



**HAL**  
open science

## Biothérapie des irradiations

Alain Chapel

► **To cite this version:**

Alain Chapel. Biothérapie des irradiations. Sciences du Vivant [q-bio]. Université Pierre et Marie Curie École Doctorale 394: Physiologie, physiopathologie et thérapeutique, 2017. tel-04029762

**HAL Id: tel-04029762**

**<https://irsn.hal.science/tel-04029762>**

Submitted on 15 Mar 2023

**HAL** is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

## **Habilitation à Diriger des Recherches**

Université Pierre et Marie Curie

École Doctorale 394 : Physiologie, physiopathologie et thérapeutique

*Institut de Radioprotection et de Sûreté Nucléaire (IRSN)*

*Laboratoire de Recherche en Régénération des tissus sains Irradiés (LR2I)*

### **Biothérapie des irradiations**

Présentée par

**Alain CHAPEL**

Présentée et soutenue publiquement le 12 Juin 2017

Devant un jury composé de :

M.	le Professeur	Norbert-Claude Gorin	Président
Mme	le Docteur	Céline Bourcier	Rapporteur
M.	le Docteur	Francis Hérodin	Rapporteur
M.	le Professeur	Wolfgang Sauerwein	Rapporteur
Mme	le Docteur	Hélène Rouard	Examineur
Mme	le Professeur	Annette K. Larsen	Examineur



# Table des matières

REMERCIEMENTS.....	5
LISTE DES ABREVIATIONS .....	6
<i>CURRICULUM VITAE</i> ET PARCOURS PROFESSIONNEL .....	7
A. INTRODUCTION .....	14
B. TRAITEMENT DES IRRADIATIONS ACCIDENTELLES A MOYENNE ET FORTE DOSES .....	18
<b>1. Le Syndrome Aigu d'Irradiation.....</b>	<b>20</b>
<b>2. Comment améliorer la prise en charge du syndrome hématopoïétique (SH) ? .....</b>	<b>21</b>
1. L'expansion ex-vivo .....	21
2. L'antifection.....	24
3. Les cellules souches mésenchymateuses (CSM) .....	24
4. Facteurs de croissance .....	25
5. Les cellules souches pluripotentes induites (iPS) .....	26
<b>3. Comment améliorer la prise en charge des brûlures cutanées ? .....</b>	<b>29</b>
1. Utilisation des CSM en clinique : traitements compassionnels.....	33
<b>4. Peut-on proposer un traitement pour les complications gastro-intestinales ?.....</b>	<b>34</b>
1. La régénération de l'intestin par les CSM peut-elle prévenir les effets néfastes, induits par l'irradiation, sur d'autres tissus du tube digestif tel que le foie ?.....	37
C. LA RADIOTHERAPIE.....	41
<b>1. Cancer et organes à risques (OAR) .....</b>	<b>42</b>
<b>2. Complications des radiothérapies abdomino-pelviennes .....</b>	<b>44</b>
1. Dommages chroniques au côlon-rectum .....	45
2. Effets secondaires aux autres organes de la sphère abdomino-pelvienne.....	46
<b>3. L'accident d'irradiation d'Épinal.....</b>	<b>51</b>
<b>4. CSM et correction des atteintes colorectales.....</b>	<b>56</b>
<b>5. Absence de toxicité des CSM .....</b>	<b>59</b>

6. CSM et cancer colorectaux.....	59
7. CSM et fibrose.....	62
8. Transfert vers la clinique humaine: Programme Hospitalier de Recherche Clinique(PHRC) PRISME.....	64
D. CONCLUSION .....	66
E. PERSPECTIVES.....	69
1. La thérapie cellulaire pour le traitement des séquelles des radiothérapies.....	70
1. La thérapie cellulaire par les CSM pour le traitement des complications des PRD : essai clinique de phase II.....	70
2. Utilisation de la bio-ingénierie tissulaire pour limiter les cystites radiques .....	72
2. La thérapie cellulaire pour le traitement des syndromes radio-induits (SGI) résultant d'expositions accidentelles; Stratégies thérapeutiques du syndrome gastro-intestinal. ....	75
F. PUBLICATIONS PERSONNELLES .....	77
G. RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES .....	97

# REMERCIEMENTS

J'ai eu la chance de participer à une merveilleuse aventure depuis ses débuts : la thérapie cellulaire. Avec un grand plaisir, j'ai partagé cette expérience avec des personnes de qualités sans lesquelles nous n'aurions pas pu révolutionner les dogmes des soins des personnes irradiées. Ce sont 30 années de recherches pour aider les victimes d'irradiation et ma plus belle récompense est ce que nous avons pu leur apporter. Je remercie chaleureusement tous ceux qui ont partagé notre recherche et je suis impatient de continuer cette aventure qui ne cesse de s'épanouir et de s'enrichir grâce au talent de chaque participant.

# LISTE DES ABREVIATIONS

AFSSAPS : Agence Française de Sécurité Sanitaire des Produits de Santé  
AIEA : Agence Internationale de l'Energie Atomique  
ANR : Agence Nationale de la Recherche  
ANSM : Agence Nationale de Sécurité du Médicament  
APC : Argon Plasma Coagulation  
BMP-2 : Bone Morphogenetic Protein-2  
CHU : Centre Hospitalier Universitaire  
CML : Cellules Musculaires Lisses  
CSH : Cellule Souche Hématopoïétique  
CSC : Cellule Souche Colique  
CSM : Cellule Souche Mésenchymateuse  
CTSA : Centre de Transfusion Sanguine des Armées  
DGA : Direction Générale de l'Armement  
EBISC : *European Bank for induced pluripotent Stem Cells*  
EBMT: *European Group for Blood and Marrow Transplantation*  
EFS : Etablissement Français du Sang  
GVHD : *Graft-Versus-Host Disease* (La réaction du greffon contre l'hôte)  
HGF : *Hepatocyte Growth Factor*  
HIA : Hôpital d'Instruction des Armées  
IBD : *Intestinal Bowel Disease*  
INCa : Institut National du Cancer  
INRA : Institut National de la Recherche Agronomique  
iPS : *Induced Pluripotent Stem cells* (cellules souches pluripotentes induites)  
IV : Intra-Veineux  
LENT- SOMA : *Late Effects of Normal Tissues- Subjective Objective Medical Analytic*

MICI : Maladies inflammatoires chroniques de l'intestin  
MTA : *Material Transfer Agreement*  
METREPOL : *Medical Treatment Protocols for radiation accident victims*  
MMP : Matrix MetalloProteinases  
MTI-PP : Médicament de Thérapie Innovante Préparé Ponctuellement  
NIRS : *National Institute of Radiological Sciences*  
NRBC : Nucléaire-Radiologique-Biologique et Chimique  
OAR : Organes à Risques  
OMS : Organisation Mondiale de la Santé  
ORN : OstéoRadioNécrose  
PHRC : Programme Hospitalier de Recherche Clinique  
PRD : *Pelvic Radiation Disease*  
RCMI : Radiothérapie Conformationnelle par Modulation d'Intensité)  
SAI : Syndrome Aigu d'Irradiation  
SAT-APHP : Hôpital Saint-Antoine - Assistance Publique - Hôpitaux de Paris  
SGI : Syndrome Gastro-Intestinal  
SH : Syndrome Hématologique ou Hématopoïétique  
SNV : Syndrome Neuro-Vasculaire  
SSA : Service de Santé des Armées  
SVF : Fraction Stromale Vasculaire  
TIMP : *Tissue Inhibitor of MetalloProteinase*  
TLR : *Toll like Receptor*  
T Reg : Lymphocyte T Régulateur  
TSG-6 : Tumor necrosis factor Stimulated Gene-6  
VADS : Voies Aéro-Digestives Supérieures  
8-MOP : 8-méthoxypsoralène

