an endocrine-like manner to enact cardioprotection against ischemia reperfusion injury.

Human pharmacokinetic of biologic drugs is predictable when injected intravenously but this remains less clear regarding subcutaneous injections. Understanding the biodistribution and absorption of drugs delivered subcutaneously remains complex because of challenges to correlate preclinical findings in clinical setting due to the inherent difference in the subcutaneous tissue between humans and other species. Prediction of human pharmacokinetics following subcutaneous injection would rely on mechanistic studies rather than empirical scales. The implication of the lymphatic system in this route of delivery is also important. Blood capillaries are tight in their endothelial junctions, the transfer of macromolecules is then facilitated in the lymphatic capillaries as they have incomplete basal lamina which enables drainage of interstitial macromolecules without size restriction (62).

Exosomes as well as other trophic factors are the main actors of the immunoregulatory effect provided by MSCs. The main elucidated mechanisms in immunoregulation involve indoleamine 2,3-deoxygenase (IDO) or inducible nitric oxide synthase (iNOS), depending on the source of MSCs. IDO is an enzyme that catabolizes tryptophan and iNOS produces NO and both mediators

can inhibit T Cells (10). Genetic knockdowns of these enzymes proved their implication in the immunosuppression, but the exact mechanisms are still unclear. Some direct interaction between MSCs and immune cells can also occur. Expressed factors on MSCs such as the co-stimulatory factors PDL1 and FASL can inhibit activated T cells by binding to CD80 (63).

The remote impact of MSCs on cardiac repair could be mediated by the activation of pericytes, microvascular mural cells. Pericytes are characterized by a strong regenerative ability, closely resembling MSC. Stem cell therapy has demonstrated that pericyte injection can reverse cardiac remodelling inhibiting fibrosis and inflammation while promoting angiogenesis (64). One could hypothesize a crosslink between injected MSCs and resident pericytes that can potentiate the pro-healing impact of the cell transplantation. The involvement of pericytes could be their contribution to the pro-angiogenic effect of ASCs as the essential function of pericytes is to recruit and stabilize endothelial cells.

Finally, pericytes are also likely to participate in the regulation of the recruitment of immune cells following myocardial infarction, a role that has been described in other tissues (65). Demonstrating efficiency of remote cell-based therapy would allow for non-invasive methods to treat ischemic heart disease. With the plethora of factors released following remote cell delivery, stem cells mobilized from niches such as bone marrow or activated endogenous cardiac progenitors can initiate and induce cardiac repair and/or regeneration following ischemic injury.

## **Conclusion**

The therapeutic potential of MSCs/ASCs can be exerted through different mechanisms involving autocrine activity to enhance stemness, paracrine factors that improve local cardiac repair and



endocrine-like effects to stimulate key stem-progenitor cells from their niches to further counter myocardial injury (Fig. 2). The most effective route of administration along with identification of the exact mechanisms of action of the trophic factors and exosomes remain to be uncovered in order to optimize clinical translation. Cardiac cell-based therapy, either via an invasive or remote manner, is indeed a promising adjuvant therapeutic strategy that can exploit advantageously the potency of the secretome of stem cells.

**Abbreviations:**

AMI: Acute Myocardial Infarction

ASC: Adipose Derived Stem cell

ESC: Embryonic Stem Cell

EVs: Extracellular Vesicles

FGF-2: Fibroblast Growth Factor 2

G/M-CSF: Granulocyte Macrophage Colony Stimulating Factor

HGF: Hepatocyte Growth Factor

ICM: Ischemic Cardiomyopathy

IHD: Ischemic Heart Disease

IGF-1: Insulin Growth Factor 1

iPSC: Induced Pluripotent Stem cell

LIF: Leukemia Inhibitory Factor

LVEF: Left Ventricular Ejection Fraction

LVEDV: Left Ventricular End-diastolic Volume

MI : Myocardial Infarction

miRNA: micro RNA

MSC: Mesenchymal Stem Cell

NO: Nitric oxide

SDF1 $\alpha$ : Stromal cell Derived Factor 1a

TGF- $\beta$ : Transforming Growth Factor B

TLR 3: Toll Like Receptor 3

VEGF: Vascular Endothelial Growth Factor

## **Declarations**

Ethical approval and consent to participate: Not applicable

Consent for publication: Not applicable

Availability of data and material: Not applicable

Competing interest: The authors declare that they have no competing interests.

Funding: This work was supported by the Montreal Heart Institute Foundation, the ThéCell Network (FRQS), *Chaire DesGroseillers-Bérard en Cardiologie Interventionnelle* and *Chaire*

*Fondation Marcelle et Jean Coutu de traitements chirurgicaux novateurs en insuffisance cardiaque* from *Université de Montréal*.

Authors contribution: CSO was responsible for conceptualization and manuscript writing. LPP and HQL performed final editing of the manuscript. All authors read and approved the final version of the manuscript.

Acknowledgements: Not applicable.

## References

1. Roth GA, Johnson C, Abajobir A, Abd-Allah F, Abera SF, Abyu G, et al. Global, Regional, and National Burden of Cardiovascular Diseases for 10 Causes, 1990 to 2015. *J Am Coll Cardiol*. 2017;70(1):1-25.
2. Wu R, Hu X, Wang J. Concise Review: Optimized Strategies for Stem Cell-Based Therapy in Myocardial Repair: Clinical Translatability and Potential Limitation. *Stem Cells*. 2018;36(4):482-500.
3. Eschenhagen T, Bolli R, Braun T, Field LJ, Fleischmann BK, Frisen J, et al. Cardiomyocyte Regeneration: A Consensus Statement. *Circulation*. 2017;136(7):680-6.
4. Bacakova L, Zarubova J, Travnickova M, Musilkova J, Pajorova J, Slepicka P, et al. Stem cells: their source, potency and use in regenerative therapies with focus on adipose-derived stem cells - a review. *Biotechnol Adv*. 2018;36(4):1111-26.
5. Dulak J, Szade K, Szade A, Nowak W, Jozkowicz A. Adult stem cells: hopes and hypes of regenerative medicine. *Acta Biochim Pol*. 2015;62(3):329-37.
6. 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.
7. Shi Y, Inoue H, Wu JC, Yamanaka S. Induced pluripotent stem cell technology: a decade of progress. *Nat Rev Drug Discov*. 2017;16(2):115-30.
8. Girdlestone J. Mesenchymal stromal cells with enhanced therapeutic properties. *Immunotherapy*. 2016;8(12):1405-16.

9. Fraser JK, Wulur I, Alfonso Z, Hedrick MH. Fat tissue: an underappreciated source of stem cells for biotechnology. *Trends Biotechnol.* 2006;24(4):150-4.
10. Shi Y, Wang Y, Li Q, Liu K, Hou J, Shao C, et al. Immunoregulatory mechanisms of mesenchymal stem and stromal cells in inflammatory diseases. *Nat Rev Nephrol.* 2018;14(8):493-507.
11. Bianco P. "Mesenchymal" stem cells. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 2014;30:677-704.
12. Iso Y, Spees JL, Serrano C, Bakondi B, Pochampally R, Song YH, et al. Multipotent human stromal cells improve cardiac function after myocardial infarction in mice without long-term engraftment. *Biochem Biophys Res Commun.* 2007;354(3):700-6.
13. Ranganath SH, Levy O, Inamdar MS, Karp JM. Harnessing the mesenchymal stem cell secretome for the treatment of cardiovascular disease. *Cell Stem Cell.* 2012;10(3):244-58.
14. Maltais S, Tremblay JP, Perrault LP, Ly HQ. The paracrine effect: pivotal mechanism in cell-based cardiac repair. *J Cardiovasc Transl Res.* 2010;3(6):652-62.
15. Hare JM, Fishman JE, Gerstenblith G, DiFede Velazquez DL, Zambrano JP, Suncion VY, et al. Comparison of allogeneic vs autologous bone marrow-derived mesenchymal stem cells delivered by transendocardial injection in patients with ischemic cardiomyopathy: the POSEIDON randomized trial. *JAMA.* 2012;308(22):2369-79.
16. Perin EC, Sanz-Ruiz R, Sanchez PL, Lasso J, Perez-Cano R, Alonso-Farto JC, et al. Adipose-derived regenerative cells in patients with ischemic cardiomyopathy: The PRECISE Trial. *Am Heart J.* 2014;168(1):88-95 e2.
17. Karantalis V, Hare JM. Use of mesenchymal stem cells for therapy of cardiac disease. *Circ Res.* 2015;116(8):1413-30.
18. Bagno L, Hatzistergos KE, Balkan W, Hare JM. Mesenchymal Stem Cell-Based Therapy for Cardiovascular Disease: Progress and Challenges. *Mol Ther.* 2018;26(7):1610-23.
19. Zuk PA, Zhu M, Mizuno H, Huang J, Futrell JW, Katz AJ, et al. Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell-based therapies. *Tissue Eng.* 2001;7(2):211-28.
20. Zuk P. Adipose-Derived Stem Cells in Tissue Regeneration: A Review. *ISRN Stem Cells.* 2013;2013:1-35.
21. Toyserkani NM, Jorgensen MG, Tabatabaeifar S, Jensen CH, Sheikh SP, Sorensen JA. Concise Review: A Safety Assessment of Adipose-Derived Cell Therapy in Clinical Trials: A Systematic Review of Reported Adverse Events. *Stem Cells Transl Med.* 2017;6(9):1786-94.

22. Planat-Benard V, Silvestre JS, Cousin B, Andre M, Nibbelink M, Tamarat R, et al. Plasticity of human adipose lineage cells toward endothelial cells: physiological and therapeutic perspectives. *Circulation*. 2004;109(5):656-63.
23. Rangappa S, Fen C, Lee EH, Bongso A, Sim EK. Transformation of adult mesenchymal stem cells isolated from the fatty tissue into cardiomyocytes. *Ann Thorac Surg*. 2003;75(3):775-9.
24. Lee WC, Sepulveda JL, Rubin JP, Marra KG. Cardiomyogenic differentiation potential of human adipose precursor cells. *Int J Cardiol*. 2009;133(3):399-401.
25. Wang H, Shi J, Wang Y, Yin Y, Wang L, Liu J, et al. Promotion of cardiac differentiation of brown adipose derived stem cells by chitosan hydrogel for repair after myocardial infarction. *Biomaterials*. 2014;35(13):3986-98.
26. Rigol M, Solanes N, Roura S, Roque M, Novensa L, Dantas AP, et al. Allogeneic adipose stem cell therapy in acute myocardial infarction. *Eur J Clin Invest*. 2014;44(1):83-92.
27. Yoon YS, Wecker A, Heyd L, Park JS, Tkebuchava T, Kusano K, et al. Clonally expanded novel multipotent stem cells from human bone marrow regenerate myocardium after myocardial infarction. *J Clin Invest*. 2005;115(2):326-38.
28. Valina C, Pinkernell K, Song YH, Bai X, Sadat S, Campeau RJ, et al. Intracoronary administration of autologous adipose tissue-derived stem cells improves left ventricular function, perfusion, and remodelling after acute myocardial infarction. *Eur Heart J*. 2007;28(21):2667-77.
29. Acquistapace A, Bru T, Lesault PF, Figeac F, Coudert AE, le Coz O, et al. Human mesenchymal stem cells reprogram adult cardiomyocytes toward a progenitor-like state through partial cell fusion and mitochondria transfer. *Stem Cells*. 2011;29(5):812-24.
30. Bai X, Yan Y, Song YH, Seidensticker M, Rabinovich B, Metzeler R, et al. Both cultured and freshly isolated adipose tissue-derived stem cells enhance cardiac function after acute myocardial infarction. *Eur Heart J*. 2010;31(4):489-501.
31. Otto Beitnes J, Oie E, Shahdadfar A, Karlsen T, Muller RM, Aakhus S, et al. Intramyocardial injections of human mesenchymal stem cells following acute myocardial infarction modulate scar formation and improve left ventricular function. *Cell Transplant*. 2012;21(8):1697-709.

32. Duque G, Huang DC, Macoritto M, Rivas D, Yang XF, Ste-Marie LG, et al. Autocrine regulation of interferon gamma in mesenchymal stem cells plays a role in early osteoblastogenesis. *Stem Cells*. 2009;27(3):550-8.
33. Rider DA, Dombrowski C, Sawyer AA, Ng GH, Leong D, Hutmacher DW, et al. Autocrine fibroblast growth factor 2 increases the multipotentiality of human adipose-derived mesenchymal stem cells. *Stem Cells*. 2008;26(6):1598-608.
34. Hamidouche Z, Fromigue O, Nuber U, Vaudin P, Pages JC, Ebert R, et al. Autocrine fibroblast growth factor 18 mediates dexamethasone-induced osteogenic differentiation of murine mesenchymal stem cells. *J Cell Physiol*. 2010;224(2):509-15.
35. Hemmingsen M, Vedel S, Skafte-Pedersen P, Sabourin D, Collas P, Bruus H, et al. The role of paracrine and autocrine signaling in the early phase of adipogenic differentiation of adipose-derived stem cells. *PLoS One*. 2013;8(5):e63638.
36. Mayer H, Bertram H, Lindenmaier W, Korff T, Weber H, Weich H. Vascular endothelial growth factor (VEGF-A) expression in human mesenchymal stem cells: autocrine and paracrine role on osteoblastic and endothelial differentiation. *J Cell Biochem*. 2005;95(4):827-39.
37. Eom YW, Oh JE, Lee JI, Baik SK, Rhee KJ, Shin HC, et al. The role of growth factors in maintenance of stemness in bone marrow-derived mesenchymal stem cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 2014;445(1):16-22.
38. Dumitru CA, Hemeda H, Jakob M, Lang S, Brandau S. Stimulation of mesenchymal stromal cells (MSCs) via TLR3 reveals a novel mechanism of autocrine priming. *FASEB J*. 2014;28(9):3856-66.
39. Lee BC, Kim HS, Shin TH, Kang I, Lee JY, Kim JJ, et al. PGE2 maintains self-renewal of human adult stem cells via EP2-mediated autocrine signaling and its production is regulated by cell-to-cell contact. *Sci Rep*. 2016;6:26298.
40. Nakagami H, Maeda K, Morishita R, Iguchi S, Nishikawa T, Takami Y, et al. Novel autologous cell therapy in ischemic limb disease through growth factor secretion by cultured adipose tissue-derived stromal cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2005;25(12):2542-7.
41. Sadat S, Gehmert S, Song YH, Yen Y, Bai X, Gaiser S, et al. The cardioprotective effect of mesenchymal stem cells is mediated by IGF-I and VEGF. *Biochem Biophys Res Commun*. 2007;363(3):674-9.

42. 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.
43. Bobi J, Solanes N, Fernandez-Jimenez R, Galan-Arriola C, Dantas AP, Fernandez-Friera L, et al. Intracoronary Administration of Allogeneic Adipose Tissue-Derived Mesenchymal Stem Cells Improves Myocardial Perfusion But Not Left Ventricle Function, in a Translational Model of Acute Myocardial Infarction. *J Am Heart Assoc*. 2017;6(5).
44. Wang X, Xi WC, Wang F. The beneficial effects of intracoronary autologous bone marrow stem cell transfer as an adjunct to percutaneous coronary intervention in patients with acute myocardial infarction. *Biotechnol Lett*. 2014;36(11):2163-8.
45. Chen SL, Fang WW, Ye F, Liu YH, Qian J, Shan SJ, et al. Effect on left ventricular function of intracoronary transplantation of autologous bone marrow mesenchymal stem cell in patients with acute myocardial infarction. *Am J Cardiol*. 2004;94(1):92-5.
46. Gao LR, Pei XT, Ding QA, Chen Y, Zhang NK, Chen HY, et al. A critical challenge: dosage-related efficacy and acute complication intracoronary injection of autologous bone marrow mesenchymal stem cells in acute myocardial infarction. *Int J Cardiol*. 2013;168(4):3191-9.
47. Makkar RR, Smith RR, Cheng K, Malliaras K, Thomson LE, Berman D, et al. Intracoronary cardiosphere-derived cells for heart regeneration after myocardial infarction (CADUCEUS): a prospective, randomised phase 1 trial. *Lancet*. 2012;379(9819):895-904.
48. Mu D, Zhang XL, Xie J, Yuan HH, Wang K, Huang W, et al. Intracoronary Transplantation of Mesenchymal Stem Cells with Overexpressed Integrin-Linked Kinase Improves Cardiac Function in Porcine Myocardial Infarction. *Sci Rep*. 2016;6:19155.
49. Perin EC, Silva GV, Assad JA, Vela D, Buja LM, Sousa AL, et al. Comparison of intracoronary and transendocardial delivery of allogeneic mesenchymal cells in a canine model of acute myocardial infarction. *J Mol Cell Cardiol*. 2008;44(3):486-95.
50. Yang D, Wang W, Li L, Peng Y, Chen P, Huang H, et al. The relative contribution of paracrine effect versus direct differentiation on adipose-derived stem cell transplantation mediated cardiac repair. *PLoS One*. 2013;8(3):e59020.
51. Mendt M, Rezvani K, Shpall E. Mesenchymal stem cell-derived exosomes for clinical use. *Bone Marrow Transplant*. 2019;54(Suppl 2):789-92.

52. Bian S, Zhang L, Duan L, Wang X, Min Y, Yu H. Extracellular vesicles derived from human bone marrow mesenchymal stem cells promote angiogenesis in a rat myocardial infarction model. *J Mol Med (Berl)*. 2014;92(4):387-97.
53. Teng X, Chen L, Chen W, Yang J, Yang Z, Shen Z. Mesenchymal Stem Cell-Derived Exosomes Improve the Microenvironment of Infarcted Myocardium Contributing to Angiogenesis and Anti-Inflammation. *Cell Physiol Biochem*. 2015;37(6):2415-24.
54. Katsuda T, Tsuchiya R, Kosaka N, Yoshioka Y, Takagaki K, Oki K, et al. Human adipose tissue-derived mesenchymal stem cells secrete functional neprilysin-bound exosomes. *Sci Rep*. 2013;3:1197.
55. Lopez-Verrilli MA, Caviedes A, Cabrera A, Sandoval S, Wyneken U, Khoury M. Mesenchymal stem cell-derived exosomes from different sources selectively promote neuritic outgrowth. *Neuroscience*. 2016;320:129-39.
56. 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.
57. Wang QL, Wang HJ, Li ZH, Wang YL, Wu XP, Tan YZ. Mesenchymal stem cell-loaded cardiac patch promotes epicardial activation and repair of the infarcted myocardium. *J Cell Mol Med*. 2017;21(9):1751-66.
58. Karp JM, Leng Teo GS. Mesenchymal stem cell homing: the devil is in the details. *Cell Stem Cell*. 2009;4(3):206-16.
59. Mao C, Hou X, Wang B, Chi J, Jiang Y, Zhang C, et al. Intramuscular injection of human umbilical cord-derived mesenchymal stem cells improves cardiac function in dilated cardiomyopathy rats. *Stem Cell Res Ther*. 2017;8(1):18.
60. Shabbir A, Zisa D, Suzuki G, Lee T. Heart failure therapy mediated by the trophic activities of bone marrow mesenchymal stem cells: a noninvasive therapeutic regimen. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2009;296(6):H1888-97.
61. Preda MB, Ronningen T, Burlacu A, Simionescu M, Moskaug JO, Valen G. Remote transplantation of mesenchymal stem cells protects the heart against ischemia-reperfusion injury. *Stem Cells*. 2014;32(8):2123-34.



62. Wang W, Chen N, Shen X, Cunningham P, Fauty S, Michel K, et al. Lymphatic transport and catabolism of therapeutic proteins after subcutaneous administration to rats and dogs. *Drug Metab Dispos.* 2012;40(5):952-62.
63. Sheng H, Wang Y, Jin Y, Zhang Q, Zhang Y, Wang L, et al. A critical role of IFN $\gamma$  in priming MSC-mediated suppression of T cell proliferation through up-regulation of B7-H1. *Cell Res.* 2008;18(8):846-57.
64. Chen CW, Okada M, Proto JD, Gao X, Sekiya N, Beckman SA, et al. Human pericytes for ischemic heart repair. *Stem Cells.* 2013;31(2):305-16.
65. Kennedy-Lydon T. Immune Functions and Properties of Resident Cells in the Heart and Cardiovascular System: Pericytes. *Adv Exp Med Biol.* 2017;1003:93-103.
66. Houtgraaf JH, den Dekker WK, van Dalen BM, Springeling T, de Jong R, van Geuns RJ, et al. First experience in humans using adipose tissue-derived regenerative cells in the treatment of patients with ST-segment elevation myocardial infarction. *J Am Coll Cardiol.* 2012;59(5):539-40.
67. Bartunek J, Behfar A, Dolatabadi D, Vanderheyden M, Ostojic M, Dens J, et al. Cardiopoietic stem cell therapy in heart failure: the C-CURE (Cardiopoietic stem Cell therapy in heart failURE) multicenter randomized trial with lineage-specified biologics. *J Am Coll Cardiol.* 2013;61(23):2329-38.
68. 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. *Circ Res.* 2014;114(8):1302-10.
69. Gao LR, Chen Y, Zhang NK, Yang XL, Liu HL, Wang ZG, et al. Intracoronary infusion of Wharton's jelly-derived mesenchymal stem cells in acute myocardial infarction: double-blind, randomized controlled trial. *BMC Med.* 2015;13:162.
70. Florea V, Rieger AC, DiFede DL, El-Khorazaty J, Natsumeda M, Banerjee MN, et al. Dose Comparison Study of Allogeneic Mesenchymal Stem Cells in Patients With Ischemic Cardiomyopathy (The TRIDENT Study). *Circ Res.* 2017;121(11):1279-90.

71. Bartunek J, Terzic A, Davison BA, Filippatos GS, Radovanovic S, Beleslin B, et al. Cardiopoietic cell therapy for advanced ischaemic heart failure: results at 39 weeks of the prospective, randomized, double blind, sham-controlled CHART-1 clinical trial. *Eur Heart J*. 2017;38(9):648-60.
72. Henry TD, Pepine CJ, Lambert CR, Traverse JH, Schatz R, Costa M, et al. The Athena trials: Autologous adipose-derived regenerative cells for refractory chronic myocardial ischemia with left ventricular dysfunction. *Catheter Cardiovasc Interv*. 2017;89(2):169-77.
73. Qayyum AA, Mathiasen AB, Mygind ND, Kuhl JT, Jorgensen E, Helqvist S, et al. Adipose-Derived Stromal Cells for Treatment of Patients with Chronic Ischemic Heart Disease (MyStromalCell Trial): A Randomized Placebo-Controlled Study. *Stem Cells Int*. 2017;2017:5237063.

**Table 1** Clinical benefits from key clinical trials using stromal stem cells in heart diseases.

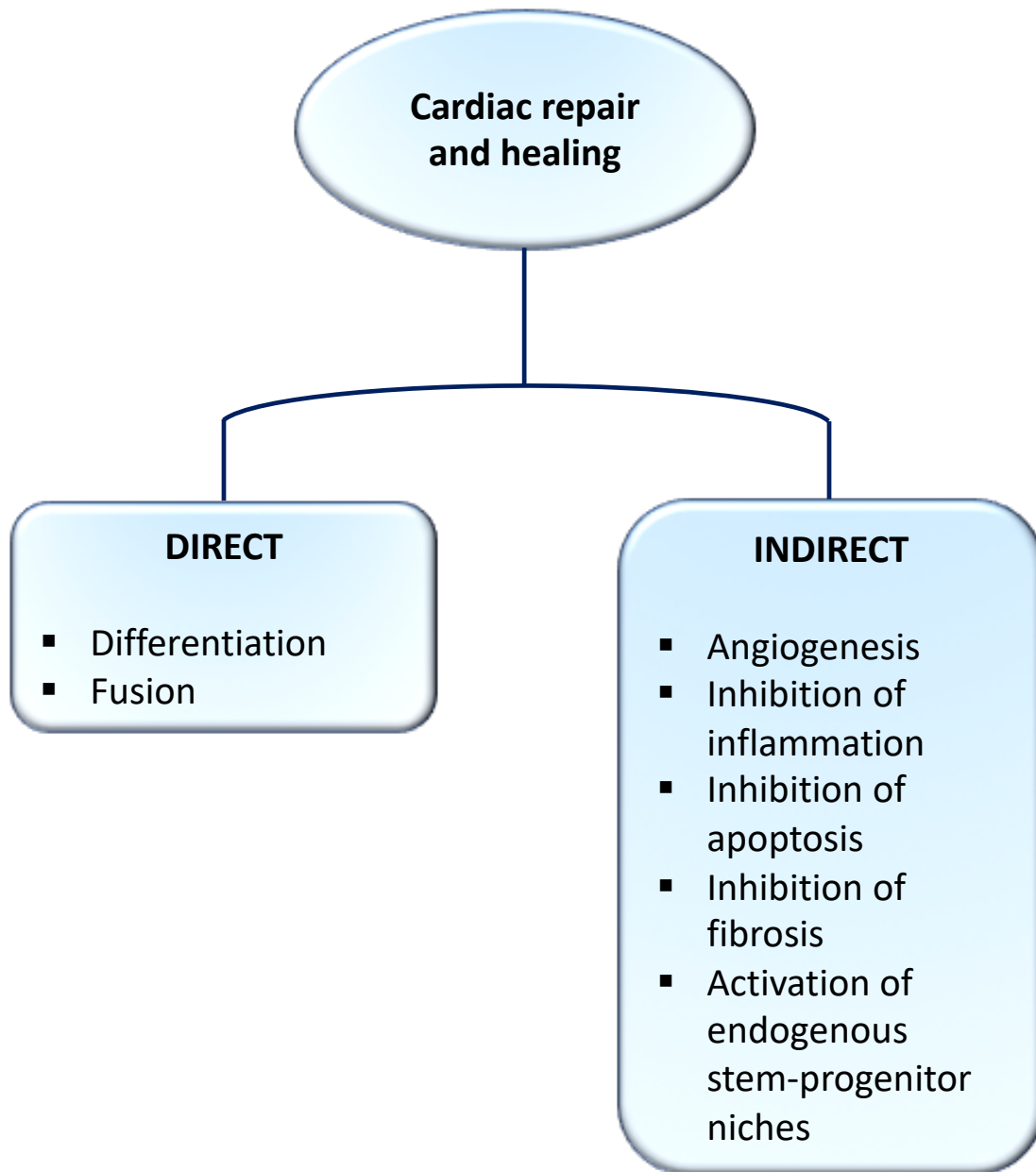
Clinical Trial	Year	Cell Type	Patient population	Delivery route	LVEF	LVEDV	Infarct size
<b>POSEIDON (15)</b>	2012	Allogeneic and autologous BM-MSC	ICM LVEF≤50%	Transendocardial	↑	↓	↓
<b>APOLLO (66)</b>	2012	Autologous ASC	STEMI	Intracoronary	↔	N/A	↓
<b>C-CURE (67)</b>	2013	Autologous BM-MSC	LVEF 15-40%	Endoventricular	↑	↓	N/A
<b>PROMETHEUS (68)</b>	2014	Autologous BM-MSC	ICM	Intramyocardial	↑	↓	↓
<b>PRECISE (16)</b>	2014	Autologous ASC	ICM, CABG	Transendocardial	↔	↔	↔
<b>Gao et al (69)</b>	2015	Allogeneic WJ-MSC	STEMI	Intracoronary	↑	↓	N/A
<b>TRIDENT (70)</b>	2017	Allogeneic BM-MSC	ICM, LVEF≤50%	Transendocardial	↔	↔	↓
<b>CHART-1 (71)</b>	2017	Autologous BM-MSC	IHF, LVEF≤35%	Intramyocardial	↔	↔	N/A
<b>ATHENA (72)</b>	2017	Autologous ASC	ICM 20%≤LVEF≤45%	Intramyocardial	↔	↔	N/A
<b>MyStromalCell (73)</b>	2017	Autologous ASC	ICM LVEF>40%	Intramyocardial	N/A	N/A	N/A

↔↑↓ Respectively mean no change, increase and decrease. N/A means not measured. BM: Bone marrow. WJ: Wharton Jelly. ICM: ischemic cardiomyopathy. CABG: Coronary Artery Bypass Grafting. LVEF: Left Ventricular. Ejection Fraction. LVEDV: Left Ventricular End-Diastolic Volume. ICM: Ischemic Cardiomyopathy. STEMI: ST-elevation Myocardial Infarction.

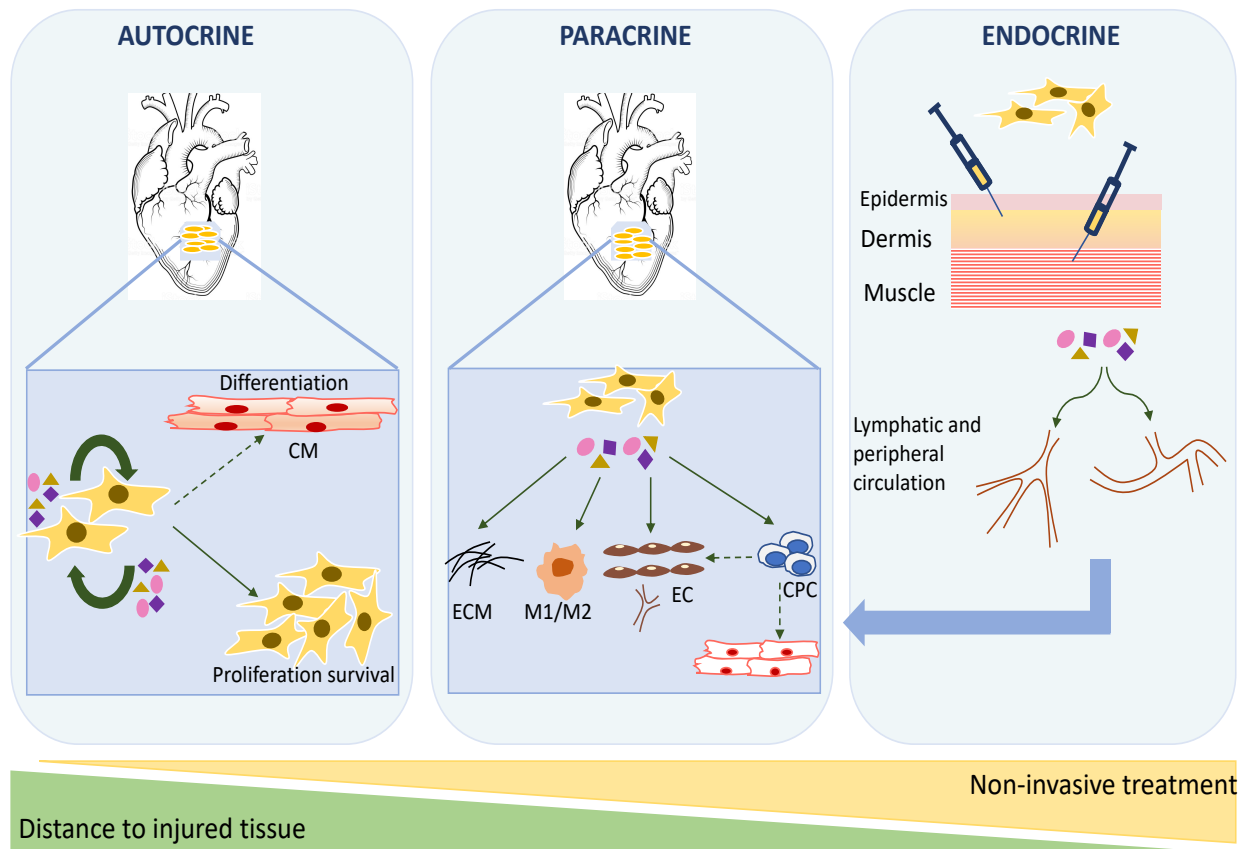


## Figure Legends

**Fig. 1** Cardiac healing and repair mediated by direct and indirect mechanisms in cardiac cell therapy.



**Fig. 2** Repair pathways related to MSC-mediated therapeutic effects following ischemic injury. Autocrine pathways are involved in proliferation, survival and possible differentiation of MSCs. Paracrine pathways are elicited by secreted mediators that act in the vicinity of MSCs to promote angiogenesis, inhibit fibrosis and activate endogenous progenitor cells. Finally, endocrine-like pathways are induced when MSC (once remotely transplanted) are activated by distant injury and secreted trophic factors that circulate either in the vascular or lymphatic systems to induce pro-healing effects related to both autocrine and paracrine pathways.



## Chapitre 7 : Manuscrit #2

### 7.1 Mise en contexte

Le groupe de Prockop a démontré en 2009 que l'embolisation des MSC dans les poumons pouvait réduire l'inflammation associée à la péritonite (R. H. Lee et col., 2009). Ainsi, malgré l'absence de domiciliation dans le tissu lésé, les cellules produisaient un effet thérapeutique à distance. Ils ont de plus identifié le TSG-6 comme facteur anti-inflammatoire important. À partir de ces données, nous avons voulu évaluer l'impact thérapeutique des ASCs injectées de façon non invasive, en sous cutané, dans un modèle de péritonite. Aussi, avec de plus en plus de rapports décrivant la richesse du sécrétome lorsque les cellules sont sous forme 3-D, nous avons voulu également comparer l'injection de cellules en suspension obtenues suite à une trypsination (ML) et l'injection des cellules sous forme de sphéroïdes (SB). La péritonite est induite par injection péritonéale de Zymosan, une toxine de levure. Il s'agit d'un modèle d'inflammation aigue et transitoire. Nous avons caractérisé l'inflammation au niveau histopathologique, ensuite au niveau immunohistochimique par dénombrement de neutrophiles et macrophages infiltrés dans le tissu.

Ce manuscrit est sous presse au journal *Cell Transplantation* (2020).

**Remote Delivery of Adipose Derived Stem Cells as Spheroid Bodies versus Monolayer to Promote an Anti-Inflammatory Effect in the Setting of Peritonitis**

Celia Sid-Otmane, Anthony Nguyen, Martin G. Sirois, Louis P. Perrault, and Hung Q. Ly

Department of Pharmacology and Department of Medicine, Université de Montréal, Montreal, QC, Canada.

Research Centre, Montreal Heart Institute, Université de Montréal, Montreal, QC, Canada.

**Running Head:** Pro-healing effect of adipose derived stem cells

**Corresponding Author:**

Hung Q. Ly, MD, SM, FRCPC; Montreal Heart Institute; 5000 Belanger Street; Montreal, Quebec  
H1T 1C8, Canada

Tel: 1-514-376-3330, #2438

Email: qh.ly@umontreal.ca.



## **Abstract**

The therapeutic potential of adipose derived stem cells (ASCs) have garnered greater attention due to their pleiotropic effects reported in both preclinical studies and recent clinical trials. The aim of this study was to explore the anti-inflammatory effect of human ASCs injected subcutaneously either as monolayers (ML) or as spheroid bodies (SBs) in a rat model of peritonitis. Sprague Dawley rats were injected with Zymosan (500mg/kg) to induce peritoneal inflammation. This was followed by subcutaneous injections of ML or SBs, 5 or 24 hours after toxin administration. Histological analysis, neutrophil and macrophage count were used to characterize inflammation. Immunostaining against CD31 was used to determine vascular density, whereas quantification of secreted factors was performed using the exudate. Immune cells infiltration was diminished in all treated animals. Moreover, neutrophil recruitment was significantly reduced by treatment with lessened tissue infiltration in the 24h-SB group compared to ML. Macrophage presence in the tissue was reduced with SB and ML remote delivery. Moreover, the inflammation-related cell infiltration was dose-dependent on the number of SBs injected. Inflammatory factors and cytokines in the exudate (such as IL-10, IL-6 and TSG-6) were higher in untreated animals compared to control without peritonitis. Treatment with ML and SBs reduced their levels, demonstrating improved healing with cellular transplantation. In conclusion, our findings show a significant anti-inflammatory effect of remote, subcutaneous delivery of hASCs either as ML or SBs to treat peritonitis, with SB demonstrating greater impact on neutrophil infiltration.

## **Keywords**

Adipose Stromal Cells, spheroid bodies, inflammation, peritonitis, remote transplantation

## Introduction

Cell-based therapy has been shown to be a promising approach to improve tissue repair and healing after tissue damage. Ethical concerns associated with embryonic stem cells and safety uncertainties in clinical use of induced pluripotent stem cells have favored mesenchymal stem cells (MSCs) for clinical translation. These multipotent cells have the capacity to self-renew and expand with ease *in vitro*<sup>1</sup>. While documented in nearly all human tissues, MSCs were first isolated from bone marrow (BM). The intricate procedure to isolate these cells and the poor yield from BM raised interest for other sources. Adipose tissue is an abundant and exploitable niche of adipose derived stromal cells (ASCs). The ease of procurement and their abundance in fat tissue represent great advantages for animal and clinical studies<sup>2,3</sup>. The low immunogenicity of ASCs offers an advantage for allogeneic transplantations without concerns regarding impact of aging or comorbidities on their intrinsic properties<sup>4</sup>. Because of the lack of migration and low rate of engraftment<sup>5</sup>, benefits due to transplantation of ASCs have been associated to the wide array of cytokines and growth factors composing their secretome<sup>6</sup>. The diversity of bioactive factors of the secretome contributes to pro-healing pleiotropic effects such as angiogenesis and immunomodulation<sup>7,8</sup>.

Inflammatory and immune responses constitute a formidable system designed to combat infections and tissue injuries<sup>9</sup>. However, excessive or ongoing inflammation contributes to diseases like diabetes, myocardial infarction, cancer or neurodegenerative disease<sup>9</sup>. Hence, there are opportunities to exploit the therapeutic potential of MSCs, as they are stimulated by microenvironment to produce anti-inflammatory factors<sup>10</sup>. Prior studies have compared the immunomodulatory abilities of bone marrow MSCs and ASCs and have documented similar capacities<sup>11,12</sup>. Conversely, others have attributed a higher anti-inflammatory potency to ASCs, relative to other stem cells<sup>13,14</sup>. Immunosuppressive properties of ASCs have been demonstrated in

models of kidney transplantation and allergy both through cytokine secretion and cell-to-cell interactions with immune cells<sup>15,16</sup>.

Different techniques (whether through gene overexpression or preconditioning) have been used to enrich the ASCs' secretome and to enhance their survival in order to achieve optimal repair<sup>17</sup>. Aggregating cells in three-dimensional culture could potentially help enrichment of the secretome of stem cells<sup>18</sup>. Studies have documented the formation of spheroid bodies (SB) when MSCs were incubated using the hanging drop technique, a condition that prevents adhesion to planar surface. Anti-inflammatory and angiogenic properties have been documented when MSCs were expanded in 3-D configurations in models of peritonitis or ischemic kidney injury<sup>18-20</sup>. Enriching the secretome would permit to elaborate strategies to deliver ASCs in a non-invasive manner with the intent of maximizing their trophic effects.

The optimal delivery method remains to be determined between systemic infusion into the vascular system or local transplantation. Intravenous injection of MSCs leads to cell trapping in the lungs, due to their larger size compared to capillary diameter<sup>21</sup>. Non-invasive administration of MSCs by intramuscular injection has been tested. In a hamster heart failure model, investigators have reported improved ventricular function and increased levels of circulating paracrine factors and stimulated expression of VEGF, IGF and HGF in the myocardium<sup>22</sup>.

Thus, the present study explores the trophic effect of hASCs spheroid bodies injected subcutaneously in a rat model of peritonitis. By delivering cells remotely (not locally or in the vicinity of the injury zone), this study will assess the impact of the hASCs secretome on wound healing, when expanded in either 3-D or monolayer configuration.

## **Material and Methods**

**Cells and Reagents:** Human adipose derived stem cells (hASCs) were purchased from Invitrogen with the specified medium and supplement, MesenPRO RS. Zymosan A from *Saccharomyces cerevisiae* was purchased from Millipore Sigma (Oakville, Ontario, CA), the myeloperoxidase MPO antibody from Thermo Fisher (Waltham, MA, USA). TSG-6 antibody A38.1.20 was purchased from Santa Cruz Biotechnology (Dallas, TX, USA) and the human TSG-6 biotinylated antibody was from R&D Systems (Minneapolis, MN, USA). Rat Luminex and ELISA assays were all from R&D Systems (Minneapolis, MN, USA). CD31 was obtained from Novus Biologicals (Littleton, CO, USA), CD68 from Thermo Fisher and CD206, from Abcam (Cambridge, UK). ImmPress reagent was purchased from Vector Laboratories (Burlingame, CA, USA).

**Animals:** Male Sprague Dawley rats weighting  $300 \pm 50$ g were purchased from Charles River Laboratories (Senneville, Quebec, CA) and used under a protocol approved by the Animal Ethics Committee of the Montreal Heart Institute. Animals were used under strict national and institutional guidelines.

**Rat Peritonitis:** Rats underwent anaesthesia with isoflurane 2-3% and received a single intraperitoneal injection of zymosan 500mg/kg at two different sites (left and right) to induce peritoneal inflammation. Buprenorphine (0.03mg/kg) was used for pain control. Treatment with either monolayer cells or SBs was administered via a subcutaneous injection with a 21G needle in the abdominal area either 5 or 24 hours post toxin injection. A total of 2 million cells were injected either as monolayer or as spheroids (10 SBs of 200k cells). Three days after zymosan injection, rats were anaesthetised with isoflurane and sacrificed with saturated potassium chloride injection in the jugular vein. Peritoneal exudate was collected with cold sterile PBS 1X and five different

sections of peritoneal tissue were excised and fixed in 10% phospho-buffered formalin for histopathology.

**Hematoxylin & Eosin Staining and Analysis:** Harvested tissue from 5 different areas of the peritoneum was fixed in 10% formalin, embedded in paraffin and cut into 6µm thick sections. Slides were stained with hematoxylin & eosin following standard procedures. Inflammation was scored as follow: using light microscope examination, 6 pictures were taken from each area for a total of 30 images per animal and were evaluated. The latter method is a modified version of previously published scoring methods<sup>23,24</sup>. Scores were established to evaluate the propensity of the inflammation based on tissue disorganisation and cell infiltration ranging from 0 to 3.0. The score of 0 was attributed to fields without any cell infiltration and peritoneal thickening, and 3 was attributed to severe inflammatory cells infiltration and thickening of peritoneal wall. The evaluation was performed blindly.

**Immunohistochemistry:** Sections were de-paraffinized with xylene and rehydrated in alcohol baths before antigen retrieval for 30 minutes at 100°C. Slides were then washed in PBS 1X and pre-treated with 3% hydrogen peroxide solution for 20 minutes to block endogenous peroxidase activity. It was followed by incubation in donkey serum for 30 minutes to block non-specific binding before primary antibody incubation for 1 hour at room temperature. Myeloperoxidase (MPO) was used to detect neutrophils, CD68 and CD206 were used to quantify macrophages. CD31 was used to determine vascular density in the peritoneal tissue. After washing off the antibody in PBS 1X, ImmPRESS reagent was put on each section for 30 minutes followed by DAB exposure and counterstaining with Mayer before mounting. Slides were observed under light microscope and pictures were taken and analyzed with image Pro Plus 9.2 software.

**Cell Culture:** hASCs were cultured in flasks in Mesenpro medium supplemented with Mesenpro RS, 100U/ml Penicillin and 100 µg/ml streptomycin and 2mM glutamine. Cells were detached with trypsin EDTA when used as monolayers or to produce spheroid bodies.

**Spheroid Bodies:** hASCs between passage 3 and 6 were used to produce SBs through the hanging drop method. Cells were detached from flasks with trypsin EDTA, collected with serum-supplemented media and centrifuged at 450g for 5 minutes. Cells were washed, centrifuged and diluted in Mesenpro medium to produce drops of 35 µl containing 100 000 or 200 000 cells. The drops were then deposited on the lid of the petri dish containing PBS solution. After three days, SBs were collected to be injected in rats with PBS as a vehicle.

**Immunoenzymatic Assays:** In the ELISA to detect TSG-6, a 96 well plate (Corning) was coated with TSG-6 antibody at 10 µg/ml overnight at 4°C. Wells were washed with PBS-Tween, blocked for 45 minutes with 0.5% Bovine serum albumin (BSA) and diluted exudates were incubated in wells for two hours along with recombinant TSG-6 diluted for standard curve on a shaker. After 2 hours, the wells were washed 4 times with PBS-tween 0.1%, and biotin coupled TSG-6 antibody was added to wells and incubated for another 2 hours. Washing was followed by streptavidin HRP incubation for 30 minutes. Wells were washed and incubated with HRP substrate for 15 minutes before stopping the reaction with sulfuric acid 2N and optical density was measured at 465 nm in a plate reader. IL-10 and VEGF were quantified using purchased ELISA kits following the manufacturer protocol.

**Luminex Assay:** IL-6 was quantified using a Luminex assay from R&D systems according to the provided protocol. Briefly, diluted exudates from rats were added to microparticles in a filtered microplate and incubated for 2 hours. A washing step with a vacuum device was followed by an

incubation of 1 hour with the biotinylated mix. Wells were washed, incubated for 30 minutes with streptavidin HRP, followed by substrate reaction and quantification using a Bio-Plex Multiplex Immunoassay System (Bio-Rad).

## **Statistical Analysis**

Statistics were performed using GraphPad Prism version 8.0c. Results are presented as mean values  $\pm$  standard error of the mean (SEM). Parametric comparisons between groups were made using one-way analysis of variance (ANOVA) with Bonferroni post hoc test for multiple comparisons. A p-value less than 0.05 was considered significant.

## **Results**

### *Subcutaneous SBs Improved Inflammatory Cell Infiltration*

Intraperitoneal injection of Zymosan induced inflammation characterized by inflammatory cell infiltration in the peritoneal tissue and thickening of the peritoneal wall (Fig. 1B). As previously described, the inflammatory score was calculated for all study rats and was found to be significantly higher among rats with no treatment relative to control (Fig. 1C;  $2.1 \pm 0.2$  vs  $0.18 \pm 0.04$  respectively,  $p < 0.0001$ ). The left panel of Figure 1C showed a significant reduction of this score in the groups treated within 5 hours of inflammation induction ( $1.07 \pm 0.16$  vs  $1.25 \pm 0.19$  for ML and SB 5h respectively). hASCs transplantation was also found to reduce inflammation when injected 24h post-Zymosan ( $1.35 \pm 0.7$  vs  $0.85 \pm 0.17$  for ML and SB 24h respectively in Fig. 1C right panel).

Peritoneal thickness represents an important marker of damage to the parietal peritoneum. Inflammation resulted in thickening of the peritoneal wall as demonstrated in Figure 1D. Peritoneal thickening was significantly different between untreated and healthy animals ( $74.35 \pm 4.55 \mu\text{m}$  and  $23.87 \pm 1.76 \mu\text{m}$  respectively;  $p < 0.0001$ ). Treatment with SB impacted peritoneal thickening, albeit with only the SB 24h-group attaining statistical significance in the right panel of Figure 1D ( $74.35 \pm 4.55 \mu\text{m}$  for untreated vs  $58.29 \pm 4.27 \mu\text{m}$  for SB 24h  $p < 0.05$ ). Moreover, differences in peritoneal thickening were noted when comparing ML and SB groups, whether delivered at 5 or 24h following injury (Fig. 1D;  $74.08 \pm 7.68 \mu\text{m}$  for ML 5h vs  $53.93 \pm 3.35 \mu\text{m}$  for SB 5h  $p < 0.05$  and  $77.54 \pm 4.92 \mu\text{m}$  for ML 24h vs  $58.29 \pm 4.27 \mu\text{m}$  for SB  $p < 0.005$ ). Thus, SBs were found to be efficient at reducing thickening of the peritoneum.

Phenotypically, animals were compared based on their weight. A weight gain of  $5.8\% \pm 1.4$  was documented in healthy rats at the end of the study period. Following Zymosan administration, there were notable phenotypic differences as untreated animals demonstrated greater weight loss relative to control. The 5h-groups (for both ML and SB remote injection) had a non-statistically significant percentage of weight change. As shown in Figure 1E, less weight loss was documented in the SB 24h group ( $-5.9 \pm 0.5\%$ ;  $p < 0.0005$ ).