# CURRICULUM VITAE ET PARCOURS PROFESSIONNEL

**CHAPEL Alain**

12 rue des roses

91330 Yerres

Né le 05 avril 1962

Nationalité : française

**Email** : alain.chapel@irsn.fr

**Index de Hirsch 24**

## Expérience professionnelle

- 2000- à ce jour** Chercheur en thérapie cellulaire à l'Institut de Radioprotection et de Sûreté Nucléaire (IRSN). *Thématique. Thérapie cellulaire des tissus sains par les cellules souches mésenchymateuses après irradiation*
- 1996- 2000** Chercheur en thérapie génique à l'IRSN. *Thématique. Suivi des populations hématopoïétiques par transduction virale chez le primate après irradiation*
- 1994-1996** Chercheur en thérapie génique à l'IRSN. *Thématique : Correction de l'aplasie médullaire radio-induite par transfert de gènes ciblés*
- 1992- 1994** Chercheur en radiobiologie à l'IRSN. *Thématique. Effet des rayonnements ionisants sur le microenvironnement médullaire*
- 1988-1992** Doctorant en virologie et immunologie. *Thématique* au Laboratoire de Neuropathologie Expérimentale et de Neurovirologie, CEA DSV/DRM 92265 Fontenay aux roses : *Permissivité des populations lymphocytaires T au VIH*
- 1986/87** Scientifique du Contingent. Service national dans le laboratoire de Radiobiologie Cellulaire et Moléculaire du Centre de Recherches du Service de Santé des Armées de Clamart. *Thématique : Permissivité des populations lymphocytaires T au VIH.*
- 1986** Vacataire au Collège de France. Laboratoire de François Gros. *Thématique : Etude protéomique des différentes isoformes de la bêta-tubuline.*

## Diplômes

**1992 : Titulaire de la Formation d'expérimentation animale** (niveau I) de l'Ecole nationale vétérinaire d'Alfort : Autorisation à expérimenter n°92-042.

**1987-92 : Thèse de Doctorat de l'Université Paris XII**, Très honorable avec les félicitations du jury. Directeur de Thèse : Dr D. Dormont. Laboratoire de Neuropathologie Expérimentale et de Neurovirologie, CEA DSV/DRM 92265 Fontenay aux roses. *Thématique : Expression différentielle du virus de l'immunodéficience humaine de type 1 dans les clones lymphocytaires T humains CD4<sup>+</sup> implications dans les phénomènes de latence.*



- 1987** **Diplôme d'Etudes Approfondies** 'Physico-chimie appliquée à la biologie médicale et para-médicale', Université Paris XII, Mention Bien. Responsable : Dr D. Dormont. Laboratoire de Radiobiologie Cellulaire et Moléculaire du Centre de Recherches du Service de Santé des Armées de Clamart.
- 1987** **Diplôme Universitaire d'Ingénieur** 'Génie Bio-industriel' Université Paris XII, Mention Assez Bien. Responsable : Dr D. Dormont. Structure d'accueil : laboratoire de Radiobiologie Cellulaire et Moléculaire du Centre de Recherches du Service de Santé des Armées de Clamart.
- 1986** **Maîtrise de Sciences et Techniques**, 'Génie Biologique et Biochimique', Université Paris XII, Mention Assez Bien.
- 1984** **DEUG** 'Sciences de la nature et de la vie', Université Paris XII, Mention Assez Bien.

## Encadrement

Type d'encadrement	Nombre	Années
Post-doc	3	2000, 2012
Thèses	8	1998, 1999, 2005, 2008, 2016
M2	7	1997, 2002, 2003, 2004, 2011, 2013

- 2016** Benoit Usunier. **Thèse** de l'université Pierre et Marie Curie, École doctorale Physiologie et Physiopathologie (ED 394). Financement IRSN. *Sujet : Application à la biothérapie au traitement du tissu sain contre les effets tardifs de la radiothérapie ; étude préclinique du traitement par les Cellules Souches contre le développement de la fibrose dans le tissu sain exposé aux irradiations fractionnées abdomino-pelviennes chez le rat Sprague-Dawley.*
- 2016:** Dhouha Darghouth ANR ASTRID « Génération de Cellules Souches Hématopoïétiques à partir d'iPS extra-hématopoïétiques chez les patients atteints d'un syndrome aiguë d'Irradiation : une stratégie thérapeutique innovante du Syndrome Hématopoïétique.» GIPSIS ANR-13-ASTR-0009.
- 2013** Cécile Enfroy. Diplôme Master. Master 2 ; 'Biothérapie tissulaire, cellulaire et génique' Université d'Evry Val d'Essonne. *Sujet : Détermination du profil d'expression des microARN régulant le microenvironnement tumoral colique en présence de cellules souches mésenchymateuses.*
- 2013** Nugalya Khumar, Diplôme de M1, 'Master Biomolécules et thérapies expérimentales.' Université Paris 13, santé biologie médecine humaine, Bobigny, Avril-Juillet. *Sujet : Etude des effets secondaires des Cellules Souches Mésenchymateuses.*