#### *Neutrophil Recruitment and Tissue Clearance Inhibited by Late Injection of SBs*

Rapid recruitment of neutrophil from the vasculature is essential in the active form of inflammation<sup>25</sup>. To further characterize inflammation in this model, we sought to determine neutrophil recruitment to the peritoneal tissue through myeloperoxidase immunostaining (Fig. 2A). Neutrophil count based on positive myeloperoxidase cells normalized to tissue area was



significantly higher in the untreated group compared to healthy rats (Fig. 2B;  $0.97 \pm 0.15$  vs  $0.027 \pm 0.019$  respectively,  $p < 0.0001$ ). Figure 2B shows intravascular neutrophil recruitment, illustrating the response to the inflammation induced by Zymosan. ML and SBs reduced the presence of neutrophils in the vasculature, whether injected 5 hours or 24 hours post Zymosan injection ( $0.17 \pm 0.06$  for ML 5h;  $0.34 \pm 0.05$  for SB 5h;  $0.18 \pm 0.05$  for ML 24h and  $0.09 \pm 0.02$  for SB 24h  $p < 0.0001$ ). With regard to extravascular neutrophils, a significant difference was observed between untreated and control groups ( $0.64 \pm 0.1$  vs  $0.24 \pm 0.04$  respectively,  $p < 0.0005$ ). ML and SB treatments resulted in reduced extravasation of neutrophils in the surrounding tissue. However, the late SB administration showed the most significant impact on the latter phenomenon (Fig. 2C right panel;  $0.15 \pm 0.03$  vs untreated,  $p < 0.0001$ ). There was a statistically significant difference between the ML-24h and SB-24h groups ( $0.39 \pm 0.08$  vs  $0.15 \pm 0.03$  respectively,  $p < 0.0001$ ).

In order to establish if there was any dose dependent effect in this model, the absolute number of injected SBs was halved, injecting five SBs rather than ten. This led to increased neutrophil recruitment (Fig. 2D, left panel;  $0.35 \pm 0.1$  for 5 SBs vs.  $0.09 \pm 0.02$  for 10 SBs,  $p < 0.05$ ) and neutrophil extravasation (Fig. 2D, right panel;  $0.49 \pm 0.16$  for 5SB versus  $0.15 \pm 0.03$  for 10 SB  $p = 0.05$ ). Hence, decreasing SB number had a detrimental effect on inflammation, as observed by a greater neutrophil extravasation.

#### *Tissue Macrophages Reduced by hASCs as Monolayers and Spheroid Bodies*

Presence of macrophages in the peritoneal tissue was investigated using CD206, primarily expressed on the surface of activated macrophages (Fig. 3A). Untreated animals showed enhanced CD206 expression compared to healthy ones (Fig. 3B;  $0.01 \pm 0.002$  vs  $0.004 \pm 0.0008$  respectively,

p<0.0005). Administration of ML cells 5 hours after Zymosan significantly reduced macrophages in the peritoneal tissue (Fig. 3B;  $0.004 \pm 0.0006$  vs untreated, p<0.005). SB treatment however did not show any marked effect whether injected 5- or 24-hours post-toxin (Fig. 3B;  $0.009 \pm 0.001$  for both). As was seen with neutrophil infiltration, reducing the number of injected SBs by half increased macrophage presence in the tissue (Fig. 3C;  $0.009 \pm 0.001$  for 10 SBs vs  $0.02 \pm 0.004$  for 5 SBs p<0.005). Macrophages were also quantified using CD68, a marker known to be associated with the pro-inflammatory phenotype (Fig. 4A). A significant increase of CD68 was observed in untreated animals compared to control group (Fig. 4B  $0.0083 \pm 0.0018$  versus  $0.00038 \pm 0.00016$  respectively). As shown in the left panel of Figure 4B, a reduction of CD68 was documented in both ML ( $0.0019 \pm 0.00033$ ) and SB ( $0.0016 \pm 0.00043$ ) groups. A similar effect was induced by the late treatment groups, as both ML and SBs injected 24h after zymosan reduced CD68 macrophages ( $0.0027 \pm 0.00063$  versus  $0.0032 \pm 0.001$ ) (Fig. 4B, right panel). In Figure 4C, we showed that reducing the number of SBs injected induced a dose dependent effect. Injecting 5 SBs increased CD68 in the peritoneal tissue compared to animals receiving 10 SBs.

#### *Subcutaneous Administration of SB or ML hASCs Increased Vascularization*

We sought to determine if subcutaneous administration of hASCs could increase vascularization in the peritoneal tissue given that pro-angiogenic factors are secreted by these cells. As shown in Figure 5A, there was a significant difference in neovascularization in untreated animals relative to control ones ( $0.0029 \pm 0.00047$  vs.  $0.00086 \pm 0.0002$ , respectively; P<0,05). When treatment was initiated at 5 hours, hASCs as ML or SBs did not result in a significant impact on vascular density (left panel of Fig. 5B;  $0.0036 \pm 0.00031$  vs  $0.0035 \pm 0.0011$ ). Conversely, when administered at

24 hours, treatment with hASCs impacted vascular density as shown in the right panel of Figure 5B. There is a trend towards increased angiogenesis, which did not reach the level of significance for SBs ( $0.0046 \pm 0.0007$  for ML 24h and  $0.0048 \pm 0.0012$  for SB 24h). With regard to timing of cell delivery, we observed that delivering ML and SBs 24h post-injury increased vascular density more significantly. Finally, as shown in Figure 5C, reducing the number of SBs abolished the pro-angiogenic effect, which underscores a dose dependent effect.

#### *Inflammatory Mediators Were Reduced by ML and SBs Treatment*

We sought to quantify secretion of factors in the peritoneal exudate as another criterion to evaluate inflammation in this model. Secretion of VEGF was found to be greater in untreated rats compared to healthy ones (Fig. 6A;  $928.9 \pm 94.99$  vs  $55.18 \pm 6.74$  pg/ml respectively,  $p < 0.005$ ). Treatment initiated 5 hours after injury by Zymosan did not seem to induce significant changes. ML and SBs increased VEGF secretion in the peritoneum without reaching statistical significance (Fig. 6A;  $1480 \pm 289$  pg/ml for ML and  $1376 \pm 266$  pg/ml for SB). We observed the same pattern with the 24h injection, ML and SB increasing VEGF release but not reaching statistical significance ( $1043 \pm 192$  pg/ml for ML and  $831 \pm 269$  pg/ml for SBs). In untreated animals, quantification of IL-10 showed increased levels compared to the healthy ones (Fig. 6B;  $139.7 \pm 18.4$  vs  $6.33 \pm 2.04$  pg/ml respectively,  $p < 0.05$ ). In the 5 hour-SB injection, IL-10 was significantly reduced in the exudate (Fig. 6B;  $73.89 \pm 11.65$  pg/ml vs untreated  $139.7 \pm 18.41$  pg/ml  $p < 0.05$ ). The initiation of treatment 24 hours after injury induced greater effect in both treated groups ( $63.04 \pm 15.84$  for ML 24h and  $62.29 \pm 15.88$  for SB 24h;  $p < 0.05$ ). Levels of IL-6 were also increased in untreated animals compared to controls (Fig. 6C:  $0.69 \pm 0.11$  vs  $0.01 \pm 0.004$  pg/ml , respectively,  $p < 0.005$ ). Treatment 5 hours post-injury did not result in significant changes in IL-6 levels, although there

was a trend toward reduced levels. However, when the treatment was initiated after 24 hours, a significant effect was observed in the SB group (Fig. 6C;  $0.18 \pm 0.04$  vs  $0.69 \pm 0.11$  pg/m for untreated;  $p < 0.005$ ). Finally, we measured levels of TSG-6, a known potent anti-inflammatory factor<sup>26</sup>. As shown in Figure 6D, increased levels of TSG-6 were observed among untreated animals compared to healthy ones ( $1.32 \pm 0.24$  vs  $0.09 \pm 0.02$  ng/ml;  $p < 0.0005$ ). In the exudates of treated animals, levels were reduced, showing lower inflammatory status, whether treatment was performed using ML or SBs.

## **Discussion**

Adipose tissue is a readily accessible reservoir of multipotent stem cells that can contribute to regenerate, repair and regulate prohealing mechanisms in injured tissues. Adipose derived stem cells can regenerate and repair tissue possibly by direct differentiation and likely through a plethora of secreted factors that participate in immunoregulation and empower other cells to tissue repair<sup>27</sup>. This study's findings extend this latter hypothesis as we report on the endocrine effect of hASCs on inflammation when remotely delivered in a peritonitis model. Moreover, we explored their therapeutic effect when expanded either as ML or as SBs. To our knowledge, this is the first study to report a pro-healing endocrine effect of hASCs delivered by subcutaneous route remote from the site of inflammatory injury. We observed an effect on neutrophil and macrophage infiltration with a reduction of inflammation-related factors and cytokines in the peritoneum of treated animals. A trend toward an increase in vascular density was documented with late administration of ML and SBs. Comparable benefits were documented for both cell configurations, but SBs appears to be more potent to reduce neutrophil tissue infiltration and their clearance in the resolution phase of

inflammation. This is yet another proof of the trophic effects of these stem cells through their rich secretome.

The 2D-monolayer cell culture system lacks the ability to portray the cellular and spatial distribution of a native environment. This method is not ideal to provide a nest-like physiological microenvironment. Conversely, tridimensional spheroid configuration can overcome such a limitation<sup>28</sup>. Using cellular aggregates free of exogenous biomaterial is advantageous as this overcomes the unwanted reactions that the matrix may elicit. The cell-to-cell contact in a 3-D structure is thought to act as a stimulus and elicit an autocrine activity to produce anti-inflammatory, proangiogenic and antiapoptotic factors. This architecture also allows for better cell survival and engraftment<sup>29</sup>.

While the inflammatory cascade is initiated as part of a protective response to tissue injury, inflammation can cause damage if it does not subside<sup>9</sup>. A complex interplay of phenotype switches of inflammatory cells and secreted molecules ensures resolution of the process. Neutrophils are the dominant leukocytes at the earliest stage of inflammation, recruited to ingest apoptotic cells and clear the microenvironment of any cellular or bacterial debris<sup>25</sup>. Bone marrow MSCs have been shown to inhibit the migration of neutrophils, preventing them from causing oxidative harm<sup>30</sup>. Our findings document that 3 days after Zymosan injury neutrophils were mainly found within the surrounding vasculature rather than in the tissue itself. Treatment very early on or 24 hours after Zymosan injury led to reduced neutrophil recruitment, defined as intravascular neutrophils. Levels of tissue or extravascular neutrophils were reduced as well in response to SBs injected 24 hours post-injury, describing a potent inhibitory effect of the 3-D form. This is a key finding as it shows the potential of hASCs SBs to reverse activated innate immune cells. It has been previously reported that graft-versus-host disease can be treated with great success when MSCs were

administrated once inflammation was already robust while the therapeutic effect was less vigorous when injected at the same time as the bone marrow transplantation<sup>31,32</sup>.

In the resolution phase of inflammation, neutrophils undergo apoptosis and are rapidly ingested by macrophages and cleared through draining lymph nodes. Our study showed a significant effect of remote delivery of either ML or SBs on CD68 macrophages with a notable decrease, irrespective of timing following Zymosan administration. CD206, also called the mannose receptor, is another marker expressed on activated macrophages thought to be important in late stages of repair<sup>33</sup>. CD206 expression showed a trend for reduction in ML and SB 24h groups but the significant impact was observed for ML 5h treated group. The latter showed a marked decrease of neutrophils in the tissue and reduced macrophages. We hypothesize that the ML injection very early on rapidly blocked neutrophil infiltration compared to SB. This would be related to the ability for ML cells to travel and diffuse into the circulation, inhibiting neutrophil extravasation through both secreted factors and direct contact regulation. The effect was mildly lost when ML were injected 24 hours after toxin administration, illustrating the difficulty of this 2-D form to reverse the process compared to SBs. There is a discrepancy between our findings and published literature, which has documented increased CD206 macrophages in response to MSC stimulation. Coculture studies have shown that MSC or conditioned media of spheroid bodies increased surface expression of CD206<sup>29</sup>. Our study evaluates the state of the tissue at sacrifice, 3 days after toxin administration. Knowing that Zymosan induces an inflammation that is self-limiting within days<sup>34</sup>, the decreased CD206 in our study could indicate resolved inflammation. We presume that quantification of CD206 hours only after cell administration would have revealed elevated expression. The increased vascular density of the peritoneal tissue also confirmed that the

inflammatory process in our model was already in its resolution phase. Further investigation is required in order to quantify macrophages in exudate and in the tissue early on after cell treatment.

We also observed reduced levels of cytokines secreted in response to inflammation (IL-6, IL-10, VEGF and TSG-6) in the exudate of treated animals, particularly for the 24-hour treatment group. This is considered a hallmark of attenuated inflammatory stress. Secretion of such factors is dependent on activation of immune cells. Macrophages expressing CD206 secrete IL-10 in order to fulfill their reparative role. The reduced levels of IL-10 in peritoneal exudates of treated animals is related to improved healing and reduced CD206 macrophages documented in this study.

Once delivered (whether remotely or locally), we can presume that SBs will respond to endogenous signals from the microenvironment in order to secrete required pro-healing factors to resolve inflammation. The beneficial outcomes arise from the crosstalk between tissue or host cells and transplanted cells<sup>29</sup>. The anti-inflammatory effect of stromal stem cells is responsive rather than constitutive. The immunosuppressive ability of MSC are induced by different cytokines in the microenvironment<sup>31</sup>. Given that cytokines vary between initiation and progression of the inflammatory process, the immunoregulatory activity of these cells vary depending on the signals they receive. The body of available evidence does not argue for any superiority of the immunomodulatory effect of ASCs over that of bone marrow MSCs. Prior data have reported that both cell populations expressed the same immune related markers and exhibited similar immunosuppressive properties, but recent data have attributed greater impact of ASCs<sup>14</sup>. Investigators have described a more inhibitory effect of ASCs on differentiation of monocytes into dendritic cells, and a greater stimulatory effect on secretion of IL-10. *In vitro* experiments have shown higher proangiogenic activity of hASCs compared to hBM-MSCs<sup>35</sup>. *In vivo* data from a murine model of bleomycin-induced lung injury have found that intravenous injection of ASCs

accumulated in the lung interstitium and inhibited proinflammatory cytokine production by macrophages such as TNF $\alpha$  and IL-12<sup>36</sup>. In addition, hASCs improved colitis injury through release of TSG-6 which resulted in macrophage polarization toward an activated, anti-inflammatory status<sup>37</sup>. Finally, immunomodulatory effects have also been attributed to ASCs in a murine model of autoimmune encephalomyelitis. Semon and collaborators showed reduced inflammatory infiltrates and serum levels of IFN- $\gamma$  and IL-12 with intraperitoneal injection of ASCs<sup>38</sup>.

Different routes of delivery for stem cell therapy have been investigated over the past decade, whether using localized or systemic transplantation. In a murine model of myocardial injury, intravenous injection resulted in MSC plugging in the pulmonary vasculature. Nevertheless, entrapped MSCs acted remotely and secreted pro-healing cytokines (such as TSG-6) to improve myocardial function and decrease scarring post infarct<sup>21</sup>. Intraperitoneally injected MSCs to rats that underwent peritoneal scraping failed to reduce peritoneal adhesion compared to a marked effect of intravenously injected cells. MSCs were phagocytosed by macrophages not long after their injection in the peritoneum while intravenous injection produced emboli of cells in the lungs, which were subsequently detected in the spleen and liver<sup>24</sup>. Moreover, investigators have reported on the improved healing of corneal injury following the intraperitoneal delivery of MSCs, with no evidence of cell engraftment in corneal tissue<sup>39</sup>. Both of the latter studies demonstrated secretion of TSG-6 by MSCs.

Subcutaneous injection delivers into the interstitial space below the dermis. Understanding the mechanisms underlying subcutaneous absorption is limited despite the widespread use of this delivery route<sup>40</sup>. Prior studies have reported on the subcutaneous administration of MSCs within or in proximity to injury to promote tissue repair<sup>41,42</sup>. However, studies exploring the impact of this



non-invasive route of administration on systemic injuries are limited. In a murine model of cardiac ischemia-reperfusion injury, subcutaneous transplantation of ASCs was found to reduce infarct size and improve cardiac function. The luciferase labeled ASCs failed to migrate and engrafted at the site of injection. The investigators sought to uncover the putative mediators behind the cardioprotective phenomenon and found elevated plasma levels of pentraxin 3 and to a lesser extent TSG-6 in ASCs transplanted mice<sup>43</sup>. Another non-invasive, remote potential strategy that has been explored is the intramuscular injection. This route of delivery was used to locally inject human cord blood derived stem cells in a rat model of dilated cardiomyopathy. This led to improved cardiac function and increased levels of circulating HGF and VEGF despite remote cell injection<sup>44</sup>. Using a hamster heart failure model, Shabbir et al. administered MSCs into the hind limb skeletal muscle and observed improved ventricular function. The investigators suggested a possible crosstalk between transplanted MSCs and bone marrow progenitor cells but mechanisms and involved factors remain ill-defined<sup>22</sup>. Therefore, the conclusions from the latter studies point to a central mechanism behind the documented pro-healing effect: an endocrine mechanism to promote tissue healing and repair. In our model, we speculate that SBs transiently engraft within the dermis and secrete mediators depending on their exposure to circulating pro-inflammatory cytokines. An immunosuppressive phenotype will be adopted by SBs resulting in dampening of inflammation to promote tissue homeostasis. Endocrine activity likely explains the therapeutic functions of ASCs and how they act on injured tissue despite remote delivery. This allows for the elaboration of further therapeutic strategies using non-invasive delivery methods better suited for clinical applicability.

Finally, our study has key limitations. The experimental design should be viewed as a proof of concept as we tried to explore the effect of remote hASCs delivery on inflammation-induced tissue injury. We did not investigate any mechanistic pathways leading to the reduced neutrophil

and macrophage infiltration and clearance. Investigation into the biodistribution of the transplanted cells was also not performed. Translational research using large animal, preclinical models of inflammation injury are needed to better validate the potential the reported endocrine pro-healing mechanisms. Furthermore, direct comparison of the remote delivery to another route such as systemic injection would enable ruling on the efficiency of the remote administration and the endocrine like effects of ASCs.

In conclusion, our study reports on a significant endocrine anti-inflammatory effect of hASCs, when delivered remotely from the site of peritoneal injury.

#### **LIST OF ABBREVIATIONS**

BM-MSC: bone marrow derived mesenchymal stem cells

hASCs: human adipose derived stem cells

HGF: Hepatocyte growth factor

IL-10/6: Interleukin 10/6

ML: monolayer

SB: spheroid bodies

TNF $\alpha$ : Tumor necrosis factor alpha

TSG-6: TNF $\alpha$  stimulated gene 6 protein

VEGF: vascular endothelial growth factor

## **Acknowledgments**

We would like to thank Marie Elaine Clavet for advice on histological analysis and animal facility staff for animal related procedures.

## **Funding**

This work was supported by the Montreal Heart Institute Foundation, the ThéCell Network (FRQS), Chaire DesGroseillers-Bérard en Cardiologie Interventionnelle and Chaire Fondation Marcel et Jean Coutu de traitements chirurgicaux novateurs en insuffisance cardiaque from Université de Montréal.

## **Conflict of Interests**

All authors declare that there is no conflict of interest.

## **Ethical Approval**

Ethical approval to report this case was obtained from the Montreal Heart Institute Animal ethics committee in accordance with the National Canadian Guidelines (Approval 2014-54-01).

## **Statement of Human and Animal Rights**

All procedures in this study were conducted in accordance with the Montreal Heart Institute Animal ethics committee (Approval 2014-54-01).

## **Statement of Informed Consent**

There are no human subjects in this article and informed consent is not applicable.

## **References**

1. Abdallah BM, Kassem M. Human mesenchymal stem cells: from basic biology to clinical applications. *Gene Ther.* 2008;15(2):109-16.
2. Gimble JM, Katz AJ, Bunnell BA. Adipose-derived stem cells for regenerative medicine. *Circ Res.* 2007;100(9):1249-60.
3. Keating A. Mesenchymal stromal cells: new directions. *Cell Stem Cell.* 2012;10(6):709-16.
4. Dimmeler S, Leri A. Aging and disease as modifiers of efficacy of cell therapy. *Circ Res.* 2008;102(11):1319-30.
5. Gnecci M, Zhang Z, Ni A, Dzau VJ. Paracrine mechanisms in adult stem cell signaling and therapy. *Circ Res.* 2008;103(11):1204-19.
6. Zuk P. Adipose-Derived Stem Cells in Tissue Regeneration: A Review. *ISRN Stem Cells.* 2013;2013:1-35.
7. Hao C, Shintani S, Shimizu Y, Kondo K, Ishii M, Wu H, Murohara T. Therapeutic angiogenesis by autologous adipose-derived regenerative cells: comparison with bone marrow mononuclear cells. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2014;307(6):H869-79.
8. Girdlestone J. Mesenchymal stromal cells with enhanced therapeutic properties. *Immunotherapy.* 2016;8(12):1405-1416.
9. Nathan C, Ding A. Nonresolving inflammation. *Cell.* 2010;140(6):871-82.

10. Prockop DJ, Oh JY. Mesenchymal stem/stromal cells (MSCs): role as guardians of inflammation. *Mol Ther*. 2012;20(1):14-20.
11. Valencia J, Blanco B, Yanez R, Vazquez M, Herrero Sanchez C, Fernandez-Garcia M, Rodriguez Serrano C, Pescador D, Blanco JF, Hernando-Rodriguez M and others. Comparative analysis of the immunomodulatory capacities of human bone marrow- and adipose tissue-derived mesenchymal stromal cells from the same donor. *Cytotherapy*. 2016;18(10):1297-311.
12. Puissant B, Barreau C, Bourin P, Clavel C, Corre J, Bousquet C, Taureau C, Cousin B, Abbal M, Laharrague P and others. Immunomodulatory effect of human adipose tissue-derived adult stem cells: comparison with bone marrow mesenchymal stem cells. *Br J Haematol*. 2005;129(1):118-29.
13. Melief SM, Zwaginga JJ, Fibbe WE, Roelofs H. Adipose tissue-derived multipotent stromal cells have a higher immunomodulatory capacity than their bone marrow-derived counterparts. *Stem Cells Transl Med*. 2013;2(6):455-63.
14. Ivanova-Todorova E, Bochev I, Mourdjeva M, Dimitrov R, Bukarev D, Kyurkchiev S, Tivchev P, Altunkova I, Kyurkchiev DS. Adipose tissue-derived mesenchymal stem cells are more potent suppressors of dendritic cells differentiation compared to bone marrow-derived mesenchymal stem cells. *Immunol Lett*. 2009;126(1-2):37-42.
15. Kato T, Okumi M, Tanemura M, Yazawa K, Kakuta Y, Yamanaka K, Tsutahara K, Doki Y, Mori M, Takahara S and others. Adipose tissue-derived stem cells suppress acute cellular rejection by TSG-6 and CD44 interaction in rat kidney transplantation. *Transplantation*. 2014;98(3):277-84.
16. Cho KS, Roh HJ. Immunomodulatory effects of adipose-derived stem cells in airway allergic diseases. *Curr Stem Cell Res Ther*. 2010;5(2):111-5.
17. Williams AR, Hare JM. Mesenchymal stem cells: biology, pathophysiology, translational findings, and therapeutic implications for cardiac disease. *Circ Res*. 2011;109(8):923-40.
18. Bartosh TJ, Ylostalo JH, Mohammadipoor A, Bazhanov N, Coble K, Claypool K, Lee RH, Choi H, Prockop DJ. Aggregation of human mesenchymal stromal cells (MSCs) into 3D spheroids enhances their antiinflammatory properties. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2010;107(31):13724-9.

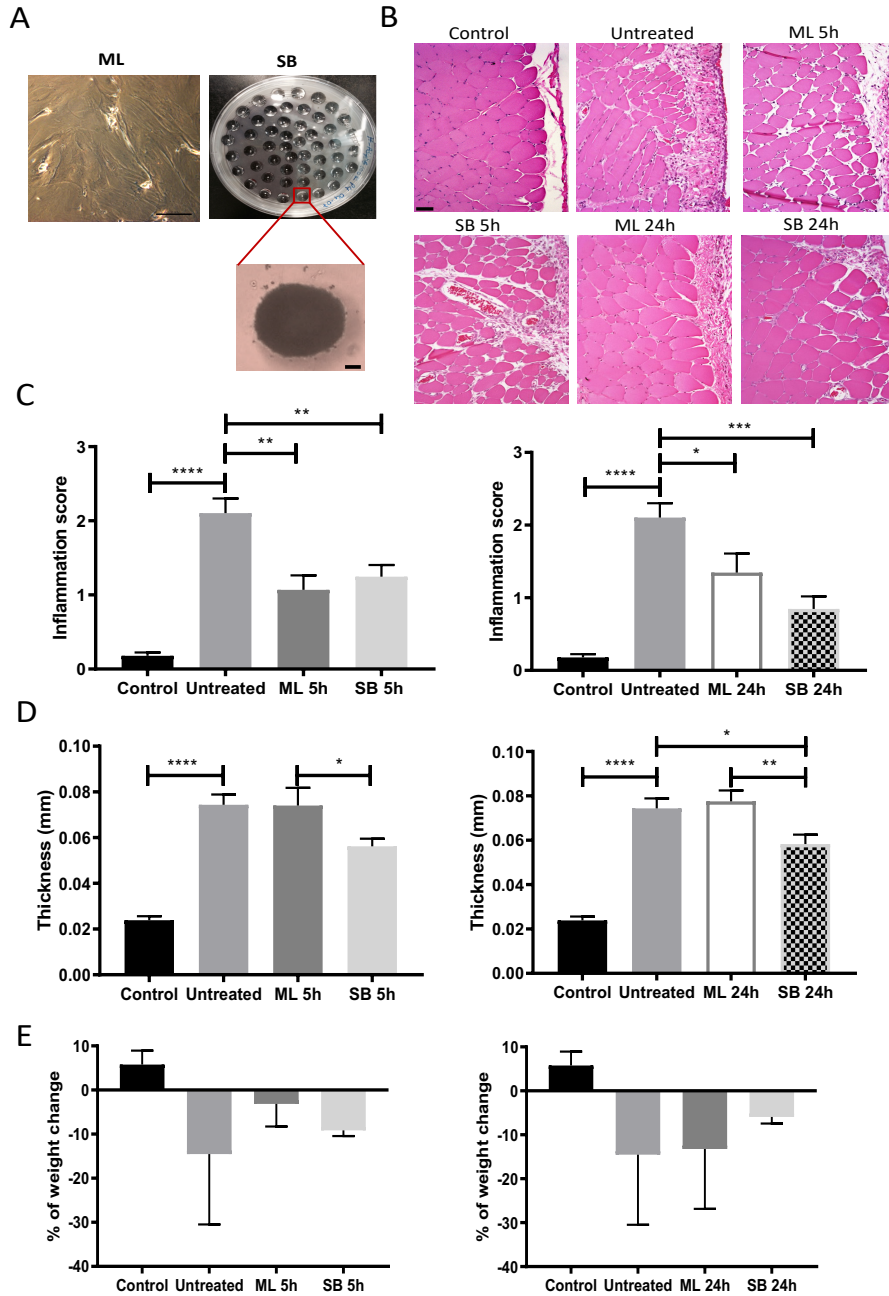
19. Zhao X, Qiu X, Zhang Y, Zhang S, Gu X, Guo H. Three-Dimensional Aggregates Enhance the Therapeutic Effects of Adipose Mesenchymal Stem Cells for Ischemia-Reperfusion Induced Kidney Injury in Rats. *Stem Cells Int.* 2016;2016:9062638.
20. Ylostalo JH, Bartosh TJ, Tiblow A, Prockop DJ. Unique characteristics of human mesenchymal stromal/progenitor cells pre-activated in 3-dimensional cultures under different conditions. *Cytotherapy.* 2014;16(11):1486-500.
21. Lee RH, Pulin AA, Seo MJ, Kota DJ, Ylostalo J, Larson BL, Semprun-Prieto L, Delafontaine P, Prockop DJ. 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.
22. Shabbir A, Zisa D, Suzuki G, Lee T. Heart failure therapy mediated by the trophic activities of bone marrow mesenchymal stem cells: a noninvasive therapeutic regimen. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2009;296(6):H1888-97.
23. Dinarvand P, Hassanian SM, Weiler H, Rezaie AR. Intraperitoneal administration of activated protein C prevents postsurgical adhesion band formation. *Blood.* 2015;125(8):1339-48.
24. Wang N, Li Q, Zhang L, Lin H, Hu J, Li D, Shi S, Cui S, Zhou J, Ji J and others. Mesenchymal stem cells attenuate peritoneal injury through secretion of TSG-6. *PLoS One.* 2012;7(8):e43768.
25. Kolaczowska E, Kubes P. Neutrophil recruitment and function in health and inflammation. *Nat Rev Immunol.* 2013;13(3):159-75.
26. Lee RH, Yu JM, Foskett AM, Peltier G, Reneau JC, Bazhanov N, Oh JY, Prockop DJ. TSG-6 as a biomarker to predict efficacy of human mesenchymal stem/progenitor cells (hMSCs) in modulating sterile inflammation in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2014;111(47):16766-71.
27. Wang Y, Chen X, Cao W, Shi Y. Plasticity of mesenchymal stem cells in immunomodulation: pathological and therapeutic implications. *Nat Immunol.* 2014;15(11):1009-16.
28. Fennema E, Rivron N, Rouwkema J, van Blitterswijk C, de Boer J. Spheroid culture as a tool for creating 3D complex tissues. *Trends Biotechnol.* 2013;31(2):108-15.

29. Ylostalo JH, Bartosh TJ, Coble K, Prockop DJ. Human mesenchymal stem/stromal cells cultured as spheroids are self-activated to produce prostaglandin E2 that directs stimulated macrophages into an anti-inflammatory phenotype. *Stem Cells*. 2012;30(10):2283-96.
30. Nemeth K, Leelahavanichkul A, Yuen PS, Mayer B, Parmelee A, Doi K, Robey PG, Leelahavanichkul K, Koller BH, Brown JM and others. 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.
31. Ren G, Zhang L, Zhao X, Xu G, Zhang Y, Roberts AI, Zhao RC, Shi Y. Mesenchymal stem cell-mediated immunosuppression occurs via concerted action of chemokines and nitric oxide. *Cell Stem Cell*. 2008;2(2):141-50.
32. Sudres M, Norol F, Trenado A, Gregoire S, Charlotte F, Levacher B, Lataillade JJ, Bourin P, Holy X, Vernant JP and others. Bone marrow mesenchymal stem cells suppress lymphocyte proliferation in vitro but fail to prevent graft-versus-host disease in mice. *J Immunol*. 2006;176(12):7761-7.
33. Koh TJ, DiPietro LA. Inflammation and wound healing: the role of the macrophage. *Expert Rev Mol Med*. 2011;13:e23.
34. Cash JL, White GE, Greaves DR. Chapter 17. Zymosan-induced peritonitis as a simple experimental system for the study of inflammation. *Methods Enzymol*. 2009;461:379-96.
35. Hsiao ST, Asgari A, Lokmic Z, Sinclair R, Dusting GJ, Lim SY, Dilley RJ. Comparative analysis of paracrine factor expression in human adult mesenchymal stem cells derived from bone marrow, adipose, and dermal tissue. *Stem Cells Dev*. 2012;21(12):2189-203.
36. Kotani T, Masutani R, Suzuka T, Oda K, Makino S, Ii M. Anti-inflammatory and anti-fibrotic effects of intravenous adipose-derived stem cell transplantation in a mouse model of bleomycin-induced interstitial pneumonia. *Sci Rep*. 2017;7(1):14608.
37. Song W-J, Li Q, Ryu M-O, Ahn J-O, Ha Bhang D, Chan Jung Y, Youn H-Y. TSG-6 Secreted by Human Adipose Tissue-derived Mesenchymal Stem Cells Ameliorates DSS-induced colitis by Inducing M2 Macrophage Polarization in Mice. *Scientific Reports*. 2017;7(1).
38. Semon JA, Maness C, Zhang X, Sharkey SA, Beuttler MM, Shah FS, Pandey AC, Gimble JM, Zhang S, Scruggs BA and others. Comparison of human adult stem cells from adipose tissue and bone marrow in the treatment of experimental autoimmune encephalomyelitis. *Stem Cell Res Ther*. 2014;5(1):2.

39. Oh JY, Kim MK, Shin MS, Lee HJ, Ko JH, Wee WR, Lee JH. 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.
40. Wang W, Chen N, Shen X, Cunningham P, Fauty S, Michel K, Wang B, Hong X, Adreani C, Nunes CN and others. Lymphatic transport and catabolism of therapeutic proteins after subcutaneous administration to rats and dogs. *Drug Metab Dispos*. 2012;40(5):952-62.
41. Qi Y, Jiang D, Sindrilaru A, Stegemann A, Schatz S, Treiber N, Rojewski M, Schrezenmeier H, Vander Beken S, Wlaschek M and others. TSG-6 released from intradermally injected mesenchymal stem cells accelerates wound healing and reduces tissue fibrosis in murine full-thickness skin wounds. *J Invest Dermatol*. 2014;134(2):526-37.
42. Falanga V, Iwamoto S, Chartier M, Yufit T, Butmarc J, Kouttab N, Shrayder D, Carson P. Autologous bone marrow-derived cultured mesenchymal stem cells delivered in a fibrin spray accelerate healing in murine and human cutaneous wounds. *Tissue Eng*. 2007;13(6):1299-312.
43. Preda MB, Ronningen T, Burlacu A, Simionescu M, Moskaug JO, Valen G. Remote transplantation of mesenchymal stem cells protects the heart against ischemia-reperfusion injury. *Stem Cells*. 2014;32(8):2123-34.
44. Mao C, Hou X, Wang B, Chi J, Jiang Y, Zhang C, Li Z. Intramuscular injection of human umbilical cord-derived mesenchymal stem cells improves cardiac function in dilated cardiomyopathy rats. *Stem Cell Res Ther*. 2017;8(1):18.

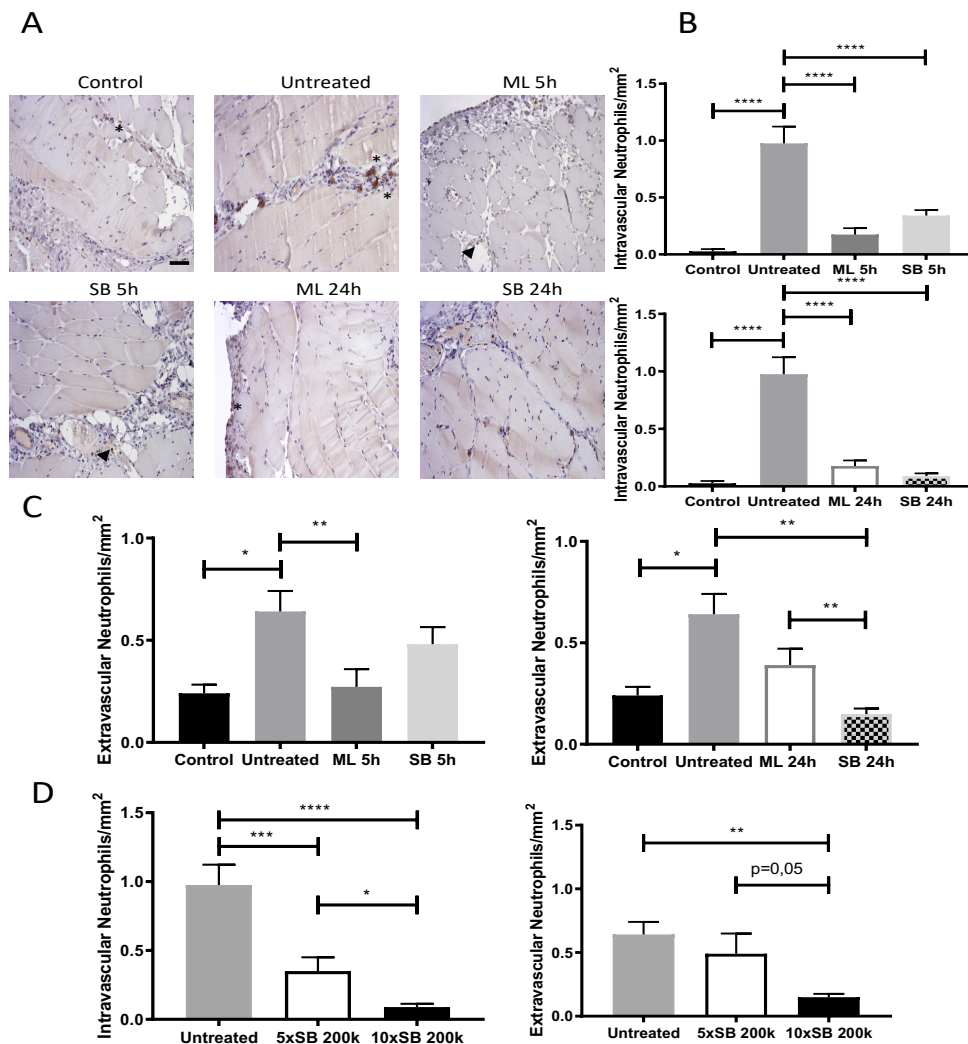


## FIGURE LEGENDS

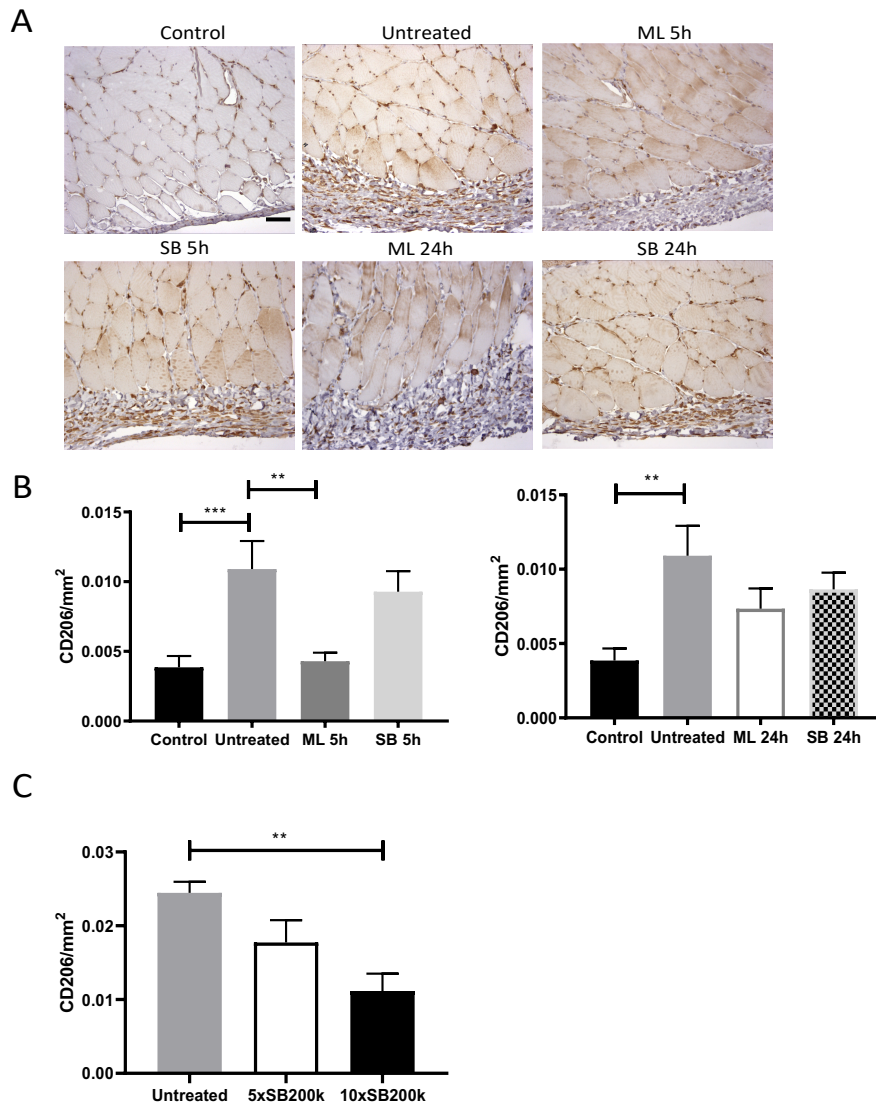


**Figure 1:** Phenotypical and histological evaluation of Zymosan-induced peritonitis (500mg/kg) and the impact of subcutaneous injection of monolayer (ML) or spheroid bodies (SB) of human adipose stromal cells (hASCs). (A) Representative images of monolayer ML and spheroid bodies

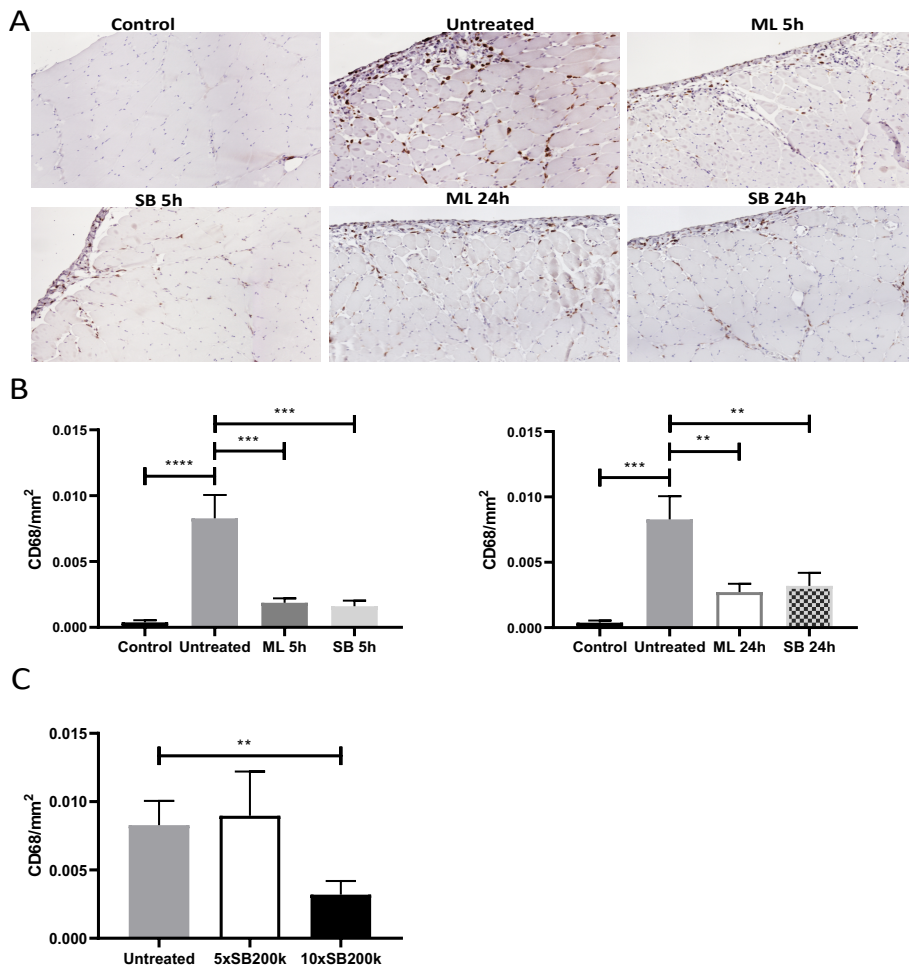
SB. (B) Representative images of peritoneal tissue stained with Hematoxylin & Eosin 3 days after zymosan injection, original magnification x200. (Scale bar, 50  $\mu$ m). (C) Inflammation scores from 30 fields per animal in each group based on a modified scoring method<sup>24</sup> described above. \*\*  $p < 0.005$  vs Untreated \*\*\*  $p < 0.0005$  vs Untreated. (D) Peritoneal thickness evaluated from 30 different fields per animal in each group. \* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.005$ ; \*\*\*\* $p < 0.0001$ .  $n = 7-9$  animals / group. (E) Percentage of change of the weight of rats in each group between the beginning before toxin injection and sacrifice, 3 days after, demonstrating a systemic effect induced by the inflammation and the therapeutic strategy.



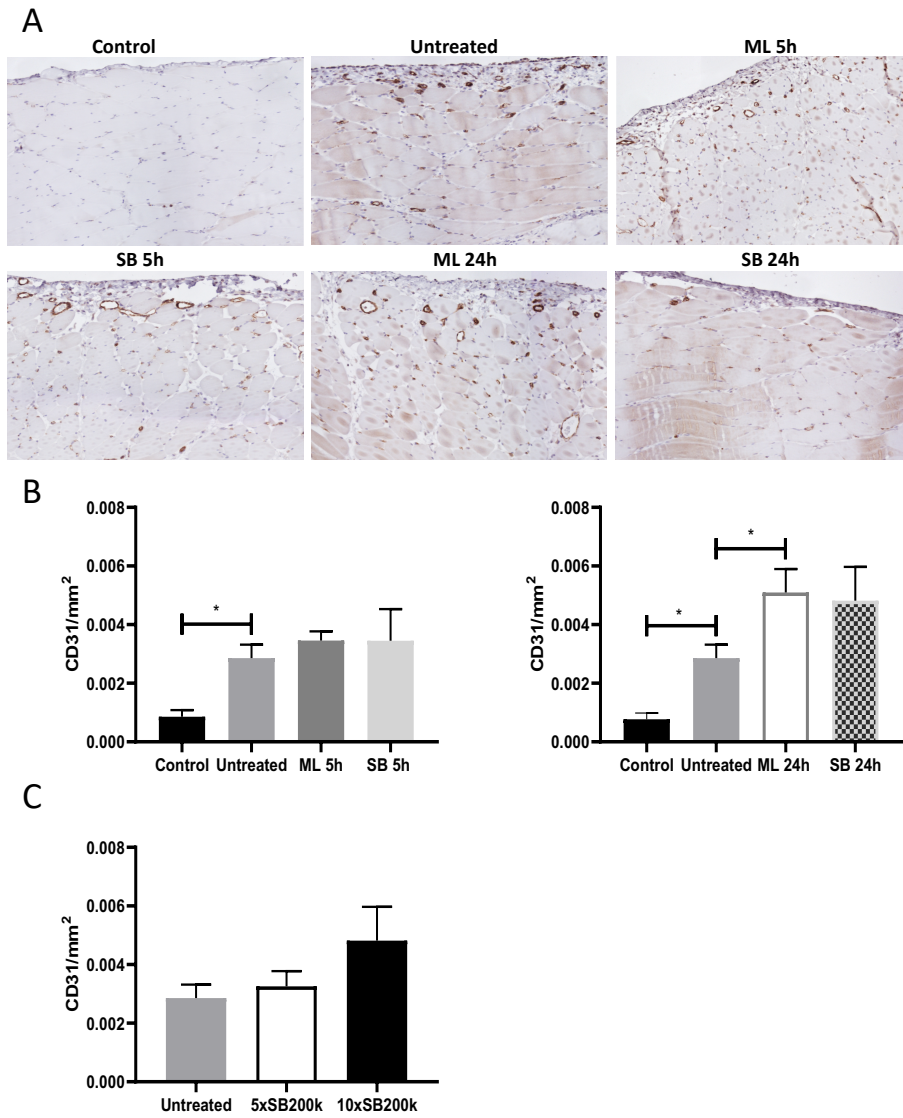
**Figure 2:** Subcutaneous Injections of ML and SB of hASCs reduce inflammation by decreasing neutrophil recruitment to peritoneal tissue. (A) Representative images of immunohistochemistry against myeloperoxidase (MPO) in peritoneal sections. Original magnification x200. (Scale bar, 100  $\mu$ m). Black arrows indicate vascular neutrophils and asterix indicate infiltrated tissue neutrophils (extravascular). (B) Intravascular neutrophil normalized to tissue area. (C) Neutrophil infiltration in peritoneal tissue normalized to tissue area. (D) Comparison of neutrophil infiltration in peritoneal tissue in response to reduced quantity of SBs, 5 SBs versus 10. n=4 animals/group.



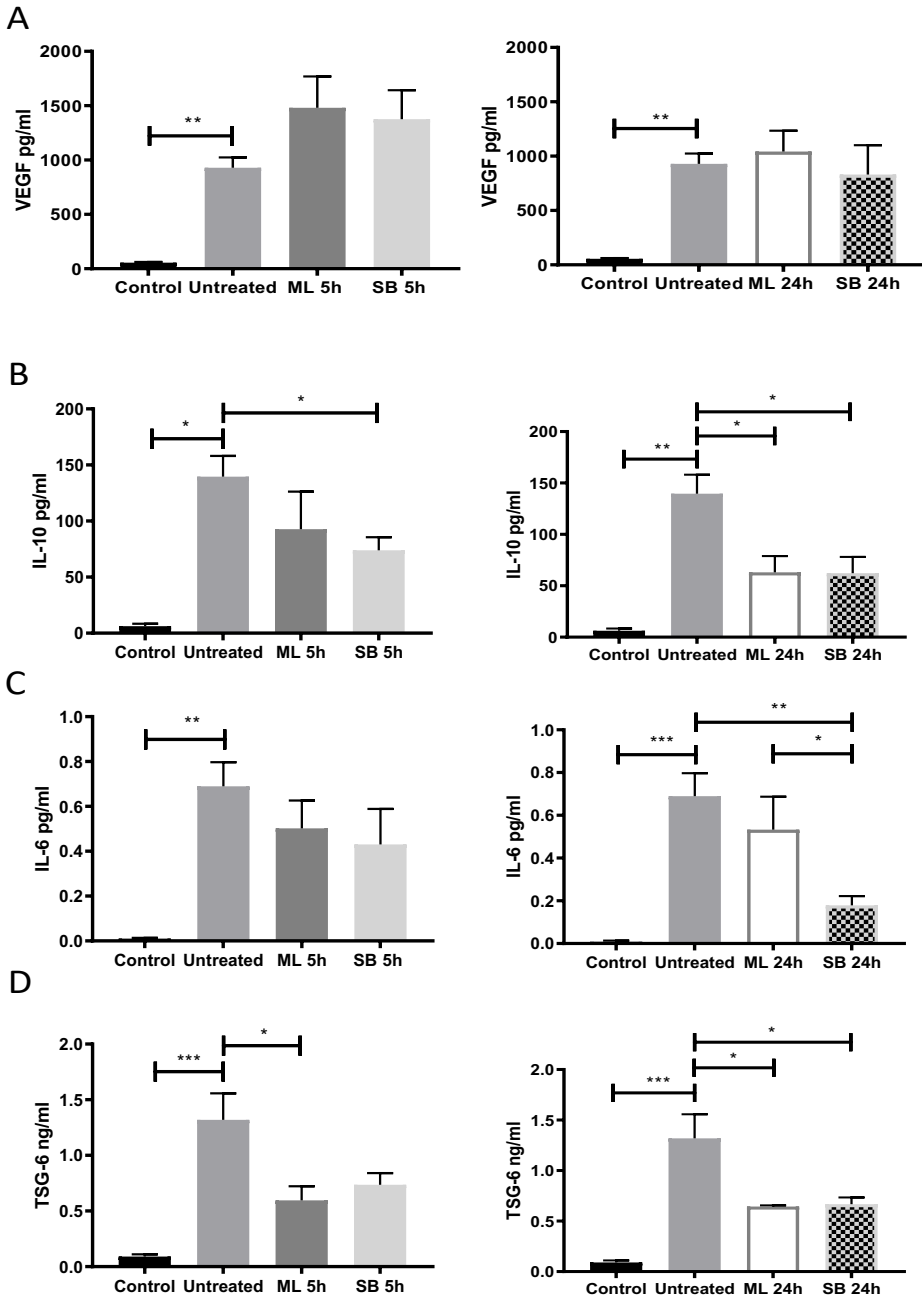
**Figure 3:** CD206 positive macrophage presence in peritoneal tissue after Zymosan injection. (A) Representative images of immunochemistry against CD206. Original magnification x200. (Scale bar, 100  $\mu$ m). (B) CD206 expression normalized to tissue area. (C) Comparison of CD206 expression normalized to tissue area in response to reduced quantity (5 SBs vs 10 SBs) or (D) \* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.005$ ; \*\*\* $p < 0.0005$ .  $n = 4$  animals /group.



**Figure 4:** CD68 positive macrophage presence in peritoneal tissue after zymosan injection. (A) Representative images of immunohistochemistry against CD68. Original magnification x200. (B) CD68 expression normalized to tissue area. (C) CD68 expression in peritoneal tissue comparing 5 SBs versus 10 SBs.  $n = 4$  animals per group.



**Figure 5:** CD31 quantification to evaluate vascular density in peritoneal tissue after zymosan injection. (A) Representative images of immunohistochemistry against CD31. Original magnification x200. (B) CD31 expression in peritoneal tissue normalized to total area. (C) CD31 expression in response to reduced SBs, comparing 5 SBs to 10 SBs. n=4 per group.



**Figure 6:** Quantification of secreted factors and cytokines in exudates of animals at sacrifice (A) VEGF, (B) IL-10, (C) IL-6 and (D) TSG-6. \* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.005$ ; \*\*\* $p < 0.0005$ .

## Chapitre 8 : Manuscrit #3

### 8.1 Mise en contexte

Tel que mentionné précédemment, la cardiopathie ischémique est encore à présent la cause la plus fréquente de mortalité et de défaillance cardiaque dans le monde, selon l'organisation mondiale de la santé (Hausenloy & Yellon, 2013). L'infarctus du myocarde aigu est la cause majeure de cardiopathie ischémique. Le traitement de choix pour limiter l'injure ischémique du myocarde et la taille de l'infarctus, demeure l'intervention coronarienne percutanée primaire (ou angioplastie primaire). Cette procédure de reperfusion importante pour soulager le myocarde d'une occlusion thrombotique aiguë induit paradoxalement une injure au tissu. La perte de cardiomyocytes suivi d'un remodelage ventriculaire néfaste engage le myocarde lésé vers la défaillance cardiaque. Ainsi, l'utilité potentielle d'un usage adjuvant de la thérapie cellulaire cardiaque réside dans le fait que celle-ci pourrait limiter la perte de tissu myocardique, le réparer et ultimement le régénérer (Ma et col., 2017).

Dans cette étude, nous avons utilisé un modèle d'ischémie-reperfusion du myocarde chez le rat afin d'évaluer l'efficacité thérapeutique des ASCs sur myocarde infarci. Alors que nous avons démontré dans le manuscrit #2 que la transplantation de ML et SB pouvait induire un effet anti-inflammatoire à distance, nous voulions confirmer cette même prémisse sur le modèle myocardique. Celui-ci est toutefois beaucoup plus complexe dû aux nombreux événements déclenchés par l'injure incluant l'apoptose, l'inflammation, la fibrose et la vascularisation. Nous avons donc décidé d'injecter les ASCs (ML et SB) en sous-cutané après l'ischémie-reperfusion et d'explorer les événements énumérés précédemment après 2 et 4 semaines.

Ce manuscrit est en révision pour publication dans le journal *Stem Cells International*.

**Remote Human Adipose-Derived Stem Cells Improve Myocardial Remodelling Through an Endocrine-like Effect.**

Celia Sid-Otmane, Natacha Duquette, Martin G. Sirois, Louis P. Perrault, and Hung Q. Ly.

<sup>1</sup>Department of Pharmacology and Physiology and Departement of Medicine, Université de Montréal, QC, Canada.

<sup>2</sup>Research Centre, Montreal Heart Institute, Université de Montréal, Montréal, QC, Canada.

<sup>3</sup>Department of Cardiovascular Surgery, Université de Montréal and Montreal Heart Institute.

**Corresponding author:**

Hung Q. Ly, MD, SM, FRCPC; Montreal Heart Institute; 5000 Belanger Street; Montreal, Quebec HIT 1C8, Canada.

Tel: 1-514-376-3330, #2438

Email: [qh.ly@umontreal.ca](mailto:qh.ly@umontreal.ca).



## **Abstract**

Therapeutic benefits of adipose-derived stem cells (ASCs) post myocardial injury are mostly related to the effects of diverse secreted factors rather than from engraftment or differentiation. The aim of this study was to explore the impact of a remote transplantation of human ASCs on myocardial damage caused on the myocardium after ischemia-reperfusion (I/R) injury. The ASCs were delivered either as monolayer (ML) or as spheroid bodies (SB). Furthermore, ASCs were delivered subcutaneously or directly on the epicardium after I/R. When delivered at 2 weeks post-I/R injury, remote transplantation of SB and ML reduced infarct size and collagen I/III ratio. Conversely, when either ML or SB were delivered 4 weeks post-I/R injury, only collagen ratio was improved. In the setting of epicardial delivery of SB and ML, there was a trend towards reduced infarct size. A reduction in M1 macrophages was found without evidence of M2 polarization accompanied. Moreover, enhanced c-kit<sup>+</sup> progenitor cells were found following both remote subcutaneous delivery and direct epicardial administration. Vascular density was enhanced in all treated groups; the SB group exhibited a higher impact on vasculogenesis when delivered at 2 weeks post-I/R injury. Subcutaneous delivery of ML and SB also reduced apoptosis. In conclusion, remote extracardiac delivery of ASCs can be considered as a minimally invasive alternative to promote cardiac repair after a myocardial ischemic injury and SB could offer greater advantages than ML cells.

**Key words:** Adipose tissue, adult stem cells, spheroid bodies, ischemia-reperfusion.

## **Introduction**

Ischemic heart diseases (IHD) represent a burden for public health and economical systems worldwide. Mortality has been greatly improved following myocardial infarction due to rapid percutaneous reperfusion and subsequent optimal pharmacological management (Benjamin et al. 2017). However, the major tissue loss associated with oxygen and nutrient disruption cannot be reversed with current therapies only rescuing injured but viable myocardial tissue. This ultimately leads to left ventricular impairment (Hausenloy and Yellon 2013). Cardiac cell-based therapy has become a novel therapeutic strategy in the setting of myocardial infarction, considering the very limited potential for self-regeneration of the adult myocardium. Based on promising pre-clinical outcomes, multiple clinical studies have explored the therapeutic potential of bone marrow derived mesenchymal stem cells (BM-MSC) in both acute cardiac ischemia and chronic ischemic cardiomyopathy (Chen et al. 2015). Harvesting BM stem cells is an intricate and painful procedure with low yield, compared to the availability and facility to obtain such stem cells from adipose tissue (Ma et al. 2017). Adipose-derived stem cells (ASCs) have shown very promising outcomes in preclinical studies improving myocardial vascularization and ventricular function while limiting adverse cardiac remodelling (Miyahara et al. 2006; Valina et al. 2007; Bobi et al. 2017). The mechanisms behind these improvements have not been fully characterized yet. Stem cell differentiation into cardiomyocytes does not occur to a significant extent to explain the therapeutic benefits following ASCs transplantation. The paracrine effect related to secreted factors is believed to be responsible for the reported therapeutic effects (Mirotsov et al. 2011; Haider et al. 2008; Kang et al. 2016).

Strategies to enhance secretion of healing factors and the survival of the transplanted stem cells have been explored in recent years in an aim to maximize the therapeutic efficacy. Preconditioning

strategies and genetic manipulations have been extensively used for this matter. Mechanical manipulation of ASCs represents another mean to improve stem cell survival and enrich their secretome (Potapova et al. 2007; Bhang et al. 2014). Producing three-dimensional structures, such as spheroid bodies, ensures maintenance of extracellular matrix organisation, contrary to standard cell suspension that requires proteolytic dissociation prior to injection (Hamdi et al. 2014). These structures have been described to produce important levels of factors promoting angiogenesis, protecting against apoptosis and regulating inflammation (Ranganath et al. 2012). In vivo application of ASCs spheroids showed improved engraftment associated with enhanced angiogenesis following ischemic injury (Kim et al. 2013; Bhang et al. 2014). The majority of preclinical models use direct cell injection into the ischemic region. Direct interaction of stem cells (irrespective of their configuration) and a hostile environment can limit their efficacy due to oxidative damage and inflammatory cytokines (Song et al. 2010). The aim of this study is to explore the efficacy of the remote, minimally invasive transplantation of hASCs SBs in a myocardial I/R model and to determine if the subcutaneous delivery can induce a therapeutic effect.

## **Material and Methods**

### *Cell Culture*

Human ASCs (Thermo Fisher scientific, MA, USA) were plated in flasks to reach confluence. Cells from passage 3 to 7 were used for the experiments. Once confluent, cells were detached with trypsin EDTA, centrifuged and re-suspended in PBS 1X for washing. Cells were then incubated in presence of CM-Dil (Thermo Fisher Scientific, MA, USA) at 2ug/ml for 5 minutes at 37°C followed by 15 minutes incubation at 4°C. After centrifugation and washing with PBS 1X, cells

were ready to be injected in rats as monolayer cells. For in vivo transplantation as monolayer cells in ML groups, a small patch of surgicel was deposited on the myocardium followed by the cells on top of the surgicel. To produce spheroid bodies, once stained, cells were put in Mesenpro media at the right concentration to produce droplets on the cover of a petri dish, following the hanging drop method. 3 days after, spheroids were transplanted subcutaneously or epicardially in rats subjected to ischemia-reperfusion.

Stimulation of hASCs were performed to analyse the secretome with ELISA and Luminex assays. Briefly, one SB of 100k cells was compared to 100k monolayer cells whether in basic culture condition, in response to TNF $\alpha$  100ng/ml stimulation for 24 hours, or in response to oxidative stress H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 1mM. Collected media was stored at -80°C until needed.

#### *Immunofluorescence of SBs*

SBs were embedded in OCT compound, frozen with liquid nitrogen and stored at -80°C until used. Cryosections of 8 $\mu$ m were used for immunofluorescence experiments. Briefly, tissue was fixed with paraformaldehyde 4% with triton 0,01% for permeabilization. After blocking non-specific binding with normal donkey serum, primary antibody incubation with anti-HIF1 $\alpha$  followed for an hour at room temperature followed by an Alexa fluor secondary antibody for another hour. After washing the slides in PBS 1X, they were mounted using a mix of glycerol and DABCO. Confocal microscopy allowed to visualize slides with Zeiss software.

#### *ELISA and Luminex Assays*

Luminex assays were used to quantify VEGF and MCP-1 (R&D systems, MN, USA) from conditioned media of hASCs following manufacturer protocol. Briefly, standards, samples and microparticles were added in a filtered microplate and incubated for 2 hours with mild shaking.

This was followed with sequential incubations with biotin antibody and streptavidin peroxidase before reading the plate using a Bio-Rad analyzer.

For ELISA assays (Thermo Fisher Scientific, MA, USA), manufacturer protocol was also followed. Optical density was read at 450 nm. All ELISA and LUMINEX experiments were performed at least 3 times on duplicates.

#### *TSG-6 homemade ELISA*

TSG-6 levels were quantified through a homemade ELISA. Briefly, a 96-well Costar plate was coated with 10 ug/ml TSG-6 monoclonal antibody (Santa Cruz Biotechnologies, TX, USA) overnight at 4°C. After washing the plate 4 times with PBS 1X Tween20 0,1%, wells were blocked with PBS containing BSA 0,5% for 45 minutes. At the end of the incubation, the plate was washed again before adding standards (recombinant human TSG-6) and samples in the appropriate wells for a 2 hours incubation. After washing off the plate, wells were incubated with biotin coupled anti-TSG-6 at 0,5 ug/ml (R&D systems, MN, USA) for 2 hours followed by streptavidin incubation for 30 minutes. HRP substrate was introduced after a final washing step and the reaction was stopped after 20 minutes with stop solution (sulphuric acid 2N). The optical density of the plate was read at 450nm right after. Experiments were performed 3 times on duplicated samples.

#### *Animals*

Male Sprague Dawley rats weighting 300-350g were used in these experiments. They were purchased from Charles River Laboratories and used under an approved protocol by the animal committee of the Montreal Heart Institute following strict national and institutional guidelines. Rats were acclimated for at least 5 days before surgery and fed standard rat chow with free access to water.

### *Myocardial Ischemia Reperfusion (I/R)*

The I/R injury was induced by an occlusion of the left anterior descending (LAD) coronary artery followed by reperfusion. Briefly, rats underwent anaesthesia with 3% isoflurane in a box and sustained with 2% isoflurane throughout the surgery. Buprenorphine (0,03mg/ml) was administered before surgery. Animals were intubated and ventilated with oxygen at 1L/min. A thoracotomy in the fourth intercostal space was performed to access the myocardium. Once the pericardium opened, a silk suture 5.0 was passed underneath the LAD approximately 1/3 down from aorta. The slipknot was tightened for 45 minutes, and ischemia was confirmed visually by observing a gray/white area on the myocardium. Loosening the suture around the LAD induced reperfusion. The chest was closed in layers and animals received a post-operative dose of buprenorphine. Rats were allowed to recover.

### *Delivery of hASCs*

Rats were randomly divided into different groups left for 2 or 4 weeks for a total of 9 groups. 2 weeks groups were: untreated (No-Trx), treated with subcutaneous ML hASCs, treated with subcutaneous SB, a group treated with ML on surgicel used as a matrix applied on the epicardium, another group received SB on surgicel as well. Groups left for 4 weeks were: untreated (No-Trx), treated with subcutaneous hASCs ML and a group treated with SB hASCs subcutaneously. Untreated rats compared with epicardial delivery of hASCs received surgicel alone. ML groups received  $1 \times 10^6$  cells while SB groups received 10 SBs of 100k cells. Subcutaneous delivery was performed 48h after I/R injury, in the chest area, while epicardial delivery was performed before chest closure after I/R injury using surgicel as a support on the myocardium.

### *Hemodynamic evaluation*

Left Ventricle hemodynamic assessment was using a Millar catheter 1.6F (Millar instruments) before sacrifice. Rats were anesthetised with isoflurane 3% and the right carotid was exposed to place the catheter and register. Heart rate (HR), left ventricular end-diastolic pressure (LVEDP), diastolic and systolic pressure, dp/dt min and max were all measurements acquired with IOX2 software from EMKA technologies.

### *Histologic analysis*

At sacrifice, myocardial tissue was put in cassettes in formalin 10%, embedded in paraffin and cut into 6µm section. Slides were stained with Masson trichrome to evaluate the infarct size and with Sirius Red to analyse collagen deposition in the scar, following standard procedures. Briefly, infarct size was determined as the proportion of blue area (scar) on total left ventricular area. Characterization of the scar was done by calculating the ratio of collagen I and collagen III represented by green and red filaments respectively, on Sirius red stained slides.

### *Immunohistochemistry*

Slides of 6µm sections were subjected to immunohistochemical detection of different antibodies. The procedure debuted with re-hydration in sequential baths of xylen and alcohol followed by antigen retrieval in citrate buffer for 30 minutes at 100°C. After washing in distilled water and equilibration in PBS baths, endogenous peroxidase was blocked for 20 minutes in 3% hydrogen peroxide solution. Slides were washed and blocked with normal goat serum for 30 minutes. Primary antibody incubation was then followed for 1hour. Once washed off, drops of ImmPress reagent were put on each section for a 30-minute incubation, washed again and revealed with DAB. Counterstaining was performed with Mayer. Primary antibodies used were: CD206 (Abcam,

Cambridge, UK) and CD68 (Thermo Fisher Scientific, MA, USA) for macrophages, c-kit (Santa Cruz Biotechnologies, TX, USA) for endogenous progenitor cells, CD31 (Novus Biological, CO, USA) for angiogenesis and cleaved caspase 3 (R&D Systems, MN, USA) for apoptotic cells.

#### *Detection of transplanted hASCs*

Transplanted cells were stained with CM-Dil dye to be detected under confocal microscopy. Slides of myocardial tissue and subcutaneous tissue were re-hydrated in sequential baths of xylene and alcohols before mounting the slides with a mix of mounting milieu and DAPI.

#### *Statistics*

Statistical analysis and comparisons were performed using Graphpad Prism 8.0. Statistical significance was considered attained with  $p < 0.05$ . One-way ANOVA was performed to compare groups and post hoc Dunnett test to evaluate differences with non-treated group.

## **Results**

#### *Enriched secretome of SB compared to ML hASCs*

The interest toward 3-D cell aggregation arise from numerous studies demonstrating enhanced production of different paracrine factors along with enhanced resistance to cell stressors and harsh environment (Zimmermann and McDevitt 2014; Bhang et al. 2011). We performed *in vitro* studies at first to compare the secretion of different factors involved in angiogenesis and immunomodulation by ML hASCs and SBs. Fig 1A showed an increased secretion by SB compared to ML of HGF ( $20.14 \pm 0.4$  pg/10k cells for SB vs  $9.8 \pm 1.9$  pg/10k cells for ML;  $p = 0.03$ ) and VEGF (Fig 1B  $11.4 \pm 3.5$  pg/10k cells for SB vs  $1.57 \pm 0.35$  pg/10k cells for ML;  $p = 0.03$ ) in



basic conditions. In response to  $\text{TNF}\alpha$ , HGF production was further elevated ( $55.0\pm 4.1$  pg/10k cells for SB vs  $4.1\pm 1.1$  pg/10k cells for ML;  $p=0.03$ ) as well as VEGF ( $5.9\pm 1.6$  pg/10k cells vs  $1.9\pm 0.2$  pg/10k cells respectively;  $p=0.05$ ). In response to oxidative stress ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ), HGF levels were significantly higher in SB compared to ML ( $25.9\pm 2.1$  pg/10k cells vs  $1.7\pm 1.1$  pg/10k cells respectively;  $p=0.001$ ) while secretion of VEGF did not show significant difference between SB and ML. Expression of HIF1 $\alpha$  in the core of the spheroid shown in Fig 1E may be related to augmented secretion of VEGF and HGF.

MCP-1, another cytokine in the secretome that is implicated in stromal stem cell pro-angiogenic and immunomodulatory effects, was been found elevated in the media of SB in standard culture condition (Fig 1C  $7.0\pm 2.0$  for SB vs  $1.8\pm 0.5$  pg/10k cells for ML;  $p=0.05$ ) and in response to  $\text{H}_2\text{O}_2$  ( $7.3\pm 1.1$  for SB vs  $1.9\pm 0.2$  pg/10k cells for ML;  $p=0.009$ ). However, in presence of  $\text{TNF}\alpha$ , ML released statistically relevant amount of MCP-1 compared to SB ( $67.2\pm 9.0$  for SB vs  $234.4\pm 59.0$  pg/10k cells for ML;  $p=0.01$ ).

TSG-6, an anti-inflammatory factor secreted mainly in response to  $\text{TNF}\alpha$ , was quantified in the media. Under standard condition, no difference was found between ML and SB but in response to  $\text{TNF}\alpha$ , SB released higher quantities of TSG-6 than ML (Fig 1D  $2.2\pm 0.2$  for SB vs  $0.5\pm 0.1$  ng/10k cells for ML;  $p=0.004$ ). In presence of oxidative stress, TSG-6 was also found to be increased in SB media relative to ML ( $0.3\pm 0.02$  vs  $0.05\pm 0.008$  ng/10k cells respectively;  $p=0.009$ ).

#### *Remote and epicardial transplantation of hASCs improved infarct scar.*

In this experimental model of ischemic injury, we investigate the impact of of remote versus direct transplantation of hASCs SB or ML on the myocardial scar. First, we evaluated the infarct size following I/R injury (Fig 2A). Untreated animals had an infarct size of  $15.14\pm 1.57\%$  after 2 weeks

and treatment with subcutaneous ML and SB effectively reduced infarcted area to  $9.22 \pm 0.94\%$  and  $11.4 \pm 0.69\%$  respectively (Fig 2B,  $p=0.002$  for ML and  $p=0.05$  for SB vs No-Trx). Untreated animals left in the 4-week group did not have a greater infarct size than untreated rats left for 2 weeks. In the former, treatment with remote hASCs transplantation did not induce any significant change (Fig 2C,  $10.37 \pm 1.24\%$  for ML and  $11.59 \pm 1.59\%$  for SB). When cells were administered directly on the epicardium, there was a trend towards reduction in infarct area with SB without reaching significance (Fig 2D,  $7.48 \pm 0.96\%$  for SB vs No-Trx  $11.97 \pm 2.29\%$ ). To further characterize the scar, the Sirius red staining was performed to differentiate between collagen I and III (Fig 2E). The ratio of collagen I/III was increased in untreated groups (Fig 2F,  $2.31 \pm 0.13$  for 2 weeks and Fig 2G,  $4.33 \pm 0.61$  for 4 weeks). Both ML and SB subcutaneous administration reduced the ratio with significance after 2 weeks (Fig 2F,  $1.42 \pm 0.12$  for ML;  $p=0.001$  and  $1.12 \pm 0.16$ ;  $p=0.0002$  for SB) and 4 weeks (Fig 2G,  $2.60 \pm 0.45$  for ML  $p=0.05$  and  $1.95 \pm 0.33$ ;  $p=0.01$  for SB). For the epicardial delivery of stem cells, ML and SB failed to induce a significant reduction in collagen ratio (Fig 2H,  $2.18 \pm 0.32$  for ML and  $1.87 \pm 0.20$  for SB vs  $2.63 \pm 0.27$  for untreated group). Remote hASCs transplantation demonstrated positive effect on fibrosis and scarring after myocardial ischemic injury. Finally, we were unable to document effects on key hemodynamic parameters with either remote or direct transplantation (Table 1).

#### *Remote ASCs transplantation reduced macrophages in the left ventricle*

In this I/R model, rats were sacrificed either 2 or 4 weeks after injury. We sought to quantify inflammatory cells infiltration in the myocardium, specifically macrophages. Prior reports have described a polarization in the macrophage phenotype with pro and anti-inflammatory macrophages (Sager, Kessler, and Schunkert 2017). Expression of CD68 (Fig 3A) has been related

to pro-inflammatory macrophages M1 while CD206 (Fig 3E) has been expressed mainly on M2, believed to be anti-inflammatory macrophages. In our study, CD68 macrophages were significantly increased in untreated rats (Fig 3B,  $0.015 \pm 0.003$ ) and subcutaneous treatment reduced CD68 expression after 2 weeks in response to ML (Fig 3B,  $0.0065 \pm 0.001$ ;  $p=0.01$ ) and to SB (Fig 3B,  $0.0047 \pm 0.001$ ;  $p=0.007$ ). After 4 weeks, remote hASCs transplantation as ML reduced CD68 without reaching statistical significance while SB exhibited a greater impact (Fig 3C,  $0.0048 \pm 0.001$  for SB vs  $0.015 \pm 0.003$  for untreated;  $p=0.04$ ). With regard to CD206 expression, untreated and treated animals showed similar values, we could not detect any convincing change in the expression of CD206 in the infarct region 2 weeks after injury (Fig 3F,  $0.014 \pm 0.002$  for untreated vs  $0.012 \pm 0.001$  for ML and  $0.012 \pm 0.003$  for SB). After 4 weeks, CD206 expression was decreased in all groups compared to 2 weeks. We could not detect significant effect of either ML and SB subcutaneous injection (Fig 3G,  $0.007 \pm 0.0008$  for ML and  $0.007 \pm 0.001$  for SB vs  $0.004 \pm 0.0005$  for No-Trx).

Epicardial transplantation of ML and SB did not induce any notable change in CD206 expression in the infarcted area (Fig 3H) while CD68 was significantly reduced by both injected forms (Fig 3D,  $0.004 \pm 0.001$  for ML and  $0.0025 \pm 0.0008$  for SB vs  $0.012 \pm 0.003$  for No-Trx;  $p < 0.05$ ). While capable of reducing infiltration of pro-inflammatory macrophages, delivery of hASCs (whether remote or direct) failed to demonstrate an ability to polarize macrophages toward an activated state i.e. into M2 macrophages.

#### *Remote and direct administration of hASCs increase c-kit<sup>+</sup> endogenous progenitor cells*

One of the mechanisms used by stem cells to repair injured myocardium is stimulation of endogenous progenitor cells (Hesse, Fleischmann, and Kotlikoff 2014). We explored whether

treated animals exhibited higher c-kit<sup>+</sup> progenitor cells (Fig 4A). Subcutaneous delivery of ML and SBs increased c-kit<sup>+</sup> cells in the myocardial tissue, mainly in the infarct region after 2 weeks. SB administration was associated with a significant activation of these endogenous progenitor cells while ML failed to reach have a similar effect (Fig 4B,  $0.009 \pm 0.002$  for SB vs  $0.003 \pm 0.0004$  for untreated;  $p=0.01$ ). In groups left for 4 weeks after I/R, both ML and SB transplantation displayed significant impact on c-kit<sup>+</sup> cells compared to the no treatment group (Fig 4C,  $0.003 \pm 0.0006$  and  $0.003 \pm 0.0004$  for ML and SB with  $p= 0.03$  and  $0.02$  respectively vs untreated  $0.001 \pm 0.0002$ ). With regard to direct delivery, ML augmented c-kit expression in the infarct area (Fig 4D,  $0.0039 \pm 0.0004$  vs  $0.0018 \pm 0.0006$  for untreated;  $p=0.02$ ) but to a lesser extent than SB (Fig 4D,  $0.0048 \pm 0.0004$ ;  $p=0.004$ ).

#### *Remote and direct delivery of SB hASCs induced vasculogenesis*

Enhancing angiogenesis is key to cardiac repair. Thus, we characterized vascular density in the infarct and peri-infarcted zone (Fig 5A). CD31, expressed by endothelial cells, was quantified and reported to surface area. We showed that vascular density was effectively enhanced by ML and SB 2 weeks after I/R injury (Fig 5B left panel,  $142.6 \pm 17.6$  and  $220.5 \pm 17.8$  with  $p=0.001$  and  $p<0.0001$  respectively, vs untreated  $49.9 \pm 7.9$ ). In the peri-infarct zone, a similar pattern was observed for both ML and SB showing significant increase in CD31 expression (Fig 5B right panel,  $46.6 \pm 5.3$  for ML and  $69.8 \pm 10.3$  for SB;  $p=0.03$  and  $0.0005$  respectively vs untreated  $19.6 \pm 3.03$ ). SB increased vascular density to a greater degree than ML for both infarct and peri-infarct zones. After 4 weeks, enhanced vascular density was documented in the infarct area following ML delivery (Fig 5C,  $144.4 \pm 36.1$ ;  $p=0.03$ ) and SB (Fig 5C,  $142.1 \pm 12.2$ ;  $p=0.02$ ) compared to untreated rats ( $63.3 \pm 8.1$ ). Increased CD31 was also documented in the peri-infarct zone for both ML and SB groups

(Fig 5C left panel,  $35.6\pm 3.2$  and  $36.9\pm 3.7$  respectively with  $p=0.001$  and  $0.0007$  vs untreated  $16.03\pm 1.7$ ). Following direct transplantation, a significant increase of CD31 in the infarct zone was observed for the SB group compared to untreated animals (Fig 5D left panel,  $148.9\pm 22.8$  vs  $70.8\pm 8$  respectively;  $p=0.006$ ). ML induced angiogenesis with less significance than SB (Fig 5D left panel,  $129\pm 10.7$ ;  $p=0.03$  vs untreated). Both ML and SB elevated CD31 expression in the peri-infarcted zone (Fig 5D right panel,  $44.6\pm 5.3$  and  $52.1\pm 4.1$  respectively vs untreated  $24.5\pm 4.0$ ;  $p=0.01$  and  $0.002$  respectively).

*Remote hASCs delivery decreased apoptotic cells in the infarcted myocardium.*

Anti-apoptotic effect has been described previously for both ASCs and MSCs treatments (whether *in vitro* or *in vivo*) (Rehman et al. 2004; Yang et al. 2013). We explored the levels of cleaved Caspase 3 in the myocardium as a hallmark of apoptosis, comparing untreated and treated groups (Fig 6A). Subcutaneous delivery was documented to impact expression of cleaved Caspase 3 in the infarcted area. Both ML and SB reduced cleaved Caspase 3 expression in the myocardium compared to untreated rats (Fig 6B,  $0.0009\pm 0.0004$  for ML and  $0.0008\pm 0.0002$  for SB vs  $0.003\pm 0.0006$  for untreated;  $p=0.02$  and  $0.01$  respectively). After 4 weeks, the treatment did not alter Caspase 3 cleavage, although showing a trend toward reduction compared to untreated group (Fig 6C,  $0.0014\pm 0.0002$  for ML and  $0.0017\pm 0.0003$  for SB vs  $0.002\pm 0.0005$  for untreated animals). Direct transplantation using surgicel as a matrix also showed a trend for reduction of cleaved caspase 3 without reaching statistical significance (Fig 6D,  $0.0012\pm 0.0005$  for ML and  $0.0012\pm 0.0005$  for SB vs  $0.0024\pm 0.0005$  for untreated animals).

*Transplanted ML and SB were retrieved in the injection site up to 4 weeks after injury*

We sought to determine if remotely transplanted cells could be retrieved in the injured myocardium. At the 2- and 4-week time points after transplantation, ML and SB were detected in the subcutaneous tissue, at the site of delivery (Fig 7A and B). There were no detectable CM-Dil cells in the myocardium. Epicardial ML and SB were also retrieved 2 weeks after I/R, on the myocardium. SB remained localized at the site of injection on the epicardium in a compact form without detectable migration of individual cells.

## **Discussion**

The healing process following cardiac injury is a complex sequence of events involving cell death, inflammation, collagen deposition, neovascularization, cardiac remodelling and in a limited way, cardiac regeneration (Bonaventura, Montecucco, and Dallegri 2016). Our study investigated these events in a rat model of myocardial I/R. We sought to determine if a remote transplantation of hASCs could promote cardiac repair after myocardial ischemic injury. We reported that a remote delivery of hASCs reduced infarct scar and its related collagen deposition, decreased inflammatory cell infiltration, increased endogenous cardiac progenitor cells and improved neovascularization in the injured myocardium.

The invasiveness of intracoronary or intramyocardial administration severely restricted routine clinical application of stem cells in cardiac ischemia (Mao et al. 2017). The plethora of trophic factors secreted by ASCs must be harnessed for success of any non-invasive cardiac therapy, especially having recognized that beneficial effects have mainly been attributed to these factors as it is well documented that cell engraftment rate remains very low (Hodgkinson et al. 2016). Prior reports have investigated extracardiac strategies to elicit cardioprotection either using remote ischemic preconditioning or gene therapy, in both animal models and clinical studies (Valen 2009).

With regard to cardiac cell therapy, Braid et al. reported that intramuscularly injected umbilical cord derived MSCs were still detected more than 100 days after transplantation (Braid et al. 2016). These investigators documented an extended dwell time of these stem cells when transplanted in the musculature compared to intravenous or intraperitoneal delivery (Braid et al. 2018). In our study, we did not find evidence of stem cell migration in the myocardium when ML or SBs were subcutaneously injected in animals. A study using intramuscular ASCs on a left ventricular hypertrophy model also reported lack of migration, whether analysed by immunohistochemistry or by RT-PCR which showed no amplification of the Alu gene (Lee et al. 2019). Similarly, Shabbir et al. showed that intramuscularly injected MSCs did not migrate to other tissues while improving ventricular function (Shabbir et al. 2009). Subcutaneous delivery has mainly been investigated in wound healing models (Park, Chung, and Ahn 2015; Qi et al. 2014; Sorrell and Caplan 2010). To our knowledge, only one group have looked at this route of administration in order to evaluate a possible healing effect after MI (Preda et al. 2014). Preda et al. showed improved left ventricular function after subcutaneous transplantation of mouse ASCs. This study along with ours shed light on an endocrine-like effect for cardioprotection, as these cells act at long distance from injured tissue. We documented increased angiogenesis and decreased apoptosis with a remote stem cell transplantation, results in accordance to outcomes from direct invasive ASCs administration (Eirin et al. 2012; Yang et al. 2013).

Immune cell regulation is surely a primary mechanism in the pro-healing effect of ASCs. These stem cells are not passive but rather act as active sensors of the microenvironment in order to produce factors to elicit a reparative process (Ma et al. 2017). In the setting of brain ischemic injury, injection of MSCs at different time points elicited different mechanisms. Cell administration 3 days after injury induced cell proliferation whereas administration 10 days after ischemia induced axonal

remodeling. One of the arguments for using cell administration rather than conditioned media is the plasticity of MSCs. Pathway focused analysis revealed differential regulation of gene expression of multiple secreted factors at the two time points (van Velthoven et al. 2010). Further studies are needed for direct comparison of stem cell transplantation and conditioned media as some reports described similar effects while others ascribed higher potential to stem cells (Yang et al. 2013; Hatzistergos et al. 2010).

Macrophages are phagocytes with great importance in the orchestration of innate immunity (Koh and DiPietro 2011). They are responsible for the clearance of pathogens and cellular debris. They have been categorized into two subpopulations: M1 representing the classically activated macrophages and M2 are alternatively activated. M1 secrete proinflammatory cytokines and inducible nitric oxide synthase (iNOS) to ascertain their defensive role. M2 have a more regulatory role secreting anti-inflammatory cytokines like IL-10. The first experimentation documenting the impact of MSCs on macrophages phenotype used co-culture studies giving rise to macrophages that produce high levels of IL-10 and low levels of TNF $\alpha$  (Kim and Hematti 2009). Prior *in vivo* studies have confirmed a polarization of macrophages toward an alternative activated M2 state following MSCs treatment. In a mice model of myocardial infarction, administration of MSCs in the border zone reduced M1 macrophages and increased M2 observed through augmented CD206 expression, 3 and 4 days after injury (Ben-Mordechai et al. 2013). Other investigators implanted selected CD105<sup>+</sup> MSCs in the border area of post infarction scar and observed increased M2 macrophages up to 3 days after cell transplantation. However, 7 days after, there was no notable difference between saline and MSCs injection on M2 in the myocardium (Czapla et al. 2016). Recently, the interrelation of bone marrow (BM) derived MSCs and macrophages post MI was explored, more specifically the role of their secreted exosomes. It was shown that intramyocardial



injection of MSC-derived exosomes reduced inflammatory cell infiltration and effectively transferred macrophage subsets from M1 to M2 in the ischemic heart (Xu et al. 2019). ASCs transplantation in a rabbit model of hindlimb ischemia induced enhanced IL-10 by the polarization of macrophages M2 through a mechanism dependent of PGE2 (Hao et al. 2014). In our study, we could not demonstrate enhanced M2 at 2 weeks after remote or direct transplantation. However, 4 weeks after injury, there seems to be a trend toward enhancement of CD206 expression in the myocardial tissue. At this stage, macrophages participate in wound healing by promoting transdifferentiation of fibroblasts into myofibroblasts, inducing angiogenesis and modulating the composition of the extracellular matrix (Sager, Kessler, and Schunkert 2017). It has been reported that presence of macrophages can be found in a secondary inflammatory response 4 weeks (Ramirez et al. 2014) and 8 weeks after myocardial infarction (Sager et al. 2016). Nevertheless, macrophages have acquired special roles based on their anatomical location and this diversity can lead to difficulties in interpreting the various impacts of macrophages originating from different tissues (Carty, Mahon, and English 2017). Macrophages display a high plasticity and can adapt their phenotype to different stimuli. The switch from M1 to M2 may not reflect post-infarction changes with the time dependent changes in the cardiac microenvironment (Bonaventura, Montecucco, and Dallegri 2016). Indeed, further research is warranted to better define the interrelation between ASCs and M2 macrophages.

The adult mammalian heart is ill-equipped to deal with extensive damage due to the poor wound healing response after ischemic injury. Independent studies have demonstrated an endogenous regenerative capacity of the heart, mainly based on endogenous cardiac progenitor cells activation to release paracrine factors or differentiate into myogenic lineage (Ellison et al. 2011; Bollini, Smart, and Riley 2011). As previously reported, stimulation of endogenous progenitor cells could

support and increase the regenerative mechanisms promoted by ASCs (Bobi et al. 2017). Accordingly, cardiac cell therapy could be viewed as a booster therapy for the endogenous reparative process. Our own findings extend prior knowledge by showing that even remotely delivered ASCs can lead to increased c-kit<sup>+</sup> expressing cells, mainly in the infarcted area.

There is a lack of reproducible manner to unlock the regenerative potential of cardiac cell therapy. The lack of reproducible, successful translation from bench to bedside of MSC-based therapy in ischemic cardiomyopathy can be ascribed to the toxic environment in injured tissues which include hypoxia, inflammatory reaction and low nutrients (Karantalis and Hare 2015). This underscores a need to optimize cell-based therapy with pre-treatment or a modification of the manufacturing process. Multiple reports have described a positive impact of aggregating cells in 3-D on stemness, angiogenic and anti-inflammatory properties of MSCs and ASCs (Cheng, Wang, and Young 2012; Cheng et al. 2013; Bartosh et al. 2010). *In vitro* experiments have shown that 3-D cultured MSCs did not display immunophenotypic differences with monolayer cells but showed greater angiogenic and anti-inflammatory effect (Potapova et al. 2008; Bhang et al. 2012). Intramyocardial transplantation of 3D-ASCs has been shown to improve cardiac recovery in a porcine model of MI (Emmert et al. 2013). Our data demonstrate some superiority of 3D structures of hASCs relative to an ML configuration with regard to neovascularization and recruitment of endogenous progenitor cells to the infarct scar.

### Limitations

The size of our SBs may not be optimal to induce the strongest effects as previous reports showed better results with smaller size (Bartosh et al. 2010). Given the challenges associated with the hanging drop method, we opted for 100k cells for SB size to be able to inject each animal with 1 million cells and producing large volumes of SBs with hanging drop method is laborious. Further

studies would be required to investigate the differential effect of smaller SBs compared to ML on healing mechanisms after MI. Our data describing augmented c-kit<sup>+</sup> cells in the infarcted myocardium call for further investigation regarding their proliferative state and their activation. To uncover mechanistic pathways, recovering tissue and serum shortly after cell transplantation would have been optimal to detect potential macrophage polarization induced by ASCs. Differential inflammatory cell infiltration and evaluation of anti-inflammatory factor secretion shortly after cell administration would have provided further validation of the remote efficacy of ML and SB hASCs on I/R injury.

## **Conclusion**

Following ischemic injury to the heart, adult stem cells might offer an opportunity to impact cardiac repair and regeneration. This study provides evidence that a subcutaneous administration of hASCs SB can be considered as a safe minimally invasive therapy to counter the deleterious chain events elicited by myocardial ischemia. This study provides evidence for a possible endocrine-like effect for future development and application of remote delivery in cardiac cell-based.

## Legends

**Figure 1:** Quantification of secreted factors in the media of ML and SB hASCs in basic conditions, in response to  $\text{TNF}\alpha$  and in response to  $\text{H}_2\text{O}_2$  after 24h. A) Quantification of HGF, B) VEGF, C) MCP-1 and D) TSG-6. E) Expression of HIF1 $\alpha$  in SB. \*  $p < 0.05$ ; \*\*  $p < 0.005$ ; n.s non-significant with  $n = 4-5$ .

**Figure 2:** Evaluation of fibrosis in the myocardium after I/R injury, without treatment (No-Trx) and in response to either ML or SB treatment via either subcutaneous or direct delivery. A) Representative images of infarcted left ventricle stained with Masson trichrome, scale bar 1mm. B) Infarct size of rats treated with subcutaneous delivery of ML and SB sacrificed after 2 weeks ( $n = 8$ ) and C) 4 weeks after I/R injury ( $n = 6-8$ ). D) Infarct size after epicardial delivery of ML and SB 2 weeks after I/R ( $n = 6-8$ ). E) Representative images of collagen I (red/orange) and collagen III (green) in infarct scar stained with Sirius red. Scale bar 50 $\mu\text{m}$ . F) Collagen I/Collagen III ratio evaluation for subcutaneous delivery of ML and SB after 2 weeks ( $n = 6-7$ ) and E) 4 weeks ( $n = 4$ ). F) Collagen I/Collagen II ratio 2 weeks after I/R injury with epicardial transplantation of ML and SB. \*  $p < 0.05$ ; \*\*  $p < 0.005$ ; \*\*\*  $p < 0.0005$  with  $n = 6-7$ .

**Figure 3:** Subcutaneous and epicardial delivery of hASCs reduced M1 macrophages (CD68) without notable effect on M2 (CD206) expression. A) Representative image of CD68 expression in myocardial sections without treatment (No-Trx) and in response to subcutaneous ML and SB for 2 and 4 weeks or epicardial ML and SB for 2 weeks. Original magnification 200X, scale bar 50 $\mu\text{m}$ . B) CD68 expression in groups with subcutaneous treatment left for 2 weeks and C) 4 weeks after I/R injury. D) CD68 expression in response to epicardial delivery of ML and SB 2 weeks after ischemic injury ( $n = 4-6$ ). E) Representative images of CD206 expression in myocardial sections without treatment or in response to subcutaneous ML and SB after 2 or 4 weeks and in response to

epicardial transplantation after 2 weeks. Original magnification 200x, scale bar 50um. F) Expression of CD206 in groups receiving subcutaneous ASCs 2 and G) 4 weeks after injury. H) Expression of CD206 in response to direct delivery of ASCs after 2 weeks. \* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.005$  with  $n = 5-7$ .

**Figure 4:** The effects of hASCs on c-kit<sup>+</sup> progenitor cells in the injured myocardium. A) representative images of c-kit<sup>+</sup> in myocardial sections following subcutaneous or epicardial delivery of ML and SB. Original magnification 200x, scale bar 50um. B) Quantification of c-kit<sup>+</sup> expression in response to subcutaneous delivery 2 weeks and C) 4 weeks after ischemic injury. D) Quantification of c-kit<sup>+</sup> 2 weeks after I/R in response to epicardial delivery of ML and SB. \* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.005$  with  $n = 5-6$ .

**Figure 5:** Impact of hASCs on angiogenesis A) Representative images of CD31 expression in myocardial tissue without treatment (No-Trx) or in response to subcutaneous and epicardial delivery of ML and SB. Original magnification 200x, scale bar 50um. B) CD31 quantification 2 weeks after I/R injury in the infarct zone (left panel) and in the peri-infarct area (right panel). C) CD31 quantification 4 weeks after injury in the infarct zone (left panel) and in the border zone (right panel) after the subcutaneous treatment regimen. D) CD31 quantification 2 weeks after injury in groups receiving epicardial ML and SB in the infarct (left panel) and the border zone (right panel). \* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.005$ ; \*\*\* $p < 0.0005$  and \*\*\*\* $p < 0.0001$  with  $n = 5$ . Arrows indicate infarct vessels while asterisks indicate peri-infarct vessels.

**Figure 6:** hASC decreased apoptosis through decreased cleavage of Caspase 3. A) representative images of cleaved Caspase-3 without treatment or in response to ML and SB administration for 2 and 4 weeks. Original magnification 200x, scale bar 50um. B) Cleaved Caspase 3 expression reported on area with subcutaneous delivery of hASC ML and SB 2 weeks and C) 4 weeks after

I/R injury. D) Cleaved Caspase 3 expression reported on tissue area in response to direct epicardial delivery of hASCs ML and SB after 2 weeks. \*p<0.05 with n=4-6.

**Figure 7:** Transplanted hASC either as ML and SB were found in the subcutaneous tissue 2 and 4 weeks after ischemic injury and on the myocardium 2 weeks after epicardial delivery. A) Representative image of subcutaneous tissue with ASCs ML and SB stained with CM-Dil 2 and B) 4 weeks after injury. C) Representative images of epicardial hASCs ML and SB CM-Dil.