- 2012** Sabine François. **Post-doc**. Financement IRSN. *Sujet : Etude des risques potentiels liés à l'utilisation des Cellules souches mésenchymateuses pour le traitement des effets secondaires de la radiothérapie dans le modèle du cancer colorectal.*
- 2012** Isabelle Cacciapuoti. Diplôme M2. Master 'Relation Hôte/Greffon' à l'Université de Paris 11 Sud. *Sujet : Etude de la bioréactivité des CSM dans un environnement précancéreux en phase d'activation des TLR.*
- 2012** Rachel Gergondey. BTS en biotechnologies. Ecole Nationale de Chimie Physique et Biologie (ENCPB). *Sujet : Etude des risques potentiels liés à l'utilisation des cellules souches mésenchymateuses pour le traitement des effets secondaires de la radiothérapie dans le modèle du cancer colorectal.*
- 2011** Benoit Usunier. Diplôme d'ingénieur de l'Ecole de Biologie Industrielle : spécialité 'Ingénierie de Développement Produit' (Cergy). *Sujet : Étude de l'effet des Cellules Souches Mésenchymateuses sur la fibrose radio-induite.*
- 2010** Che Thi Cam. **Thèse** de l'Université Paris-Diderot Paris VII Ecole doctorale B2T. *Sujet : Effet des cellules souches mésenchymateuses sur la cancerogénèse colique chimio-induite chez le rat.*
- 2008** Aisha Nacef. **Thèse** : Université de Besançon. *Sujet : Rôle des molécules solubles et du contact cellulaire dans l'immunosuppression induite par les CSM et leur sous-population.*
- 2008** M. Mouisedine. **Thèse** Université de Versailles. Co- Financement IRSN/EDF. *Sujet : Utilisation des cellules souches mésenchymateuses humaines dans les atteintes tissulaires radio-induites.*
- 2008** Agnès Blossier. DUT de biologie appliquée. *Sujet : Optimisation de l'efficacité thérapeutique des CSM sur les brûlures radiologiques sur un modèle de petit animal.* Tours.
- 2007** Natacha Guyon. Certificat de technicien supérieur spécialisé en biologie moléculaire et culture cellulaire à l'école de l'association pour la formation en biologie et en biochimie. Paris. *Sujet : Etude in vitro de l'effet des Cellules Souches Mésenchymateuses sur les cellules endothéliales irradiées.*
- 2007** Asma Boutarfa. Licence Microbiologie Industrielle et Biotechnologies. Paris. *Sujet : Etude des mécanismes de protection des cellules souches mésenchymateuses sur les cellules endothéliales après irradiation.*
- 2006** A Sémont. **Post-doc** financement Sixt *framework programme Further improvement of radiotherapy of cancer through side effect.* Contract no: 503436. *Sujet : Étude de la régénération intestinale par les cellules souches mésenchymateuses humaines (CSM h) après irradiation abdominale dans un modèle de souris immunotolérantes.*
- 2005** Sabine Francois. **Thèse** Université de Versailles. Co- Financement IRSN/EDF *Sujet : Étude de la plasticité des cellules souches mésenchymateuses humaines (CSM h) après irradiation du tissu receveur dans le cadre d'une approche thérapeutique de l'atteinte multi-organe radio-induite.*
- 2004** Aisha Nacef. Diplôme d'Etude Approfondies Relation Hôte Greffon En Transplantation d'Organes et Greffe de Tissus. Université de Dijon. *Sujet : Immuno modulation induites par les Cellules Souches Mésenchymateuses (CSM). Rôle de la dose de CSM, rôle du contact cellulaire entre les CSM et les lymphocytes T, rôle des cytokines.*

- 2003** Moubarack Mouiseddine. Paris XII, DESS. Modèles cellulaires *in vitro*. *Sujet : Etude des phénomènes de plasticité de transdifférenciation dans le traitement des lésions tissulaires post irradiation.*
- 2002** Claire Germain. DEA 'Relation Hôte-Greffon en transplantation d'organes et greffe de tissus' (Besançon) *Sujet : Etude de la capacité plastique des cellules souches mésenchymateuses (CSM) humaines après irradiation.*
- 2002** Christelle Mazurier. Diplôme d'ingénieur en Recherche et Développement de l'Ecole de Biologie Industrielle. Cergy-pontoise. *Sujet : Etude de la biodistribution et de différenciation des cellules souches mésenchymateuses dans le modèle murin NOD/SCID irradié.*
- 2001** Frédérique. Cuvelier. Certificat de technicien supérieur spécialisé ESBB, Paris. *Sujet : Apport des cellules souches mésenchymateuses (CSM) génétiquement modifiées dans la réparation tissulaire après irradiation.*
- 2000** Stéphanie. Arenales. Certificat de spécialisation en biologie moléculaire et culture cellulaire ESBB, Paris. *Sujet : Transfert du gène de la GFP pour le marquage des cellules hématopoïétiques immatures.*
- 2000** Laetitia Baudry. ESTBA, Paris. Certificat de spécialisation. *Sujet : Marquage des progéniteurs hématopoïétiques de macaque par transfert du gène de la Green Fluorescent Protein (GFP) et suivi après réinjection chez l'animal irradié.*
- 2000** Bruno L'Homme. Certificat de spécialisation ESBB, Paris *Sujet : Optimisation du Transfert de gène de la GFP (Green Fluorescent Protein) dans les progéniteurs hématopoïétiques. Sélection et marquage des cellules souches mésenchymateuses (CSM).*
- 2000** Sébastien Jacquelin. BTS biochimie Institut Notre Dame, Le Mans 72000. *Sujet : Optimisation de la quantification par PCR des ARN messagers des récepteurs au TNF et à l'interleukine-13.*
- 2000** Sandrine Bouchet. Rapport DUT de biologie appliquée, IUT de CRETEIL. *Sujet : Mise au point d'une technique de quantification PCR sur l'appareil ABI Prism 7700 (PE France).*
- 1999** Emmanuelle Tisserand. Certificat d'études spécialisées technologiques en bio expérimentation industrielle. ESTBA, Paris. *Sujet : Optimisation du marquage de progéniteurs hématopoïétiques du modèle animal Macaca fascicularis par transfert de gènes.*
- 1999** Virginie Laquet. DUT de biologie appliquée, IUT CRETEIL. *Sujet : Transfert du gène de la GFP dans les cellules hématopoïétiques.*
- 1999.** Sébastien Jacquelin. BTS biochimie ESBB Paris. *Sujet : Transfert de gène dans les cellules hématopoïétiques ou stromales.*
- 1999** Jérôme Vétillard. **Thèse** d'Université. Discipline : Génie enzymatique, bioconversion et microbiologie. Ecole Supérieure des Industries Agricoles et Alimentaires. *Sujet : Expansion ex-vivo des cellules souches et des progéniteurs hématopoïétiques : application au traitement des aplasies radio-induites, étude de faisabilité.*
- 1998** Basak Sari. BTS biochimie ESTBA. *Sujet : Etude sur l'expansion ex vivo : transfert de gènes codants pour des facteurs de croissance hématopoïétiques dans des cellules murines.*

- 1997** Christine Granotier. Certificat d'études spécialisées technologiques : microbiologie industrielle, ESTBA Paris. *Sujet : En vue de l'expansion ex vivo : Transfert de gènes codant pour des facteurs de croissance hématopoïétiques dans des cellules humaines et murines en co-culture stroma/progéniteurs humains.*
- 1998** Nathalie Brouard. **Thèse** d'Université, spécialité physiologie de la différenciation Université Denis Diderot, Paris 7. *Sujet : Transplantabilité de cellules provenant du stroma médullaire.*
- 1998** ThyMiAnn Neildez-Nguyen. **Thèse** d'Université, spécialité sciences pharmaceutiques, Université René Descartes, Paris V. *Sujet : Etudes fonctionnelles de la lignée granulocytaire lors des expansions ex vivo destinées au traitement de la neutropénie. Prix de thèse.*
- 1997** Jérôme Vétillard. DEA de biotechnologie ENSIA-Université de Compiègne. Maître de stage. *Sujet : Expansion ex vivo des cellules souches hématopoïétiques. Optimisation des cultures. Application au cas des aplasies radio-induites.*
- 1997** Basak Sari. BTS biochimie ESTBA. *Sujet : Transfert de gène codant pour des facteurs de croissance dans des cellules murines.*
- 1996** Carine Perennou. Certificat d'études spécialisées technologiques, option bio expérimentation industrielle ESTBA. *Sujet : Transfert du gène de l'interleukine-3 humaine dans les cellules hématopoïétiques murines immatures par la méthode d'antiféction. Transfert de cellules stromales médullaires murines porteuses du transgène de l'interleukine 3 humaine dans les souris NOD-SCID humanisées.*
- 1996** Dominique Dufflaut. BTS biochimie ENCPB Paris. *Sujet : Transfert de gène codant pour des facteurs de croissance humains dans des cellules de stroma médullaire murin.*

## Enseignement

- 2010-17** Etablissement : Ecole de Biologie Industrielle. Polytechnique Saint Louis. Pontoise (<http://www.ebi-edu.com>). Masters of Business Engineering mention Génomique Industrielle. Méthodologie de la Génomique structurale et fonctionnelle. Cours de Biothérapie (9h/an).
- 2014-17** Enseignements du Master 2 BCG de l'UPEC dans le cadre de l'Unité d'Enseignement Thérapies visant à la Régénération Tissulaire (Créteil) module sur les thérapies visant la réparation tissulaire (1h30). Cet enseignement s'inscrit dans le cadre du M2 de Biothérapies tissulaires, cellulaires et géniques organisé conjointement par l'Université d'Evry, de Paris 13 et l'Université Paris-Est Créteil.
- 2012** *Summer school course* – University of Tokyo. Japan. Radiobiology, Radiation Protection and a Stem Cell Response- Basic Radiobiology, Radiation protection and a Stem Cell Response Summer School Course. Thursday, July 26.

## Membre ou rapporteur d'un jury de thèse

**2016 Examineur :** Thèse Benoit Usunier. Application à la biothérapie au traitement du tissu sain contre les effets tardifs de la radiothérapie; étude préclinique du traitement par les Cellules Souches contre le développement de la fibrose dans le tissu sain exposé aux irradiations fractionnées abdominaux-pelviennes chez le rat Sprague-Dawley. Université Pierre et Marie Curie, École doctorale Physiologie et Physiopathologie (ED 394). Financement IRSN.

**2009 Rapporteur :** Diplôme de l'École Pratique des Hautes Etudes. Sébastien Jacquelin. Rôle du complément et des inhibiteurs de tyrosines kinases dans la réaction du greffon contre l'hôte après greffe de CSH allogéniques chez la souris.

**2008 Examineur :** Thèse Moubarak Mousidine. Utilisation des Cellules Souches Mésoenchymateuses humaines dans les atteintes tissulaires radio induites. Université de Versailles.

**2008 Examineur :** Thèse Aisha Nasef. Rôle des molécules solubles et du contact cellulaire dans l'immunosuppression induite par les CSM et leur sous populations. Université de Besançon.

## Financements

Types de financements	Nombre	Années	Acronyme	Responsabilité
PHRC	3	2016 2007 2004	PRISME	Responsable scientifique Investigateur biologique Co- Investigateur biologique
ANR	1	2014	GIPSIS	Coordinateur
Europe	1	2003	FIRST	Works package
Etablissement Français du Sang	1	2014		Chercheur associé
Région ile de France	2	2005 2008	IdF	Responsable de thèse
EDF	2	1992 1995 1998		Chercheur associé

**2016-2019 INCa.** 3 ans 540 000 euros Investigateur coordonnateur : Pr Mohamad Mohty (service d'hématologie de l'hôpital Saint Antoine). Responsable scientifique : A. Chapel (IRSN). *Protocole Hospitalier de Recherche Clinique. INCa. Essai thérapeutique de phase II évaluant l'efficacité de l'injection de Cellules Stromales Mésoenchymateuses (CSMs) sur la symptomatologie de complications chroniques sévères des radiothérapies abdomino-pelviennes, après échec des thérapeutiques conventionnelles.*

**2014-17** EFS. 400 000 euros 3 ans Coordinateur Luc Douay. Titre du projet : *Vecteurs non intégratifs pour reprogrammer de cellules iPS de grade clinique et validation par différenciation hématopoïétique*. Equipes participantes : UMR\_S938, Centre de recherche Saint-Antoine, Equipe prolifération et différenciation des cellules souches, EFS Unité d'ingénierie et de thérapie cellulaire (UITC), EFS Ile de France, Créteil EFS, UMR5525 CNRS Université Joseph Fourier, Faculté de médecine, Institut Jean Roget, domaine de la merci F-38700 La tronche. IRSN-PRP HOM, SRBE, LRTE.

**2014-17** ANR-DGA 300 000 euro 3 ans ; Coordinateur : A. Chapel, Titre « *Génération de Cellules Souches Hématopoïétiques à partir d'iPS extra-hématopoïétiques chez les patients atteints d'un syndrome aigu d'Irradiation : une stratégie thérapeutique innovante du Syndrome Hématopoïétique.* » Acronyme GIPSIS.

**2007** Protocoles hospitaliers de recherches cliniques PHRC nationaux. Responsable investigations biologiques : *Essai de phase I-II d'injection de Cellules Souches Mésoenchymateuses pour le traitement des dommages tissulaires induits par un surdosage d'irradiation accidentel survenu chez des patients traités pour un cancer de la prostate.*

**2004** Protocoles hospitaliers de recherches cliniques PHRC nationaux (demande de financement pour les investigations biologiques). Responsable des investigations biologiques *Essai clinique de phase I-II (recherche de doses) : efficacité et tolérance de l'apport de cellules souches mésoenchymateuses au cours d'une autogreffe ou une allogreffe de cellules souches hématopoïétiques.*

**2003-2006** Sixth framework programme Further improvement of radiotherapy of cancer through side effect. FIRST Contract no.: 503436. Work package.

**2002-2005** François Sabine bourse de thèse Région Ile de France.

**2005-2008** Moubarak Mouiseddine bourse de thèse Région Ile de France.

**1992-2000** Financement EDF.

## Publications

Mes publications sont regroupées à la fin du document dans le chapitre « **publications personnelles** »

D'après Journal Citation Reports (JCR)

Niveau des revues	Nombre de signatures en premier ou dernier auteur	Nombre de signatures dans un autre rang d'auteur	Facteur d'impact des revues concernées
A	3	8	10,5 à 5
B	21	33	5 à 0
Autres	2	0	Livres

## A. INTRODUCTION

La thérapie cellulaire est en train de révolutionner la médecine. Les progrès très rapides des biothérapies associées à une imagerie de plus en plus performante permettent de concevoir de manière différente les stratégies thérapeutiques. Les missions auxquelles j'ai été associé au sein de l'Institut de Radioprotection et de Sûreté Nucléaire ont contribué à proposer des stratégies thérapeutiques innovantes, fondées sur l'utilisation de la thérapie cellulaire pour le traitement des tissus sains lésés lors d'une irradiation. Là où la pharmacologie avait échoué depuis plusieurs décennies, nous avons pu repousser les limites des traitements dans le domaine des accidents d'irradiation et dans le domaine des séquelles des radiothérapies. En effet, la régénération tissulaire en réponse à une lésion est assurée par les cellules souches adultes. Une déplétion excessive de ces cellules souches réduit les capacités physiologiques de l'organisme à se régénérer, à la suite d'une radiothérapie ou d'une irradiation accidentelle. Les travaux de recherche auxquels j'ai participé ont permis d'apporter des stratégies thérapeutiques pour la prise en charge du syndrome hématopoïétique (SH), la prise en charge des brûlures cutanées, le traitement du syndrome gastro-intestinal (SGI) ainsi que pour les effets secondaires des radiothérapies.