**Table I:** Hemodynamic Parameters at 2 and 4 weeks after I/R injury.

<b>Subcutaneous Delivery</b>				
	<b>HR (bpm)</b>	<b>-dp/dt min (mmHg/s)</b>	<b>dp/dt max (mmHg/s)</b>	<b>LVEDP (mmHg)</b>
<b>No-Tx 2 weeks</b>	339.3±5.2	5935±162.9	6287±217.1	13.08±0.68
<b>ML 2 weeks</b>	347.5±8.6	5956±226.9	6369±206.9	13.52±0.47
<b>SB 2 weeks</b>	345.6±8.3	5777±218.3	6456±307.5	11.19±1.03
<b>No-Tx 4 weeks</b>	333.7±8.0	6451±258.2	6768±173.4	12.91±0.52
<b>ML 4 weeks</b>	337.8±7.3	6220±237.7	6635±210.2	10.94±1.28
<b>SB 4 weeks</b>	339.4±9.2	6392±408.1	6434±355.2	9.40±1.11*
<b>Epicardial Delivery</b>				
	<b>HR (bpm)</b>	<b>-dp/dt min</b>	<b>dp/dt max</b>	<b>LVEDP</b>
<b>No-Tx 2 weeks</b>	313.6±12.5	5572±342.8	6367±448.2	10.93±1.66
<b>ML 2 weeks</b>	330.3±6.8	5639±229.8	6469±192.9	10.65±1.98
<b>SB 2 weeks</b>	313.1±12.2	5332±237.4	5901±237.3	11.18±0.93
<b>*p&lt;0.05 vs no-trx 4 weeks.</b>				

## Abbreviations

MSCs: Mesenchymal Stem Cells

hASCs: Human Adipose derived Stem cells

ML: Monolayer

SB: Spheroid Bodies

I/R: Ischemia Reperfusion

PGE2: Prostaglandin E2

iNOS: Inducible Nitric Oxide synthase

### **Acknowledgements**

We would like to thank Marie-Elaine Clavet for all the help she provided in immunohistochemistry experiments.

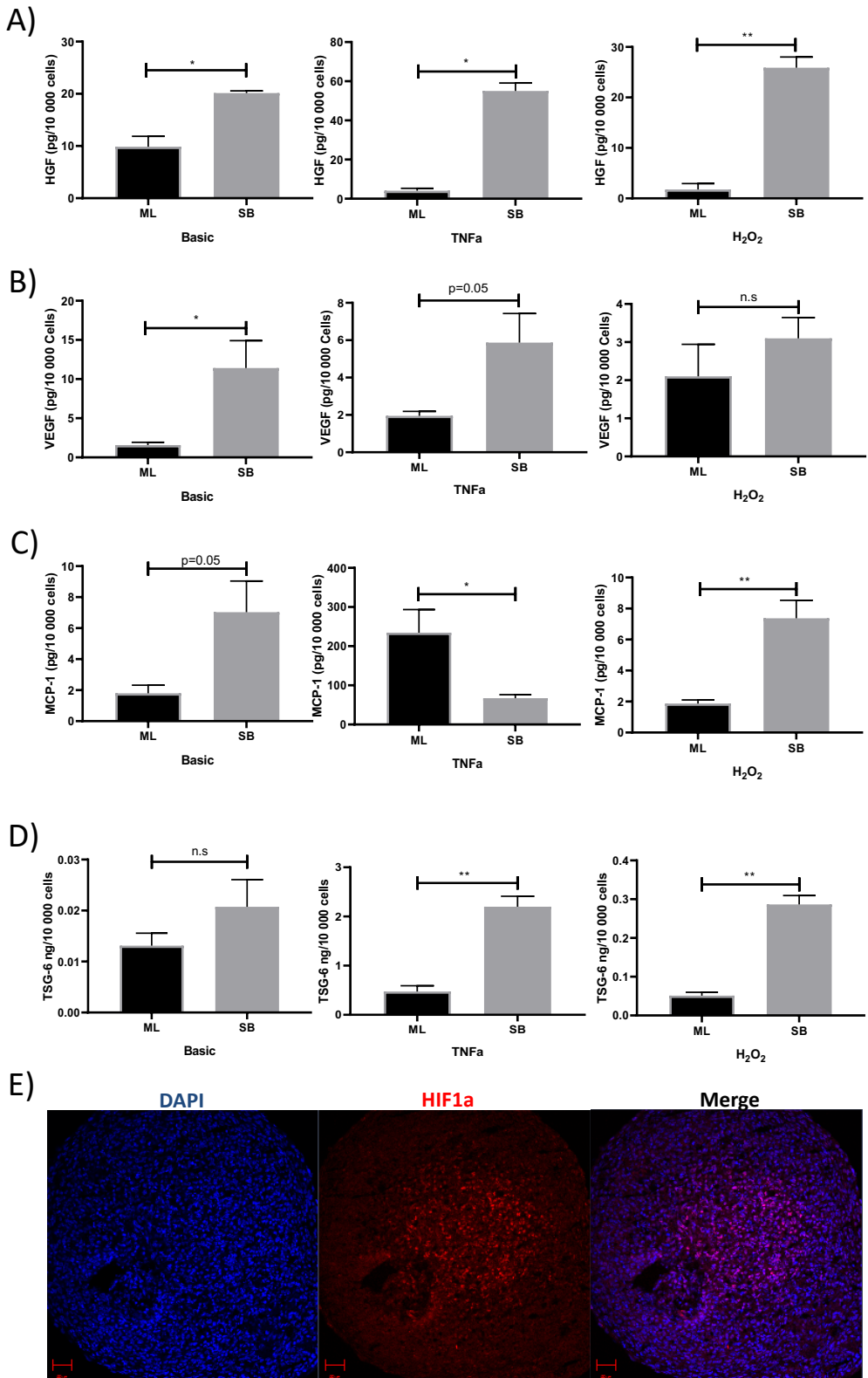
### **Funding**

This work was supported by the Montreal Heart Institute Foundation, the ThéCell Network (FRQS), Chaire DesGroseillers-Bérard en Cardiologie Interventionnelle and Chaire Fondation Marcel et Jean Coutu de traitements chirurgicaux novateurs en insuffisance cardiaque from Université de Montréal.

### **Highlights**

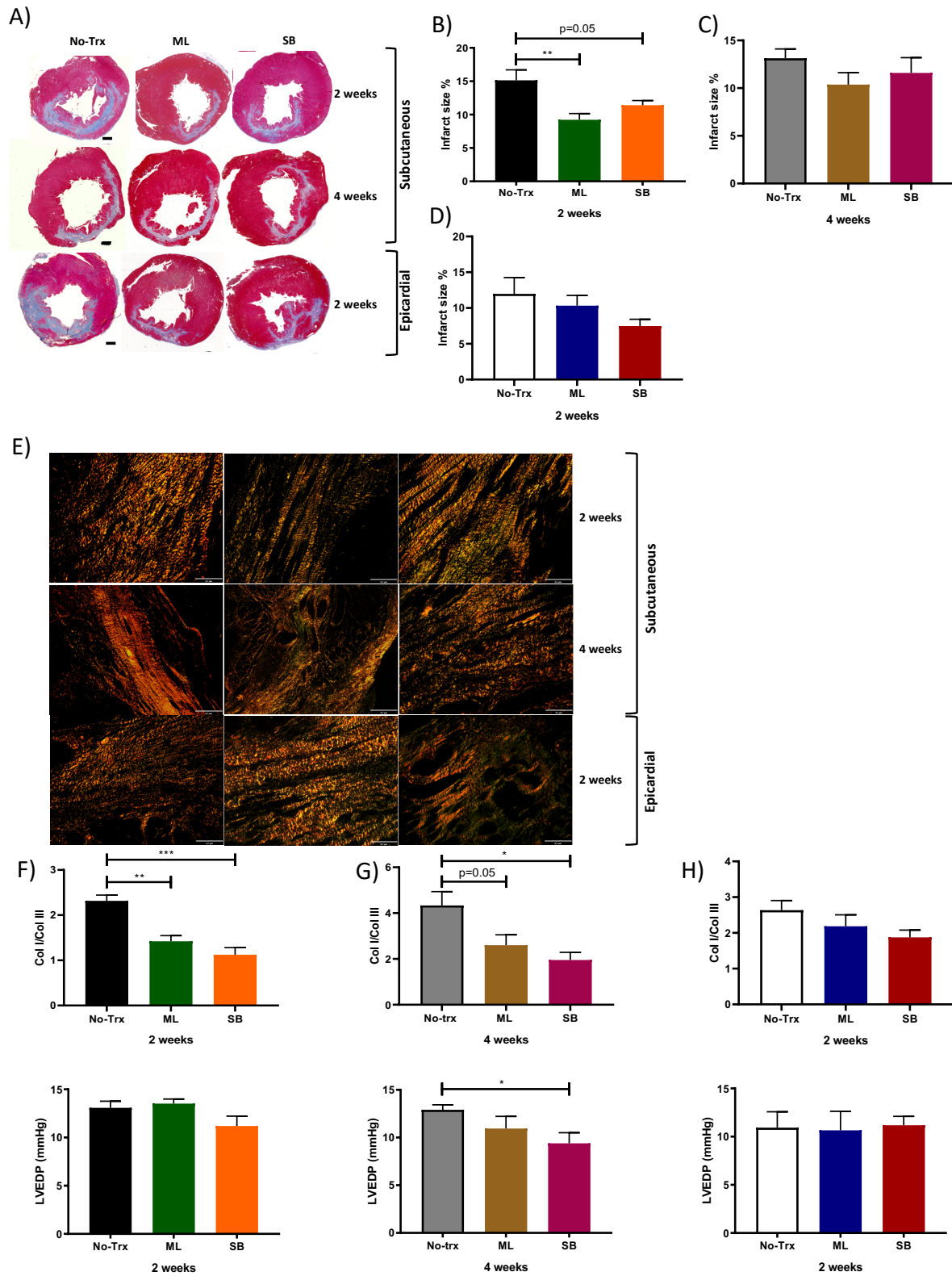
The takeout message of this manuscript is the ability of ASCs to elicit myocardial repair after ischemic injury through an endocrine-like effect. The remote delivery of ASCs induced

**Figure 1:**

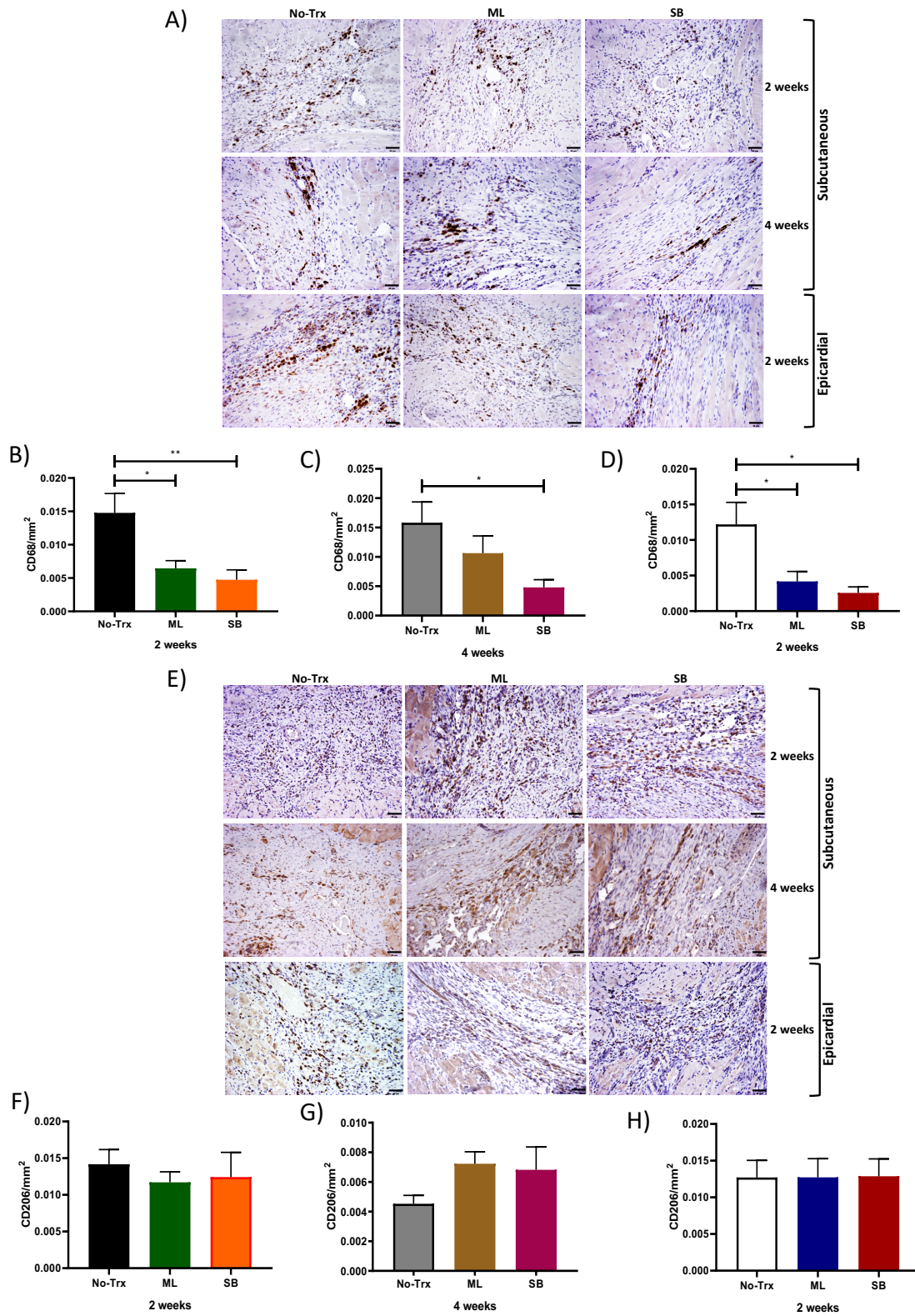




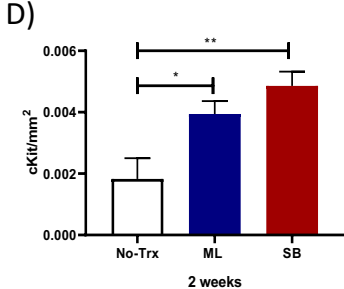
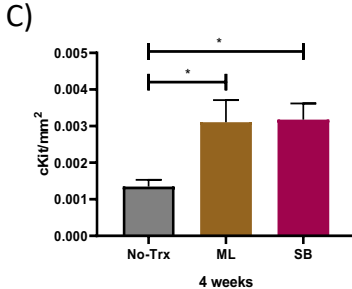
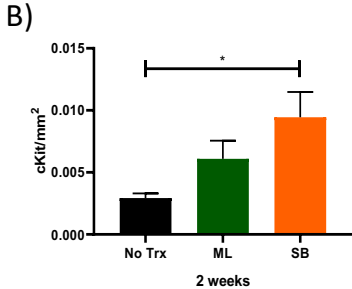
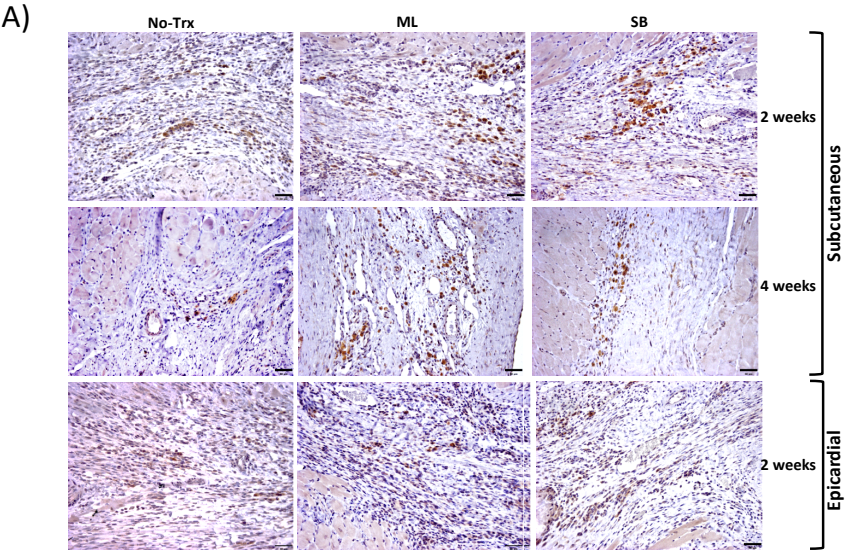
**Figure 2:**



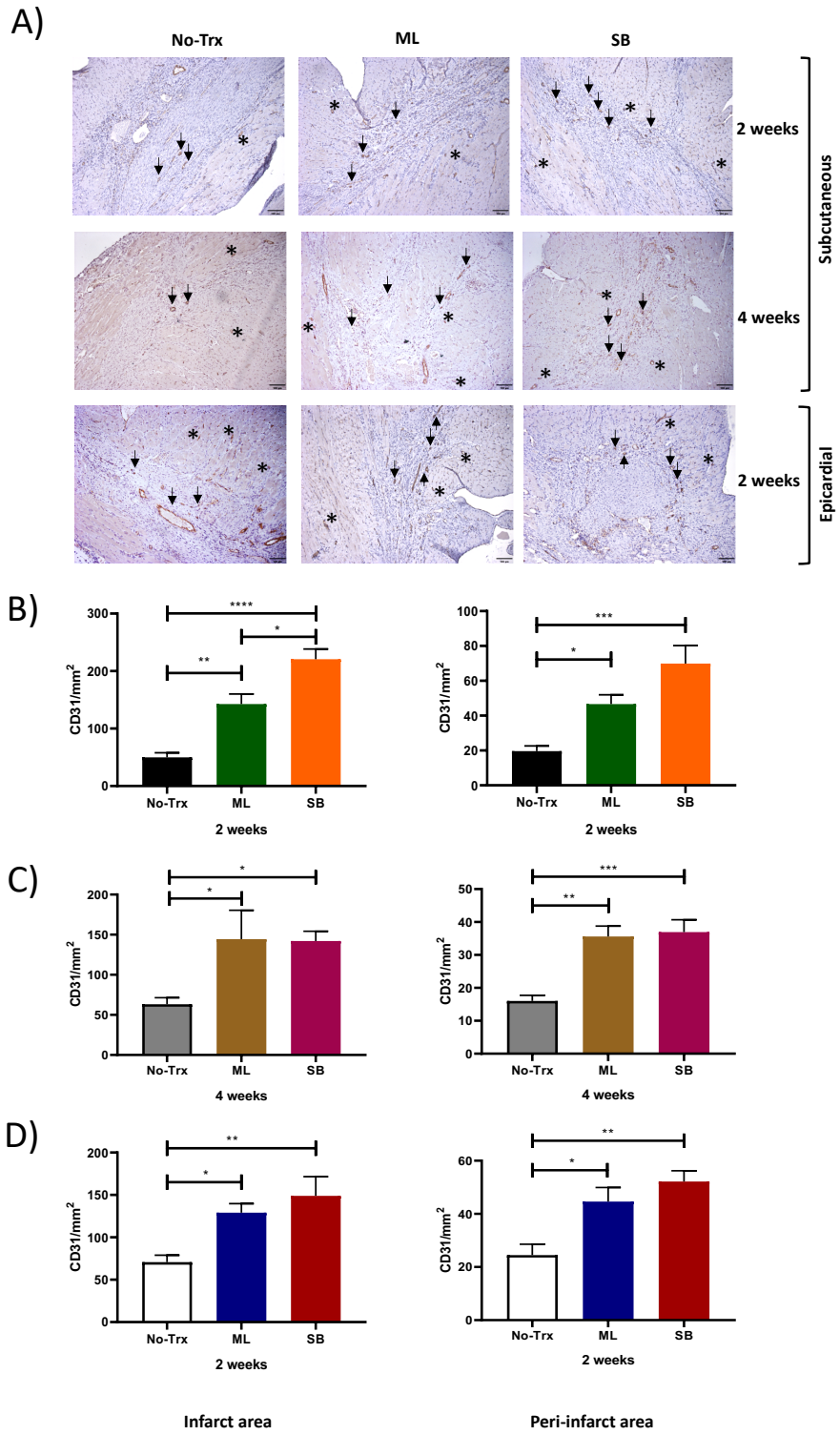
**Figure 3:**



**Figure 4:**



**Figure 5:**



**Figure 6:**

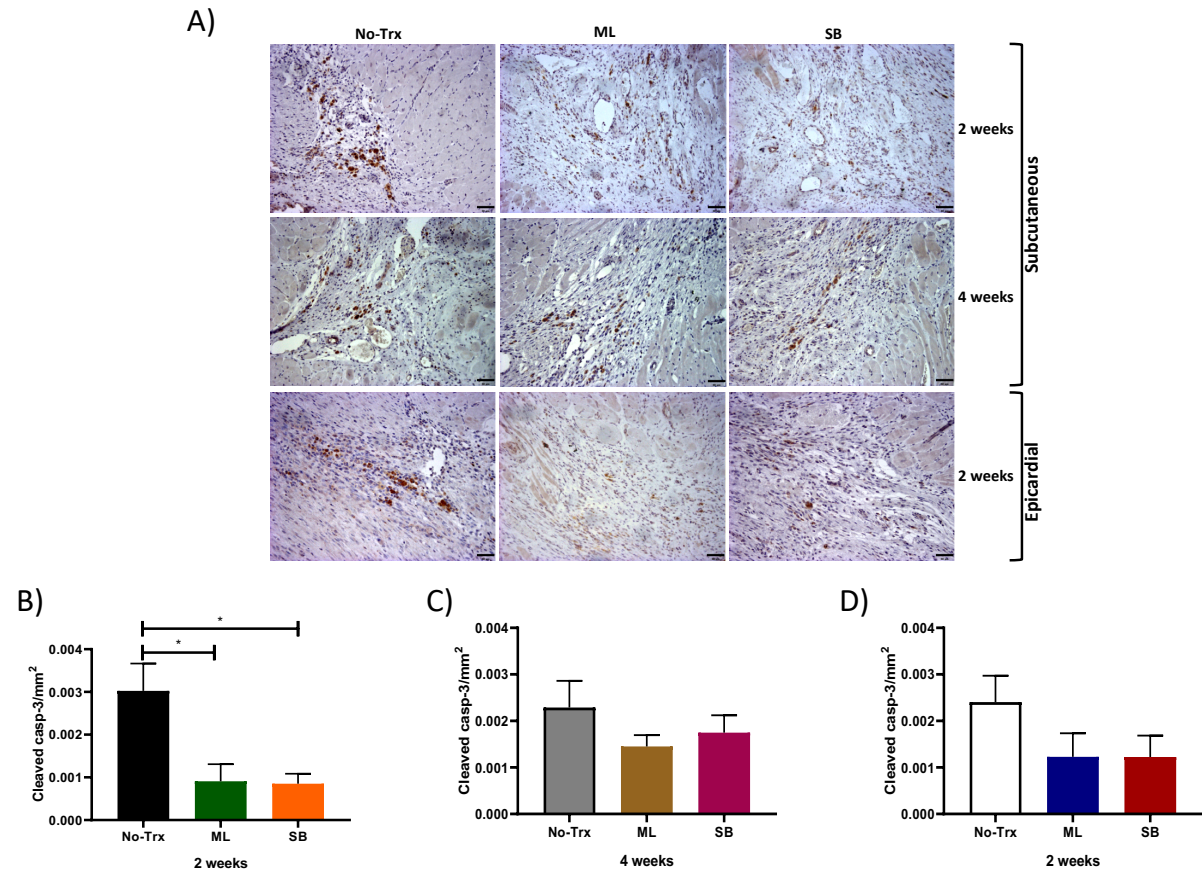
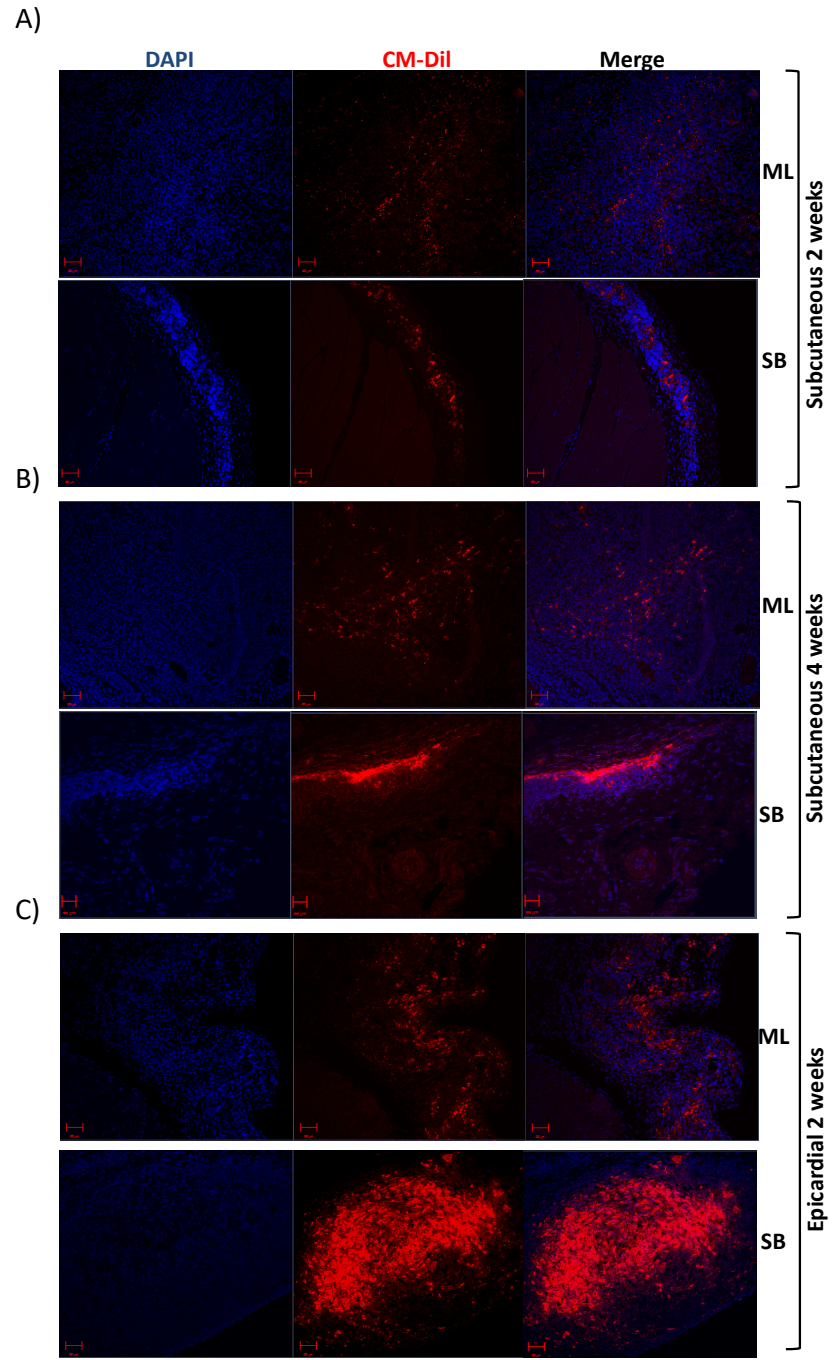


Figure 7:



## References

Bartosh, T. J., J. H. Ylostalo, A. Mohammadipoor, N. Bazhanov, K. Coble, K. Claypool, R. H. Lee, H. Choi, and D. J. Prockop. 2010. 'Aggregation of human mesenchymal stromal cells (MSCs) into 3D spheroids enhances their antiinflammatory properties', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 107: 13724-9.

Ben-Mordechai, T., R. Holbova, N. Landa-Rouben, T. Harel-Adar, M. S. Feinberg, I. Abd Elrahman, G. Blum, F. H. Epstein, Z. Silman, S. Cohen, and J. Leor. 2013. 'Macrophage subpopulations are essential for infarct repair with and without stem cell therapy', *J Am Coll Cardiol*, 62: 1890-901.

Benjamin, E. J., M. J. Blaha, S. E. Chiuve, M. Cushman, S. R. Das, R. Deo, S. D. de Ferranti, J. Floyd, M. Fornage, C. Gillespie, C. R. Isasi, M. C. Jimenez, L. C. Jordan, S. E. Judd, D. Lackland, J. H. Lichtman, L. Lisabeth, S. Liu, C. T. Longenecker, R. H. Mackey, K. Matsushita, D. Mozaffarian, M. E. Mussolino, K. Nasir, R. W. Neumar, L. Palaniappan, D. K. Pandey, R. R. Thiagarajan, M. J. Reeves, M. Ritchey, C. J. Rodriguez, G. A. Roth, W. D. Rosamond, C. Sasson, A. Towfighi, C. W. Tsao, M. B. Turner, S. S. Virani, J. H. Voeks, J. Z. Willey, J. T. Wilkins, J. H. Wu, H. M. Alger, S. S. Wong, P. Muntner, Committee American Heart Association Statistics, and Subcommittee Stroke Statistics. 2017. 'Heart Disease and Stroke Statistics-2017 Update: A Report From the American Heart Association', *Circulation*, 135: e146-e603.

Bhang, S. H., S. W. Cho, W. G. La, T. J. Lee, H. S. Yang, A. Y. Sun, S. H. Baek, J. W. Rhie, and B. S. Kim. 2011. 'Angiogenesis in ischemic tissue produced by spheroid grafting of human adipose-derived stromal cells', *Biomaterials*, 32: 2734-47.

Bhang, S. H., S. Lee, J. Y. Shin, T. J. Lee, H. K. Jang, and B. S. Kim. 2014. 'Efficacious and clinically relevant conditioned medium of human adipose-derived stem cells for therapeutic angiogenesis', *Mol Ther*, 22: 862-72.

Bhang, S. H., S. Lee, J. Y. Shin, T. J. Lee, and B. S. Kim. 2012. 'Transplantation of cord blood mesenchymal stem cells as spheroids enhances vascularization', *Tissue Eng Part A*, 18: 2138-47.

Bobi, J., N. Solanes, R. Fernandez-Jimenez, C. Galan-Arriola, A. P. Dantas, L. Fernandez-Friera, C. Galvez-Monton, E. Rigol-Monzo, J. Aguero, J. Ramirez, M. Roque, A. Bayes-Genis, J. Sanchez-Gonzalez, A. Garcia-Alvarez, M. Sabate, S. Roura, B. Ibanez, and M. Rigol. 2017. 'Intracoronary Administration of Allogeneic Adipose Tissue-Derived Mesenchymal Stem Cells Improves Myocardial Perfusion But Not Left Ventricle Function, in a Translational Model of Acute Myocardial Infarction', *J Am Heart Assoc*, 6.

Bollini, S., N. Smart, and P. R. Riley. 2011. 'Resident cardiac progenitor cells: at the heart of regeneration', *J Mol Cell Cardiol*, 50: 296-303.

Bonaventura, A., F. Montecucco, and F. Dallegri. 2016. 'Cellular recruitment in myocardial ischaemia/reperfusion injury', *Eur J Clin Invest*, 46: 590-601.

Braid, L. R., W. G. Hu, J. E. Davies, and L. P. Nagata. 2016. 'Engineered Mesenchymal Cells Improve Passive Immune Protection Against Lethal Venezuelan Equine Encephalitis Virus Exposure', *Stem Cells Transl Med*, 5: 1026-35.

Braid, L. R., C. A. Wood, D. M. Wiese, and B. N. Ford. 2018. 'Intramuscular administration potentiates extended dwell time of mesenchymal stromal cells compared to other routes', *Cytotherapy*, 20: 232-44.

Carty, F., B. P. Mahon, and K. English. 2017. 'The influence of macrophages on mesenchymal stromal cell therapy: passive or aggressive agents?', *Clin Exp Immunol*, 188: 1-11.

Chen, C. H., K. I. Sereti, B. M. Wu, and R. Ardehali. 2015. 'Translational aspects of cardiac cell therapy', *J Cell Mol Med*, 19: 1757-72.



Cheng, N. C., S. Y. Chen, J. R. Li, and T. H. Young. 2013. 'Short-term spheroid formation enhances the regenerative capacity of adipose-derived stem cells by promoting stemness, angiogenesis, and chemotaxis', *Stem Cells Transl Med*, 2: 584-94.

Cheng, N. C., S. Wang, and T. H. Young. 2012. 'The influence of spheroid formation of human adipose-derived stem cells on chitosan films on stemness and differentiation capabilities', *Biomaterials*, 33: 1748-58.

Czapla, J., S. Matuszczak, E. Wisniewska, M. Jarosz-Biej, R. Smolarczyk, T. Cichon, M. Glowala-Kosinska, J. Sliwka, M. Garbacz, M. Szczypior, T. Jazwiec, A. Langrzyk, M. Zembala, and S. Szala. 2016. 'Human Cardiac Mesenchymal Stromal Cells with CD105+CD34- Phenotype Enhance the Function of Post-Infarction Heart in Mice', *PLoS One*, 11: e0158745.

Eirin, A., X. Y. Zhu, J. D. Krier, H. Tang, K. L. Jordan, J. P. Grande, A. Lerman, S. C. Textor, and L. O. Lerman. 2012. 'Adipose tissue-derived mesenchymal stem cells improve revascularization outcomes to restore renal function in swine atherosclerotic renal artery stenosis', *Stem Cells*, 30: 1030-41.

Ellison, G. M., D. Torella, S. DelleGrottaglie, C. Perez-Martinez, A. Perez de Prado, C. Vicinanza, S. Purushothaman, V. Galuppo, C. Iaconetti, C. D. Waring, A. Smith, M. Torella, C. Cuellas Ramon, J. M. Gonzalo-Orden, V. Agosti, C. Indolfi, M. Galinanes, F. Fernandez-Vazquez, and B. Nadal-Ginard. 2011. 'Endogenous cardiac stem cell activation by insulin-like growth factor-1/hepatocyte growth factor intracoronary injection fosters survival and regeneration of the infarcted pig heart', *J Am Coll Cardiol*, 58: 977-86.

Emmert, M. Y., P. Wolint, N. Wickboldt, G. Gemayel, B. Weber, C. E. Brokopp, A. Boni, V. Falk, A. Bosman, M. E. Jaconi, and S. P. Hoerstrup. 2013. 'Human stem cell-based three-dimensional microtissues for advanced cardiac cell therapies', *Biomaterials*, 34: 6339-54.

Haider, HKh, S. Jiang, N. M. Idris, and M. Ashraf. 2008. 'IGF-1-overexpressing mesenchymal stem cells accelerate bone marrow stem cell mobilization via paracrine activation of SDF-1alpha/CXCR4 signaling to promote myocardial repair', *Circ Res*, 103: 1300-8.

Hamdi, H., V. Planat-Benard, A. Bel, H. Neamatalla, L. Saccenti, D. Calderon, V. Bellamy, M. Bon, M. C. Perrier, C. Mandet, P. Bruneval, L. Casteilla, A. A. Hagege, M. Puceat, O. Agbulut, and P. Menasche. 2014. 'Long-term functional benefits of epicardial patches as cell carriers', *Cell Transplant*, 23: 87-96.

Hao, C., S. Shintani, Y. Shimizu, K. Kondo, M. Ishii, H. Wu, and T. Murohara. 2014. 'Therapeutic angiogenesis by autologous adipose-derived regenerative cells: comparison with bone marrow mononuclear cells', *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 307: H869-79.

Hatzistergos, K. E., H. Quevedo, B. N. Oskouei, Q. Hu, G. S. Feigenbaum, I. S. Margitich, R. Mazhari, A. J. Boyle, J. P. Zambrano, J. E. Rodriguez, R. Dulce, P. M. Pattany, D. Valdes, C. Revilla, A. W. Heldman, I. McNiece, and J. M. Hare. 2010. 'Bone marrow mesenchymal stem cells stimulate cardiac stem cell proliferation and differentiation', *Circ Res*, 107: 913-22.

Hausenloy, D. J., and D. M. Yellon. 2013. 'Myocardial ischemia-reperfusion injury: a neglected therapeutic target', *J Clin Invest*, 123: 92-100.

Hesse, M., B. K. Fleischmann, and M. I. Kotlikoff. 2014. 'Concise review: The role of C-kit expressing cells in heart repair at the neonatal and adult stage', *Stem Cells*, 32: 1701-12.

Hodgkinson, C. P., A. Bareja, J. A. Gomez, and V. J. Dzau. 2016. 'Emerging Concepts in Paracrine Mechanisms in Regenerative Cardiovascular Medicine and Biology', *Circ Res*, 118: 95-107.

Kang, T., T. M. Jones, C. Naddell, M. Bacanamwo, J. W. Calvert, W. E. Thompson, V. C. Bond, Y. E. Chen, and D. Liu. 2016. 'Adipose-Derived Stem Cells Induce Angiogenesis via Microvesicle Transport of miRNA-31', *Stem Cells Transl Med*, 5: 440-50.

Karantalis, V., and J. M. Hare. 2015. 'Use of mesenchymal stem cells for therapy of cardiac disease', *Circ Res*, 116: 1413-30.

Kim, J. H., I. S. Park, Y. Park, Y. Jung, S. H. Kim, and S. H. Kim. 2013. 'Therapeutic angiogenesis of three-dimensionally cultured adipose-derived stem cells in rat infarcted hearts', *Cytotherapy*, 15: 542-56.

Kim, J., and P. Hematti. 2009. 'Mesenchymal stem cell-educated macrophages: a novel type of alternatively activated macrophages', *Exp Hematol*, 37: 1445-53.

Koh, T. J., and L. A. DiPietro. 2011. 'Inflammation and wound healing: the role of the macrophage', *Expert Rev Mol Med*, 13: e23.

Lee, T. M., H. J. Harn, T. W. Chiou, M. H. Chuang, C. H. Chen, C. H. Chuang, P. C. Lin, and S. Z. Lin. 2019. 'Remote transplantation of human adipose-derived stem cells induces regression of cardiac hypertrophy by regulating the macrophage polarization in spontaneously hypertensive rats', *Redox Biol*, 27: 101170.

Ma, T., J. Sun, Z. Zhao, W. Lei, Y. Chen, X. Wang, J. Yang, and Z. Shen. 2017. 'A brief review: adipose-derived stem cells and their therapeutic potential in cardiovascular diseases', *Stem Cell Res Ther*, 8: 124.

Mao, C., X. Hou, B. Wang, J. Chi, Y. Jiang, C. Zhang, and Z. Li. 2017. 'Intramuscular injection of human umbilical cord-derived mesenchymal stem cells improves cardiac function in dilated cardiomyopathy rats', *Stem Cell Res Ther*, 8: 18.

Mirotsov, M., T. M. Jayawardena, J. Schmeckpeper, M. Gneccchi, and V. J. Dzau. 2011. 'Paracrine mechanisms of stem cell reparative and regenerative actions in the heart', *J Mol Cell Cardiol*, 50: 280-9.

Miyahara, Y., N. Nagaya, M. Kataoka, B. Yanagawa, K. Tanaka, H. Hao, K. Ishino, H. Ishida, T. Shimizu, K. Kangawa, S. Sano, T. Okano, S. Kitamura, and H. Mori. 2006. 'Monolayered mesenchymal stem cells repair scarred myocardium after myocardial infarction', *Nat Med*, 12: 459-65.

Park, I. S., P. S. Chung, and J. C. Ahn. 2015. 'Enhancement of Ischemic Wound Healing by Spheroid Grafting of Human Adipose-Derived Stem Cells Treated with Low-Level Light Irradiation', *PLoS One*, 10: e0122776.

Potapova, I. A., P. R. Brink, I. S. Cohen, and S. V. Doronin. 2008. 'Culturing of human mesenchymal stem cells as three-dimensional aggregates induces functional expression of CXCR4 that regulates adhesion to endothelial cells', *J Biol Chem*, 283: 13100-7.

Potapova, I. A., G. R. Gaudette, P. R. Brink, R. B. Robinson, M. R. Rosen, I. S. Cohen, and S. V. Doronin. 2007. 'Mesenchymal stem cells support migration, extracellular matrix invasion, proliferation, and survival of endothelial cells in vitro', *Stem Cells*, 25: 1761-8.

Preda, M. B., T. Ronningen, A. Burlacu, M. Simionescu, J. O. Moskaug, and G. Valen. 2014. 'Remote transplantation of mesenchymal stem cells protects the heart against ischemia-reperfusion injury', *Stem Cells*, 32: 2123-34.

Qi, Y., D. Jiang, A. Sindrilaru, A. Stegemann, S. Schatz, N. Treiber, M. Rojewski, H. Schrezenmeier, S. Vander Beken, M. Wlaschek, M. Bohm, A. Seitz, N. Scholz, L. Durselen, J. Brinckmann, A. Ignatius, and K. Scharffetter-Kochanek. 2014. 'TSG-6 released from intradermally injected mesenchymal stem cells accelerates wound healing and reduces tissue fibrosis in murine full-thickness skin wounds', *J Invest Dermatol*, 134: 526-37.

Ramirez, T. A., R. P. Iyer, O. Ghasemi, E. F. Lopez, D. B. Levin, J. Zhang, R. Zamilpa, Y. M. Chou, Y. F. Jin, and M. L. Lindsey. 2014. 'Aliskiren and valsartan mediate left ventricular remodeling post-myocardial infarction in mice through MMP-9 effects', *J Mol Cell Cardiol*, 72: 326-35.

Ranganath, S. H., O. Levy, M. S. Inamdar, and J. M. Karp. 2012. 'Harnessing the mesenchymal stem cell secretome for the treatment of cardiovascular disease', *Cell Stem Cell*, 10: 244-58.

Rehman, J., D. Traktuev, J. Li, S. Merfeld-Clauss, C. J. Temm-Grove, J. E. Bovenkerk, C. L. Pell, B. H. Johnstone, R. V. Considine, and K. L. March. 2004. 'Secretion of angiogenic and antiapoptotic factors by human adipose stromal cells', *Circulation*, 109: 1292-8.

Sager, H. B., M. Hulsmans, K. J. Lavine, M. B. Moreira, T. Heidt, G. Courties, Y. Sun, Y. Iwamoto, B. Tricot, O. F. Khan, J. E. Dahlman, A. Borodovsky, K. Fitzgerald, D. G. Anderson, R. Weissleder, P. Libby, F. K. Swirski, and M. Nahrendorf. 2016. 'Proliferation and Recruitment Contribute to Myocardial Macrophage Expansion in Chronic Heart Failure', *Circ Res*, 119: 853-64.

Sager, H. B., T. Kessler, and H. Schunkert. 2017. 'Monocytes and macrophages in cardiac injury and repair', *J Thorac Dis*, 9: S30-S35.

Shabbir, A., D. Zisa, G. Suzuki, and T. Lee. 2009. 'Heart failure therapy mediated by the trophic activities of bone marrow mesenchymal stem cells: a noninvasive therapeutic regimen', *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 296: H1888-97.

Song, H., M. J. Cha, B. W. Song, I. K. Kim, W. Chang, S. Lim, E. J. Choi, O. Ham, S. Y. Lee, N. Chung, Y. Jang, and K. C. Hwang. 2010. 'Reactive oxygen species inhibit adhesion of mesenchymal stem cells implanted into ischemic myocardium via interference of focal adhesion complex', *Stem Cells*, 28: 555-63.

Sorrell, J. M., and A. I. Caplan. 2010. 'Topical delivery of mesenchymal stem cells and their function in wounds', *Stem Cell Res Ther*, 1: 30.

Valen, G. 2009. 'Extracardiac approaches to protecting the heart', *Eur J Cardiothorac Surg*, 35: 651-7.

Valina, C., K. Pinkernell, Y. H. Song, X. Bai, S. Sadat, R. J. Campeau, T. H. Le Jemtel, and E. Alt. 2007. 'Intracoronary administration of autologous adipose tissue-derived stem cells

improves left ventricular function, perfusion, and remodelling after acute myocardial infarction', *Eur Heart J*, 28: 2667-77.

van Velthoven, C. T., A. Kavelaars, F. van Bel, and C. J. Heijnen. 2010. 'Repeated mesenchymal stem cell treatment after neonatal hypoxia-ischemia has distinct effects on formation and maturation of new neurons and oligodendrocytes leading to restoration of damage, corticospinal motor tract activity, and sensorimotor function', *J Neurosci*, 30: 9603-11.

Xu, R., F. Zhang, R. Chai, W. Zhou, M. Hu, B. Liu, X. Chen, M. Liu, Q. Xu, N. Liu, and S. Liu. 2019. 'Exosomes derived from pro-inflammatory bone marrow-derived mesenchymal stem cells reduce inflammation and myocardial injury via mediating macrophage polarization', *J Cell Mol Med*.

Yang, D., W. Wang, L. Li, Y. Peng, P. Chen, H. Huang, Y. Guo, X. Xia, Y. Wang, H. Wang, W. E. Wang, and C. Zeng. 2013. 'The relative contribution of paracrine effect versus direct differentiation on adipose-derived stem cell transplantation mediated cardiac repair', *PLoS One*, 8: e59020.

Zimmermann, J. A., and T. C. McDevitt. 2014. 'Pre-conditioning mesenchymal stromal cell spheroids for immunomodulatory paracrine factor secretion', *Cytotherapy*, 16: 331-45.

## Chapitre 9 : Discussion

Ce projet de thèse a été bâti dans l'objectif d'explorer une avenue moins invasive pour traiter une injure à un organe noble avec une capacité de régénération très limitée, spécifiquement le cœur. Ainsi, l'hypothèse globale prévoyait que le pouvoir thérapeutique des cellules souches mésenchymateuses, dans notre cas, dérivées du tissu adipeux, allait être assez important pour agir à distance de l'organe injurié. De plus, l'utilisation de la forme sphéroïdale a été investiguée afin d'évaluer si celle-ci augmenterait davantage l'efficacité thérapeutique, puisque la littérature avait documenté un sécrétome plus enrichi pour les sphéroïdes (Bartosh et col., 2010).

Suite à des taux de différenciation faible *in vivo*, la relâche de médiateurs est considérée à présent comme principal mécanisme d'action des ASCs pour activer la guérison et la réparation tissulaire (Dubey et col., 2018). La réponse du myocarde suite à une injure ischémique commence par une réaction inflammatoire rapide suivie par la prolifération et l'activation de myofibroblastes. Ceci va générer une cicatrice riche en collagène pour remplacer les cardiomyocytes perdus et éviter ainsi la rupture du myocarde. Ce plan initié en urgence a cependant des effets néfastes sur la fonction cardiaque, principalement avec le remodelage ventriculaire et la fibrose interstitielle qui mènent vers l'insuffisance cardiaque (Forte et col., 2018). Une intervention au niveau de l'inflammation, et par conséquent sur le remodelage, est au cœur de nouvelles avenues thérapeutiques pour réduire la morbidité associée aux cardiopathies ischémiques. Ce sont ces aspects qui ont été au centre des études présentées dans cette thèse.

Nous avons démontré dans nos études que la transplantation à distance des ASCs pouvait réduire l'infiltration de cellules inflammatoires dans un modèle de péritonite et d'ischémie-reperfusion du myocarde. Dans le modèle de cardiopathie ischémique, nous avons démontré un impact important sur la vascularisation également. La formation de sphéroïdes semble induire des effets plus significatifs à certains égards. Au niveau du remodelage ventriculaire après injure ischémique, l'administration à distance des ASCs modulait favorablement le collagène et augmentait la présence de cellules progénitrices endogènes, facilitant ainsi la guérison myocardique.

## 9.1 L'interrelation des ASCs avec les cellules inflammatoires

Alors que l'objectif primaire était d'investiguer un traitement non invasif contre la cardiopathie ischémique, nous avons d'abord voulu tester le potentiel anti-inflammatoire des ASCs sur un modèle d'inflammation stérile. Le but de l'étude était d'évaluer l'efficacité d'une injection sous-cutanée et distale sur le recrutement de cellules inflammatoires dans le péritoine, en comparant les ASCs sous la forme standard monocouche ML et 3-D.