Les Cellules Souches Hématopoïétiques (CSH) sont parmi les cellules souches les plus radiosensibles, leur disparition entraîne un syndrome hématopoïétique (Chapel *et al.*, 1998). Une irradiation accidentelle étant majoritairement hétérogène, il demeure ainsi des territoires médullaires préservés de l'irradiation, conservant leur CSH (Thierry *et al.*, 2002). Une première approche de nos travaux de recherche a été d'amplifier les CSH résiduelles par expansion *ex-vivo*. Les CSH produites, ainsi, *in vitro* en quantité suffisante, elles sont réinjectées au patient irradié afin de corriger le syndrome hématopoïétique (Vetillard *et al.*, 1999, Thèse Vetillard 1999 ; Neildez-Nguyen *et al.*, 1998 a et b, Thèse 1998 ; Huchet *et al.*, 2003 ; Thierry *et al.*, 1995, 1996 ; Bertho *et al.*, 2002, 2005). Une autre stratégie a été de stimuler les CSH résiduelles en les ciblant *in vivo* au moyen d'un anticorps couplé à un gène de facteur de croissance (Durrbach *et al.*, 1999, Chapel *et al.*, 1999, 2004 ; Hirsch *et al.*, 1993). Les CSH transfectées par l'anticorps couplé au gène, produisent alors les facteurs de croissance nécessaires à leur prolifération permettant, ainsi, la reprise de l'hématopoïèse. La dernière approche a été d'utiliser des facteurs de croissance afin de mettre en prolifération les cellules souches résiduelles (Bertho *et al.*, 2005). L'irradiation accidentelle étant souvent hétérogène, l'existence d'une hématopoïèse résiduelle est en faveur d'un traitement cytokinique (G-CSF). Cependant, dans les cas les plus sévères, si le traitement cytokinique ne permet pas la sortie d'aplasie du patient, une autogreffe de CSH issues de cellules souches pluripotentes induites (iPS) est l'unique alternative. Cette approche est une stratégie thérapeutique inédite de l'autogreffe de

moelle osseuse. Nous avons généré des CSH saines à partir d'iPS autologues pour le traitement de l'aplasie médullaire radio-induite (Kobari *et al.*, 2012, Larbi *et al.*, 2012, 2014) dans un premier temps, puis du syndrome digestif. La première originalité de cette étude a été de générer ces CSH à partir d'un tissu extra-hématopoïétique sain et préservé de l'irradiation pour restaurer chez ces patients une hématopoïèse fonctionnelle. La seconde originalité est d'avoir démontré pour la première fois, que ces CSH dérivées d'iPs ont un potentiel hématopoïétique de reconstitution multi-lignages à long terme post-greffe (Harmand *et al.*, soumis). Appliquer les résultats de ce projet à des lignées couvrant la majorité des schémas de compatibilité d'allogreffe permettra d'avoir, en permanence, une source illimitée de cellules souches disponibles pour la régénération des organes lésés par l'irradiation. En effet, il est ainsi possible d'imaginer la création de lignées permettant de répondre aux besoins de la transplantation de CSH, notamment en termes de compatibilité HLA. L'alternative thérapeutique des iPS en thérapie cellulaire repose sur la création de banques d'iPS.

En complément, une autre approche de thérapie cellulaire a été investiguée, à partir d'autres types de cellules souches. Les Cellules Souches Mésoenchymateuses (CSM), ont été décrites dans la littérature comme des cellules possédant un fort potentiel de régénération tissulaire ainsi que des capacités de régulation immunologique et inflammatoire (Benderitter *et al.*, 2010, 2014). En effet, les CSM constituent aujourd'hui un des outils thérapeutiques les plus avancés pour la régénération et la réparation tissulaire avec plus de 263 essais cliniques en cours.

En 2003, en collaboration avec la société *Osiris Therapeutic* (Baltimore, USA), nos travaux ont permis de démontrer que les CSM migrent dans les tissus exposés aux irradiations (Chapel *et al.*, 2003 ; Bensidhoum *et al.* ; 2004, François *et al.* ; 2006, Mouiseddine *et al.* ; 2007). Elles restaurent le microenvironnement médullaire et améliorent l'hématopoïèse (Thèse N. Brouard 1998, Brouard *et al.*, 1998, 2000 ; Garderet *et al.*, 2007). Les CSM assurent la régénération de l'intestin (Sémont *et al.*, 2006, 2010 ; Chapel *et al.*, 2012) et du foie (Mouiseddine *et al.*, 2009, 2012, thèse Mouiseddine 2012). Elles limitent la radionécrose musculo-cutanée (Bensidhoum *et al.*, 2005 ; François *et al.*, 2007 ; thèse François 2005 ; Benderitter *et al.*, 2010, François *et al.*, 2017). Les mécanismes d'action sont dus aux propriétés immuno-régulatrices des CSM (Zhang *et al.*, 2005 ; Nasef *et al.*, 2007, 2008, 2009 ; Thèse Nasef 2009) et à leur action sur les cellules souches endogènes de l'intestin (Sémont *et al.*, 2006, 2010) et du muscle (Vauchez *et al.*, 2009). Elles protègent le foie de l'irradiation par plusieurs effets : 1) anti-oxydatif, 2) protection vasculaire, 3) trophique (François *et al.*, 2013). Elles n'ont pas d'effets secondaires sur le tissu sain (François *et al.*, 2014), ni sur les tumeurs résiduelles après radiothérapie (Che *et al.*, 2010, François *et al.*, soumis).

Ces études ont permis de faire bénéficier des patients irradiés d'un traitement compassionnel en ce qui concerne l'hématopoïèse (Fouillard *et al.*, 2004, 2007) et la radionécrose



musculo-cutanée (Lataillade *et al.*, 2007) ainsi que 4 patients d'Epinal victimes de surdosage de radiothérapie (Voswinkel *et al.*, 2012, 2013). Plus particulièrement, le traitement compassionnel des patients sur-irradiés à l'hôpital d'Epinal a démontré que les CSM peuvent corriger des dommages tardifs dus à un surdosage de radiothérapie : il a été noté une bonne efficacité antalgique et anti-inflammatoire ainsi qu'une diminution des hémorragies (Voswinkel *et al.*, 2013). Des résultats bénéfiques ont également été observés dans le cas du traitement des effets tardifs des radiothérapies des cancers du sein (Caviggioli *et al.*, 2011, 2013 a et b, 2016, 2017 a et b ; Kursova *et al.*, 2009 ; Rigotti *et al.*, 2007, 2010, 2012).

Le nombre croissant de patients survivant au traitement d'un premier cancer ne cesse d'augmenter et pose la problématique de leur qualité de vie à moyen et long terme. La radiothérapie externe entre dans 2/3 des schémas thérapeutiques de traitement anti-cancéreux. Malgré son efficacité indéniable, la radiothérapie occasionne de nombreux effets secondaires tardifs. La prise en charge répétée de ces patients par les hôpitaux pour des soins palliatifs est un coût élevé pour notre système de santé sans apporter de bénéfice thérapeutique. Il s'agit d'un enjeu éthique existe également pour notre société car aucune solution n'est apportée à ces patients en grande détresse morale et physique. Ainsi, les avancées scientifiques dans la compréhension des mécanismes biologiques des complications et des séquelles des traitements de radiothérapie, et la nécessité absolue de proposer des traitements, sont non seulement une question sociétale d'actualité mais aussi un enjeu médical de premier plan.

Dans un domaine où les approches pharmacologiques seules sont un échec depuis plusieurs décennies, la médecine régénérative est des plus prometteuses pour les traitements des séquelles des irradiations. En effet, les travaux de l'IRSN ont montré que la thérapie cellulaire a permis de limiter, voire de reverser ces lésions radioinduites. Cependant, il reste des interrogations sur l'innocuité de ce type de traitement et plus particulièrement, concernant la récurrence tumorale et le potentiel des CSM à promouvoir la fibrose. A notre connaissance, aucune étude n'a porté sur l'influence de la transplantation de CSM après stérilisation tumorale par radiothérapie, ou sur le traitement de la fibrose du côlon par transplantation de CSM (pour revue sur la fibrose et la thérapie cellulaire, voir Usunier *et al.*, 2014). La problématique naît de la difficulté à prédire l'effet des CSM transplantées et du large panel de facteurs de croissance produits par les CSM, dont certains sont pro-tumoraux ou pro-fibrosant. Il a donc été nécessaire de développer un modèle au plus près des traitements des patients : des expériences permettant d'évaluer la sûreté et l'efficacité de la transplantation de CSM avant et après radiothérapie colorectale chez le rat. Sur un modèle de tumorigénèse colorectale suivie de radiothérapie, l'injection de CSM a inhibé la croissance tumorale en modifiant le profil des lymphocytes T et des macrophages du microenvironnement tumoral (Francois *et al.*, soumis). Dans un second modèle, les CSM ont induit une suppression durable de la

fibrose colorectale radio-induite. Les protéines HGF et TSG-6 sécrétées par les CSM bloquent l'acquisition du phénotype pro-fibrosant par les cellules sécrétrices de matrice extracellulaire dans le côlon-rectum. Les CSM ont donc amélioré la survie des animaux dans ces deux modèles (Usunier *et al.*, soumis). Nos résultats supportent la possibilité de l'utilisation des CSM dans le contexte des complications des radiothérapies abdomino-pelviennes.

Un transfert clinique de la thérapie cellulaire dans le traitement des séquelles tardives des radiothérapies abdominopelviennes est actuellement en cours. Les patients sont sélectionnés auprès des radiothérapeutes pour lesquels plus aucun traitement pharmacologique ne permet d'améliorer les séquelles sévères de la radiothérapie abdominopelvienne. L'absence de traitement alternatif, la sévérité des dommages aux tissus sains permet de proposer à ces patients une thérapie cellulaire par les CSM. Les premières inclusions d'un Protocole Hospitalier de Recherche Clinique (PHRC) de phase 2 débuteront en 2017 (Financement INCA, projet PRISME, 2017-2020). Chaque patient recevra plusieurs injections de CSM par voie intraveineuse. Le CHU Saint Antoine (Pr. M. Mothy) est promoteur de l'étude, l'IRSN (A. Chapel responsable scientifique) est l'institut associé.

Toutefois, à notre connaissance, il existe une lacune au niveau de la physiologie et du traitement par CSM des cystites hémorragiques induites par l'irradiation. Nous étudierons donc l'effet des CSM sur un modèle préclinique de cystite radique, ce modèle nous permettra d'identifier les modalités de traitement optimales. Pour les ulcérations les plus graves, des techniques d'ingénierie tissulaire impliquant des CSM, et développées par l'IRSN sur le traitement de l'anastomose, seront mises en place à moyen terme. Suite à ces études une seconde demande de PHRC pourra être élaborée à moyen terme (2019-2022), en élargissant le champ d'application des séquelles traitées.

**L'ensemble de nos travaux a été le fondement d'une nouvelle doctrine qui a révolutionné le traitement des irradiations là où la pharmacologie et la chirurgie avaient atteint leurs limites ; la thérapie cellulaire par les CSM est l'alternative thérapeutique pour le traitement des irradiés accidentels ainsi que celle des patients soumis à une radiothérapie.**

## **B. TRAITEMENT DES IRRADIATIONS ACCIDENTELLES A MOYENNE ET FORTE DOSES**

Le risque nucléaire est une préoccupation croissante au niveau mondial. L'actualité internationale montre que malgré les doctrines de radioprotection et de sûreté, l'accident nucléaire est possible. Soixante-cinq réacteurs nucléaires sont en construction dans le monde. Aux centrales nucléaires il faut ajouter cinq grandes puissances nucléaires (États-Unis, Russie, Grande-Bretagne, France et Chine) qui disposent de 245 réacteurs nucléaires militaires sur 182 bâtiments de guerre (Source : Centre de documentation et de recherche sur la paix et les conflits). L'accident nucléaire est devenu une préoccupation majeure des organismes militaires et civils comme l'Agence Internationale de l'Énergie Atomique (IAEA, <http://www.iaea.org/>). Par ailleurs, le développement d'un programme d'armement nucléaire en Corée du Nord et en Iran, ainsi que les tensions croissantes entre l'Inde et la Chine (pays détenteurs de l'arme nucléaire) inquiètent particulièrement la communauté internationale. Le risque nucléaire demeure important et impose de proposer de nouvelles stratégies thérapeutiques tant aux militaires en opération qu'aux populations civiles. De plus, l'évolution du contexte géopolitique fait craindre plus que jamais la survenue d'un acte de malveillance mettant potentiellement en jeu une menace Nucléaire-Radiologique-Biologique et Chimique (NRBC). Ce risque vient s'ajouter à celui des accidents radiologiques (Epinal, 2004) et nucléaires (Fukushima, 2011). Pour toutes ces raisons, le risque nucléaire demeure important et impose à l'état français, et donc à l'IRSN, d'être en capacité de proposer de nouvelles stratégies thérapeutiques à destination des travailleurs du nucléaire et des populations civiles.

Une explosion nucléaire, un accident sur un réacteur nucléaire, un accident de criticité lors de la manipulation de matière fissile, une exposition à une radiosource puissante ainsi que l'acte de malveillance sont les principales causes d'une exposition à moyenne ou forte dose pouvant induire un Syndrome Aigu d'Irradiation (SAI). Le nombre de décès par SAI est de 180 de 1945 à 2004 sur 600 accidents radiologiques recensés, Hiroshima et Nagasaki exclus. L'accident sur un réacteur nucléaire, à Tchernobyl en 1986, a provoqué un SAI chez deux cents ouvriers et pompiers. L'actualité japonaise montre que, malgré toutes les sécurités des centrales nucléaires, l'accident nucléaire ne peut pas être exclu. Actuellement, 442 réacteurs de puissance fonctionnent dans 31 pays. En 2006, dans le cadre du programme de fission nucléaire, la commission européenne a constitué un consortium d'experts (France, Allemagne, Grande-Bretagne et les Pays-Bas) afin de parvenir à un consensus sur la prise en charge médicale des irradiations accidentelles. L'objectif était de synthétiser les connaissances scientifiques et médicales concernant les lésions radio-induites et d'affiner les techniques de diagnostic et le pronostic. Des échelles de sévérité ont été établies pour les systèmes