L'immunorégulation, et spécifiquement l'effet anti-inflammatoire des ASCs, a été le point central des projets décrits dans cette thèse. D'abord, *in vitro*, il a été démontré que les cellules produisaient le TSG-6 en plus grande quantité lorsque sous forme de sphéroïdes. Plusieurs études avaient préalablement décrit la sécrétion de TSG-6 par les MSCs de différentes sources tissulaires (Choi et col., 2011; W.-J. Song et col., 2017). Une des études qui a d'ailleurs inspiré le projet de thèse est une description des effets bénéfiques des MSCs, embolisées dans les poumons suite à une injection intraveineuse, sur le myocarde infarci (R. H. Lee et col., 2009). Cette étude dirigée par le Dr Prockop a démontré que même s'il n'y avait pas eu de migration, et que les cellules demeuraient captives au sein du lit capillaire pulmonaire, la sécrétion de cytokines, dont le TSG-6, était efficace pour promouvoir la guérison du myocarde à distance. En plus du TSG-6, plusieurs facteurs ont été identifiés comme participant à la réhabilitation tissulaire induite par les cellules tels la PGE2,IDO, VEGF, HGF et plus encore (Bartosh et col., 2013; E. Y. Lee et col., 2009; Madrigal et col., 2014; X. Zhang et col., 2016). Ainsi, le potentiel anti-inflammatoire des MSCs et ASCs n'est pas relié à un facteur spécifique mais plutôt à un cocktail de facteurs solubles.

La transplantation sous cutanée des ASCs dans le modèle de péritonite (Manuscrit #2) a prouvé le concept de l'efficacité d'une injection localisée à distance à induire un effet systémique. Ainsi, nous avons pu constater un effet anti-inflammatoire de l'administration sous-cutanée de ASCs, puisque les cellules ont réduit les neutrophiles et les macrophages dans le tissu péritonéal. Nous n'avons toutefois pas pu démontrer de façon définitive dans notre modèle que les SB avaient un effet plus remarquable que les cellules cultivées en monocouche ML. Les SB démontraient toutefois un effet plus significatif sur l'invasion tissulaire des neutrophiles. Cet impact des SB sur



l'extravasation des neutrophiles peut être expliquée par la sécrétion importante de TSG-6, un facteur précédemment relié à l'inhibition de l'extravasation, l'activation et l'infiltration des neutrophiles dans une étude sur un modèle murin déficient en TSG-6 (Szanto et col., 2004).

Les ASCs sont également intimement reliées au recrutement et activation de macrophages dans le processus inflammatoire (Bowles et col., 2017). Nous avons pu démontrer un effet considérable des ASCs sur la présence des macrophages avec phénotype pro-inflammatoire dans le modèle de péritonite, et d'ischémie-reperfusion du myocarde chez le rat. La diminution des M1 avec la transplantation des ASCs dans le modèle de péritonite et d'I/R concorde avec les données de la littérature sur l'impact des cellules sur les macrophages pro-inflammatoires (Bowles et col., 2017; Jin et col., 2019). Nous n'avons toutefois pas pu observer une augmentation des macrophages M2, avec l'expression du marqueur membranaire CD206, dans la fenêtre de temps que nous avons analysé. Dans le modèle de péritonite, nous n'avons pu observer une augmentation de CD206 avec traitement cellulaire, ce qui corrélait avec le faible niveau de IL-10 retrouvé dans l'exsudat péritonéal, puisque cette cytokine est principalement relâchée par les M2 (Nemeth et col., 2009). Il est fort probable que cette situation est représentative d'une inflammation résorbée au troisième jour (période du sacrifice de l'animal) après l'injection de la toxine Zymosan. Une analyse des macrophages dans le tissu rapidement après la transplantation de cellules aurait permis une appréciation plus éclairée de l'induction d'une polarisation des macrophages. Cependant, il est important de préciser que la genèse de ce concept de stimulation de la polarisation des macrophages est venue d'expériences *in vitro* de co-culture avec des lignées de monocytes/macrophages originaires de différents tissus (Nahrendorf & Swirski, 2016). Toutefois, les macrophages possèdent une plasticité phénotypique permettant d'adopter des caractéristiques spécifiques dépendamment de leur tissu d'origine (Nahrendorf & Swirski, 2016). Transposer cette capacité de polarisation *in vitro* dans un modèle complexe qu'est un myocarde infarci représente un défi non-négligeable. En effet, les nombreux changements et transitions se produisant après l'injure ischémique ne peuvent concorder avec une description aussi schématique. Il est fort probable que les caractéristiques des macrophages dans le myocarde infarci dépendent de variables spatio-temporelles (Sager et col., 2017). Les différents comportements cellulaires des macrophages sont également potentiellement importants pour la

croissance et le remodelage micro-vasculaire. La relâche de facteurs tels le VEGF-A, FGF-2 et MMP-9 par différents phénotypes de macrophages sous-entend que la réponse de vascularisation implique plusieurs types de macrophages sur l'intervalle de temps allant de l'injure à la guérison (Corliss et col., 2016).

## 9.2 La stimulation de mécanismes de réparation endogènes

Avec l'aide de facteurs solubles, les ASCs ont la capacité de mobiliser des cellules progénitrices endogènes autologues vers ou au sein d'un tissu endommagé. La relâche de certains facteurs tel le SDF-1 $\alpha$  participe à la mobilisation de cellules progénitrices endothéliales et à leur enrichissement dans la cicatrice cardiaque (Kondo et col., 2009). Le VEGF et le HGF peuvent également agir à titre de chimioattractants pour les cellules progénitrices et l'augmentation de la production de ces facteurs par les sphéroïdes peut expliquer une plus grande mobilisation (Bhang et col., 2012).

La néo-vascularisation post-natale peut découler de 3 mécanismes : 1) l'angiogenèse, 2) l'artériogénèse et 3) la vasculogénèse post-natale avec appel de cellules progénitrices endothéliales à partir de la moelle osseuse pour former de nouveaux vaisseaux (Asahara et col., 2011). L'augmentation de la densité vasculaire observée suite à la transplantation de MSCs (ou ASCs) a fait l'objet de débat, à savoir si les cellules se différenciaient en cellules endothéliales ou en cellules musculaires lisses, expliquant cette vascularisation. Une différenciation des ASCs en péricytes a également été démontré *in vitro* et *in vivo* en démontrant l'expression de marqueurs péri-vasculaires (Amos et col., 2008). Toutefois, compte tenu du niveau de domiciliation limité des cellules transplantées, la sécrétion de médiateurs pour stimuler la formation d'un réseau vasculaire est le mécanisme privilégié. Dans notre étude I/R, les animaux traités ont montré une présence plus accrue de cellules c-kit<sup>+</sup>, ces cellules ayant une facilité vers la transdifférenciation en lignée myogénique. Les cellules progénitrices c-kit<sup>+</sup> peuvent aussi participer à la néo-angiogenèse soit par différenciation, soit par relâche de facteurs paracrins (Hesse et col., 2014).

Une étude décrivant l'injection de MSC dans la zone péri-infarctée a démontré la présence de chimères entre les MSC marquées à la GFP et les cellules c-kit<sup>+</sup> du myocarde (Suzuki et col., 2011). Alors que nous avons démontré une augmentation des c-kit<sup>+</sup> dans la cicatrice, il serait important de vérifier également leur prolifération. Les études explorant les effets des MSC sur les cellules endogènes progénitrices sont principalement basées sur les effets paracrins des MSC qui activent les cellules progénitrices. L'augmentation des cellules c-kit<sup>+</sup> suite à l'injection à distance serait donc ultimement liée à la sécrétion de médiateurs ou d'exosomes transportant plusieurs facteurs, qui stimuleraient le recrutement des cellules c-kit<sup>+</sup> et leur prolifération. Les études sur l'importance de l'expression de c-kit dans la néo-vascularisation et réparation (ou régénération) cardiaque sont d'une grande importance pour développer des méthodes afin de stimuler leur activation, qui peut induire une réactivation de la prolifération des cardiomyocytes ou induire la différenciation de précurseurs (Hesse et col., 2014).

### **9.3 La thérapie cellulaire à l'ère de la 3-D**

L'agrégation des cellules souches mésenchymateuses vient d'une propriété intrinsèque de ces cellules de s'auto-assembler en absence de surface adhérente, soit en réponse à une force mécanique ou dans un espace confiné (Sart et col., 2014). Les mécanismes entourant cet aspect sont encore sous investigation.

La transplantation des ASCs sous forme tridimensionnelle a démontré des avantages *in vivo* dans nos études. Les mécanismes exacts permettant cette efficacité demeurent à être élucidés mais plusieurs théories peuvent expliquer ce phénomène. D'abord, la possibilité que la forme 3-D agisse à titre de méthode de préconditionnement dans un milieu hypoxique pour les cellules. La littérature a déjà illustré la capacité de l'hypoxie à augmenter la sécrétion de plusieurs facteurs par les ASCs (Bhang et col., 2011; E. Y. Lee et col., 2009). L'expression de HIF-1 $\alpha$  est associée à l'augmentation de la sécrétion de facteurs tels que le VEGF et le HGF, mais aussi de protéines de matrice extracellulaire telles que la fibronectine ou le collagène (Bhang et col., 2011; J. Kim & Ma,

2013). Cette matrice extracellulaire protège également contre le stress oxydant, permettant aux sphéroïdes de répondre au  $H_2O_2$  alors que la forme ML ne tolérerait pas la présence de ce réactif dans nos expériences *in vitro*. De plus, sous forme de sphéroïde, le contact cellule-à-cellule permet l'activation autocrine qui est éventuellement une des causes de la production accrue de facteurs solubles (Petrenko et col., 2017). La présence importante de matrice extracellulaire dans la structure 3-D est considérée comme majeure dans la facilité de signalisation autocrine. La sécrétion plus élevée de VEGF par les MSC du sang de cordon en sphéroïdes a été reliée à l'expression élevée de E-cadhérine, suivant une signalisation dépendante de ERK/AKT (E. J. Lee et col., 2012).

La culture en 3-D crée un microenvironnement complexe et hétérogène qui va former un gradient de nutriments et d'oxygène au sein de la structure, en comparaison à la forme conventionnelle 2-D. Cette hétérogénéité spatio-temporelle est basée sur les différences intrinsèques telles que l'expression des intégrines et cadhérines (Sart et col., 2014). En effet, maximiser le contact cellule-à-cellule dans le sphéroïde crée une pression sur l'extérieur de la sphère dispersée seulement sur les cellules de la couche externe, beaucoup moins sur les ASCs à l'intérieur. Cette différence de tension crée une polarisation des cellules au sein de la structure. Les cellules à l'extérieur du sphéroïde sont aplaties avec expression élevée d'intégrines alors que les cellules à l'intérieur expriment beaucoup plus les cadhérines (Sart et col., 2014).

Nos résultats ont montré que *in vitro*, les SB sécrétaient plus de MCP-1 en condition de culture standard et en réponse au stress oxydant. Toutefois, en réponse à une stimulation inflammatoire ( $TNF\alpha$ ), les SB produisaient beaucoup moins de MCP-1 que les ML. Ceci peut aussi être relié à cette propriété de régulation autocrine des structures 3-D pouvant alors effectuer une retro-inhibition de la relâche de MCP-1. Cette cytokine est associée *in vitro* et *in vivo* au recrutement de macrophages (Bonaventura et col., 2016), et la capacité de régulation sur sa relâche par les SB peut démontrer la plasticité de réaction dépendante des conditions du microenvironnement.

Malgré ces données prometteuses, les SB doivent faire l'objet d'études plus approfondies afin de réussir la transition vers la clinique. Il est important de comprendre comment fonctionne précisément l'agrégation des cellules et la relation entre la structure et la fonction. Dans les

agrégats de cellules, il doit y avoir une analyse approfondie du gradient d'oxygène pour comprendre l'impact de l'hypoxie sur le fonctionnement de la sphère. Toutefois, cette analyse semble de prime abord complexe puisqu'il y a accumulation de facteurs de croissance endogènes interférant dans le métabolisme cellulaire. De plus, l'adaptabilité de la structure à son environnement est une autre variable à considérer lors de l'interprétation des résultats (Mylotte et col., 2008).

## **9.4 L'axe endocrinien pour la régénération du myocarde**

En démontrant que la transplantation à distance des ASCs pouvait engendrer des avantages thérapeutiques, nous suggérons l'hypothèse de l'importance d'un axe endocrinien dans la régulation de la guérison médiée par les ASCs. Il y a eu précédemment, dans les études précliniques, la stipulation suivie par la preuve d'une activation d'un axe de réparation reliant la moelle osseuse au cœur suite à l'injection de MSCs. Précisément, la transplantation de MSCs pour réparer un myocarde infarci induisait une mobilisation de cellules endogènes à partir de la moelle osseuse, ceci évidemment dépendant de facteurs trophiques relâchés. Avec une injection sous cutanée de cellules, nous ne pouvons parler d'effets paracrins puisque ce concept concerne une communication entre cellules à courte distance. Il s'agit d'une signalisation endocrine puisqu'il y a implication de la circulation systémique et/ou lymphatique.

Ainsi, les facteurs relâchés par les ASCs à distance pourraient agir de la même façon que la rénine et l'angiotensine secrétées par les reins sur le myocarde. Certains facteurs peuvent agir sur des nodules lymphatiques afin de réguler la mobilisation de cellules inflammatoires, alors que d'autres participeront à la mobilisation de cellules progénitrices endogènes à partir de la moelle osseuse ou du tissu adipeux. L'implication du système lymphatique serait non négligeable dans les mécanismes de cardioprotection induit par la transplantation sous cutanée. Une étude cherchant à démontrer une mobilisation interne de cellules souches à partir du tissu adipeux a

montré que ces dernières étaient retrouvées préférentiellement dans le fluide lymphatique plutôt que dans le sang (Gil-Ortega et col., 2013).

La thérapie à base de protéines solubles en cardiopathie ischémique a fait l'objet de recherche extensive avec comme objectif de stimuler la régénération cardiaque. Des protéines pour stimuler l'angiogenèse tel que le VEGF ou le HGF ont été injecté sans obtenir les résultats cliniques escomptés, dû à la formation de vaisseaux immatures (Segers & Lee, 2010). Les protéines faisant appel à une mobilisation de cellules progénitrices endogènes ont également été utilisées comme le G-CSF ou le SDF-1 $\alpha$ . Les études précliniques avec injection intramusculaire de SDF-1 $\alpha$  ou sous-cutanée de G-CSF, ont montré une habilité à améliorer la fonction cardiaque post ischémie (Hasegawa et col., 2006; Saxena et col., 2008). Au niveau clinique, le G-CSF a été injecté en sous cutané chez des patients ayant subi un infarctus du myocarde. L'essai clinique a démontré la sécurité de cette protéine avec mobilisation de cellules souches de la moelle osseuse, sans toutefois démontrer d'avantage thérapeutique notable sur la fonction myocardique (Ripa et col., 2006). Le manque de spécificité quant aux cellules endogènes mobilisées est un inconvénient de cette stratégie. En effet, les cellules mobilisées démontraient très peu de différenciation en cellules myogéniques. L'usage d'une seule protéine n'offre pas les avantages qu'un cocktail de facteurs peut offrir. De plus, plusieurs groupes multidisciplinaires travaillent sur de nombreuses méthodes de modifications post-traductionnelles pour augmenter l'efficacité de cette stratégie de traitement, alors que la biodisponibilité des protéines en tant que médicament demeure limitée. Ces études démontrent toutefois la faisabilité des approches de traitements appliqués de manière extrinsèque au cœur, accentuant la nécessité de compréhension de l'implication d'un axe endocrinien-cardiaque dans les thérapies non-invasives à base de cellules souches ou de leur sécrétome.

## 9.5 Limitations

Dans nos projets, nous avons utilisé la méthode de goutte suspendue (*hanging drop method*) pour produire des sphéroïdes. Cette méthode n'est toutefois pas appropriée pour la production à grande échelle. Pour les besoins de ce projet, nous avons choisi d'utiliser des SB de 100 ou 200K cellules puisque nos essais *in vitro* montraient une plus grande capacité à produire plusieurs facteurs pro-guérison en comparaison au même nombre de cellules en ML. Toutefois, dans l'optique de provoquer des effets plus marqués et peut-être démontrer une efficacité accrue des SB par rapport aux ML, il aurait fallu utiliser des SB de plus petite taille. En effet plusieurs ont montré une plus grande capacité sécrétoire de SB de plus petite taille (10K ou 25K par exemple) (Bhang et col., 2014; Choi et col., 2011). Par souci d'efficacité et de logistique afin de transplanter 1 à 2 millions de cellules par rat, nous avons choisi ces SB de grande taille.

Dans notre modèle I/R, nous n'avons pas investigué en profondeur des mécanismes de réparation impliquant les cellules progénitrices endogènes et leur effet potentiel sur la prolifération des cardiomyocytes. Ainsi, une documentation de l'état mitotique des cardiomyocytes nous aurait permis de voir si celles-ci avaient été stimulées à retourner en prolifération par les facteurs sécrétés.

De plus, afin de déterminer si l'hypothèse que la transplantation de cellules était nécessaire car celles-ci constituaient une usine de production de médiateurs sensibles aux besoins de l'hôte, il aurait été utile de comparer des animaux transplantés avec des animaux recevant uniquement le cocktail de médiateurs. Ainsi, en comparant l'impact du cocktail versus les cellules, il aurait été possible de déterminer si les cellules sécrètent les facteurs de façon réactive ou constitutive. Le choix d'utiliser du PBS comme vecteur pour accompagner les cellules plutôt que du milieu de culture ne permettait pas telle comparaison. Ceci dans l'optique de minimiser toute réaction négative dû à la présence de sérum dans le milieu, phénomène soulevé dans certaines études (Mochizuki & Nakahara, 2018).

Aussi, dans notre modèle d'I/R, en ce qui a trait aux groupes traités par transplantation directe sur l'épicarde, le temps d'administration devait être immédiatement après reperfusion plutôt que 48h après, comme chez les groupes ayant reçu les cellules en sous-cutanée. Ainsi, nous ne pouvions ré-ouvrir le thorax pour transplanter les cellules sur le myocarde sans risque

d'augmenter la mortalité. Ceci aurait pu induire un biais, puisque la transplantation de ML ou SB directement sur le myocarde après reperfusion peut avoir induit une mort cellulaire dû à la toxicité du microenvironnement.

## 9.6 L'avenir de la thérapie cellulaire cardiaque

Il est évident que les résultats précliniques sont sans équivoque quant à l'importance de la thérapie cellulaire en réparation et régénération cardiaque. La grande difficulté est toutefois la transposition de ces avantages thérapeutiques en clinique. Ceci est limité par un manque flagrant de standardisation des méthodes d'isolation et de culture des MSCs/ASCs de différentes sources. L'absence de marqueur unique et spécifique aux cellules souches mésenchymateuses complique également leur identification ou leur suivi *in vivo*. La possibilité d'induire un effet à distance implique une stratégie non invasive de traitement. Une réflexion sur ce point est fortement requise afin de développer des systèmes permettant l'accès au cocktail de médiateurs, sans forcément avoir un accès direct et invasif au myocarde.

De plus, au niveau clinique, il serait intéressant de confirmer l'effet des médiateurs trophiques sur la réparation post-ischémie. Développer des méthodes sensibles et spécifiques permettrait de décortiquer les effets paracrins et endocriniens de la transplantation des MSCs/ASCs. Il faudrait pour ce faire, mesurer la présence de ces facteurs dans le sérum des patients, idéalement avant et après l'injection, ce qui pourrait offrir une analyse comparative sur les effets des médiateurs.

Les différentes techniques permettant l'optimisation de la relâche de facteurs solubles devraient être minutieusement étudiées afin d'en définir la meilleure pour augmenter l'avantage clinique. L'utilité d'utiliser des matrices accompagnant les cellules doit également être investiguée afin de découvrir si cela procure plus d'avantages, grâce à une meilleure survie dans l'organisme. Avec les quelques études démontrant les effets endocriniens des ASCs, de nouvelles avenues biotechnologiques doivent être développées pour optimiser cet axe de livraison. En effet, des



études comparatives sur les méthodes de livraison non-invasives en présence ou pas d'adjuvant biodégradable pourraient donner lieu à une nouvelle façon de voir la thérapie cellulaire cardiaque.

Il reste qu'il faut déterminer entre les différentes sources de MSCs, laquelle serait la plus appropriée selon la physiopathologie visée. Rares sont les études comparant directement des MSCs de différentes sources sur une maladie particulière. Alors que nous avons eu quelques études décrivant les ASCs plus immunomodulatrices que les MSCs issues de la moelle osseuse (Melief et col., 2013), il est difficile de conclure sur ce postulat sans ambiguïté.

Par ailleurs, l'usage de cellules allogéniques demeure très attrayant car cela représente un gain de temps sur les disponibilités des cellules sur un court laps de temps, alors qu'une transplantation autologue implique l'attente de l'expansion des cellules. Cependant, il serait important d'établir un équilibre entre l'efficacité d'une seule injection comparée à celle d'injections en série, par rapport à l'induction d'une réaction immunogénique. Les expériences *in vitro* ont montré que la réponse lymphocytaire en co-culture avec les MSCs issue de la moelle osseuse ou ASCs était minime (Puissant et col., 2005). Des études *in vivo* ne semblent toutefois pas aboutir à la même conclusion, certains ayant démontré le déclenchement d'une réponse immunitaire par appel de lymphocytes (Rigol et col., 2014) alors que d'autres ne rapportent pas de présence de lymphocytes qui altère les avantages thérapeutiques (Niemeyer et col., 2008).

## Chapitre 10 : Conclusion

Avec les nombreuses avancées de l'arsenal thérapeutique, il a été possible de réduire tant la mortalité que la morbidité pour les patients suite à un infarctus du myocarde. Toutefois, ceci n'empêche pas l'hospitalisation pour cause de comorbidité. En effet, malgré la reperfusion, un épisode ischémique peut laisser la fonction et la structure du myocarde grandement amoindrie et altérée.

La thérapie cellulaire cardiaque peut être utilisée comme adjuvant thérapeutique dans l'optique de limiter la transition vers l'insuffisance cardiaque. Le développement de techniques permettant de maximiser l'impact thérapeutique des ASCs, telle que la culture en sphéroïdes, peut ouvrir la voie à une transition plus achevée vers l'application clinique de ces cellules. Avec un potentiel aussi considérable, ces cellules peuvent constituer des thérapies non-invasives pour l'amélioration de la réparation et régénération cardiaque. Les études présentées ci-dessus constituent une des premières preuves de l'effet à distance que peuvent induire les ASCs sur les nombreux événements déclenchés par l'ischémie du myocarde. Des effets anti-inflammatoires, anti-apoptotiques et anti-fibrotiques ont été décrits suite à l'injection sous cutanée, potentiellement suivant un axe endocrinien permettant une action pro-guérison cardiaque. Cet aspect donne lieu à une réflexion sur la possibilité d'utiliser cette route de livraison non-invasive en cardiopathie ischémique.

## Références bibliographiques

Abbott, C. P., Lindsey, E. S., Creech, O., Jr., & Dewitt, C. W. (1964). A Technique for Heart Transplantation in the Rat. *Arch Surg*, 89, 645-652. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14186795>

Afzal, M. R., Samanta, A., Shah, Z. I., Jeevanantham, V., Abdel-Latif, A., Zuba-Surma, E. K., & Dawn, B. (2015). Adult Bone Marrow Cell Therapy for Ischemic Heart Disease: Evidence and Insights From Randomized Controlled Trials. *Circ Res*, 117(6), 558-575. doi:10.1161/CIRCRESAHA.114.304792

Aggarwal, R., Lu, J., Pompili, V. J., & Das, H. (2012). Hematopoietic stem cells: transcriptional regulation, ex vivo expansion and clinical application. *Curr Mol Med*, 12(1), 34-49. doi:10.2174/156652412798376125

Alvaro-Gracia, J. M., Jover, J. A., Garcia-Vicuna, R., Carreno, L., Alonso, A., Marsal, S., . . . Diaz-Gonzalez, F. (2017). Intravenous administration of expanded allogeneic adipose-derived mesenchymal stem cells in refractory rheumatoid arthritis (Cx611): results of a multicentre, dose escalation, randomised, single-blind, placebo-controlled phase Ib/IIa clinical trial. *Ann Rheum Dis*, 76(1), 196-202. doi:10.1136/annrheumdis-2015-208918

Amorin, B., Alegretti, A. P., Valim, V., Pezzi, A., Laureano, A. M., da Silva, M. A., . . . Silla, L. (2014). Mesenchymal stem cell therapy and acute graft-versus-host disease: a review. *Hum Cell*, 27(4), 137-150. doi:10.1007/s13577-014-0095-x

Amos, P. J., Shang, H., Bailey, A. M., Taylor, A., Katz, A. J., & Peirce, S. M. (2008). IFATS collection: The role of human adipose-derived stromal cells in inflammatory microvascular remodeling and evidence of a perivascular phenotype. *Stem Cells*, 26(10), 2682-2690. doi:10.1634/stemcells.2008-0030

Anghileri, E., Marconi, S., Pignatelli, A., Cifelli, P., Galie, M., Sbarbati, A., . . . Bonetti, B. (2008). Neuronal differentiation potential of human adipose-derived mesenchymal stem cells. *Stem Cells Dev*, 17(5), 909-916. doi:10.1089/scd.2007.0197

Aoi, T., Yae, K., Nakagawa, M., Ichisaka, T., Okita, K., Takahashi, K., . . . Yamanaka, S. (2008). Generation of pluripotent stem cells from adult mouse liver and stomach cells. *Science*, 321(5889), 699-702. doi:10.1126/science.1154884

Arboleda, D., Forostyak, S., Jendelova, P., Marekova, D., Amemori, T., Pivonkova, H., . . . Sykova, E. (2011). Transplantation of predifferentiated adipose-derived stromal cells for the treatment of spinal cord injury. *Cell Mol Neurobiol*, 31(7), 1113-1122. doi:10.1007/s10571-011-9712-3

Asahara, T., Kawamoto, A., & Masuda, H. (2011). Concise review: Circulating endothelial progenitor cells for vascular medicine. *Stem Cells*, 29(11), 1650-1655. doi:10.1002/stem.745

Augello, A., Tasso, R., Negrini, S. M., Cancedda, R., & Pennesi, G. (2007). Cell therapy using allogeneic bone marrow mesenchymal stem cells prevents tissue damage in collagen-induced arthritis. *Arthritis Rheum*, 56(4), 1175-1186. doi:10.1002/art.22511

Auletta, J. J., Eid, S. K., Wuttisarnwattana, P., Silva, I., Metheny, L., Keller, M. D., . . . Cooke, K. R. (2015). Human mesenchymal stromal cells attenuate graft-versus-host disease and maintain graft-versus-leukemia activity following experimental allogeneic bone marrow transplantation. *Stem Cells*, 33(2), 601-614. doi:10.1002/stem.1867

Bacakova, L., Zarubova, J., Travnickova, M., Musilkova, J., Pajorova, J., Slepicka, P., . . . Molitor, M. (2018). Stem cells: their source, potency and use in regenerative therapies with focus on adipose-derived stem cells - a review. *Biotechnol Adv*, 36(4), 1111-1126. doi:10.1016/j.biotechadv.2018.03.011

Bai, L., Lennon, D. P., Caplan, A. I., DeChant, A., Hecker, J., Kranso, J., . . . Miller, R. H. (2012). Hepatocyte growth factor mediates mesenchymal stem cell-induced recovery in multiple sclerosis models. *Nat Neurosci*, *15*(6), 862-870. doi:10.1038/nn.3109

Ball, S. G., Shuttleworth, C. A., & Kielty, C. M. (2007). Mesenchymal stem cells and neovascularization: role of platelet-derived growth factor receptors. *J Cell Mol Med*, *11*(5), 1012-1030. doi:10.1111/j.1582-4934.2007.00120.x

Banas, A., Teratani, T., Yamamoto, Y., Tokuhara, M., Takeshita, F., Osaki, M., . . . Ochiya, T. (2009). Rapid hepatic fate specification of adipose-derived stem cells and their therapeutic potential for liver failure. *J Gastroenterol Hepatol*, *24*(1), 70-77. doi:10.1111/j.1440-1746.2008.05496.x

Banas, A., Teratani, T., Yamamoto, Y., Tokuhara, M., Takeshita, F., Osaki, M., . . . Ochiya, T. (2008). IFATS collection: in vivo therapeutic potential of human adipose tissue mesenchymal stem cells after transplantation into mice with liver injury. *Stem Cells*, *26*(10), 2705-2712. doi:10.1634/stemcells.2008-0034

Banerjee, M. N., Bolli, R., & Hare, J. M. (2018). Clinical Studies of Cell Therapy in Cardiovascular Medicine: Recent Developments and Future Directions. *Circ Res*, *123*(2), 266-287. doi:10.1161/CIRCRESAHA.118.311217

Baron, F., Baker, J. E., Storb, R., Gooley, T. A., Sandmaier, B. M., Maris, M. B., . . . Little, M. T. (2004). Kinetics of engraftment in patients with hematologic malignancies given allogeneic hematopoietic cell transplantation after nonmyeloablative conditioning. *Blood*, *104*(8), 2254-2262. doi:10.1182/blood-2004-04-1506

Bartholomew, A., Sturgeon, C., Siatskas, M., Ferrer, K., McIntosh, K., Patil, S., . . . Hoffman, R. (2002). Mesenchymal stem cells suppress lymphocyte proliferation in vitro and prolong skin graft survival in vivo. *Exp Hematol*, *30*(1), 42-48. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11823036>

Bartosh, T. J., Ylostalo, J. H., Bazhanov, N., Kuhlman, J., & Prockop, D. J. (2013). Dynamic compaction of human mesenchymal stem/precursor cells into spheres self-activates caspase-dependent IL1 signaling to enhance secretion of modulators of inflammation and immunity (PGE2, TSG6, and STC1). *Stem Cells*, *31*(11), 2443-2456. doi:10.1002/stem.1499

Bartosh, T. J., Ylostalo, J. H., Mohammadipoor, A., Bazhanov, N., Coble, K., Claypool, K., . . . Prockop, D. J. (2010). Aggregation of human mesenchymal stromal cells (MSCs) into 3D spheroids enhances their antiinflammatory properties. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *107*(31), 13724-13729. doi:10.1073/pnas.1008117107

Bartunek, J., Behfar, A., Dolatabadi, D., Vanderheyden, M., Ostojic, M., Dens, J., . . . Terzic, A. (2013). Cardiopoietic stem cell therapy in heart failure: the C-CURE (Cardiopoietic stem Cell therapy in heart failURE) multicenter randomized trial with lineage-specified biologics. *J Am Coll Cardiol*, *61*(23), 2329-2338. doi:10.1016/j.jacc.2013.02.071

Bassi, E. J., Moraes-Vieira, P. M., Moreira-Sa, C. S., Almeida, D. C., Vieira, L. M., Cunha, C. S., . . . Camara, N. O. (2012). Immune regulatory properties of allogeneic adipose-derived mesenchymal stem cells in the treatment of experimental autoimmune diabetes. *Diabetes*, *61*(10), 2534-2545. doi:10.2337/db11-0844

Bearzi, C., Rota, M., Hosoda, T., Tillmanns, J., Nascimbene, A., De Angelis, A., . . . Anversa, P. (2007). Human cardiac stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *104*(35), 14068-14073. doi:10.1073/pnas.0706760104

Becker, A. J., Mc, C. E., & Till, J. E. (1963). Cytological demonstration of the clonal nature of spleen colonies derived from transplanted mouse marrow cells. *Nature*, *197*, 452-454. doi:10.1038/197452a0

Bedi, D. S., Riella, L. V., Tullius, S. G., & Chandraker, A. (2010). Animal models of chronic allograft injury: contributions and limitations to understanding the mechanism of long-term graft dysfunction. *Transplantation*, *90*(9), 935-944. doi:10.1097/TP.0b013e3181efcfbc

Behr, B., Tang, C., Germann, G., Longaker, M. T., & Quarto, N. (2011). Locally applied vascular endothelial growth factor A increases the osteogenic healing capacity of human adipose-derived stem cells by promoting osteogenic and endothelial differentiation. *Stem Cells*, *29*(2), 286-296. doi:10.1002/stem.581

Beltrami, A. P., Barlucchi, L., Torella, D., Baker, M., Limana, F., Chimenti, S., . . . Anversa, P. (2003). Adult cardiac stem cells are multipotent and support myocardial regeneration. *Cell*, *114*(6), 763-776. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14505575>

Benke, K., Sayour, A. A., Matyas, C., Agg, B., Nemeth, B. T., Olah, A., . . . Szabo, G. (2017). Heterotopic Abdominal Rat Heart Transplantation as a Model to Investigate Volume Dependency of Myocardial Remodeling. *Transplantation*, *101*(3), 498-505. doi:10.1097/TP.0000000000001585

Bergmann, O., Bhardwaj, R. D., Bernard, S., Zdunek, S., Barnabe-Heider, F., Walsh, S., . . . Frisen, J. (2009). Evidence for cardiomyocyte renewal in humans. *Science*, *324*(5923), 98-102. doi:10.1126/science.1164680

Bhang, S. H., Cho, S. W., La, W. G., Lee, T. J., Yang, H. S., Sun, A. Y., . . . Kim, B. S. (2011). Angiogenesis in ischemic tissue produced by spheroid grafting of human adipose-derived stromal cells. *Biomaterials*, *32*(11), 2734-2747. doi:10.1016/j.biomaterials.2010.12.035

Bhang, S. H., Lee, S., Shin, J. Y., Lee, T. J., Jang, H. K., & Kim, B. S. (2014). Efficacious and clinically relevant conditioned medium of human adipose-derived stem cells for therapeutic angiogenesis. *Mol Ther*, *22*(4), 862-872. doi:10.1038/mt.2013.301

Bhang, S. H., Lee, S., Shin, J. Y., Lee, T. J., & Kim, B. S. (2012). Transplantation of cord blood mesenchymal stem cells as spheroids enhances vascularization. *Tissue Eng Part A*, *18*(19-20), 2138-2147. doi:10.1089/ten.TEA.2011.0640

Bianco, P. (2014). "Mesenchymal" stem cells. *Annu Rev Cell Dev Biol*, *30*, 677-704. doi:10.1146/annurev-cellbio-100913-013132

Birks, E. J. (2013). Molecular changes after left ventricular assist device support for heart failure. *Circ Res*, *113*(6), 777-791. doi:10.1161/CIRCRESAHA.113.301413

Bolli, R., Chugh, A. R., D'Amario, D., Loughran, J. H., Stoddard, M. F., Ikram, S., . . . Anversa, P. (2011). Cardiac stem cells in patients with ischaemic cardiomyopathy (SCIPIO): initial results of a randomised phase 1 trial. *Lancet*, *378*(9806), 1847-1857. doi:10.1016/S0140-6736(11)61590-0

Bonafede, R., Brandi, J., Manfredi, M., Scambi, I., Schiaffino, L., Merigo, F., . . . Mariotti, R. (2019). The Anti-Apoptotic Effect of ASC-Exosomes in an In Vitro ALS Model and Their Proteomic Analysis. *Cells*, *8*(9). doi:10.3390/cells8091087

Bonaventura, A., Montecucco, F., & Dallegri, F. (2016). Cellular recruitment in myocardial ischaemia/reperfusion injury. *Eur J Clin Invest*, *46*(6), 590-601. doi:10.1111/eci.12633

Bonora-Centelles, A., Jover, R., Mirabet, V., Lahoz, A., Carbonell, F., Castell, J. V., & Gomez-Lechon, M. J. (2009). Sequential hepatogenic transdifferentiation of adipose tissue-derived stem cells: relevance of different extracellular signaling molecules, transcription factors involved, and expression of new key marker genes. *Cell Transplant*, *18*(12), 1319-1340. doi:10.3727/096368909X12483162197321

Boomsma, R. A., & Geenen, D. L. (2012). Mesenchymal stem cells secrete multiple cytokines that promote angiogenesis and have contrasting effects on chemotaxis and apoptosis. *PLoS One*, *7*(4), e35685. doi:10.1371/journal.pone.0035685

Boulais, P. E., & Frenette, P. S. (2015). Making sense of hematopoietic stem cell niches. *Blood*, *125*(17), 2621-2629. doi:10.1182/blood-2014-09-570192

Bowles, A. C., Wise, R. M., Gerstein, B. Y., Thomas, R. C., Ogelman, R., Febbo, I., & Bunnell, B. A. (2017). Immunomodulatory Effects of Adipose Stromal Vascular Fraction Cells Promote Alternative Activation Macrophages to Repair Tissue Damage. *Stem Cells*, *35*(10), 2198-2207. doi:10.1002/stem.2689



Bowles, A. C., Wise, R. M., Gerstein, B. Y., Thomas, R. C., Ogelman, R., Manayan, R. C., & Bunnell, B. A. (2018). Adipose stromal vascular fraction attenuates TH1 cell-mediated pathology in a model of multiple sclerosis. *J Neuroinflammation*, *15*(1), 77. doi:10.1186/s12974-018-1099-3

Bruns, I., Lucas, D., Pinho, S., Ahmed, J., Lambert, M. P., Kunisaki, Y., . . . Frenette, P. S. (2014). Megakaryocytes regulate hematopoietic stem cell quiescence through CXCL4 secretion. *Nat Med*, *20*(11), 1315-1320. doi:10.1038/nm.3707

Brzoska, M., Geiger, H., Gauer, S., & Baer, P. (2005). Epithelial differentiation of human adipose tissue-derived adult stem cells. *Biochem Biophys Res Commun*, *330*(1), 142-150. doi:10.1016/j.bbrc.2005.02.141

Bura, A., Planat-Benard, V., Bourin, P., Silvestre, J. S., Gross, F., Grolleau, J. L., . . . Casteilla, L. (2014). Phase I trial: the use of autologous cultured adipose-derived stroma/stem cells to treat patients with non-revascularizable critical limb ischemia. *Cytotherapy*, *16*(2), 245-257. doi:10.1016/j.jcyt.2013.11.011

Burchill, L. J., & Ross, H. J. (2012). Heart transplantation in adults with end-stage congenital heart disease. *Future Cardiol*, *8*(2), 329-342. doi:10.2217/fca.12.11

Cai, L., Johnstone, B. H., Cook, T. G., Liang, Z., Traktuev, D., Cornetta, K., . . . March, K. L. (2007). Suppression of hepatocyte growth factor production impairs the ability of adipose-derived stem cells to promote ischemic tissue revascularization. *Stem Cells*, *25*(12), 3234-3243. doi:10.1634/stemcells.2007-0388

Calvi, L. M., & Link, D. C. (2015). The hematopoietic stem cell niche in homeostasis and disease. *Blood*, *126*(22), 2443-2451. doi:10.1182/blood-2015-07-533588

Cao, D. J., Jiang, N., Blagg, A., Johnstone, J. L., Gondalia, R., Oh, M., . . . Hill, J. A. (2013). Mechanical unloading activates FoxO3 to trigger Bnip3-dependent cardiomyocyte atrophy. *J Am Heart Assoc*, *2*(2), e000016. doi:10.1161/JAHA.113.000016

Caplan, A. I. (1991). Mesenchymal stem cells. *J Orthop Res*, 9(5), 641-650. doi:10.1002/jor.1100090504

Caplan, A. I., & Correa, D. (2011). The MSC: an injury drugstore. *Cell Stem Cell*, 9(1), 11-15. doi:10.1016/j.stem.2011.06.008

Castelo-Branco, M. T., Soares, I. D., Lopes, D. V., Buongusto, F., Martinusso, C. A., do Rosario, A., Jr., . . . Souza, H. S. (2012). Intraperitoneal but not intravenous cryopreserved mesenchymal stromal cells home to the inflamed colon and ameliorate experimental colitis. *PLoS One*, 7(3), e33360. doi:10.1371/journal.pone.0033360

Chamuleau, S. A., Vrijisen, K. R., Rokosh, D. G., Tang, X. L., Piek, J. J., & Bolli, R. (2009). Cell therapy for ischaemic heart disease: focus on the role of resident cardiac stem cells. *Neth Heart J*, 17(5), 199-207. doi:10.1007/bf03086247

Chan, C. K., Wu, K. H., Lee, Y. S., Hwang, S. M., Lee, M. S., Liao, S. K., . . . Huang, J. L. (2012). The comparison of interleukin 6-associated immunosuppressive effects of human ESCs, fetal-type MSCs, and adult-type MSCs. *Transplantation*, 94(2), 132-138. doi:10.1097/TP.0b013e31825940a4

Chan, J., Waddington, S. N., O'Donoghue, K., Kurata, H., Guillot, P. V., Gotherstrom, C., . . . Fisk, N. M. (2007). Widespread distribution and muscle differentiation of human fetal mesenchymal stem cells after intrauterine transplantation in dystrophic mdx mouse. *Stem Cells*, 25(4), 875-884. doi:10.1634/stemcells.2006-0694

Chen, C., Feng, Y., Zou, L., Wang, L., Chen, H. H., Cai, J. Y., . . . Chao, W. (2014). Role of extracellular RNA and TLR3-Trif signaling in myocardial ischemia-reperfusion injury. *J Am Heart Assoc*, 3(1), e000683. doi:10.1161/JAHA.113.000683

Chen, W., & Frangogiannis, N. G. (2013). Fibroblasts in post-infarction inflammation and cardiac repair. *Biochim Biophys Acta*, 1833(4), 945-953. doi:10.1016/j.bbamcr.2012.08.023

Cho, K. S., & Roh, H. J. (2010). Immunomodulatory effects of adipose-derived stem cells in airway allergic diseases. *Curr Stem Cell Res Ther*, 5(2), 111-115. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19941459>

Choi, H., Lee, R. H., Bazhanov, N., Oh, J. Y., & Prockop, D. J. (2011). Anti-inflammatory protein TSG-6 secreted by activated MSCs attenuates zymosan-induced mouse peritonitis by decreasing TLR2/NF-kappaB signaling in resident macrophages. *Blood*, 118(2), 330-338. doi:10.1182/blood-2010-12-327353

Connick, P., Kolappan, M., Crawley, C., Webber, D. J., Patani, R., Michell, A. W., . . . Chandran, S. (2012). Autologous mesenchymal stem cells for the treatment of secondary progressive multiple sclerosis: an open-label phase 2a proof-of-concept study. *Lancet Neurol*, 11(2), 150-156. doi:10.1016/S1474-4422(11)70305-2

Corliss, B. A., Azimi, M. S., Munson, J. M., Peirce, S. M., & Murfee, W. L. (2016). Macrophages: An Inflammatory Link Between Angiogenesis and Lymphangiogenesis. *Microcirculation*, 23(2), 95-121. doi:10.1111/micc.12259

Cowan, C. M., Shi, Y. Y., Aalami, O. O., Chou, Y. F., Mari, C., Thomas, R., . . . Longaker, M. T. (2004). Adipose-derived adult stromal cells heal critical-size mouse calvarial defects. *Nat Biotechnol*, 22(5), 560-567. doi:10.1038/nbt958

Crop, M. J., Baan, C. C., Korevaar, S. S., Ijzermans, J. N., Weimar, W., & Hoogduijn, M. J. (2010). Human adipose tissue-derived mesenchymal stem cells induce explosive T-cell proliferation. *Stem Cells Dev*, 19(12), 1843-1853. doi:10.1089/scd.2009.0368

Cselenyak, A., Pankotai, E., Horvath, E. M., Kiss, L., & Lacza, Z. (2010). Mesenchymal stem cells rescue cardiomyoblasts from cell death in an in vitro ischemia model via direct cell-to-cell connections. *BMC Cell Biol*, 11, 29. doi:10.1186/1471-2121-11-29

Cui, L., Liu, B., Liu, G., Zhang, W., Cen, L., Sun, J., . . . Cao, Y. (2007). Repair of cranial bone defects with adipose derived stem cells and coral scaffold in a canine model. *Biomaterials*, *28*(36), 5477-5486. doi:10.1016/j.biomaterials.2007.08.042

Cui, L., Yin, S., Liu, W., Li, N., Zhang, W., & Cao, Y. (2007). Expanded adipose-derived stem cells suppress mixed lymphocyte reaction by secretion of prostaglandin E2. *Tissue Eng*, *13*(6), 1185-1195. doi:10.1089/ten.2006.0315

Cui, X., He, Z., Liang, Z., Chen, Z., Wang, H., & Zhang, J. (2017). Exosomes From Adipose-derived Mesenchymal Stem Cells Protect the Myocardium Against Ischemia/Reperfusion Injury Through Wnt/beta-Catenin Signaling Pathway. *J Cardiovasc Pharmacol*, *70*(4), 225-231. doi:10.1097/FJC.0000000000000507

Cyranoski, D. (2018). How human embryonic stem cells sparked a revolution. *Nature*, *555*(7697), 428-430. doi:10.1038/d41586-018-03268-4

Deuse, T., Hua, X., Taylor, V., Stubbendorff, M., Baluom, M., Chen, Y., . . . Schrepfer, S. (2012). Significant reduction of acute cardiac allograft rejection by selective janus kinase-1/3 inhibition using R507 and R545. *Transplantation*, *94*(7), 695-702. doi:10.1097/TP.0b013e3182660496

Dewald, O., Ren, G., Duerr, G. D., Zoerlein, M., Klemm, C., Gersch, C., . . . Frangogiannis, N. G. (2004). Of mice and dogs: species-specific differences in the inflammatory response following myocardial infarction. *Am J Pathol*, *164*(2), 665-677. doi:10.1016/S0002-9440(10)63154-9

Djouad, F., Charbonnier, L. M., Bouffi, C., Louis-Pence, P., Bony, C., Apparailly, F., . . . Noel, D. (2007). Mesenchymal stem cells inhibit the differentiation of dendritic cells through an interleukin-6-dependent mechanism. *Stem Cells*, *25*(8), 2025-2032. doi:10.1634/stemcells.2006-0548

Dominici, M., Le Blanc, K., Mueller, I., Slaper-Cortenbach, I., Marini, F., Krause, D., . . . Horwitz, E. (2006). Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy*, *8*(4), 315-317. doi:10.1080/14653240600855905

Dragoo, J. L., Samimi, B., Zhu, M., Hame, S. L., Thomas, B. J., Lieberman, J. R., . . . Benhaim, P. (2003). Tissue-engineered cartilage and bone using stem cells from human infrapatellar fat pads. *J Bone Joint Surg Br*, *85*(5), 740-747. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12892203>

Du, Y., Roh, D. S., Funderburgh, M. L., Mann, M. M., Marra, K. G., Rubin, J. P., . . . Funderburgh, J. L. (2010). Adipose-derived stem cells differentiate to keratocytes in vitro. *Mol Vis*, *16*, 2680-2689. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21179234>

Dubey, N. K., Mishra, V. K., Dubey, R., Deng, Y. H., Tsai, F. C., & Deng, W. P. (2018). Revisiting the Advances in Isolation, Characterization and Secretome of Adipose-Derived Stromal/Stem Cells. *Int J Mol Sci*, *19*(8). doi:10.3390/ijms19082200

Dulak, J., Szade, K., Szade, A., Nowak, W., & Jozkowicz, A. (2015). Adult stem cells: hopes and hypes of regenerative medicine. *Acta Biochim Pol*, *62*(3), 329-337. doi:10.18388/abp.2015\_1023

Eggenhofer, E., Luk, F., Dahlke, M. H., & Hoogduijn, M. J. (2014). The life and fate of mesenchymal stem cells. *Front Immunol*, *5*, 148. doi:10.3389/fimmu.2014.00148

Eliopoulos, N., Zhao, J., Bouchentouf, M., Forner, K., Birman, E., Yuan, S., . . . Martineau, D. (2010). Human marrow-derived mesenchymal stromal cells decrease cisplatin renotoxicity in vitro and in vivo and enhance survival of mice post-intraperitoneal injection. *Am J Physiol Renal Physiol*, *299*(6), F1288-1298. doi:10.1152/ajprenal.00671.2009

Ellison, G. M., Vicinanza, C., Smith, A. J., Aquila, I., Leone, A., Waring, C. D., . . . Nadal-Ginard, B. (2013). Adult c-kit(pos) cardiac stem cells are necessary and sufficient for functional cardiac regeneration and repair. *Cell*, *154*(4), 827-842. doi:10.1016/j.cell.2013.07.039