hématopoïétiques, neuro-vasculaires, cutanés et gastro-intestinaux. Ils permettent de planifier la prise en charge thérapeutique des patients. L'ensemble de ces données a permis la mise en place d'un premier protocole international, nommé classement METREPOL (*Medical Treatment Protocols for radiation accident victims*) (Fliedner *et al.*, 2008), de gestion médicale de telles situations. Par ailleurs, un consensus médical a été obtenu en 2006 sous l'égide de l'*European Group for Blood and Marrow Transplantation* (EBMT) et de l'IRSN pour la prise en charge thérapeutique de ces victimes (consensus des Vaux-de-Cernay) (Gorin *et al.*, 2006). Afin de permettre une gestion des accidents encore plus efficace, il faut se préparer à une situation d'urgence pour améliorer la prise en charge des accidentés. La qualité des traitements dépend de la connaissance et de l'expérience acquise lors des accidents antérieurs de surexposition aux rayonnements ionisants. C'est pourquoi, une condition préalable à toute évaluation scientifique et à toute comparaison d'informations liées aux accidents d'irradiation est de recueillir des données selon une méthode standardisée (Friescke *et al.*, 2001). Dans ce but, la base de données de recherche (SEARCH, système d'évaluation et d'archivage des accidents d'irradiation basé sur les histoires de cas) a été mise en œuvre comme base de données (<http://www.faw.uniulm.de/radmed/>). Elle contient 824 cas cliniques issus de 81 accidents d'irradiation dans 19 pays (Dörr *et al.*, 2017).

La connaissance acquise, par les différentes équipes de recherche internationales dans le domaine montre que : 1) les stratégies thérapeutiques existantes pour la prise en charge des patients recevant des doses supérieures à 5-6 Gy (syndrome gastro-intestinal, syndrome neurovasculaire (SNV)) étaient inefficaces ; 2) les stratégies thérapeutiques pour les victimes irradiées à très fortes doses et pour des expositions globales (défaillance multiple des organes) étaient palliatives; 3) les stratégies thérapeutiques existantes étaient inefficaces pour la prise en charge des patients irradiés localement à forte dose (atteinte musculo-cutanée et osseuse, doses >25 Gy) ou souffrant de lésions combinées ; 4) ces traitements spécifiques peuvent poser un problème de conditions de stockage et de disponibilité.

Dans le cadre de la santé publique, de la santé du militaire en opération et dans le domaine nucléaire-radiologique, la prise en charge du SAI n'est pas encore maîtrisée. La thérapie cellulaire présente donc un potentiel intéressant pour le traitement des victimes de malveillances ou des irradiés accidentels. Ce contexte amène un regain d'intérêt de différents pays pour l'organisation de la réponse en cas d'accident et le développement de nouvelles contre-mesures médicales pour la prise en charge des victimes: USA : programme du BARDA ; Japon : lancement récent d'un programme de thérapie cellulaire au *National Institute of Radiological Sciences* (NIRS) et projet triangulaire entre l'Université de Fukushima-Nagasaki-Hiroshima ; Chine : Création d'un réseau national d'hôpitaux pour la réponse en cas d'accident radiologique et nucléaire, Hôpital de Suzhou.

## 1. Le Syndrome Aigu d'Irradiation

Les différents syndromes développés par les victimes d'irradiation accidentelle dépendent des conditions d'exposition. Les victimes exposées aux rayonnements ionisants sur de larges volumes corporels, ou en corps entier, peuvent, développer un SAI en fonction de la dose reçue. Il se définit comme l'association d'un syndrome hématopoïétique d'un syndrome gastro-intestinal et d'un syndrome neuro cérébral. Les victimes exposées localement aux rayonnements ionisants peuvent, en fonction de la dose reçue, développer une brûlure radiologique. Par ailleurs, la réponse médicale face à un accident radiologique ou nucléaire est orientée par le nombre de victimes à prendre en charge, le type et la sévérité des syndromes mis en jeu (Dörr *et al.*, 2017). Les travaux de recherche auxquels j'ai participé ont permis d'apporter des réponses aux questions suivantes :

1. **Comment améliorer la prise en charge du syndrome hématopoïétique (SH) ?** Le SH apparaît pour des doses supérieures à 1 Gy. Il se caractérise notamment par une aplasie médullaire dont les conséquences peuvent menacer la survie de l'individu, affaibli par l'apparition d'infections et d'hémorragies ;

2. **Comment améliorer la prise en charge des brûlures cutanées ?** La brûlure radiologique se caractérise par le développement d'une lésion évoluant par vagues imprévisibles dont la gravité va jusqu'à la nécrose pour une dose supérieure à 25 Gy,

3. **Peut-on proposer un traitement pour le syndrome gastro-intestinal ?** Le SGI survient pour des doses supérieures à 6 Gy, et se caractérise par l'apparition de diarrhées, de crampes abdominales, parfois même d'hémorragies digestives et de septicémie dues à la rupture de la muqueuse intestinale et des ulcérations digestives. Il peut entraîner la mort en une à deux semaines.

La prise en charge du SAI n'est pas complètement maîtrisée. La thérapie cellulaire présente un potentiel intéressant pour le traitement de ces victimes (Hérodin *et al.*, 2005).

## 2. Comment améliorer la prise en charge du syndrome hématopoïétique (SH) ?

Le SH est le premier syndrome radio-induit mis en jeu chez l'homme dans le cas d'une exposition externe partielle ou 'corps entier'. Les principales causes du syndrome hématopoïétique sont la suppression des cellules souches hématopoïétiques et de leurs progéniteurs, ce qui entraîne une hypo-cellularité, une aplasie de la moelle osseuse, l'apoptose des lymphocytes et la disparition des autres cellules hématopoïétiques. Le SH se traduit par une aplasie médullaire plus ou moins sévère résultant essentiellement en risques hémorragiques (thrombopénie) et infectieux (neutropénie). La sévérité de la lymphopénie et de la thrombopénie correspondent en général à la dose d'irradiation reçue et au débit de dose. Le taux de chute du nombre absolu de lymphocytes, a été utilisé comme marqueur de pronostic de la profondeur de l'aplasie. D'autres marqueurs ont été investigués comme l'aspartate aminotransférase, la créatinine kinase, l'acide lactique déshydrogénase, l'urée, la protéine C réactive, des miRNA (miR-574-3p) et le Flt3-ligand (Valent *et al.*, 2015, Port *et al.*, 2017, Bertho *et al.*, 2000). Le SH peut engager rapidement le pronostic vital du patient. Comme dit précédemment, les expositions accidentelles aux rayonnements ionisants sont souvent hétérogènes et donc des territoires médullaires sont préservés de l'irradiation. Nous avons exploité cette hématopoïèse résiduelle à des fins thérapeutiques, en récupérant ces cellules afin de les multiplier *in vitro* (expansion *ex vivo*) avant de les réinjecter au patient irradié accidentellement, lors de sa phase d'aplasie médullaire. Dans un second temps, notre démarche scientifique a été de stimuler directement *in situ* les CSH endogènes soit par une approche de thérapie génique ciblée (antiféction) soit par un traitement cytokinique (G-CSF). Dans les cas les plus sévères de nouvelles approches thérapeutiques sont en cours d'investigation.