Eming, S. A., Hammerschmidt, M., Krieg, T., & Roers, A. (2009). Interrelation of immunity and tissue repair or regeneration. *Semin Cell Dev Biol*, *20*(5), 517-527. doi:10.1016/j.semcdb.2009.04.009

Eminli, S., Utikal, J., Arnold, K., Jaenisch, R., & Hochedlinger, K. (2008). Reprogramming of neural progenitor cells into induced pluripotent stem cells in the absence of exogenous Sox2 expression. *Stem Cells*, *26*(10), 2467-2474. doi:10.1634/stemcells.2008-0317

Emmert, M. Y., Emmert, L. S., Martens, A., Ismail, I., Schmidt-Richter, I., Gawol, A., . . . Gruh, I. (2013). Higher frequencies of BCRP+ cardiac resident cells in ischaemic human myocardium. *Eur Heart J*, *34*(36), 2830-2838. doi:10.1093/eurheartj/ehs156

Fang, B., Song, Y., Liao, L., Zhang, Y., & Zhao, R. C. (2007). Favorable response to human adipose tissue-derived mesenchymal stem cells in steroid-refractory acute graft-versus-host disease. *Transplant Proc*, *39*(10), 3358-3362. doi:10.1016/j.transproceed.2007.08.103

Florea, V., Rieger, A. C., DiFede, D. L., El-Khorazaty, J., Natsumeda, M., Banerjee, M. N., . . . Hare, J. M. (2017). Dose Comparison Study of Allogeneic Mesenchymal Stem Cells in Patients With Ischemic Cardiomyopathy (The TRIDENT Study). *Circ Res*, *121*(11), 1279-1290. doi:10.1161/CIRCRESAHA.117.311827

Flowers, M. E., & Martin, P. J. (2015). How we treat chronic graft-versus-host disease. *Blood*, *125*(4), 606-615. doi:10.1182/blood-2014-08-551994

Follin, B., Juhl, M., Cohen, S., Pedersen, A. E., Gad, M., Kastrup, J., & Ekblond, A. (2015). Human adipose-derived stromal cells in a clinically applicable injectable alginate hydrogel: Phenotypic and immunomodulatory evaluation. *Cytotherapy*, *17*(8), 1104-1118. doi:10.1016/j.jcyt.2015.04.008

Forbes, G. M., Sturm, M. J., Leong, R. W., Sparrow, M. P., Segarajasingam, D., Cummins, A. G., . . . Herrmann, R. P. (2014). A phase 2 study of allogeneic mesenchymal stromal cells for luminal Crohn's disease refractory to biologic therapy. *Clin Gastroenterol Hepatol*, *12*(1), 64-71. doi:10.1016/j.cgh.2013.06.021

Forte, E., Furtado, M. B., & Rosenthal, N. (2018). The interstitium in cardiac repair: role of the immune-stromal cell interplay. *Nat Rev Cardiol*, *15*(10), 601-616. doi:10.1038/s41569-018-0077-x

Frangogiannis, N. G. (2012). Regulation of the inflammatory response in cardiac repair. *Circ Res*, *110*(1), 159-173. doi:10.1161/CIRCRESAHA.111.243162

Friedenstein, A. J., Chailakhjan, R. K., & Lalykina, K. S. (1970). The development of fibroblast colonies in monolayer cultures of guinea-pig bone marrow and spleen cells. *Cell Tissue Kinet*, *3*(4), 393-403. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/5523063>

Friedenstein, A. J., Petrakova, K. V., Kurolesova, A. I., & Frolova, G. P. (1968). Heterotopic of bone marrow. Analysis of precursor cells for osteogenic and hematopoietic tissues. *Transplantation*, *6*(2), 230-247. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/5654088>

Furuichi, K., Shintani, H., Sakai, Y., Ochiya, T., Matsushima, K., Kaneko, S., & Wada, T. (2012). Effects of adipose-derived mesenchymal cells on ischemia-reperfusion injury in kidney. *Clin Exp Nephrol*, *16*(5), 679-689. doi:10.1007/s10157-012-0614-6

Gerdoni, E., Gallo, B., Casazza, S., Musio, S., Bonanni, I., Pedemonte, E., . . . Uccelli, A. (2007). Mesenchymal stem cells effectively modulate pathogenic immune response in experimental autoimmune encephalomyelitis. *Ann Neurol*, *61*(3), 219-227. doi:10.1002/ana.21076

Gil-Ortega, M., Garidou, L., Barreau, C., Maumus, M., Breasson, L., Tavernier, G., . . . Sengenès, C. (2013). Native adipose stromal cells egress from adipose tissue in vivo: evidence during lymph node activation. *Stem Cells*, *31*(7), 1309-1320. doi:10.1002/stem.1375

Gimble, J. M., Bunnell, B. A., Frazier, T., Rowan, B., Shah, F., Thomas-Porch, C., & Wu, X. (2013). Adipose-derived stromal/stem cells: a primer. *Organogenesis*, 9(1), 3-10. doi:10.4161/org.24279

Gimble, J. M., Katz, A. J., & Bunnell, B. A. (2007). Adipose-derived stem cells for regenerative medicine. *Circ Res*, 100(9), 1249-1260. doi:10.1161/01.RES.0000265074.83288.09

Girdlestone, J. (2016). Mesenchymal stromal cells with enhanced therapeutic properties. *Immunotherapy*, 8(12), 1405-1416. doi:10.2217/imt-2016-0098

Gnecchi, M., He, H., Noiseux, N., Liang, O. D., Zhang, L., Morello, F., . . . Dzau, V. J. (2006). Evidence supporting paracrine hypothesis for Akt-modified mesenchymal stem cell-mediated cardiac protection and functional improvement. *FASEB J*, 20(6), 661-669. doi:10.1096/fj.05-5211com

Gnecchi, M., Zhang, Z., Ni, A., & Dzau, V. J. (2008). Paracrine mechanisms in adult stem cell signaling and therapy. *Circ Res*, 103(11), 1204-1219. doi:10.1161/CIRCRESAHA.108.176826

Gomes, S. A., Rangel, E. B., Premer, C., Dulce, R. A., Cao, Y., Florea, V., . . . Hare, J. M. (2013). S-nitrosoglutathione reductase (GSNOR) enhances vasculogenesis by mesenchymal stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 110(8), 2834-2839. doi:10.1073/pnas.1220185110

Gonzalez, M. A., Gonzalez-Rey, E., Rico, L., Buscher, D., & Delgado, M. (2009a). Adipose-derived mesenchymal stem cells alleviate experimental colitis by inhibiting inflammatory and autoimmune responses. *Gastroenterology*, 136(3), 978-989. doi:10.1053/j.gastro.2008.11.041

Gonzalez, M. A., Gonzalez-Rey, E., Rico, L., Buscher, D., & Delgado, M. (2009b). Treatment of experimental arthritis by inducing immune tolerance with human adipose-derived mesenchymal stem cells. *Arthritis Rheum*, 60(4), 1006-1019. doi:10.1002/art.24405



Gonzalez-Rey, E., Gonzalez, M. A., Varela, N., O'Valle, F., Hernandez-Cortes, P., Rico, L., . . . Delgado, M. (2010). Human adipose-derived mesenchymal stem cells reduce inflammatory and T cell responses and induce regulatory T cells in vitro in rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis*, *69*(1), 241-248. doi:10.1136/ard.2008.101881

Gupte, A. A., Hamilton, D. J., Cordero-Reyes, A. M., Youker, K. A., Yin, Z., Estep, J. D., . . . Hsueh, W. A. (2014). Mechanical unloading promotes myocardial energy recovery in human heart failure. *Circ Cardiovasc Genet*, *7*(3), 266-276. doi:10.1161/CIRCGENETICS.113.000404

Haider, H., Jiang, S., Idris, N. M., & Ashraf, M. (2008). IGF-1-overexpressing mesenchymal stem cells accelerate bone marrow stem cell mobilization via paracrine activation of SDF-1alpha/CXCR4 signaling to promote myocardial repair. *Circ Res*, *103*(11), 1300-1308. doi:10.1161/CIRCRESAHA.108.186742

Hamdi, H., Planat-Benard, V., Bel, A., Neamatalla, H., Saccenti, L., Calderon, D., . . . Menasche, P. (2014). Long-term functional benefits of epicardial patches as cell carriers. *Cell Transplant*, *23*(1), 87-96. doi:10.3727/096368912X658836

Hare, J. M., Fishman, J. E., Gerstenblith, G., DiFede Velazquez, D. L., Zambrano, J. P., Suncion, V. Y., . . . Lardo, A. (2012). Comparison of allogeneic vs autologous bone marrow-derived mesenchymal stem cells delivered by transendocardial injection in patients with ischemic cardiomyopathy: the POSEIDON randomized trial. *JAMA*, *308*(22), 2369-2379. doi:10.1001/jama.2012.25321

Hare, J. M., Traverse, J. H., Henry, T. D., Dib, N., Strumpf, R. K., Schulman, S. P., . . . Sherman, W. (2009). A randomized, double-blind, placebo-controlled, dose-escalation study of intravenous adult human mesenchymal stem cells (prochymal) after acute myocardial infarction. *J Am Coll Cardiol*, *54*(24), 2277-2286. doi:10.1016/j.jacc.2009.06.055

Harris, L. J., Abdollahi, H., Zhang, P., McIlhenny, S., Tulenko, T. N., & DiMuzio, P. J. (2011). Differentiation of adult stem cells into smooth muscle for vascular tissue engineering. *J Surg Res*, *168*(2), 306-314. doi:10.1016/j.jss.2009.08.001

Hasegawa, H., Takano, H., Iwanaga, K., Ohtsuka, M., Qin, Y., Niitsuma, Y., . . . Komuro, I. (2006). Cardioprotective effects of granulocyte colony-stimulating factor in swine with chronic myocardial ischemia. *J Am Coll Cardiol*, *47*(4), 842-849. doi:10.1016/j.jacc.2005.09.048

Hausenloy, D. J., & Yellon, D. M. (2013). Myocardial ischemia-reperfusion injury: a neglected therapeutic target. *J Clin Invest*, *123*(1), 92-100. doi:10.1172/JCI62874

Hendrikx, M., Hensen, K., Clijsters, C., Jongen, H., Koninckx, R., Bijmens, E., . . . Rummens, J. L. (2006). Recovery of regional but not global contractile function by the direct intramyocardial autologous bone marrow transplantation: results from a randomized controlled clinical trial. *Circulation*, *114*(1 Suppl), I101-107. doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.105.000505

Henry, T. D., Pepine, C. J., Lambert, C. R., Traverse, J. H., Schatz, R., Costa, M., . . . Perin, E. C. (2017). The Athena trials: Autologous adipose-derived regenerative cells for refractory chronic myocardial ischemia with left ventricular dysfunction. *Catheter Cardiovasc Interv*, *89*(2), 169-177. doi:10.1002/ccd.26601

Hesse, M., Fleischmann, B. K., & Kotlikoff, M. I. (2014). Concise review: The role of C-kit expressing cells in heart repair at the neonatal and adult stage. *Stem Cells*, *32*(7), 1701-1712. doi:10.1002/stem.1696

Hicok, K. C., Du Laney, T. V., Zhou, Y. S., Halvorsen, Y. D., Hitt, D. C., Cooper, L. F., & Gimble, J. M. (2004). Human adipose-derived adult stem cells produce osteoid in vivo. *Tissue Eng*, *10*(3-4), 371-380. doi:10.1089/107632704323061735

Hipp, J., & Atala, A. (2008). Sources of stem cells for regenerative medicine. *Stem Cell Rev*, *4*(1), 3-11. doi:10.1007/s12015-008-9010-8

Hoke, N. N., Salloum, F. N., Kass, D. A., Das, A., & Kukreja, R. C. (2012). Preconditioning by phosphodiesterase-5 inhibition improves therapeutic efficacy of adipose-derived stem cells following myocardial infarction in mice. *Stem Cells*, *30*(2), 326-335. doi:10.1002/stem.789

Houtgraaf, J. H., den Dekker, W. K., van Dalen, B. M., Springeling, T., de Jong, R., van Geuns, R. J., . . . Duckers, H. J. (2012). First experience in humans using adipose tissue-derived regenerative cells in the treatment of patients with ST-segment elevation myocardial infarction. *J Am Coll Cardiol*, *59*(5), 539-540. doi:10.1016/j.jacc.2011.09.065

Hsiao, S. T., Asgari, A., Lokmic, Z., Sinclair, R., Disting, G. J., Lim, S. Y., & Dilley, R. J. (2012). Comparative analysis of paracrine factor expression in human adult mesenchymal stem cells derived from bone marrow, adipose, and dermal tissue. *Stem Cells Dev*, *21*(12), 2189-2203. doi:10.1089/scd.2011.0674

Hye Kim, J., Gyu Park, S., Kim, W. K., Song, S. U., & Sung, J. H. (2015). Functional regulation of adipose-derived stem cells by PDGF-D. *Stem Cells*, *33*(2), 542-556. doi:10.1002/stem.1865

Ibanez, B., Heusch, G., Ovize, M., & Van de Werf, F. (2015). Evolving therapies for myocardial ischemia/reperfusion injury. *J Am Coll Cardiol*, *65*(14), 1454-1471. doi:10.1016/j.jacc.2015.02.032

Ii, M., Horii, M., Yokoyama, A., Shoji, T., Mifune, Y., Kawamoto, A., . . . Asahara, T. (2011). Synergistic effect of adipose-derived stem cell therapy and bone marrow progenitor recruitment in ischemic heart. *Lab Invest*, *91*(4), 539-552. doi:10.1038/labinvest.2010.191

Ikada, Y. (2006). Challenges in tissue engineering. *J R Soc Interface*, *3*(10), 589-601. doi:10.1098/rsif.2006.0124

Ilic, D., & Ogilvie, C. (2017). Concise Review: Human Embryonic Stem Cells-What Have We Done? What Are We Doing? Where Are We Going? *Stem Cells*, *35*(1), 17-25. doi:10.1002/stem.2450

Im, G. I., Kim, H. J., & Lee, J. H. (2011). Chondrogenesis of adipose stem cells in a porous PLGA scaffold impregnated with plasmid DNA containing SOX trio (SOX-5,-6 and -9) genes. *Biomaterials*, *32*(19), 4385-4392. doi:10.1016/j.biomaterials.2011.02.054

Inoue, S., Popp, F. C., Koehl, G. E., Piso, P., Schlitt, H. J., Geissler, E. K., & Dahlke, M. H. (2006). Immunomodulatory effects of mesenchymal stem cells in a rat organ transplant model. *Transplantation*, *81*(11), 1589-1595. doi:10.1097/01.tp.0000209919.90630.7b

Ivanova-Todorova, E., Bochev, I., Mourdjeva, M., Dimitrov, R., Bukarev, D., Kyurkchiev, S., . . . Kyurkchiev, D. S. (2009). Adipose tissue-derived mesenchymal stem cells are more potent suppressors of dendritic cells differentiation compared to bone marrow-derived mesenchymal stem cells. *Immunol Lett*, *126*(1-2), 37-42. doi:10.1016/j.imlet.2009.07.010

Jabbarzadeh, E., Starnes, T., Khan, Y. M., Jiang, T., Wirtel, A. J., Deng, M., . . . Laurencin, C. T. (2008). Induction of angiogenesis in tissue-engineered scaffolds designed for bone repair: a combined gene therapy-cell transplantation approach. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *105*(32), 11099-11104. doi:10.1073/pnas.0800069105

Jang, S., Cho, H. H., Cho, Y. B., Park, J. S., & Jeong, H. S. (2010). Functional neural differentiation of human adipose tissue-derived stem cells using bFGF and forskolin. *BMC Cell Biol*, *11*, 25. doi:10.1186/1471-2121-11-25

Jardine, A. G., Gaston, R. S., Fellstrom, B. C., & Holdaas, H. (2011). Prevention of cardiovascular disease in adult recipients of kidney transplants. *Lancet*, *378*(9800), 1419-1427. doi:10.1016/S0140-6736(11)61334-2

Jin, L., Deng, Z., Zhang, J., Yang, C., Liu, J., Han, W., . . . Chen, G. (2019). Mesenchymal stem cells promote type 2 macrophage polarization to ameliorate the myocardial injury caused by diabetic cardiomyopathy. *J Transl Med*, *17*(1), 251. doi:10.1186/s12967-019-1999-8

Jing, H. X., Duan de, J., Zhou, H., Hu, Q. M., & Lei, T. C. (2016). Adiposederived mesenchymal stem cellfacilitated TRAIL expression in melanoma treatment in vitro. *Mol Med Rep*, *14*(1), 195-201. doi:10.3892/mmr.2016.5283

Kakudo, N., Morimoto, N., Ogawa, T., Taketani, S., & Kusumoto, K. (2015). Hypoxia Enhances Proliferation of Human Adipose-Derived Stem Cells via HIF-1a Activation. *PLoS One*, *10*(10), e0139890. doi:10.1371/journal.pone.0139890

Kanelidis, A. J., Premer, C., Lopez, J., Balkan, W., & Hare, J. M. (2017). Route of Delivery Modulates the Efficacy of Mesenchymal Stem Cell Therapy for Myocardial Infarction: A Meta-Analysis of Preclinical Studies and Clinical Trials. *Circ Res*, *120*(7), 1139-1150. doi:10.1161/CIRCRESAHA.116.309819

Karantalis, V., & Hare, J. M. (2015). Use of mesenchymal stem cells for therapy of cardiac disease. *Circ Res*, *116*(8), 1413-1430. doi:10.1161/CIRCRESAHA.116.303614

Karussis, D., Karageorgiou, C., Vaknin-Dembinsky, A., Gowda-Kurkalli, B., Gomori, J. M., Kassis, I., . . . Slavin, S. (2010). Safety and immunological effects of mesenchymal stem cell transplantation in patients with multiple sclerosis and amyotrophic lateral sclerosis. *Arch Neurol*, *67*(10), 1187-1194. doi:10.1001/archneurol.2010.248

Keating, A. (2012). Mesenchymal stromal cells: new directions. *Cell Stem Cell*, *10*(6), 709-716. doi:10.1016/j.stem.2012.05.015

Kilroy, G. E., Foster, S. J., Wu, X., Ruiz, J., Sherwood, S., Heifetz, A., . . . Gimble, J. M. (2007). Cytokine profile of human adipose-derived stem cells: expression of angiogenic, hematopoietic, and pro-inflammatory factors. *J Cell Physiol*, *212*(3), 702-709. doi:10.1002/jcp.21068

Kim, E. K., Li, G., Lee, T. J., & Hong, J. P. (2011). The effect of human adipose-derived stem cells on healing of ischemic wounds in a diabetic nude mouse model. *Plast Reconstr Surg*, *128*(2), 387-394. doi:10.1097/PRS.0b013e31821e6de2

Kim, J., & Ma, T. (2013). Autocrine fibroblast growth factor 2-mediated interactions between human mesenchymal stem cells and the extracellular matrix under varying oxygen tension. *J Cell Biochem*, *114*(3), 716-727. doi:10.1002/jcb.24413

Kim, J. H., Park, I. S., Park, Y., Jung, Y., Kim, S. H., & Kim, S. H. (2013). Therapeutic angiogenesis of three-dimensionally cultured adipose-derived stem cells in rat infarcted hearts. *Cytotherapy*, *15*(5), 542-556. doi:10.1016/j.jcyt.2012.11.016

Kim, J. M., Lee, S. T., Chu, K., Jung, K. H., Song, E. C., Kim, S. J., . . . Roh, J. K. (2007). Systemic transplantation of human adipose stem cells attenuated cerebral inflammation and degeneration in a hemorrhagic stroke model. *Brain Res*, *1183*, 43-50. doi:10.1016/j.brainres.2007.09.005

Kim, J. Y., Shin, K. K., Lee, A. L., Kim, Y. S., Park, H. J., Park, Y. K., . . . Jung, J. S. (2014). MicroRNA-302 induces proliferation and inhibits oxidant-induced cell death in human adipose tissue-derived mesenchymal stem cells. *Cell Death Dis*, *5*, e1385. doi:10.1038/cddis.2014.344

Kim, K., Doi, A., Wen, B., Ng, K., Zhao, R., Cahan, P., . . . Daley, G. Q. (2010). Epigenetic memory in induced pluripotent stem cells. *Nature*, *467*(7313), 285-290. doi:10.1038/nature09342

Kim, S. Y., Lee, J. H., Kim, H. J., Park, M. K., Huh, J. W., Ro, J. Y., . . . Lee, Y. S. (2012). Mesenchymal stem cell-conditioned media recovers lung fibroblasts from cigarette smoke-induced damage. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, *302*(9), L891-908. doi:10.1152/ajplung.00288.2011

Kinnaird, T., Stabile, E., Burnett, M. S., Shou, M., Lee, C. W., Barr, S., . . . Epstein, S. E. (2004). Local delivery of marrow-derived stromal cells augments collateral perfusion through paracrine mechanisms. *Circulation*, *109*(12), 1543-1549. doi:10.1161/01.CIR.0000124062.31102.57

Kirklin, J. K., Naftel, D. C., Kormos, R. L., Stevenson, L. W., Pagani, F. D., Miller, M. A., . . . Young, J. B. (2011). Third INTERMACS Annual Report: the evolution of destination therapy in the United States. *J Heart Lung Transplant*, *30*(2), 115-123. doi:10.1016/j.healun.2010.12.001

Kirklin, J. K., Naftel, D. C., Pagani, F. D., Kormos, R. L., Stevenson, L. W., Blume, E. D., . . . Young, J. B. (2015). Seventh INTERMACS annual report: 15,000 patients and counting. *J Heart Lung Transplant*, *34*(12), 1495-1504. doi:10.1016/j.healun.2015.10.003

Kokai, L. E., Marra, K., & Rubin, J. P. (2014). Adipose stem cells: biology and clinical applications for tissue repair and regeneration. *Transl Res*, *163*(4), 399-408. doi:10.1016/j.trsl.2013.11.009

Kolaczowska, E., & Kubes, P. (2013). Neutrophil recruitment and function in health and inflammation. *Nat Rev Immunol*, *13*(3), 159-175. doi:10.1038/nri3399

Kondo, K., Shintani, S., Shibata, R., Murakami, H., Murakami, R., Imaizumi, M., . . . Murohara, T. (2009). Implantation of adipose-derived regenerative cells enhances ischemia-induced angiogenesis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, *29*(1), 61-66. doi:10.1161/ATVBAHA.108.166496

Krueger, T. E. G., Thorek, D. L. J., Denmeade, S. R., Isaacs, J. T., & Brennen, W. N. (2018). Concise Review: Mesenchymal Stem Cell-Based Drug Delivery: The Good, the Bad, the Ugly, and the Promise. *Stem Cells Transl Med*, *7*(9), 651-663. doi:10.1002/sctm.18-0024

Kuo, Y. R., Chen, C. C., Chen, Y. C., & Chien, C. M. (2017). Recipient Adipose-Derived Stem Cells Enhance Recipient Cell Engraftment and Prolong Allotransplant Survival in a Miniature Swine Hind-Limb Model. *Cell Transplant*, *26*(8), 1418-1427. doi:10.1177/0963689717724534

Kuo, Y. R., Goto, S., Shih, H. S., Wang, F. S., Lin, C. C., Wang, C. T., . . . Lee, W. P. (2009). Mesenchymal stem cells prolong composite tissue allotransplant survival in a swine model. *Transplantation*, *87*(12), 1769-1777. doi:10.1097/TP.0b013e3181a664f1

Lambert, J. M., Lopez, E. F., & Lindsey, M. L. (2008). Macrophage roles following myocardial infarction. *Int J Cardiol*, *130*(2), 147-158. doi:10.1016/j.ijcard.2008.04.059

Lanz, T. V., Opitz, C. A., Ho, P. P., Agrawal, A., Lutz, C., Weller, M., . . . Platten, M. (2010). Mouse mesenchymal stem cells suppress antigen-specific TH cell immunity independent of indoleamine 2,3-dioxygenase 1 (IDO1). *Stem Cells Dev*, 19(5), 657-668. doi:10.1089/scd.2009.0385

Larose, E., Rodes-Cabau, J., Pibarot, P., Rinfret, S., Proulx, G., Nguyen, C. M., . . . Bertrand, O. F. (2010). Predicting late myocardial recovery and outcomes in the early hours of ST-segment elevation myocardial infarction: traditional measures compared with microvascular obstruction, salvaged myocardium, and necrosis characteristics by cardiovascular magnetic resonance. *J Am Coll Cardiol*, 55(22), 2459-2469. doi:10.1016/j.jacc.2010.02.033

Laugwitz, K. L., Moretti, A., Lam, J., Gruber, P., Chen, Y., Woodard, S., . . . Chien, K. R. (2005). Postnatal isl1+ cardioblasts enter fully differentiated cardiomyocyte lineages. *Nature*, 433(7026), 647-653. doi:10.1038/nature03215

Le Blanc, K., Frassoni, F., Ball, L., Locatelli, F., Roelofs, H., Lewis, I., . . . Marrow, T. (2008). Mesenchymal stem cells for treatment of steroid-resistant, severe, acute graft-versus-host disease: a phase II study. *Lancet*, 371(9624), 1579-1586. doi:10.1016/S0140-6736(08)60690-X

Le Blanc, K., Rasmusson, I., Sundberg, B., Gotherstrom, C., Hassan, M., Uzunel, M., & Ringden, O. (2004). Treatment of severe acute graft-versus-host disease with third party haploidentical mesenchymal stem cells. *Lancet*, 363(9419), 1439-1441. doi:10.1016/S0140-6736(04)16104-7

Lee, E. J., Park, S. J., Kang, S. K., Kim, G. H., Kang, H. J., Lee, S. W., . . . Kim, H. S. (2012). Spherical bullet formation via E-cadherin promotes therapeutic potency of mesenchymal stem cells derived from human umbilical cord blood for myocardial infarction. *Mol Ther*, 20(7), 1424-1433. doi:10.1038/mt.2012.58

Lee, E. Y., Xia, Y., Kim, W. S., Kim, M. H., Kim, T. H., Kim, K. J., . . . Sung, J. H. (2009). Hypoxia-enhanced wound-healing function of adipose-derived stem cells: increase in stem cell



proliferation and up-regulation of VEGF and bFGF. *Wound Repair Regen*, 17(4), 540-547. doi:10.1111/j.1524-475X.2009.00499.x

Lee, H. C., An, S. G., Lee, H. W., Park, J. S., Cha, K. S., Hong, T. J., . . . Jung, J. S. (2012). Safety and effect of adipose tissue-derived stem cell implantation in patients with critical limb ischemia: a pilot study. *Circ J*, 76(7), 1750-1760. doi:10.1253/circj.cj-11-1135

Lee, R. H., Pulin, A. A., Seo, M. J., Kota, D. J., Ylostalo, J., Larson, B. L., . . . Prockop, D. J. (2009). 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*, 5(1), 54-63. doi:10.1016/j.stem.2009.05.003

Lensch, M. W., Schlaeger, T. M., Zon, L. I., & Daley, G. Q. (2007). Teratoma formation assays with human embryonic stem cells: a rationale for one type of human-animal chimera. *Cell Stem Cell*, 1(3), 253-258. doi:10.1016/j.stem.2007.07.019

Levi, B., James, A. W., Nelson, E. R., Vistnes, D., Wu, B., Lee, M., . . . Longaker, M. T. (2010). Human adipose derived stromal cells heal critical size mouse calvarial defects. *PLoS One*, 5(6), e11177. doi:10.1371/journal.pone.0011177

Li, N., Sarojini, H., An, J., & Wang, E. (2010). Prosaposin in the secretome of marrow stroma-derived neural progenitor cells protects neural cells from apoptotic death. *J Neurochem*, 112(6), 1527-1538. doi:10.1111/j.1471-4159.2009.06565.x

Li, Q., Song, W. J., Ryu, M. O., Nam, A., An, J. H., Ahn, J. O., . . . Youn, H. Y. (2018). TSG-6 secreted by human adipose tissue-derived mesenchymal stem cells ameliorates severe acute pancreatitis via ER stress downregulation in mice. *Stem Cell Res Ther*, 9(1), 255. doi:10.1186/s13287-018-1009-8

Li, X., Ma, T., Sun, J., Shen, M., Xue, X., Chen, Y., & Zhang, Z. (2019). Harnessing the secretome of adipose-derived stem cells in the treatment of ischemic heart diseases. *Stem Cell Res Ther*, 10(1), 196. doi:10.1186/s13287-019-1289-7

Li, Y. Y., Liu, H. H., Chen, H. L., & Li, Y. P. (2012). Adipose-derived mesenchymal stem cells ameliorate STZ-induced pancreas damage in type 1 diabetes. *Biomed Mater Eng*, *22*(1-3), 97-103. doi:10.3233/BME-2012-0694

Liang, J., Li, X., Zhang, H., Wang, D., Feng, X., Wang, H., . . . Sun, L. (2012). Allogeneic mesenchymal stem cells transplantation in patients with refractory RA. *Clin Rheumatol*, *31*(1), 157-161. doi:10.1007/s10067-011-1816-0

Liang, S. X., Tan, T. Y., Gaudry, L., & Chong, B. (2010). Differentiation and migration of Sca1+/CD31- cardiac side population cells in a murine myocardial ischemic model. *Int J Cardiol*, *138*(1), 40-49. doi:10.1016/j.ijcard.2008.08.032

Lin, G., Wang, G., Banie, L., Ning, H., Shindel, A. W., Fandel, T. M., . . . Lin, C. S. (2010). Treatment of stress urinary incontinence with adipose tissue-derived stem cells. *Cytotherapy*, *12*(1), 88-95. doi:10.3109/14653240903350265

Liqing, Y., Jia, G., Jiqing, C., Ran, G., Fei, C., Jie, K., . . . Cheng, Z. (2011). Directed differentiation of motor neuron cell-like cells from human adipose-derived stem cells in vitro. *Neuroreport*, *22*(8), 370-373. doi:10.1097/WNR.0b013e3283469615

Littman, D. R., & Rudensky, A. Y. (2010). Th17 and regulatory T cells in mediating and restraining inflammation. *Cell*, *140*(6), 845-858. doi:10.1016/j.cell.2010.02.021

Liu, Y., Yan, X., Sun, Z., Chen, B., Han, Q., Li, J., & Zhao, R. C. (2007). Flk-1+ adipose-derived mesenchymal stem cells differentiate into skeletal muscle satellite cells and ameliorate muscular dystrophy in mdx mice. *Stem Cells Dev*, *16*(5), 695-706. doi:10.1089/scd.2006.0118

Lopez-Santalla, M., Mancheno-Corvo, P., Menta, R., Lopez-Belmonte, J., DelaRosa, O., Bueren, J. A., . . . Garin, M. I. (2015). Human Adipose-Derived Mesenchymal Stem Cells Modulate Experimental Autoimmune Arthritis by Modifying Early Adaptive T Cell Responses. *Stem Cells*, *33*(12), 3493-3503. doi:10.1002/stem.2113

Lu, Y., Wang, Y., Lin, M., Zhou, J., Wang, Z., Jiang, M., & He, B. (2016). A systematic review of randomised controlled trials examining the therapeutic effects of adult bone marrow-derived stem cells for non-ischaemic dilated cardiomyopathy. *Stem Cell Res Ther*, 7(1), 186. doi:10.1186/s13287-016-0441-x

Lugrin, J., Parapanov, R., Rosenblatt-Velin, N., Rignault-Clerc, S., Feihl, F., Waeber, B., . . . Liaudet, L. (2015). Cutting edge: IL-1alpha is a crucial danger signal triggering acute myocardial inflammation during myocardial infarction. *J Immunol*, 194(2), 499-503. doi:10.4049/jimmunol.1401948

Lund, R. J., Narva, E., & Lahesmaa, R. (2012). Genetic and epigenetic stability of human pluripotent stem cells. *Nat Rev Genet*, 13(10), 732-744. doi:10.1038/nrg3271

Luz-Crawford, P., Kurte, M., Bravo-Alegria, J., Contreras, R., Nova-Lamperti, E., Tejedor, G., . . . Carrion, F. (2013). Mesenchymal stem cells generate a CD4+CD25+Foxp3+ regulatory T cell population during the differentiation process of Th1 and Th17 cells. *Stem Cell Res Ther*, 4(3), 65. doi:10.1186/scrt216

Luz-Crawford, P., Tejedor, G., Mausset-Bonnefont, A. L., Beaulieu, E., Morand, E. F., Jorgensen, C., . . . Djouad, F. (2015). Glucocorticoid-induced leucine zipper governs the therapeutic potential of mesenchymal stem cells by inducing a switch from pathogenic to regulatory Th17 cells in a mouse model of collagen-induced arthritis. *Arthritis Rheumatol*, 67(6), 1514-1524. doi:10.1002/art.39069

Ma, T., Liu, H., Chen, W., Xia, X., Bai, X., Liang, L., . . . Liang, T. (2012). Implanted adipose-derived stem cells attenuate small-for-size liver graft injury by secretion of VEGF in rats. *Am J Transplant*, 12(3), 620-629. doi:10.1111/j.1600-6143.2011.03870.x

Ma, T., Sun, J., Zhao, Z., Lei, W., Chen, Y., Wang, X., . . . Shen, Z. (2017). A brief review: adipose-derived stem cells and their therapeutic potential in cardiovascular diseases. *Stem Cell Res Ther*, 8(1), 124. doi:10.1186/s13287-017-0585-3

Madrigal, M., Rao, K. S., & Riordan, N. H. (2014). A review of therapeutic effects of mesenchymal stem cell secretions and induction of secretory modification by different culture methods. *J Transl Med*, *12*, 260. doi:10.1186/s12967-014-0260-8

Maherali, N., Ahfeldt, T., Rigamonti, A., Utikal, J., Cowan, C., & Hochedlinger, K. (2008). A high-efficiency system for the generation and study of human induced pluripotent stem cells. *Cell Stem Cell*, *3*(3), 340-345. doi:10.1016/j.stem.2008.08.003

Makkar, R. R., Smith, R. R., Cheng, K., Malliaras, K., Thomson, L. E., Berman, D., . . . Marban, E. (2012). Intracoronary cardiosphere-derived cells for heart regeneration after myocardial infarction (CADUCEUS): a prospective, randomised phase 1 trial. *Lancet*, *379*(9819), 895-904. doi:10.1016/S0140-6736(12)60195-0

Mandai, M., Kurimoto, Y., & Takahashi, M. (2017). Autologous Induced Stem-Cell-Derived Retinal Cells for Macular Degeneration. *N Engl J Med*, *377*(8), 792-793. doi:10.1056/NEJMc1706274

Martin, G. R. (1981). Isolation of a pluripotent cell line from early mouse embryos cultured in medium conditioned by teratocarcinoma stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *78*(12), 7634-7638. doi:10.1073/pnas.78.12.7634

Mazo, M., Hernandez, S., Gavira, J. J., Abizanda, G., Arana, M., Lopez-Martinez, T., . . . Prosper, F. (2012). Treatment of reperfused ischemia with adipose-derived stem cells in a preclinical Swine model of myocardial infarction. *Cell Transplant*, *21*(12), 2723-2733. doi:10.3727/096368912X638847

Mazo, M., Planat-Benard, V., Abizanda, G., Pelacho, B., Leobon, B., Gavira, J. J., . . . Prosper, F. (2008). Transplantation of adipose derived stromal cells is associated with functional improvement in a rat model of chronic myocardial infarction. *Eur J Heart Fail*, *10*(5), 454-462. doi:10.1016/j.ejheart.2008.03.017

Mehlhorn, A. T., Zwingmann, J., Finkenzeller, G., Niemeyer, P., Dauner, M., Stark, B., . . . Schmal, H. (2009). Chondrogenesis of adipose-derived adult stem cells in a poly-lactide-co-glycolide scaffold. *Tissue Eng Part A*, *15*(5), 1159-1167. doi:10.1089/ten.tea.2008.0069

Meier, R. P., Mahou, R., Morel, P., Meyer, J., Montanari, E., Muller, Y. D., . . . Buhler, L. H. (2015). Microencapsulated human mesenchymal stem cells decrease liver fibrosis in mice. *J Hepatol*, *62*(3), 634-641. doi:10.1016/j.jhep.2014.10.030

Melief, S. M., Zwaginga, J. J., Fibbe, W. E., & Roelofs, H. (2013). Adipose tissue-derived multipotent stromal cells have a higher immunomodulatory capacity than their bone marrow-derived counterparts. *Stem Cells Transl Med*, *2*(6), 455-463. doi:10.5966/sctm.2012-0184

Merceron, C., Vinatier, C., Portron, S., Masson, M., Amiaud, J., Guigand, L., . . . Guicheux, J. (2010). Differential effects of hypoxia on osteochondrogenic potential of human adipose-derived stem cells. *Am J Physiol Cell Physiol*, *298*(2), C355-364. doi:10.1152/ajpcell.00398.2009

Messina, E., De Angelis, L., Frati, G., Morrone, S., Chimenti, S., Fiordaliso, F., . . . Giacomello, A. (2004). Isolation and expansion of adult cardiac stem cells from human and murine heart. *Circ Res*, *95*(9), 911-921. doi:10.1161/01.RES.0000147315.71699.51

Miranville, A., Heeschen, C., Sengenès, C., Curat, C. A., Busse, R., & Bouloumie, A. (2004). Improvement of postnatal neovascularization by human adipose tissue-derived stem cells. *Circulation*, *110*(3), 349-355. doi:10.1161/01.CIR.0000135466.16823.D0

Mirotsov, M., Jayawardena, T. M., Schmeckpeper, J., Gnechhi, M., & Dzau, V. J. (2011). Paracrine mechanisms of stem cell reparative and regenerative actions in the heart. *J Mol Cell Cardiol*, *50*(2), 280-289. doi:10.1016/j.yjmcc.2010.08.005

Miyahara, Y., Nagaya, N., Kataoka, M., Yanagawa, B., Tanaka, K., Hao, H., . . . Mori, H. (2006). Monolayered mesenchymal stem cells repair scarred myocardium after myocardial infarction. *Nat Med*, *12*(4), 459-465. doi:10.1038/nm1391

Miyamoto, S., Kawaguchi, N., Ellison, G. M., Matsuoka, R., Shin'oka, T., & Kurosawa, H. (2010). Characterization of long-term cultured c-kit<sup>+</sup> cardiac stem cells derived from adult rat hearts. *Stem Cells Dev*, *19*(1), 105-116. doi:10.1089/scd.2009.0041

Mizuno, H., Tobita, M., & Uysal, A. C. (2012). Concise review: Adipose-derived stem cells as a novel tool for future regenerative medicine. *Stem Cells*, *30*(5), 804-810. doi:10.1002/stem.1076

Mochizuki, M., & Nakahara, T. (2018). Establishment of xenogeneic serum-free culture methods for handling human dental pulp stem cells using clinically oriented in-vitro and in-vivo conditions. *Stem Cell Res Ther*, *9*(1), 25. doi:10.1186/s13287-017-0761-5

Mohr, A., & Zwacka, R. (2018). The future of mesenchymal stem cell-based therapeutic approaches for cancer - From cells to ghosts. *Cancer Lett*, *414*, 239-249. doi:10.1016/j.canlet.2017.11.025

Montanari, S., Dayan, V., Yannarelli, G., Billia, F., Viswanathan, S., Connelly, K. A., & Keating, A. (2015). Mesenchymal stromal cells improve cardiac function and left ventricular remodeling in a heart transplantation model. *J Heart Lung Transplant*, *34*(11), 1481-1488. doi:10.1016/j.healun.2015.05.008

Mosser, D. M., & Edwards, J. P. (2008). Exploring the full spectrum of macrophage activation. *Nat Rev Immunol*, *8*(12), 958-969. doi:10.1038/nri2448

Munoz, J., Shah, N., Rezvani, K., Hosing, C., Bollard, C. M., Oran, B., . . . Shpall, E. J. (2014). Concise review: umbilical cord blood transplantation: past, present, and future. *Stem Cells Transl Med*, *3*(12), 1435-1443. doi:10.5966/sctm.2014-0151

Mussano, F., Genova, T., Corsalini, M., Schierano, G., Pettini, F., Di Venere, D., & Carossa, S. (2017). Cytokine, Chemokine, and Growth Factor Profile Characterization of Undifferentiated and Osteoinduced Human Adipose-Derived Stem Cells. *Stem Cells Int*, 2017, 6202783. doi:10.1155/2017/6202783

Mylotte, L. A., Duffy, A. M., Murphy, M., O'Brien, T., Samali, A., Barry, F., & Szegezdi, E. (2008). Metabolic flexibility permits mesenchymal stem cell survival in an ischemic environment. *Stem Cells*, 26(5), 1325-1336. doi:10.1634/stemcells.2007-1072

Naderi, N., Wilde, C., Haque, T., Francis, W., Seifalian, A. M., Thornton, C. A., . . . Whitaker, I. S. (2014). Adipogenic differentiation of adipose-derived stem cells in 3-dimensional spheroid cultures (microtissue): implications for the reconstructive surgeon. *J Plast Reconstr Aesthet Surg*, 67(12), 1726-1734. doi:10.1016/j.bjps.2014.08.013

Nahrendorf, M., & Swirski, F. K. (2016). Abandoning M1/M2 for a Network Model of Macrophage Function. *Circ Res*, 119(3), 414-417. doi:10.1161/CIRCRESAHA.116.309194

Nahrendorf, M., Swirski, F. K., Aikawa, E., Stangenberg, L., Wurdinger, T., Figueiredo, J. L., . . . Pittet, M. J. (2007). The healing myocardium sequentially mobilizes two monocyte subsets with divergent and complementary functions. *J Exp Med*, 204(12), 3037-3047. doi:10.1084/jem.20070885

Najar, M., Raicevic, G., Boufker, H. I., Fayyad-Kazan, H., De Bruyn, C., Meuleman, N., . . . Lagneaux, L. (2010). Adipose-tissue-derived and Wharton's jelly-derived mesenchymal stromal cells suppress lymphocyte responses by secreting leukemia inhibitory factor. *Tissue Eng Part A*, 16(11), 3537-3546. doi:10.1089/ten.TEA.2010.0159

Nasseri, B. A., Ebell, W., Dandel, M., Kukucka, M., Gebker, R., Doltra, A., . . . Stamm, C. (2014). Autologous CD133+ bone marrow cells and bypass grafting for regeneration of ischaemic myocardium: the Cardio133 trial. *Eur Heart J*, 35(19), 1263-1274. doi:10.1093/eurheartj/ehu007

Nathan, C., & Ding, A. (2010). Nonresolving inflammation. *Cell*, *140*(6), 871-882. doi:10.1016/j.cell.2010.02.029

Nemeth, K., Leelahavanichkul, A., Yuen, P. S., Mayer, B., Parmelee, A., Doi, K., . . . Mezey, E. (2009). Bone marrow stromal cells attenuate sepsis via prostaglandin E(2)-dependent reprogramming of host macrophages to increase their interleukin-10 production. *Nat Med*, *15*(1), 42-49. doi:10.1038/nm.1905

Ng, A. P., & Alexander, W. S. (2017). Haematopoietic stem cells: past, present and future. *Cell Death Discov*, *3*, 17002. doi:10.1038/cddiscovery.2017.2

Niemeyer, P., Vohrer, J., Schmal, H., Kasten, P., Fellenberg, J., Suedkamp, N. P., & Mehlhorn, A. T. (2008). Survival of human mesenchymal stromal cells from bone marrow and adipose tissue after xenogenic transplantation in immunocompetent mice. *Cytotherapy*, *10*(8), 784-795. doi:10.1080/14653240802419302

Nigro, P., Bassetti, B., Cavallotti, L., Catto, V., Carbucicchio, C., & Pompilio, G. (2018). Cell therapy for heart disease after 15 years: Unmet expectations. *Pharmacol Res*, *127*, 77-91. doi:10.1016/j.phrs.2017.02.015

Noiseux, N., Gneccchi, M., Lopez-Illasaca, M., Zhang, L., Solomon, S. D., Deb, A., . . . Pratt, R. E. (2006). Mesenchymal stem cells overexpressing Akt dramatically repair infarcted myocardium and improve cardiac function despite infrequent cellular fusion or differentiation. *Mol Ther*, *14*(6), 840-850. doi:10.1016/j.ymthe.2006.05.016

Noiseux, N., Mansour, S., Weisel, R., Stevens, L. M., Der Sarkissian, S., Tsang, K., . . . Yau, T. M. (2016). The IMPACT-CABG trial: A multicenter, randomized clinical trial of CD133(+) stem cell therapy during coronary artery bypass grafting for ischemic cardiomyopathy. *J Thorac Cardiovasc Surg*, *152*(6), 1582-1588 e1582. doi:10.1016/j.jtcvs.2016.07.067

Nombela-Arrieta, C., Pivarnik, G., Winkel, B., Canty, K. J., Harley, B., Mahoney, J. E., . . . Silberstein, L. E. (2013). Quantitative imaging of haematopoietic stem and progenitor cell



localization and hypoxic status in the bone marrow microenvironment. *Nat Cell Biol*, 15(5), 533-543. doi:10.1038/ncb2730

Okura, H., Saga, A., Soeda, M., Miyagawa, S., Sawa, Y., Daimon, T., . . . Matsuyama, A. (2012). Intracoronary artery transplantation of cardiomyoblast-like cells from human adipose tissue-derived multi-lineage progenitor cells improve left ventricular dysfunction and survival in a swine model of chronic myocardial infarction. *Biochem Biophys Res Commun*, 425(4), 859-865. doi:10.1016/j.bbrc.2012.08.004

Ono, K., & Lindsey, E. S. (1969). Improved technique of heart transplantation in rats. *J Thorac Cardiovasc Surg*, 57(2), 225-229. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4884735>

Panther, F., Strasen, J., Czolbe, M., Lazariotou, M., Burkard, N., Williams, T., . . . Ritter, O. (2011). Inhibition of nuclear translocation of calcineurin suppresses T-cell activation and prevents acute rejection of donor hearts. *Transplantation*, 91(6), 597-604. doi:10.1097/TP.0b013e3182090f67

Park, I. H., Zhao, R., West, J. A., Yabuuchi, A., Huo, H., Ince, T. A., . . . Daley, G. Q. (2008). Reprogramming of human somatic cells to pluripotency with defined factors. *Nature*, 451(7175), 141-146. doi:10.1038/nature06534

Park, I. S., Chung, P. S., & Ahn, J. C. (2017). Adipose-derived stem cell spheroid treated with low-level light irradiation accelerates spontaneous angiogenesis in mouse model of hindlimb ischemia. *Cytotherapy*, 19(9), 1070-1078. doi:10.1016/j.jcyt.2017.06.005

Park, J. S., Yang, H. N., Woo, D. G., Jeon, S. Y., & Park, K. H. (2011). The promotion of chondrogenesis, osteogenesis, and adipogenesis of human mesenchymal stem cells by multiple growth factors incorporated into nanosphere-coated microspheres. *Biomaterials*, 32(1), 28-38. doi:10.1016/j.biomaterials.2010.08.088

Pasha, Z., Wang, Y., Sheikh, R., Zhang, D., Zhao, T., & Ashraf, M. (2008). Preconditioning enhances cell survival and differentiation of stem cells during transplantation in infarcted myocardium. *Cardiovasc Res*, 77(1), 134-142. doi:10.1093/cvr/cvm025

Patila, T., Lehtinen, M., Vento, A., Schildt, J., Sinisalo, J., Laine, M., . . . Harjula, A. (2014). Autologous bone marrow mononuclear cell transplantation in ischemic heart failure: a prospective, controlled, randomized, double-blind study of cell transplantation combined with coronary bypass. *J Heart Lung Transplant*, 33(6), 567-574. doi:10.1016/j.healun.2014.02.009

Paul, A., Chen, G., Khan, A., Rao, V. T., Shum-Tim, D., & Prakash, S. (2012). Genipin-cross-linked microencapsulated human adipose stem cells augment transplant retention resulting in attenuation of chronically infarcted rat heart fibrosis and cardiac dysfunction. *Cell Transplant*, 21(12), 2735-2751. doi:10.3727/096368912X637497

Peister, A., Mellad, J. A., Larson, B. L., Hall, B. M., Gibson, L. F., & Prockop, D. J. (2004). Adult stem cells from bone marrow (MSCs) isolated from different strains of inbred mice vary in surface epitopes, rates of proliferation, and differentiation potential. *Blood*, 103(5), 1662-1668. doi:10.1182/blood-2003-09-3070

Perin, E. C., Sanz-Ruiz, R., Sanchez, P. L., Lasso, J., Perez-Cano, R., Alonso-Farto, J. C., . . . Fernandez-Aviles, F. (2014). Adipose-derived regenerative cells in patients with ischemic cardiomyopathy: The PRECISE Trial. *Am Heart J*, 168(1), 88-95 e82. doi:10.1016/j.ahj.2014.03.022

Perin, E. C., Silva, G. V., Assad, J. A., Vela, D., Buja, L. M., Sousa, A. L., . . . Willerson, J. T. (2008). Comparison of intracoronary and transendocardial delivery of allogeneic mesenchymal cells in a canine model of acute myocardial infarction. *J Mol Cell Cardiol*, 44(3), 486-495. doi:10.1016/j.yjmcc.2007.09.012

Perin, E. C., Willerson, J. T., Pepine, C. J., Henry, T. D., Ellis, S. G., Zhao, D. X., . . . Cardiovascular Cell Therapy Research, N. (2012). Effect of transendocardial delivery of autologous bone

marrow mononuclear cells on functional capacity, left ventricular function, and perfusion in chronic heart failure: the FOCUS-CCTRN trial. *JAMA*, 307(16), 1717-1726. doi:10.1001/jama.2012.418

Perrault, L. P., Bidouard, J. P., Desjardins, N., Villeneuve, N., Vilaine, J. P., & Vanhoutte, P. M. (2002). Comparison of coronary endothelial dysfunction in the working and nonworking graft in porcine heterotopic heart transplantation. *Transplantation*, 74(6), 764-772. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12364853>

Pers, Y. M., Rackwitz, L., Ferreira, R., Pullig, O., Delfour, C., Barry, F., . . . Consortium, A. (2016). Adipose Mesenchymal Stromal Cell-Based Therapy for Severe Osteoarthritis of the Knee: A Phase I Dose-Escalation Trial. *Stem Cells Transl Med*, 5(7), 847-856. doi:10.5966/sctm.2015-0245

Petrenko, Y., Sykova, E., & Kubinova, S. (2017). The therapeutic potential of three-dimensional multipotent mesenchymal stromal cell spheroids. *Stem Cell Res Ther*, 8(1), 94. doi:10.1186/s13287-017-0558-6

Pinto, A. R., Paolicelli, R., Salimova, E., Gospocic, J., Slonimsky, E., Bilbao-Cortes, D., . . . Rosenthal, N. A. (2012). An abundant tissue macrophage population in the adult murine heart with a distinct alternatively-activated macrophage profile. *PLoS One*, 7(5), e36814. doi:10.1371/journal.pone.0036814

Planat-Benard, V., Silvestre, J. S., Cousin, B., Andre, M., Nibbelink, M., Tamarat, R., . . . Casteilla, L. (2004). Plasticity of human adipose lineage cells toward endothelial cells: physiological and therapeutic perspectives. *Circulation*, 109(5), 656-663. doi:10.1161/01.CIR.0000114522.38265.61

Potapova, I. A., Gaudette, G. R., Brink, P. R., Robinson, R. B., Rosen, M. R., Cohen, I. S., & Doronin, S. V. (2007). Mesenchymal stem cells support migration, extracellular matrix invasion, proliferation, and survival of endothelial cells in vitro. *Stem Cells*, 25(7), 1761-1768. doi:10.1634/stemcells.2007-0022

Preda, M. B., Ronningen, T., Burlacu, A., Simionescu, M., Moskaug, J. O., & Valen, G. (2014). Remote transplantation of mesenchymal stem cells protects the heart against ischemia-reperfusion injury. *Stem Cells*, 32(8), 2123-2134. doi:10.1002/stem.1687

Ptaszek, L. M., Mansour, M., Ruskin, J. N., & Chien, K. R. (2012). Towards regenerative therapy for cardiac disease. *Lancet*, 379(9819), 933-942. doi:10.1016/S0140-6736(12)60075-0

Puissant, B., Barreau, C., Bourin, P., Clavel, C., Corre, J., Bousquet, C., . . . Blancher, A. (2005). Immunomodulatory effect of human adipose tissue-derived adult stem cells: comparison with bone marrow mesenchymal stem cells. *Br J Haematol*, 129(1), 118-129. doi:10.1111/j.1365-2141.2005.05409.x

Qiu, G., Zheng, G., Ge, M., Huang, L., Tong, H., Chen, P., . . . Xu, J. (2017). Adipose-derived mesenchymal stem cells modulate CD14(++)CD16(+) expression on monocytes from sepsis patients in vitro via prostaglandin E2. *Stem Cell Res Ther*, 8(1), 97. doi:10.1186/s13287-017-0546-x

Raaijmakers, M. H., Mukherjee, S., Guo, S., Zhang, S., Kobayashi, T., Schoonmaker, J. A., . . . Scadden, D. T. (2010). Bone progenitor dysfunction induces myelodysplasia and secondary leukaemia. *Nature*, 464(7290), 852-857. doi:10.1038/nature08851

Ranganath, S. H., Levy, O., Inamdar, M. S., & Karp, J. M. (2012). Harnessing the mesenchymal stem cell secretome for the treatment of cardiovascular disease. *Cell Stem Cell*, 10(3), 244-258. doi:10.1016/j.stem.2012.02.005

Rangappa, S., Fen, C., Lee, E. H., Bongso, A., & Sim, E. K. (2003). Transformation of adult mesenchymal stem cells isolated from the fatty tissue into cardiomyocytes. *Ann Thorac Surg*, 75(3), 775-779. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12645692>

Rehman, J., Traktuev, D., Li, J., Merfeld-Clauss, S., Temm-Grove, C. J., Bovenkerk, J. E., . . . March, K. L. (2004). Secretion of angiogenic and antiapoptotic factors by human adipose stromal cells. *Circulation*, 109(10), 1292-1298. doi:10.1161/01.CIR.0000121425.42966.F1

Reinders, M. E., de Fijter, J. W., Roelofs, H., Bajema, I. M., de Vries, D. K., Schaapherder, A. F., . . . Rabelink, T. J. (2013). Autologous bone marrow-derived mesenchymal stromal cells for the treatment of allograft rejection after renal transplantation: results of a phase I study. *Stem Cells Transl Med*, 2(2), 107-111. doi:10.5966/sctm.2012-0114

Reinders, M. E., Dreyer, G. J., Bank, J. R., Roelofs, H., Heidt, S., Roelen, D. L., . . . de Fijter, J. W. (2015). Safety of allogeneic bone marrow derived mesenchymal stromal cell therapy in renal transplant recipients: the neptune study. *J Transl Med*, 13, 344. doi:10.1186/s12967-015-0700-0

Ren, G., Zhang, L., Zhao, X., Xu, G., Zhang, Y., Roberts, A. I., . . . Shi, Y. (2008). Mesenchymal stem cell-mediated immunosuppression occurs via concerted action of chemokines and nitric oxide. *Cell Stem Cell*, 2(2), 141-150. doi:10.1016/j.stem.2007.11.014

Renner, P., Eggenhofer, E., Rosenauer, A., Popp, F. C., Steinmann, J. F., Slowik, P., . . . Dahlke, M. H. (2009). Mesenchymal stem cells require a sufficient, ongoing immune response to exert their immunosuppressive function. *Transplant Proc*, 41(6), 2607-2611. doi:10.1016/j.transproceed.2009.06.119

Rigol, M., Solanes, N., Roura, S., Roque, M., Novensa, L., Dantas, A. P., . . . Heras, M. (2014). Allogeneic adipose stem cell therapy in acute myocardial infarction. *Eur J Clin Invest*, 44(1), 83-92. doi:10.1111/eci.12195

Riis, S., Stensballe, A., Emmersen, J., Pennisi, C. P., Birkelund, S., Zachar, V., & Fink, T. (2016). Mass spectrometry analysis of adipose-derived stem cells reveals a significant effect of hypoxia on pathways regulating extracellular matrix. *Stem Cell Res Ther*, 7(1), 52. doi:10.1186/s13287-016-0310-7

Riordan, N. H., Ichim, T. E., Min, W. P., Wang, H., Solano, F., Lara, F., . . . Minev, B. (2009). Non-expanded adipose stromal vascular fraction cell therapy for multiple sclerosis. *J Transl Med*, 7, 29. doi:10.1186/1479-5876-7-29

Ripa, R. S., Jorgensen, E., Wang, Y., Thune, J. J., Nilsson, J. C., Sondergaard, L., . . . Kastrup, J. (2006). Stem cell mobilization induced by subcutaneous granulocyte-colony stimulating factor to improve cardiac regeneration after acute ST-elevation myocardial infarction: result of the double-blind, randomized, placebo-controlled stem cells in myocardial infarction (STEMMI) trial. *Circulation*, *113*(16), 1983-1992. doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.105.610469

Rizk, M., Monaghan, M., Shorr, R., Kekre, N., Bredeson, C. N., & Allan, D. S. (2016). Heterogeneity in Studies of Mesenchymal Stromal Cells to Treat or Prevent Graft-versus-Host Disease: A Scoping Review of the Evidence. *Biol Blood Marrow Transplant*, *22*(8), 1416-1423. doi:10.1016/j.bbmt.2016.04.010

Robinton, D. A., & Daley, G. Q. (2012). The promise of induced pluripotent stem cells in research and therapy. *Nature*, *481*(7381), 295-305. doi:10.1038/nature10761

Robles, J. D., Liu, Y. P., Cao, J., Xiang, Z., Cai, Y., Manio, M., . . . Chan, G. C. (2015). Immunosuppressive mechanisms of human bone marrow derived mesenchymal stromal cells in BALB/c host graft versus host disease murine models. *Exp Hematol Oncol*, *4*, 13. doi:10.1186/s40164-015-0007-0

Rodriguez, A. M., Pisani, D., Dechesne, C. A., Turc-Carel, C., Kurzenne, J. Y., Wdziekonski, B., . . . Dani, C. (2005). Transplantation of a multipotent cell population from human adipose tissue induces dystrophin expression in the immunocompetent mdx mouse. *J Exp Med*, *201*(9), 1397-1405. doi:10.1084/jem.20042224

Roemeling-van Rhijn, M., Reinders, M. E., Franquesa, M., Engela, A. U., Korevaar, S. S., Roelofs, H., . . . Hoogduijn, M. J. (2013). Human Allogeneic Bone Marrow and Adipose Tissue Derived Mesenchymal Stromal Cells Induce CD8+ Cytotoxic T Cell Reactivity. *J Stem Cell Res Ther*, *3*(Suppl 6), 004. doi:10.4172/2157-7633.S6-004

Rowe, R. G., & Daley, G. Q. (2019). Induced pluripotent stem cells in disease modelling and drug discovery. *Nat Rev Genet*, *20*(7), 377-388. doi:10.1038/s41576-019-0100-z

Sager, H. B., Kessler, T., & Schunkert, H. (2017). Monocytes and macrophages in cardiac injury and repair. *J Thorac Dis*, 9(Suppl 1), S30-S35. doi:10.21037/jtd.2016.11.17

Sahoo, S., & Losordo, D. W. (2014). Exosomes and cardiac repair after myocardial infarction. *Circ Res*, 114(2), 333-344. doi:10.1161/CIRCRESAHA.114.300639

Sajic, M., Hunt, D. P., Lee, W., Compston, D. A., Schweimer, J. V., Gregson, N. A., . . . Smith, K. J. (2012). Mesenchymal stem cells lack efficacy in the treatment of experimental autoimmune neuritis despite in vitro inhibition of T-cell proliferation. *PLoS One*, 7(2), e30708. doi:10.1371/journal.pone.0030708

Salamon, A., Adam, S., Rychly, J., & Peters, K. (2014). Long-term tumor necrosis factor treatment induces NFkappaB activation and proliferation, but not osteoblastic differentiation of adipose tissue-derived mesenchymal stem cells in vitro. *Int J Biochem Cell Biol*, 54, 149-162. doi:10.1016/j.biocel.2014.07.014

Sanz-Ruiz, R., Fernandez-Santos, E., Dominguez-Munoz, M., Parma, R., Villa, A., Fernandez, L., . . . Fernandez-Aviles, F. (2009). Early translation of adipose-derived cell therapy for cardiovascular disease. *Cell Transplant*, 18(3), 245-254. doi:10.3727/096368909788534889

Sart, S., Tsai, A. C., Li, Y., & Ma, T. (2014). Three-dimensional aggregates of mesenchymal stem cells: cellular mechanisms, biological properties, and applications. *Tissue Eng Part B Rev*, 20(5), 365-380. doi:10.1089/ten.TEB.2013.0537

Sato, Y., Araki, H., Kato, J., Nakamura, K., Kawano, Y., Kobune, M., . . . Niitsu, Y. (2005). Human mesenchymal stem cells xenografted directly to rat liver are differentiated into human hepatocytes without fusion. *Blood*, 106(2), 756-763. doi:10.1182/blood-2005-02-0572

Saxena, A., Fish, J. E., White, M. D., Yu, S., Smyth, J. W., Shaw, R. M., . . . Srivastava, D. (2008). Stromal cell-derived factor-1alpha is cardioprotective after myocardial infarction. *Circulation*, 117(17), 2224-2231. doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.107.694992

Schrepfer, S., Deuse, T., Reichenspurner, H., Fischbein, M. P., Robbins, R. C., & Pelletier, M. P. (2007). Stem cell transplantation: the lung barrier. *Transplant Proc*, 39(2), 573-576. doi:10.1016/j.transproceed.2006.12.019

Schwartz, S. D., Hubschman, J. P., Heilwell, G., Franco-Cardenas, V., Pan, C. K., Ostrick, R. M., . . . Lanza, R. (2012). Embryonic stem cell trials for macular degeneration: a preliminary report. *Lancet*, 379(9817), 713-720. doi:10.1016/S0140-6736(12)60028-2

Segers, V. F., & Lee, R. T. (2010). Protein therapeutics for cardiac regeneration after myocardial infarction. *J Cardiovasc Transl Res*, 3(5), 469-477. doi:10.1007/s12265-010-9207-5

Shabbir, A., Zisa, D., Suzuki, G., & Lee, T. (2009). Heart failure therapy mediated by the trophic activities of bone marrow mesenchymal stem cells: a noninvasive therapeutic regimen. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 296(6), H1888-1897. doi:10.1152/ajpheart.00186.2009

Shake, J. G., Gruber, P. J., Baumgartner, W. A., Senechal, G., Meyers, J., Redmond, J. M., . . . Martin, B. J. (2002). Mesenchymal stem cell implantation in a swine myocardial infarct model: engraftment and functional effects. *Ann Thorac Surg*, 73(6), 1919-1925; discussion 1926. doi:10.1016/s0003-4975(02)03517-8

Shi, Y., Inoue, H., Wu, J. C., & Yamanaka, S. (2017). Induced pluripotent stem cell technology: a decade of progress. *Nat Rev Drug Discov*, 16(2), 115-130. doi:10.1038/nrd.2016.245

Shi, Y., Wang, Y., Li, Q., Liu, K., Hou, J., Shao, C., & Wang, Y. (2018). Immunoregulatory mechanisms of mesenchymal stem and stromal cells in inflammatory diseases. *Nat Rev Nephrol*, 14(8), 493-507. doi:10.1038/s41581-018-0023-5

Siminovitch, L., McCulloch, E. A., & Till, J. E. (1963). The Distribution of Colony-Forming Cells among Spleen Colonies. *J Cell Comp Physiol*, 62, 327-336. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14086156>



Song, W.-J., Li, Q., Ryu, M.-O., Ahn, J.-O., Ha Bhang, D., Chan Jung, Y., & Youn, H.-Y. (2017). TSG-6 Secreted by Human Adipose Tissue-derived Mesenchymal Stem Cells Ameliorates DSS-induced colitis by Inducing M2 Macrophage Polarization in Mice. *Scientific Reports*, 7(1). doi:10.1038/s41598-017-04766-7

Song, W. K., Park, K. M., Kim, H. J., Lee, J. H., Choi, J., Chong, S. Y., . . . Lanza, R. (2015). Treatment of macular degeneration using embryonic stem cell-derived retinal pigment epithelium: preliminary results in Asian patients. *Stem Cell Reports*, 4(5), 860-872. doi:10.1016/j.stemcr.2015.04.005

Sorrell, J. M., & Caplan, A. I. (2010). Topical delivery of mesenchymal stem cells and their function in wounds. *Stem Cell Res Ther*, 1(4), 30. doi:10.1186/scrt30

Stadtfeld, M., Brennand, K., & Hochedlinger, K. (2008). Reprogramming of pancreatic beta cells into induced pluripotent stem cells. *Curr Biol*, 18(12), 890-894. doi:10.1016/j.cub.2008.05.010

Sun, C. K., Yen, C. H., Lin, Y. C., Tsai, T. H., Chang, L. T., Kao, Y. H., . . . Yip, H. K. (2011). Autologous transplantation of adipose-derived mesenchymal stem cells markedly reduced acute ischemia-reperfusion lung injury in a rodent model. *J Transl Med*, 9, 118. doi:10.1186/1479-5876-9-118

Sun, N., Panetta, N. J., Gupta, D. M., Wilson, K. D., Lee, A., Jia, F., . . . Wu, J. C. (2009). Feeder-free derivation of induced pluripotent stem cells from adult human adipose stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 106(37), 15720-15725. doi:10.1073/pnas.0908450106

Suzuki, G., Iyer, V., Lee, T. C., & Canty, J. M., Jr. (2011). Autologous mesenchymal stem cells mobilize cKit+ and CD133+ bone marrow progenitor cells and improve regional function in hibernating myocardium. *Circ Res*, 109(9), 1044-1054. doi:10.1161/CIRCRESAHA.111.245969

Szanto, S., Bardos, T., Gal, I., Glant, T. T., & Mikecz, K. (2004). Enhanced neutrophil extravasation and rapid progression of proteoglycan-induced arthritis in TSG-6-knockout mice. *Arthritis Rheum*, *50*(9), 3012-3022. doi:10.1002/art.20655

Takahashi, K., & Yamanaka, S. (2006). Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell*, *126*(4), 663-676. doi:10.1016/j.cell.2006.07.024

Tan, J., Wu, W., Xu, X., Liao, L., Zheng, F., Messinger, S., . . . Ricordi, C. (2012). Induction therapy with autologous mesenchymal stem cells in living-related kidney transplants: a randomized controlled trial. *JAMA*, *307*(11), 1169-1177. doi:10.1001/jama.2012.316

Tang, J., Wang, J., Guo, L., Kong, X., Yang, J., Zheng, F., . . . Huang, Y. (2010). Mesenchymal stem cells modified with stromal cell-derived factor 1 alpha improve cardiac remodeling via paracrine activation of hepatocyte growth factor in a rat model of myocardial infarction. *Mol Cells*, *29*(1), 9-19. doi:10.1007/s10059-010-0001-7

Tang, W., Zeve, D., Suh, J. M., Bosnakovski, D., Kyba, M., Hammer, R. E., . . . Graff, J. M. (2008). White fat progenitor cells reside in the adipose vasculature. *Science*, *322*(5901), 583-586. doi:10.1126/science.1156232

Thomson, J. A., Itskovitz-Eldor, J., Shapiro, S. S., Waknitz, M. A., Swiergiel, J. J., Marshall, V. S., & Jones, J. M. (1998). Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science*, *282*(5391), 1145-1147. doi:10.1126/science.282.5391.1145

Tobin, L. M., Healy, M. E., English, K., & Mahon, B. P. (2013). Human mesenchymal stem cells suppress donor CD4(+) T cell proliferation and reduce pathology in a humanized mouse model of acute graft-versus-host disease. *Clin Exp Immunol*, *172*(2), 333-348. doi:10.1111/cei.12056

Toma, C., Pittenger, M. F., Cahill, K. S., Byrne, B. J., & Kessler, P. D. (2002). Human mesenchymal stem cells differentiate to a cardiomyocyte phenotype in the adult murine heart. *Circulation*, *105*(1), 93-98. doi:10.1161/hc0102.101442

Trayhurn, P., & Wood, I. S. (2005). Signalling role of adipose tissue: adipokines and inflammation in obesity. *Biochem Soc Trans*, *33*(Pt 5), 1078-1081. doi:10.1042/BST20051078

Trounson, A., & DeWitt, N. D. (2016). Pluripotent stem cells progressing to the clinic. *Nat Rev Mol Cell Biol*, *17*(3), 194-200. doi:10.1038/nrm.2016.10

Trounson, A., & McDonald, C. (2015). Stem Cell Therapies in Clinical Trials: Progress and Challenges. *Cell Stem Cell*, *17*(1), 11-22. doi:10.1016/j.stem.2015.06.007

Uccelli, A., Milanese, M., Principato, M. C., Morando, S., Bonifacino, T., Vergani, L., . . . Bonanno, G. (2012). Intravenous mesenchymal stem cells improve survival and motor function in experimental amyotrophic lateral sclerosis. *Mol Med*, *18*, 794-804. doi:10.2119/molmed.2011.00498

van de Rijn, M., Heimfeld, S., Spangrude, G. J., & Weissman, I. L. (1989). Mouse hematopoietic stem-cell antigen Sca-1 is a member of the Ly-6 antigen family. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *86*(12), 4634-4638. doi:10.1073/pnas.86.12.4634

VanWagner, L. B., Ning, H., Whitsett, M., Levitsky, J., Uttal, S., Wilkins, J. T., . . . Lloyd-Jones, D. M. (2017). A point-based prediction model for cardiovascular risk in orthotopic liver transplantation: The CAR-OLT score. *Hepatology*, *66*(6), 1968-1979. doi:10.1002/hep.29329

Wakayama, K., Fukai, M., Yamashita, K., Kimura, T., Hirokata, G., Shibasaki, S., . . . Todo, S. (2012). Successful transplantation of rat hearts subjected to extended cold preservation with a novel preservation solution. *Transpl Int*, *25*(6), 696-706. doi:10.1111/j.1432-2277.2012.01469.x

Wan, C. D., Cheng, R., Wang, H. B., & Liu, T. (2008). Immunomodulatory effects of mesenchymal stem cells derived from adipose tissues in a rat orthotopic liver transplantation model. *Hepatobiliary Pancreat Dis Int*, 7(1), 29-33. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18234635>

Wang, K., Jiang, Z., Webster, K. A., Chen, J., Hu, H., Zhou, Y., . . . Wang, J. (2017). Enhanced Cardioprotection by Human Endometrium Mesenchymal Stem Cells Driven by Exosomal MicroRNA-21. *Stem Cells Transl Med*, 6(1), 209-222. doi:10.5966/sctm.2015-0386

Wang, L., Deng, J., Tian, W., Xiang, B., Yang, T., Li, G., . . . Tian, G. (2009). Adipose-derived stem cells are an effective cell candidate for treatment of heart failure: an MR imaging study of rat hearts. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 297(3), H1020-1031. doi:10.1152/ajpheart.01082.2008

Wang, L., Wang, L., Cong, X., Liu, G., Zhou, J., Bai, B., . . . Liu, Y. (2013). Human umbilical cord mesenchymal stem cell therapy for patients with active rheumatoid arthritis: safety and efficacy. *Stem Cells Dev*, 22(24), 3192-3202. doi:10.1089/scd.2013.0023

Wang, L. T., Ting, C. H., Yen, M. L., Liu, K. J., Sytwu, H. K., Wu, K. K., & Yen, B. L. (2016). Human mesenchymal stem cells (MSCs) for treatment towards immune- and inflammation-mediated diseases: review of current clinical trials. *J Biomed Sci*, 23(1), 76. doi:10.1186/s12929-016-0289-5

Wang, M., Zhang, W., Crisostomo, P., Markel, T., Meldrum, K. K., Fu, X. Y., & Meldrum, D. R. (2007). STAT3 mediates bone marrow mesenchymal stem cell VEGF production. *J Mol Cell Cardiol*, 42(6), 1009-1015. doi:10.1016/j.yjmcc.2007.04.010

Wang, N., Zhang, R., Wang, S. J., Zhang, C. L., Mao, L. B., Zhuang, C. Y., . . . Zhang, T. C. (2013). Vascular endothelial growth factor stimulates endothelial differentiation from mesenchymal stem cells via Rho/myocardin-related transcription factor--a signaling pathway. *Int J Biochem Cell Biol*, 45(7), 1447-1456. doi:10.1016/j.biocel.2013.04.021

Wisniewski, H. G., & Vilcek, J. (2004). Cytokine-induced gene expression at the crossroads of innate immunity, inflammation and fertility: TSG-6 and PTX3/TSG-14. *Cytokine Growth Factor Rev*, 15(2-3), 129-146. doi:10.1016/j.cytogfr.2004.01.005

Wolbank, S., Peterbauer, A., Fahrner, M., Hennerbichler, S., van Griensven, M., Stadler, G., . . . Gabriel, C. (2007). Dose-dependent immunomodulatory effect of human stem cells from amniotic membrane: a comparison with human mesenchymal stem cells from adipose tissue. *Tissue Eng*, 13(6), 1173-1183. doi:10.1089/ten.2006.0313

Wollert, K. C., & Drexler, H. (2010). Cell therapy for the treatment of coronary heart disease: a critical appraisal. *Nat Rev Cardiol*, 7(4), 204-215. doi:10.1038/nrcardio.2010.1

Wu, Z., Zhang, S., Zhou, L., Cai, J., Tan, J., Gao, X., . . . Li, D. (2017). Thromboembolism Induced by Umbilical Cord Mesenchymal Stem Cell Infusion: A Report of Two Cases and Literature Review. *Transplant Proc*, 49(7), 1656-1658. doi:10.1016/j.transproceed.2017.03.078

Xu, R., Zhang, F., Chai, R., Zhou, W., Hu, M., Liu, B., . . . Liu, S. (2019). Exosomes derived from pro-inflammatory bone marrow-derived mesenchymal stem cells reduce inflammation and myocardial injury via mediating macrophage polarization. *J Cell Mol Med*. doi:10.1111/jcmm.14635

Yagi, H., Soto-Gutierrez, A., Kitagawa, Y., Tilles, A. W., Tompkins, R. G., & Yarmush, M. L. (2010). Bone marrow mesenchymal stromal cells attenuate organ injury induced by LPS and burn. *Cell Transplant*, 19(6), 823-830. doi:10.3727/096368910X508942

Yang, F., Cho, S. W., Son, S. M., Bogatyrev, S. R., Singh, D., Green, J. J., . . . Anderson, D. G. (2010). Genetic engineering of human stem cells for enhanced angiogenesis using biodegradable polymeric nanoparticles. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 107(8), 3317-3322. doi:10.1073/pnas.0905432106

Ylostalo, J. H., Bartosh, T. J., Coble, K., & Prockop, D. J. (2012). Human mesenchymal stem/stromal cells cultured as spheroids are self-activated to produce prostaglandin E2 that

directs stimulated macrophages into an anti-inflammatory phenotype. *Stem Cells*, 30(10), 2283-2296. doi:10.1002/stem.1191

Yoshimura, K., Asano, Y., Aoi, N., Kurita, M., Oshima, Y., Sato, K., . . . Harii, K. (2010). Progenitor-enriched adipose tissue transplantation as rescue for breast implant complications. *Breast J*, 16(2), 169-175. doi:10.1111/j.1524-4741.2009.00873.x

Yoshimura, K., Sato, K., Aoi, N., Kurita, M., Inoue, K., Suga, H., . . . Harii, K. (2008). Cell-assisted lipotransfer for facial lipoatrophy: efficacy of clinical use of adipose-derived stem cells. *Dermatol Surg*, 34(9), 1178-1185. doi:10.1111/j.1524-4725.2008.34256.x

Zanotti, L., Sarukhan, A., Dander, E., Castor, M., Cibella, J., Soldani, C., . . . Viola, A. (2013). Encapsulated mesenchymal stem cells for in vivo immunomodulation. *Leukemia*, 27(2), 500-503. doi:10.1038/leu.2012.202

Zappia, E., Casazza, S., Pedemonte, E., Benvenuto, F., Bonanni, I., Gerdoni, E., . . . Uccelli, A. (2005). Mesenchymal stem cells ameliorate experimental autoimmune encephalomyelitis inducing T-cell anergy. *Blood*, 106(5), 1755-1761. doi:10.1182/blood-2005-04-1496

Zhang, R., Jack, G. S., Rao, N., Zuk, P., Ignarro, L. J., Wu, B., & Rodriguez, L. V. (2012). Nuclear fusion-independent smooth muscle differentiation of human adipose-derived stem cells induced by a smooth muscle environment. *Stem Cells*, 30(3), 481-490. doi:10.1002/stem.1023

Zhang, X., Hu, M. G., Pan, K., Li, C. H., & Liu, R. (2016). 3D Spheroid Culture Enhances the Expression of Antifibrotic Factors in Human Adipose-Derived MSCs and Improves Their Therapeutic Effects on Hepatic Fibrosis. *Stem Cells Int*, 2016, 4626073. doi:10.1155/2016/4626073

Zhang, Z., Li, S., Cui, M., Gao, X., Sun, D., Qin, X., . . . Cao, F. (2013). Rosuvastatin enhances the therapeutic efficacy of adipose-derived mesenchymal stem cells for myocardial infarction via

PI3K/Akt and MEK/ERK pathways. *Basic Res Cardiol*, 108(2), 333. doi:10.1007/s00395-013-0333-5

Zhao, M., Perry, J. M., Marshall, H., Venkatraman, A., Qian, P., He, X. C., . . . Li, L. (2014). Megakaryocytes maintain homeostatic quiescence and promote post-injury regeneration of hematopoietic stem cells. *Nat Med*, 20(11), 1321-1326. doi:10.1038/nm.3706

Zhou, Z., Chen, Y., Zhang, H., Min, S., Yu, B., He, B., & Jin, A. (2013). Comparison of mesenchymal stromal cells from human bone marrow and adipose tissue for the treatment of spinal cord injury. *Cytotherapy*, 15(4), 434-448. doi:10.1016/j.jcyt.2012.11.015

Zimmermann, J. A., & McDevitt, T. C. (2014). Pre-conditioning mesenchymal stromal cell spheroids for immunomodulatory paracrine factor secretion. *Cytotherapy*, 16(3), 331-345. doi:10.1016/j.jcyt.2013.09.004

Zuk, P. (2013). Adipose-Derived Stem Cells in Tissue Regeneration: A Review. *ISRN Stem Cells*, 2013, 1-35. doi:10.1155/2013/713959

Zuk, P. A., Zhu, M., Ashjian, P., De Ugarte, D. A., Huang, J. I., Mizuno, H., . . . Hedrick, M. H. (2002). Human adipose tissue is a source of multipotent stem cells. *Mol Biol Cell*, 13(12), 4279-4295. doi:10.1091/mbc.e02-02-0105





## **Annexe 1 : Manuscrit #4**

### **Mise en contexte**

Ce manuscrit rapporte les résultats d'un projet réalisé dans le cadre de l'obtention du grade de doctorat par un autre étudiant du laboratoire en codirection avec Dr Louis Perrault, Anthony Nguyen MD. Son projet expérimente également l'impact thérapeutique des ASC sous forme de SB dans un modèle de greffe hétérotopique chez le rat. Ma participation dans ce projet englobe toute la partie in vitro, i.e. la réalisation des SB pour injection in vivo, la stimulation des cellules ML et SB pour analyses du surnageant par techniques d'ELISA et de Luminex.

Brièvement, les SB sont appliqués sur le greffon cardiaque afin d'évaluer si ceux-ci, grâce au sécrétome enrichi, pouvaient réduire la fibrose et l'inflammation tout en favorisant l'angiogenèse, pour ainsi réduire la vasculopathie associée au rejet chronique du greffon cardiaque. Le modèle animal utilisé et décrit dans ce manuscrit a été développé dans les années 60 et implique la transplantation abdominale d'un cœur de la souche de rat Fisher sur un rat Lewis afin de provoquer le rejet. Une caractérisation de la fibrose, de l'inflammation et de la vascularisation du greffon est effectuée pour déterminer l'impact thérapeutique des SB.

Ce manuscrit est en révision pour publication dans le Journal Of Thoracic and Cardiovascular Surgery.

**Adipose-Derived Mesenchymal Stem Cells cultured as spheroids improve cardiac allograft vasculopathy development in a heart transplantation model**

Anthony Nguyen MD, MSc <sup>a,ct</sup>, Celia Sid-Otmane MSc<sup>b,ct</sup>, Martin G. Sirois PhD<sup>c</sup>, Marie-Elaine Clavet<sup>c</sup>, Louis-P. Perrault MD, PhD <sup>a,c</sup>, and Hung Q. Ly MD, MSc<sup>b,c</sup>

*<sup>†</sup>These authors contributed equally to this work as first coauthors*

<sup>a</sup> Department of Cardiovascular Surgery, Montreal Heart Institute and Université de Montréal, Montreal, Quebec, Canada

<sup>b</sup> Department of Cardiology, Montreal Heart Institute and Université de Montréal, Montreal, Quebec, Canada

<sup>c</sup> Research center, Montreal Heart Institute and Université de Montréal, Montreal, Quebec, Canada

**Word Count: 4917**

**Abstract Word Count: 237**

---

\* Corresponding author: Hung Quoc Ly, MD, SM, FRCPC, Department of Cardiology, Montreal Heart Institute, 5000 Belanger Street, Montreal, Quebec H1T 1C8, Canada. Tel.: 514-376-3330 (Ext. 2438). Fax: 514-593-6299. E-mail: qh.ly@umontreal.ca

## Abstract

**BACKGROUND:** Cardiac transplantation remains the definitive therapy for eligible patients with end-stage heart failure. Beyond the first-year post-transplant period, cardiac allograft vasculopathy (CAV) represents one of the major causes of death, which implies immunologic and non-immunologic factors. Adipose tissue is a rich and convenient source of stem cells for therapeutic application. Adipose-derived stromal cells (ASC) represent a promising cell population in heart disease. The study aim was to investigate the effects of epicardial delivery of an ASC matrix in a rat model of heterotopic abdominal heart transplantation (HAHT) associated with CAV.

**METHODS:** Hearts of wild-type Fischer 344 rats were harvested and transplanted heterotopically into the abdomen of recipient wild-type Lewis rats (n=20). After HAHT, ASCs cultured as 3D spheroid bodies (SB) were injected on epicardial patch into transplanted hearts of animals in the experimental group (n=10), whereas controls received normal saline (NS). Immunohistochemistry was performed to determine neutrophil presence, apoptosis and angiogenesis in the allograft.

**RESULTS:** *In vitro*, the ASC SBs showed enhanced anti-inflammatory properties compared to monolayer cultured ASCs. Levels of VEGF, IL-6, IL-8 and MCP-1 were significantly more elevated in 3D spheroids ASCs compared to monolayer ASCs. *In vivo*, 14 days after injection, confocal immunofluorescence identified ASCs into the allograft myocardium but also in lower proportion in the host native heart. An improvement in ventricular remodeling and reduction in cardiac fibrosis were observed by immuno-histochemical analysis and confirmed by cardiac magnetic resonance imaging in the ASC group. Reduced apoptosis was observed but no effect on angiogenesis could be detected using CD31 immunostaining.

**CONCLUSIONS:** Epicardial delivery of spheroids ASCs positively impacted ventricular remodeling, reduced cardiac fibrosis, and decreased cardiomyocyte apoptosis of the transplanted heart in a rat model of HAHT. In this setting, 3D spheroids ASCs improved anti-inflammatory properties compared to monolayer cultured ASCs.

**Keywords:** Cardiac allograft vasculopathy – other ▪ Heart failure ▪ Heterotopic heart transplant model

## INTRODUCTION

Currently, orthotopic heart transplantation remains the only curative treatment for irreversible post-infarct damage, despite recent advances in mechanical support techniques.<sup>1</sup> However, the shortage of cardiac grafts has limited access to transplant and the incidence of end-stage heart failure (HF) is still increasing across developed countries due to aging population.<sup>2</sup>

Considerable improvement in the prevention and treatment of acute rejection has been achieved over the past 20 years.<sup>2</sup> Greater understanding of transplant immunology combined with an increasingly effective and targeted use of immunosuppressive treatments has improved short-term survival in transplant patients. However, improvement in the long-term success of organ transplantation remains limited, mainly compromised by the occurrence of cardiac allograft vasculopathy (CAV). The factors determining the occurrence of CAV are multiple, involving immunological and non-immunological mechanisms. Graft vascular disease remains one of the determining factors for the occurrence of chronic allograft dysfunction. This remains one of the main causes of early graft loss following heart transplant. The registry of the International Society of Cardiac and Lung Transplantation (ISHLT) reports the survival rates of heart transplants at five and ten years to be 60 and 45%, respectively.<sup>3</sup> This registry also indicates that angiographic evidence of chronic coronary lesions are documented in 8% of survivors at one year, 32% at five years and 43% at eight years. Furthermore, recent work has suggested that the impact of graft vascular disease would be underestimated in kidney or liver transplant<sup>4,5</sup>.

Bone marrow mesenchymal stem cells (BM-MSCs) are multipotent stromal cells whose cardiac tissue repair properties have been studied for many years.<sup>6</sup> In preclinical<sup>7</sup> and clinical studies<sup>8, 9</sup>, MSCs demonstrated improvement in left ventricular ejection fraction (LVEF),

ventricular remodeling and reduction of myocardial scar size. Recent reports have demonstrated promising results with adipose-derived stem cells (ASCs) in cardiac regenerative medicine due to their unique anti-apoptotic, anti-inflammatory and pro-angiogenic properties.<sup>10, 11</sup> ASCs represent an interesting alternative to BM-MSCs in cardiac cell therapy since they are harvested by lipoaspirate sampling in greater quantity and in a less invasive fashion compared to BM-MSCs. Moreover, adipose tissue contains 500-fold more MSCs than adult bone marrow.<sup>10, 11</sup>

In animal model studies<sup>12</sup>, ASCs have demonstrated a reduction in myocardial scar size by paracrine effect, notably by the secretion of soluble factors directly affecting cardiomyogenesis, neovascularization and cardiac regeneration.<sup>13</sup> The ASCs have been shown to have a greater benefit in improving cardiac function and decreasing myocardial scar compared to MSCs.<sup>14, 15</sup> Furthermore, recent studies have shown that 3D cultures of MSCs (spheroid bodies) increase their anti-inflammatory and immunomodulatory potential compared to monolayer cultures.<sup>16, 17</sup> However, few studies have investigated the therapeutic role of ASC spheroid bodies (SB) in CAV.

Heterotopic abdominal heart transplantation (HAHT) model in rats has been widely used to explore the physiological and structural modifications involved in left ventricle (LV) unloading. This model was first described by Abbot et al<sup>18</sup> in 1964 and improved by Ono and Lindsey<sup>19</sup> in 1969, which is currently the animal model of choice to investigate post-transplant ventricular discharge in the rat. The technique has been well described in the literature<sup>20</sup>. HAHT is an inexpensive experimental model frequently used to study hemodynamic and histological changes in ischemia/reperfusion injury<sup>21</sup> (isogenic strain of rats) but also in immunological research on acute<sup>22, 23</sup> or chronic rejection<sup>24</sup> (allogeneic rats).

In this study, we used an allogenic HAHT rat model to study the effects of ASCs on chronic allograft rejection. We hypothesized that the local delivery of ASC SBs on the epicardial surface of the grafted heart would be associated with a reduction in the progression of CAV, characterized by reduced inflammation and apoptosis, decreased myocardial fibrosis and favorable ventricular remodeling.

## **MATERIALS AND METHODS**

### **Animal Subjects and Experimental Design**

Eight weeks old male rats (200-250g) from two histo-incompatible inbred strains of rats, Lewis-Fisher F344 (FIS) and Lewis (LEW), were purchased from the Charles River Laboratory (Saint Constant, QC, Canada). Before surgery, rats were randomly divided into two experimental groups: the control group treated with normal saline (NS) injection (NS; n=10) or the ASCs group treated with ASCs spheroids (ASC; n=10). We used the rat model of HAHT FIS-to-LEW, which consisted in heterotopic grafting of hearts from FIS rats to LEW recipients with a minor histocompatibility complex (MHS) matched to allow the development of CAV without any immunosuppressive therapy. All experiments were conducted according to the Canadian Legislation for the Treatment of Animals and this study was approved by the Institutional Animal Use and Care Committee of the Université de Montréal, Montreal, QC, Canada (Animal Use Protocol #1699). Rats had access to food and water *ad libitum*.

### **Cell cultures**

Human ASCs were purchased from Life Technologies (StemPro human ASCs, Invitrogen, Carlsbad, California, USA) and cultured in Mesenpro RS medium supplemented with 1000 U/ml penicillin, 100 µg/ml streptomycin, and 2 mM glutamine. Once confluence reached, cells were detached from flasks using trypsin ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) to produce SBs by the hanging drop method. Briefly, drops of 35µl of cell suspension were plated on the lid of a petri dish and inverted on the dish with PBS inside to produce spheroids containing  $2 \times 10^6$  cells/spheroid. After 3 days in the incubator (37°C; 5% CO<sub>2</sub>), SBs were recovered to transplant on the myocardium or



used for *in vitro* experiments. One SB of 200k cells was compared to 200k monolayer cells. Media was collected 24 or 72h after TNF $\alpha$  treatment (100ng/ml) and stored at -80°C until needed.

### **Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA)**

TNF $\alpha$  stimulated gene 6 (TSG-6) levels were quantified through ELISA. Briefly, a 96-well Costar plate was coated with TSG-6 monoclonal antibody (Santa Cruz Biotechnologies, California, USA) at a concentration of 10  $\mu$ g/ml overnight at 4°C. After washing the plate 4 times with PBS 1X Tween-20 0.1%, wells were blocked with PBS containing BSA 0.5% for 45 minutes. At the end of the incubation, the plate was washed again before putting standards (recombinant human TSG-6) and samples in the appropriate wells for 2h30 incubation. After washing off the plate, another 2h incubation with anti-TSG-6 biotin at 0.5  $\mu$ g/ml followed by streptavidin incubation for 30 minutes. HRP substrate was introduced after a final washing step and the reaction was stopped after 20 minutes with stop solution (sulphuric acid 2N). The optical density of the plate was read at 450 nm right after.

### **Luminex<sup>®</sup> Assay**

The assays were performed following the manufacturer's protocol. Briefly, microparticles and samples or standards were put in the appropriate wells of 96 well-filtered plate and incubated for 2 hours with agitation. Washing step followed and biotin antibody was added for 1h before incubating with streptavidin for 30 minutes. The washing solution was added at the end after washing off streptavidin and the plate was read in a Bio-plex 200 (Bio-Rad) to quantify Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF), Monocyte Chemoattractant protein-1 (MCP-1), Interleukin 6 (IL-6) and Interleukin 8 (IL-8).

## **Heterotopic Abdominal Heart Transplantation**

All experiments were performed under general anesthesia (isoflurane 3-5%). After heparin injection, the donor heart was rapidly harvested and flushed with cold physiologic saline solution and immediately transplanted to the recipient in infrarenal position. Prior to transplantation, donor caval veins and pulmonary veins were ligated. Briefly, the implantation of the cardiac graft was performed intra-abdominally between the ascending aorta of the donor and the descending aorta of the recipient, and then between the pulmonary artery of the donor and the inferior vena cava of the recipient. No immunosuppressive treatment was used. The recipient aortic clamping time ranged from 50-60 minutes. This constitutes a right working-heart model with complete unloading of the left ventricle.

## **Delivery of Adipose-derived Stem Cells**

Normal saline (NS group) or ten ASCs spheroids ( $2 \times 10^6$  cells/spheroid) suspended in 3 ml of NS (ASC group) were placed on the surface of the beating right ventricle (RV) of the transplanted heart and, subsequently, an oxidized regenerated cellulose matrix was used to cover the epicardium in order to maintain NS or ASCs in direct contact with the epicardium.

## **Animal Monitoring and Sacrifice**

The transplanted hearts were monitored by daily sterile manual palpation. After 14 days, under general anesthesia (Isoflurane 3-5%, 20cc saline solution followed by 20cc formalin perfusion by pressure gradient), all rats were sacrificed by aortic transection. The transplanted and the native hearts were rapidly dissected, removed and irrigated with cold physiological saline before preparation for immunohistochemistry analysis.

## **Distribution of transplanted ASCs**

### *Immunohistofluorescence*

The localization of CD90<sup>+</sup>, a well-known surface marker for stromal stem cells, was determined by immunohistofluorescence on 5 µm sectional slices of the native and transplanted ventricles from LEW rats. The sections were incubated overnight at 4 °C with anti-CD90 mouse antibody (1: 500; Abcam Inc., Toronto, ON, Canada). The second antibody used was a goat anti-mouse antibody IgG (1: 800; Abcam Inc., Toronto, ON, Canada). Nonspecific staining was achieved by adding the secondary antibody alone. immunohistofluorescence was performed using a confocal fluorescence microscope (LSM 510 Carl Zeiss, Oberkochen, Germany) as z-stacks consisting of serial 2-D images acquired at 250 nm intervals. Image stacks were digitally deconvolved (Huygens Professional software, Scientific Volume Imaging, Hilversum, Netherlands) to reduce out-of-focus light and maximum projections were prepared from the deconvolved z-stacks.

## **Cardiac fibrosis and ventricular remodeling**

### *Histology and Immunohistochemistry (IHC)*

Following sacrifice, native and orthotopic hearts were fixed in 10% formalin PBS-buffered solution, embedded in paraffin and sectioned into sagittal cuts of 6 µm-thickness at the ASCs injection site (orthotopic hearts) or corresponding site (native hearts). The sections were stained with Masson's trichrome reagent to assess the degree of myocardial fibrosis, which was evaluated

by calculating the amount of collagen content per region. In addition, morphometric analyses were performed to evaluate the LV myocardial thickness and the coronary intima hyperplasia.

To determine whether transplanted human ASCs persisted at the injection site, we performed an immunohistochemistry (IHC) study using monoclonal mouse anti-human mitochondrial antibody. A citrate-antigen retrieval approach was used to unmask protein epitopes on tissues. The endogenous peroxidase activity was quenched in a solution of 3% hydrogen peroxide and non-specific binding of primary antibodies was prevented by preincubating the tissues with 10% serum from the species used to raise the secondary antibodies. Corresponding heart tissue sections were then exposed to monoclonal mouse anti-human mitochondrial antibody (1: 1000, Abcam Inc., ON, Canada), overnight at 4°C followed by incubation with biotinylated goat anti-mouse (1:400) (Vector Laboratories; Burlingame, CA, USA). The peroxidase labeling was achieved using an avidin/biotin complex (ABC kit; Vector), and antibody visualization was established after an exposure to 3,3-diaminobenzidine solution (DAB kit; Vector). Sections were counterstained by Mayer's hematoxylin and then mounted with a permount solution (Fisher Scientific, Hampton NH, USA). This approach was repeated for the following IHC experiments to define the remodeling process of the hearts (e.g. apoptosis, angiogenesis and acute/chronical inflammation). Apoptosis was revealed by quantification of cleaved Caspase-3 (1:100, Cell signaling, MA, USA); angiogenesis was assessed by endothelial cells staining and by measuring PECAM-1 (CD31) expression (1:200, Novus Biologicals, CO, USA); acute/chronic inflammation was measured by neutrophil-specific detection of myeloperoxidase (MPO) expression (1:200, Thermo Fisher Scientific ON, Canada), and macrophage-specific detection of mannose-receptor (CD206) expression (1:500, Abcam Inc., ON, Canada).

Images were collected using a brightfield microscope (BX45 by Olympus, Tokyo, Japan) and acquired with Image Pro Premier software (MediaCybernetics, MD). All IHC results (except for PECAM-1 staining) were expressed as a percentage (%) of occupancy of the protein compared with the total area of the cardiac sections analyzed (%) of 5 random fields. Analysis of angiogenesis was performed by the detection and quantification of PECAM-1 protein in the region of viable (non-necrotic) cardiac region and compared to the total area of the cardiac sections analyzed.

### **Magnetic resonance imaging (MRI)**

Fourteen days after HAHT, cardiac MRI was performed (n = 3 injected with saline, n = 3 injected with ASC) with a 7 Tesla (Agilent, Santa Clara, CA, USA) MRI scanner, with a 30 cm bore and a gradient insert with 600mT/m maximal slope. Rat noses were placed into a cylindrical tube for anesthesia that limited head movement. Anesthesia was maintained with 2-3% isoflurane at 2 L/min in pure O<sub>2</sub>. Rats were maintained at 37 °C and rectal temperature and respiration rate were recorded. The electrocardiographic gating was optimized with two cardiogram electrodes attached to the animal's abdomen with respiratory motion and body temperature monitors (Small Animal Instruments, Stony Brook, NY, USA).

### **Statistical analysis**

Results of morphometric study collected prospectively in a database were reported as means ± SD for continuous variables and as absolute numbers or percentages for categorical variables. Comparisons between treatments groups were performed using ANOVA for continuous variables, and Chi-square or Fisher's exact test for categorical variable. *P*<0.05 values were

deemed to be statistically significant. Statistical analyses were conducted with the SPSS computer software package (version 25.0, SPSS Inc., Chicago, IL, USA).

## RESULTS

### Successful model of CAV following Heterotopic Abdominal Heart Transplantation

As described Sacrifices on day 14 showed obliterative lesions in coronary arteries in all transplanted hearts (Figure 1). Those coronary lesions were characterized by extensive intimal proliferation leading to coronary artery occlusion, associated to massive perivascular adventitial inflammatory cell infiltrate and lymphocyte cell infiltrate into the myocardium.

### Spheroid bodies secretome is richer in immunomodulatory and angiogenic factors compared to monolayer ASCs (MLs)

*In vitro* experiments from this study documented that ASCs secrete soluble factors at different levels when cultured either as 2D or 3D (Figure 2). The level of secreted TSG-6, an anti-inflammatory factor, was higher for SBs compared to ML under baseline conditions as well as in response to the inflammatory stimulation by exposure to  $TNF\alpha$ . In the former, 24-hour assessments demonstrated a greater secretion of TSG-6 in baseline conditions and in response to  $TNF\alpha$ . However, 3 days after  $TNF\alpha$  stimulation, ML ASCs were capable of reaching the similar levels of secreted TSG-6. For the immunomodulator IL-6, SBs produced higher amounts in presence or not of inflammatory stimulus ( $TNF\alpha$ ). Conversely, following  $TNF\alpha$  stimulation, IL-8 is secreted in higher levels by ML than by SBs. To evaluate the angiogenic potential of ASC delivery, VEGF was quantified. SBs were also more efficient at secreting VEGF than ML. MCP-1 has also been associated with pro-angiogenic properties and SBs were able to secrete this chemokine at higher levels than ML. However, as was the case for IL-8 secretion in response to inflammatory

stimulus, ML secreted higher levels of MCP-1 than SBs. In summary, SBs showed higher levels of TSG-6, VEGF and IL-6 whether stimulated or not.

### **Distribution of transplanted ASCs**

After 14 days post-injection of ASCs, the presence of CD90<sup>+</sup> labelling in confocal immunofluorescence within the myocardium indicated the migration of ASC SBs from the surface to the transplanted heart. Interestingly, confocal immunofluorescence antibodies CD90<sup>+</sup> identified ASCs in both the allograft but as well as host heart where there was no CAV injury (Figure 3). Cells were also present near epicardial arteries but in lower proportion. These findings correlated with results obtained with mouse anti-human mitochondrial monoclonal antibodies analysis. Indeed, the presence of labeled cells by human anti-mitochondrial antibodies was 7-fold higher in the ASC group than in the control group (Figure 4).

### **Delivery of ASCs significantly reduced cardiac fibrosis and improved ventricular remodeling in transplanted hearts**

In all transplanted hearts, Masson's trichrome staining performed 14 days after HAHT showed moderate fibrosis in the ASCs group and in the control group (shown in Figure 5). Quantitative analysis of the collagen volume fraction demonstrated a significant reduction of fibrosis in the ASCs treated group compared to the NS-treated group (HAHT / ASCs  $31.2 \pm 1.2\%$  vs HAHT / NS  $21.6 \pm 1.7\%$ ,  $p < 0.05$ ). The left ventricle wall was significantly thicker in the ASCs group than in the control group, indicating a favorable ventricular remodeling in the ASCs group (HAHT / ASCs  $2.4 \pm 0.2\text{mm}$  vs HAHT / NS  $1.7 \pm 0.7\text{mm}$ ,  $p < 0.05$ ).

### **Delivery of ASCs significantly reduced inflammation and apoptosis in transplanted hearts**



ASC SBs decrease neutrophilic activity, as demonstrated by the secreted myeloperoxidase (MPO) assay (Figure 6). Distribution of MPO positive cells was less important in the ASCs group compared to the control group. In the group of transplanted hearts, the density of MPO positive cells was lower than in the NS-treated group ( $0.11 \pm 0.04\%$  vs  $0.24 \pm 0.03\%$  HAHT / NS vs ASCs,  $p < 0.05$ ). Assessment of apoptosis was performed by quantifying cleaved Caspase 3 positive cells. We showed decreased percentage of apoptotic cells in the ASCs-treated group compared to the NS-treated group ( $0.01\%$  HAHT / ASCs vs.  $1.1\%$  HAHT / NS,  $p < 0.01$ ).

#### **Delivery of ASCs did not alter macrophage activation or angiogenesis in transplanted hearts**

Microvessel density (angiogenesis, CD31positive cells) and macrophage cell infiltration (CD206 positive cells) are shown in Figure 7A-D and Figure 7E-H, respectively. In transplanted hearts in the ASC group, the microvessel density was not found to be significantly different than that of the NS group (HAHT/ ASCs  $0.59 \pm 0.31$  vs HAHT/ NS  $0.43 \pm 0.27\%$ ,  $p=0.8$ ) (Figure 7D). Similarly, macrophage density was not significantly altered after ASC delivery relative to the control group (HAHT/ ASCs  $0.55 \pm 0.16$  vs HAHT/ NS  $0.42 \pm 0.74\%$ ,  $p=0.75$ ) (Figure 7H).

## DISCUSSION

Despite recent advances in the field of cardiocirculatory assistance and immunosuppression, chronic rejection remains a major cause of mortality during first year after cardiac transplantation<sup>1, 18</sup>. Moreover, CAV remains a major reason for graft failure and current treatment options to halt its progression are limited.

New therapeutic pathways are needed to counter this key limitation to long-term success following cardiac transplantation. Cardiac cell-based therapy has promising results in ischemic cardiomyopathy and could offer a novel means of addressing, at both the cellular and tissue levels, challenges related to graft rejection. The effect of ASCs in solid organ transplantation models has not been reported so far. In this study, we investigated the therapeutic effects of ASC delivery in a 3D configuration (i.e. as SBs) on CAV development in a rat model of HAHT. In our study, local delivery of ASC SBs impacted ventricular remodeling by promoting a significant decrease in the fibrotic area and an increase in thickness of the left ventricle in systole, relative to the control group, as early as 14 days after HAHT . While no effect on macrophage activation and angiogenesis was found, ASC delivery resulted in a significant decrease in neutrophilic activity as well as apoptosis. Thus, our findings suggest an early cardioprotective effect of ASCs on transplanted heart.

Three-dimensional culture of MSCs is an efficient method known to regulate their healing properties. Culturing cells as 3D structures closely reproduce the *in vivo* microenvironment through the cell-to-cell contact and cell-to-matrix contact. Enhanced immunomodulatory functions have been related to aggregating MSCs, showing higher amounts of secreted PGE2 that

could induce a switch from pro-inflammatory macrophages to an anti-inflammatory phenotype<sup>25</sup>. The secretome of ASCs contains multiple factors explaining the pleiotropic effects of these cells such as anti-apoptotic, angiogenic and anti-inflammatory. Given the similarities between MSCs and ASCs, aggregating ASCs could likely favor their pro-healing properties. Bhang et al characterized the secretome of 3D cultured ASCs and reported higher VEGF, HGF and FGF-2 than the conventional monolayer culture<sup>26</sup>. Moreover, they described a pro-angiogenic effect of the conditioned media of such 3D structures in a hind-limb ischemia-reperfusion mice model. Our *in vitro* data lead to the same conclusion as SBs showed richer secretome in angiogenic factors with increased levels of VEGF and MCP-1. The anti-inflammatory effect of ASCs was mediated in great part by a well-documented potent paracrine factor, Tumor necrosis factor (TNF)-stimulated gene 6 (TSG-6)<sup>27</sup>. This study showed an enhanced secretion of TSG-6 by SBs in standard and stimulated media for 24 hours. However, stimulation with TNF $\alpha$  for 72 hours triggered the same level of TSG-6 secretion between 2D and 3D structures. This could be explained by the impact of TNF $\alpha$  on ASCs proliferation cultured as monolayers<sup>28</sup>, whereas aggregating is thought to inhibit cell proliferation<sup>16</sup>. Mediators participating to the immunoregulatory impact of ASCs are secreted in a responsive rather than a constitutive pattern. The microenvironment induces a different response depending on paracrine, endocrine and neural signals<sup>29</sup>. Herein, we tested responsiveness to TNF $\alpha$  but other cells stressors such as hypoxia or oxidative stress will be experimented to provide further characterization of the secretome.

Prior reports have shown that ASCs can modulate pro-apoptosis genes as well as survival genes, which likely contributes to the decrease in the number of apoptotic cells in the transplanted

heart.<sup>30</sup> Recent reports demonstrated that ASCs are associated to an improvement in LVEF, an increase in angiogenesis, and a decrease in fibrosis in a rat model of myocardial infarction.<sup>15</sup>

In our study, *in vitro* experiment documenting greater secretion of pro-angiogenic molecules (such as VEGF, monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) and immunomodulatory factors (such as TSG-6, IL-6 and IL-8) by 3D spheroid ASCs suggest that such culture method could be more effective than monolayer adherent cell cultures for therapeutic application.<sup>9-12, 16, 25</sup>

Indeed, when delivered in injured inflammatory tissue, ASCs can alter the inflammatory response by secreting immunomodulatory cytokines (IL-6, IL-8) as well as anti-apoptotic and anti-fibrotic growth factors (such as MCP-1). Such mediators induce a local anti-inflammatory, pro-healing cellular state in a paracrine fashion, thus reducing the area of fibrosis which we observed in the transplanted hearts 14 days after cell delivery. Moreover, secretion of pro-angiogenesis factors could promote additional wound healing. Nevertheless, we were not able to document a significant *in vivo* difference in vascular density between the two study group. Likely reasons to explain the discordance between our *in vitro* and *in vivo* finding would be that delivery was too early in the healing process to allow for angiogenesis to occur as well as the potentially need to inject greater quantity of cells or SBs to elicit an *in vivo* microvascular response.

In recent studies, the contribution of stromal stem cells is limited by their low rate cell retention after local or intravascular delivery, varying from less than 1% to 5% depending on the studies. It has also been reported that adult stromal stem cells are capable of transmigration into inflammatory tissues and partially integrate near the endothelium<sup>15</sup>. Thus, our hypothesis was that the closest delivery of the target organ would allow a better therapeutic effect of ASCs on

cells and tissue of the transplanted heart. Our cell-tracking experiment showed that CD90<sup>+</sup> labeled ASCs were present in both the transplanted heart but also in a smaller amount in the native heart near small epicardial arteries, signaling transmigration of ASCs. These observations were corroborated by the second labeling with IgG anti-human mitochondria.

Finally, the immunomodulatory properties of ASCs are well known, including the promotion of T-cell induction, which may limit the progression of CAV. Further studies investigating whether the decrease in T-cell infiltration by ASCs could contribute to the reduction of lymphocyte attack on the arteriole media.

## **LIMITATIONS**

A major limitation of our HAHT model is the virtual complete LV unloading leading to myocardial atrophy and progressive thrombosis of the LV of the donor. Many modifications of the model originally described by Ono and Lindsey in 1969<sup>19</sup> have been published to allow partial discharge of the LV. However, the effects induced by the left ventricular discharge remain controversial as it may contribute in part to apoptosis of the myocardium<sup>31</sup>, metabolic changes via the transcription factors<sup>32</sup> or alterations of mitochondrial proteins expression.<sup>33</sup>

This non-volume loaded model has been a long-standing model used in solid organ rejection research<sup>34</sup>. In addition, the well-established FIS-LEW model allows for the study of chronic rejection and its immunological mechanisms without any use of immunosuppression.

However, as previously published by our group<sup>35</sup>, working heterotopic allografts develop an endothelial dysfunction comparable with that of nonworking allografts, which validates the use of the simpler nonworking graft for the study of endothelial function. Perrault et al<sup>35</sup> concluded

that the similar prevalence of intimal hyperplasia with the development of more severe coronary lesions in working hearts may be due to differences in local nitric oxide release in these two models.

## **CONCLUSION**

In the setting of HAHT, our findings suggest that delivery ASC SBs is well tolerated and can contribute to limit the onset of CAV through paracrine effects. Delivery of ASC SBs can reduce inflammation and apoptosis, which can positively impact cardiac fibrosis and ventricular remodeling. Thus, cardiac cell-based therapy could represent a promising therapeutic pathway to improve chronic rejection, thereby improving graft tolerance and survival.

## FIGURE LEGENDS

**Figure 1: Histologic aspects of NS FIS cardiac graft 14 days after injection:** Effects of chronic rejection on coronary artery in LEW recipient (hematein). In all cases, transplant coronary lesions were characterized by extensive intimal proliferation leading to coronary artery occlusion (A, C, D). Those intimal lesions were associated with massive perivascular adventitial inflammatory cell infiltrate (A, D) and lymphocyte cell infiltrate into the myocardium (B). *LEW*, Lewis; *FIS*, Fisher rat

**Figure 2: Levels of anti-inflammatory (TSG-6), immunomodulator (IL-6, IL-8), antiapoptotic (MCP-1) and proangiogenic (VEGF) molecules.** Luminex assay measurements of TSG-6, VEGF, MCP-1, IL-6 and IL-8 expression in ASCs grown as monolayer culture (ML) or 3D spheroid bodies (SB) in basic conditions and in response to TNF $\alpha$  (100 ng/ml) for two time points, 24 and 72h. (A) Anti-inflammatory factor TSG-6, (B) Angiogenesis related factors VEGF and MCP-1 and (C) immunomodulator IL-6 and IL-8 Values are mean  $\pm$  SEM. \*  $p < 0.05$ ; \*\*  $p < 0.005$ ; \*\*\*  $p < 0.0005$  and \*\*\*\*  $p < 0.0001$  vs ML.

**Figure 3: Distribution of ASC spheroids in treated animals 14 days after infusion (A, C).** Representative images from confocal CD90<sup>+</sup> immunostaining ASCs in transplanted heart (original magnification: 20X). (B, D) Representative images from immunostaining of grafted ASCs, in host heart. Arrows: CD90<sup>+</sup> cells. White scale bar = 100  $\mu$ m; blue scale bar = 50  $\mu$ m.

**Figure 4: Distribution of ASCs measured by immunostaining for mouse anti-human mitochondrial monoclonal antibodies (Human IgG) in heart sections.** Representative staining of (A, C) recipient (host) and (B, D) heterotopic transplanted (HAHT) heart tissue in animals 14 days post-infusion of (A, B) NS or (C, D) ASCs. Human IgG stained yellow (original magnification: 10). Values are mean  $\pm$  SEM. Scale bar = 100  $\mu$ m \*  $p = NS$  \*\*\*  $p < 0.05$

**Figure 5: Degree of fibrosis and left ventricular wall thickness 14 days after ASCs spheroids or NS infusion in cardiac tissue.** Representative Masson's trichrome staining of (A) recipient (host)

and (B, C) heterotopically transplanted heart tissue in animals 14 days after infusion of (A, B) NS or (C) ASCs. Scar tissue stained blue. Scale bar =2mm. (D) Fibrotic area quantified as percent of total heart area (host vs ASCs treated  $31.2 \pm 1.2\%$  vs NS treated  $21.6 \pm 1.7\%$ ). Left ventricular wall thickness (LVWT; vs ASCs treated  $2.4 \pm 0.2\text{mm}$  vs NS  $1.7 \pm 0.7\text{mm}$ ). Data represent mean  $\pm$  SEM (n=10); \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$  \*\*\*  $p < 0.001$

**Figure 6: Neutrophil cells and apoptotic cells measured by immunostaining for myeloperoxidase (MPO) and Caspase 3 in heart sections.** (A-D) MPO<sup>+</sup> cells and (E-H) Caspase 3<sup>+</sup> values. Representative staining of (A, E) recipient (host) and (B, C, F, G) heterotopic transplanted (HAHT) heart tissue in animals at 14 days post-infusion of (B, F) NS or (C, G) ASCs spheroid. MPO and Caspase 3 stained brown (original magnification 20x using Image Pro Premier imaging software). Scale bar=100 $\mu\text{m}$ . (D, H) MPO<sup>+</sup> and Caspase 3<sup>+</sup> cells density of host, with transplanted hearts receiving NS or ASCs spheroid. Data represent mean  $\pm$  SEM; \* $p < 0.05$  \*\*\*  $p < 0.01$

**Figure 7: Representative angiogenesis and macrophages cells measured by immunostaining for CD31 and CD206 in heart sections.** (A-D) CD31<sup>+</sup> cells and (E-H) CD206<sup>+</sup> values. Representative staining of (A, E) recipient (host) and (B, C, F, G) heterotopic transplanted (HHT) heart tissue in animals at 14 days post-infusion of (B, F) NS or (C, G) ASCs spheroid. CD206 and CD31 stained brown (original magnification 20x) using Image Pro Premier imaging software). Scale bar=100 $\mu\text{m}$ . (D, H) CD31<sup>+</sup> and CD206<sup>+</sup> cells density of host, with transplanted hearts receiving NS or ASCs spheroid. Data represent mean  $\pm$  SEM; \* $p = \text{NS}$



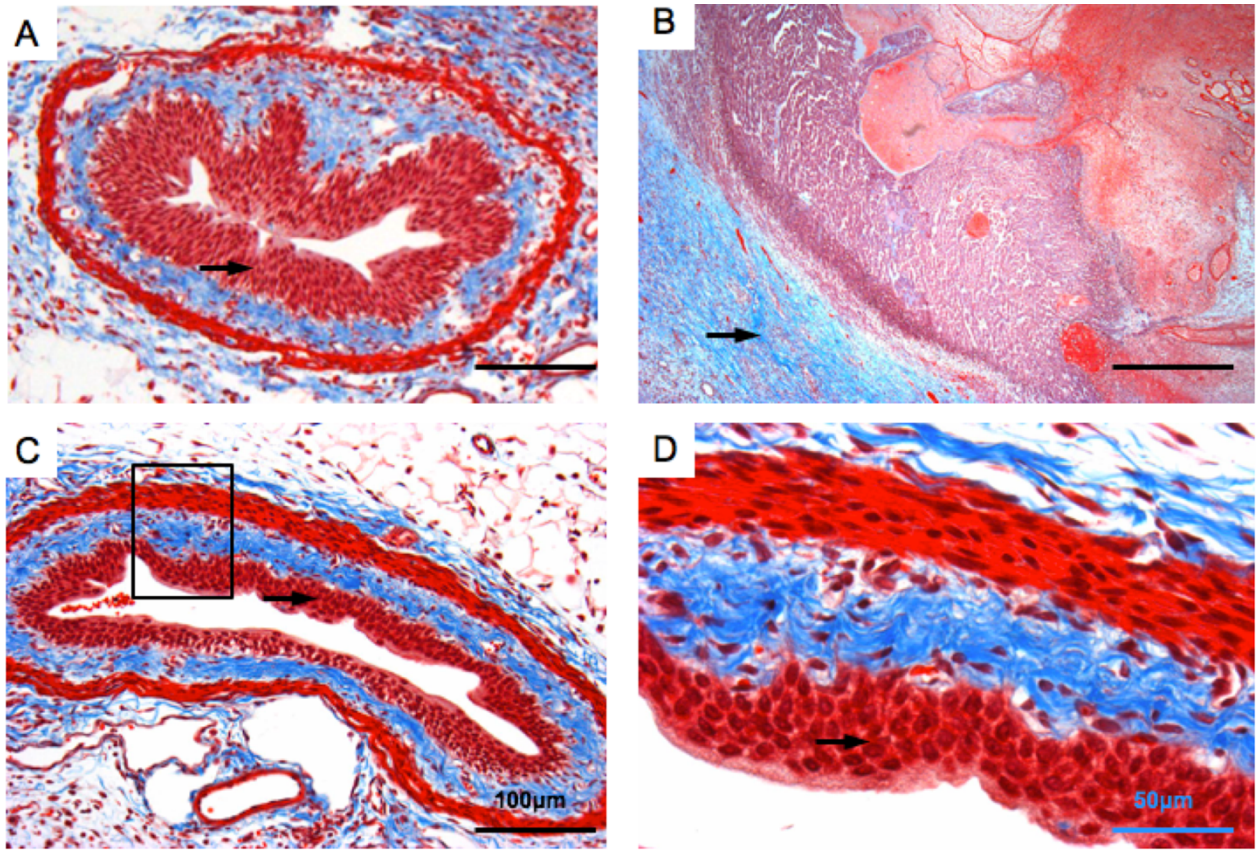


Figure 1

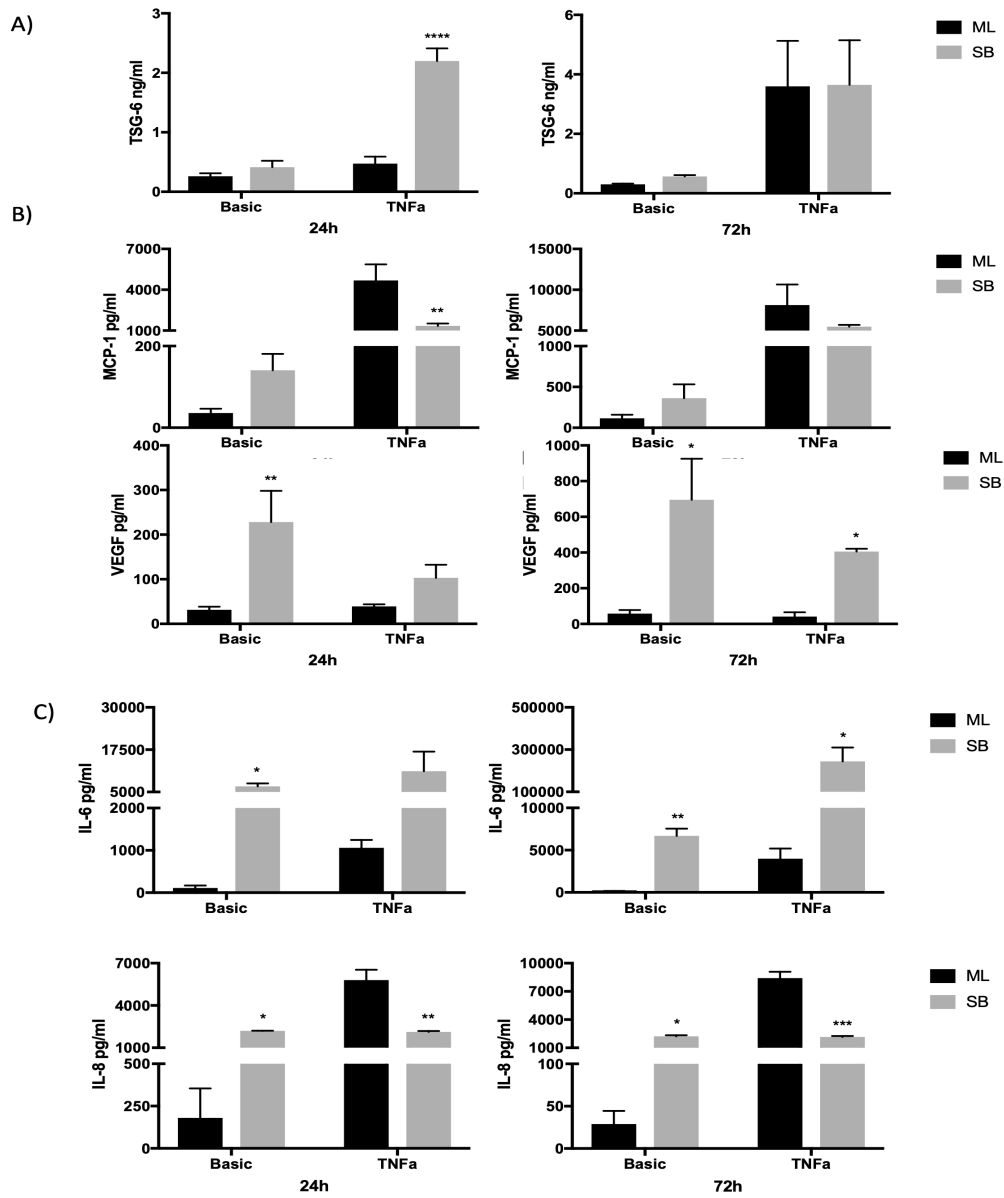


Figure 2

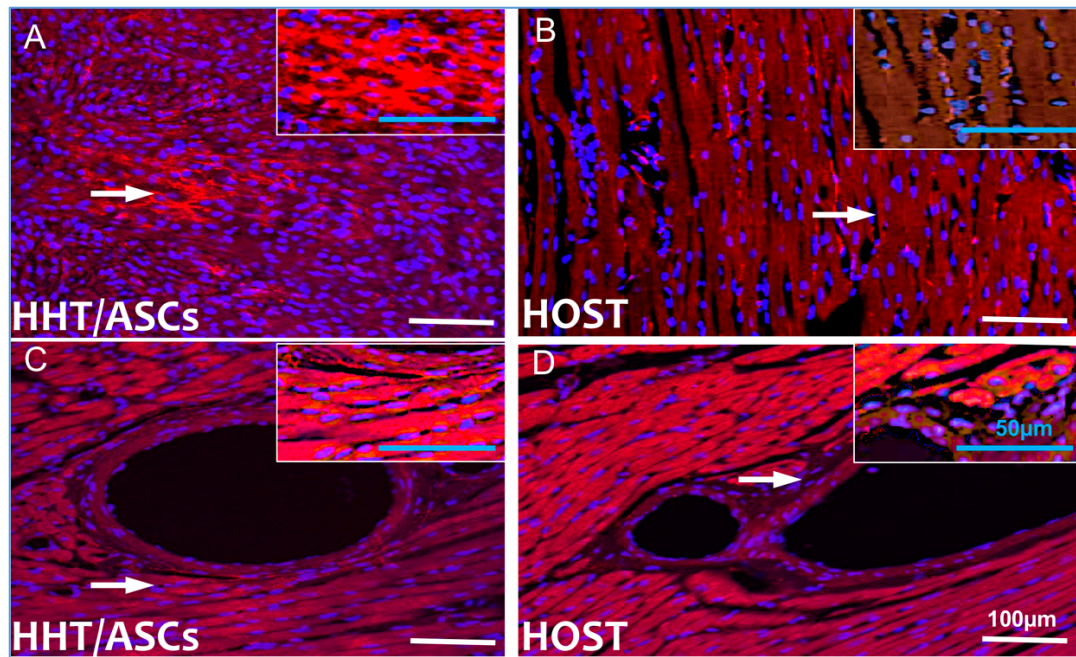
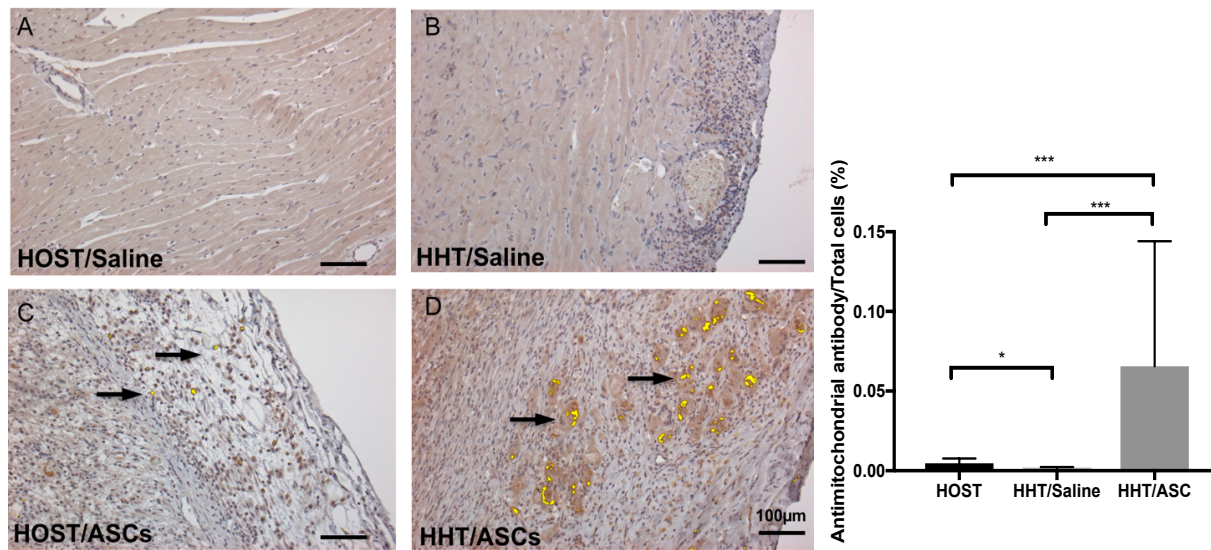
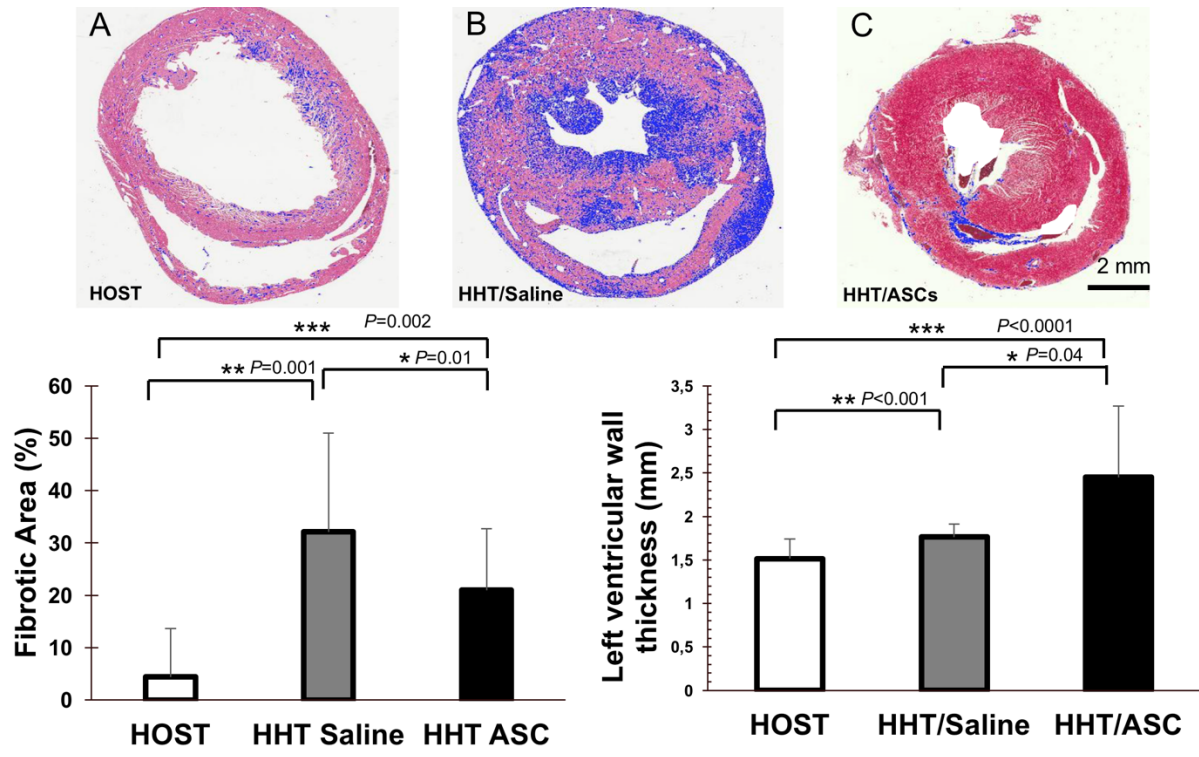


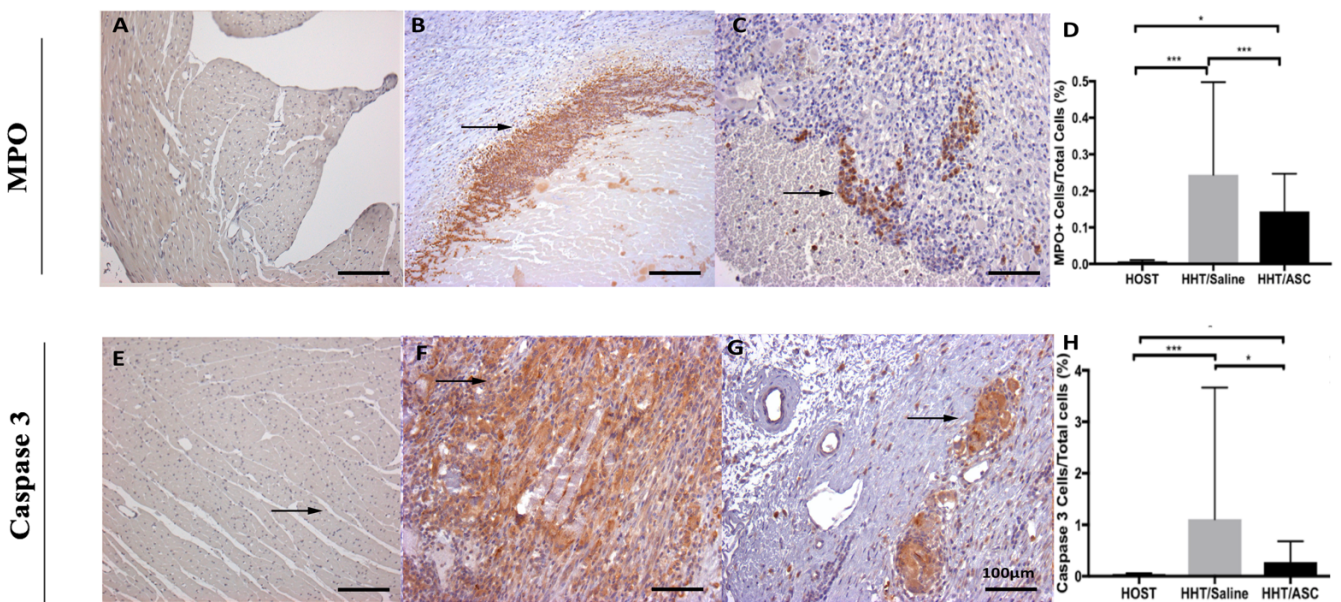
Figure 3



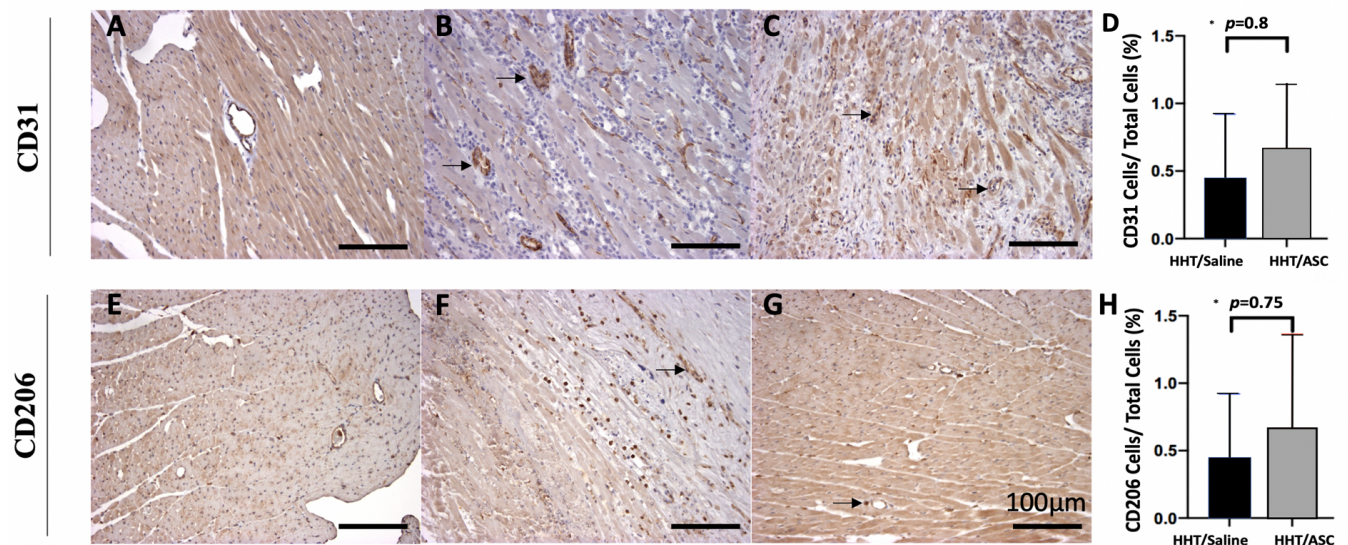
**Figure 4**



**Figure 5**



**Figure 6**



**Figure 7**

## References

1. Kirklin JK, Naftel DC, Pagani FD, Kormos RL, Stevenson LW, Blume ED, Myers SL, Miller MA, Baldwin JT and Young JB. Seventh INTERMACS annual report: 15,000 patients and counting. *J Heart Lung Transplant*. 2015;34:1495-504.
2. Burchill LJ and Ross HJ. Heart transplantation in adults with end-stage congenital heart disease. *Future Cardiol*. 2012;8:329-42.
3. Kirklin JK, Naftel DC, Kormos RL, Stevenson LW, Pagani FD, Miller MA, Ulisney KL, Baldwin JT and Young JB. Third INTERMACS Annual Report: the evolution of destination therapy in the United States. *J Heart Lung Transplant*. 2011;30:115-23.
4. Jardine AG, Gaston RS, Fellstrom BC and Holdaas H. Prevention of cardiovascular disease in adult recipients of kidney transplants. *Lancet*. 2011;378:1419-27.

5. VanWagner LB, Ning H, Whitsett M, Levitsky J, Uttal S, Wilkins JT, Abecassis MM, Ladner DP, Skaro AI and Lloyd-Jones DM. A point-based prediction model for cardiovascular risk in orthotopic liver transplantation: The CAR-OLT score. *Hepatology*. 2017;66:1968-1979.
6. Ptaszek LM, Mansour M, Ruskin JN and Chien KR. Towards regenerative therapy for cardiac disease. *Lancet*. 2012;379:933-42.
7. Toma C, Pittenger MF, Cahill KS, Byrne BJ and Kessler PD. Human mesenchymal stem cells differentiate to a cardiomyocyte phenotype in the adult murine heart. *Circulation*. 2002;105:93-8.
8. Hare JM, Fishman JE, Gerstenblith G, DiFede Velazquez DL, Zambrano JP, Suncion VY, Tracy M, Ghersin E, Johnston PV, Brinker JA, Breton E, Davis-Sproul J, Schulman IH, Byrnes J, Mendizabal AM, Lowery MH, Rouy D, Altman P, Wong Po Foo C, Ruiz P, Amador A, Da Silva J, McNiece IK, Heldman AW, George R and Lardo A. Comparison of allogeneic vs autologous bone marrow-derived mesenchymal stem cells delivered by transendocardial injection in patients with ischemic cardiomyopathy: the POSEIDON randomized trial. *JAMA*. 2012;308:2369-79.
9. Hare JM, Traverse JH, Henry TD, Dib N, Strumpf RK, Schulman SP, Gerstenblith G, DeMaria AN, Denktas AE, Gammon RS, Hermiller JB, Jr., Reisman MA, Schaer GL and Sherman W. A randomized, double-blind, placebo-controlled, dose-escalation study of intravenous adult human mesenchymal stem cells (prochymal) after acute myocardial infarction. *J Am Coll Cardiol*. 2009;54:2277-86.
10. Planat-Benard V, Silvestre JS, Cousin B, Andre M, Nibbelink M, Tamarat R, Clergue M, Manneville C, Saillan-Barreau C, Duriez M, Tedgui A, Levy B, Penicaud L and Casteilla L. Plasticity of human adipose lineage cells toward endothelial cells: physiological and therapeutic perspectives. *Circulation*. 2004;109:656-63.

11. Sanz-Ruiz R, Fernandez-Santos E, Dominguez-Munoz M, Parma R, Villa A, Fernandez L, Sanchez PL and Fernandez-Aviles F. Early translation of adipose-derived cell therapy for cardiovascular disease. *Cell Transplant*. 2009;18:245-54.
12. Rehman J, Traktuev D, Li J, Merfeld-Clauss S, Temm-Grove CJ, Bovenkerk JE, Pell CL, Johnstone BH, Considine RV and March KL. Secretion of angiogenic and antiapoptotic factors by human adipose stromal cells. *Circulation*. 2004;109:1292-8.
13. Gnecci M, Zhang Z, Ni A and Dzau VJ. Paracrine mechanisms in adult stem cell signaling and therapy. *Circ Res*. 2008;103:1204-19.
14. Miyahara Y, Nagaya N, Kataoka M, Yanagawa B, Tanaka K, Hao H, Ishino K, Ishida H, Shimizu T, Kangawa K, Sano S, Okano T, Kitamura S and Mori H. Monolayered mesenchymal stem cells repair scarred myocardium after myocardial infarction. *Nat Med*. 2006;12:459-65.
15. Mazo M, Planat-Benard V, Abizanda G, Pelacho B, Leobon B, Gavira JJ, Penuelas I, Cemborain A, Penicaud L, Laharrague P, Joffre C, Boisson M, Ecay M, Collantes M, Barba J, Casteilla L and Prosper F. Transplantation of adipose derived stromal cells is associated with functional improvement in a rat model of chronic myocardial infarction. *Eur J Heart Fail*. 2008;10:454-62.
16. Bartosh TJ, Ylostalo JH, Mohammadipoor A, Bazhanov N, Coble K, Claypool K, Lee RH, Choi H and Prockop DJ. Aggregation of human mesenchymal stromal cells (MSCs) into 3D spheroids enhances their antiinflammatory properties. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2010;107:13724-9.
17. Zimmermann JA and McDevitt TC. Pre-conditioning mesenchymal stromal cell spheroids for immunomodulatory paracrine factor secretion. *Cytotherapy*. 2014;16:331-45.
18. Abbott CP, Lindsey ES, Creech O, Jr. and Dewitt CW. A Technique for Heart Transplantation in the Rat. *Arch Surg*. 1964;89:645-52.

19. Ono K and Lindsey ES. Improved technique of heart transplantation in rats. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 1969;57:225-9.
20. Benke K, Sayour AA, Matyas C, Agg B, Nemeth BT, Olah A, Ruppert M, Hartyanszky I, Szabolcs Z, Radovits T, Merkely B and Szabo G. Heterotopic Abdominal Rat Heart Transplantation as a Model to Investigate Volume Dependency of Myocardial Remodeling. *Transplantation.* 2017;101:498-505.
21. Montanari S, Dayan V, Yannarelli G, Billia F, Viswanathan S, Connelly KA and Keating A. Mesenchymal stromal cells improve cardiac function and left ventricular remodeling in a heart transplantation model. *J Heart Lung Transplant.* 2015;34:1481-8.
22. Deuse T, Hua X, Taylor V, Stubbendorff M, Baluom M, Chen Y, Park G, Velden J, Streichert T, Reichenspurner H, Robbins RC and Schrepfer S. Significant reduction of acute cardiac allograft rejection by selective janus kinase-1/3 inhibition using R507 and R545. *Transplantation.* 2012;94:695-702.
23. Panther F, Strasen J, Czolbe M, Lazariotou M, Burkard N, Williams T, Lange V, Otto C and Ritter O. Inhibition of nuclear translocation of calcineurin suppresses T-cell activation and prevents acute rejection of donor hearts. *Transplantation.* 2011;91:597-604.
24. Bedi DS, Riella LV, Tullius SG and Chandraker A. Animal models of chronic allograft injury: contributions and limitations to understanding the mechanism of long-term graft dysfunction. *Transplantation.* 2010;90:935-44.
25. Ylostalo JH, Bartosh TJ, Coble K and Prockop DJ. Human mesenchymal stem/stromal cells cultured as spheroids are self-activated to produce prostaglandin E2 that directs stimulated macrophages into an anti-inflammatory phenotype. *Stem Cells.* 2012;30:2283-96.



26. Bhang SH, Lee S, Shin JY, Lee TJ, Jang HK and Kim BS. Efficacious and clinically relevant conditioned medium of human adipose-derived stem cells for therapeutic angiogenesis. *Mol Ther.* 2014;22:862-72.
27. Song W-J, Li Q, Ryu M-O, Ahn J-O, Ha Bhang D, Chan Jung Y and Youn H-Y. TSG-6 Secreted by Human Adipose Tissue-derived Mesenchymal Stem Cells Ameliorates DSS-induced colitis by Inducing M2 Macrophage Polarization in Mice. *Scientific Reports.* 2017;7.
28. Salamon A, Adam S, Rychly J and Peters K. Long-term tumor necrosis factor treatment induces NFkappaB activation and proliferation, but not osteoblastic differentiation of adipose tissue-derived mesenchymal stem cells in vitro. *Int J Biochem Cell Biol.* 2014;54:149-62.
29. Keating A. Mesenchymal stromal cells: new directions. *Cell Stem Cell.* 2012;10:709-16.
30. Preda MB, Ronningen T, Burlacu A, Simionescu M, Moskaug JO and Valen G. Remote transplantation of mesenchymal stem cells protects the heart against ischemia-reperfusion injury. *Stem Cells.* 2014;32:2123-34.
31. Birks EJ. Molecular changes after left ventricular assist device support for heart failure. *Circ Res.* 2013;113:777-91.
32. Gupte AA, Hamilton DJ, Cordero-Reyes AM, Youker KA, Yin Z, Estep JD, Stevens RD, Wenner B, Ilkayeva O, Loebe M, Peterson LE, Lyon CJ, Wong ST, Newgard CB, Torre-Amione G, Taegtmeyer H and Hsueh WA. Mechanical unloading promotes myocardial energy recovery in human heart failure. *Circ Cardiovasc Genet.* 2014;7:266-76.
33. Cao DJ, Jiang N, Blagg A, Johnstone JL, Gondalia R, Oh M, Luo X, Yang KC, Shelton JM, Rothermel BA, Gillette TG, Dorn GW and Hill JA. Mechanical unloading activates FoxO3 to trigger Bnip3-dependent cardiomyocyte atrophy. *J Am Heart Assoc.* 2013;2:e000016.

34. Wakayama K, Fukai M, Yamashita K, Kimura T, Hirokata G, Shibasaki S, Fukumori D, Haga S, Sugawara M, Suzuki T, Taniguchi M, Shimamura T, Furukawa H, Ozaki M, Kamiyama T and Todo S. Successful transplantation of rat hearts subjected to extended cold preservation with a novel preservation solution. *Transpl Int.* 2012;25:696-706.
35. Perrault LP, Bidouard JP, Desjardins N, Villeneuve N, Vilaine JP and Vanhoutte PM. Comparison of coronary endothelial dysfunction in the working and nonworking graft in porcine heterotopic heart transplantation. *Transplantation.* 2002;74:764-72.