Vingt-neuf patients ont déjà pu bénéficier de ce traitement par des facteurs de croissance et 19 ont survécu. Cependant, dans les cas les plus sévères, si le traitement cytokinique ne permet pas la sortie d'aplasie du patient, une autogreffe de CSH est l'unique alternative.

### 1. L'expansion ex-vivo

Notre première approche a été de proposer un protocole de thérapie cellulaire basé sur l'expansion *ex-vivo* des CSH. Le principe de la thérapie par expansion *ex-vivo* de cellules hématopoïétiques est de prélever une petite quantité de cellules dans un territoire protégé de l'irradiation, de mettre ces cellules en culture *in vitro* ces cellules de façon à les amplifier, puis de les réinjecter au patient au moment où il en a le plus besoin. Cette stratégie thérapeutique présente

plusieurs avantages : le premier est que la thérapie se fait dans un contexte autologue, le patient est son propre donneur, ce qui évite les complications liées au rejet de greffe ou à la réaction du greffon contre l'hôte. D'autre part, il est possible de marquer génétiquement les cellules avant leur réinjection, ce qui permet de suivre le devenir de ces cellules réinjectées et de déterminer la part prise par ces cellules dans l'efficacité du traitement. Un autre avantage est qu'il est possible de moduler les conditions de culture *in vitro* des cellules de façon à produire, à la demande, des cellules hématopoïétiques soit matures soit immatures. En effet, les cellules matures permettront de lutter contre les conséquences immédiates de l'aplasie (infections et hémorragies), les cellules immatures, quant à elles, permettent de réduire la période d'aplasie en accélérant la reprise hématopoïétique (Thierry *et al.*, 1995).

La stratégie de l'expansion ex-vivo, peut également être appliquée à d'autres types cellulaires et, en particulier, aux CSM, qui sont à l'origine du microenvironnement médullaire, et peuvent, également, pour les CSM les plus précoces comme les CSM STRO1+, générer d'autres tissus tels que le muscle, le tendon ou le cartilage (Brouard *et al.*, 2000). L'étude de l'accident de Tokai-Mura a montré que les victimes d'irradiation en flux mixte gammas/neutrons souffraient d'un syndrome multi-organes, lié à la destruction de cellules de structure, comme les cellules du microenvironnement médullaire ou les cellules musculaires (Chiba *et al.*, 2002). La réinjection de CSM, obtenues après amplification *in vitro* à partir d'un petit prélèvement de moelle osseuse, pourrait permettre non seulement d'assurer le maintien à long terme d'une hématopoïèse normale par la régénération du microenvironnement médullaire, mais également de traiter efficacement ce syndrome multi-organes (

Figure 1).

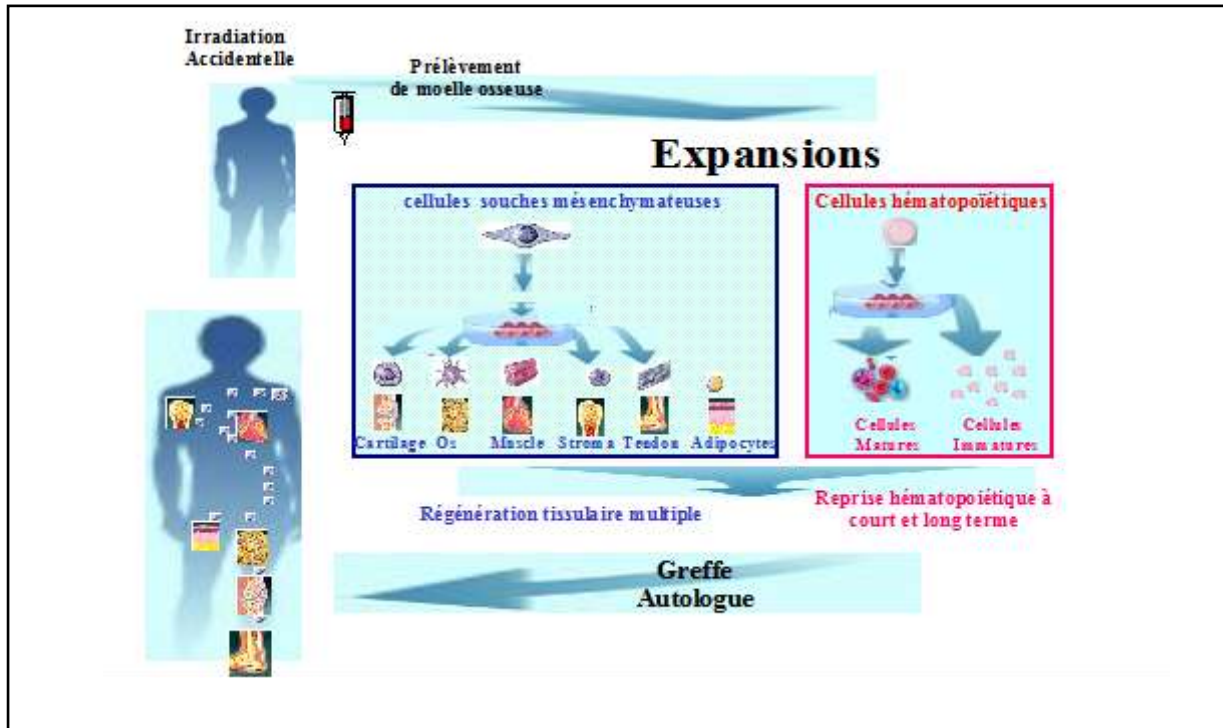


Figure 1 : Thérapie cellulaire après irradiation accidentelle par expansion *ex-vivo* de cellules hématopoïétiques et des CSM : stratégie de production cellulaire et de remplacement pour chaque tissu lésé. Les CSH et les CSM sont issues d'un prélèvement médullaire. Elles sont amplifiées séparément *in vitro*. L'expansion *ex-vivo* de cellules hématopoïétiques produit des cellules matures assurant le soutien de l'hématopoïèse et des cellules immatures permettant la reconstitution à long terme. L'expansion *ex-vivo* des CSM assure les régénérations tissulaires multiples.

En conclusion, nous avons montré que la réinjection des cellules produites par expansion *ex-vivo*, à partir d'un échantillon de moelle osseuse prélevée avant l'irradiation, permet de traiter efficacement l'aplasie médullaire induite par une irradiation. La réinjection des cellules hématopoïétiques produites par expansion *ex-vivo* a permis de réduire la durée et la profondeur de l'aplasie radio-induite pour toutes les lignées sanguines, avec une réduction de la durée de l'antibiothérapie préventive des infections opportunistes et une réduction du nombre de transfusions de plaquettes nécessaires (Thèse Vétillard 1999, TMA Neildez-Nguyen *et al.*, 1998 ; Thèse 1998, Brouard N *et al.*, 1998, 2000 ; Thèse 2000, Huchet *et al.*, 2003 ; Thierry *et al.*, 1999, 2000, 2002, 2004 ; Bertho *et al.*, 2002, 2005 ; Bensidhoum *et al.*, 2004).



## 2. L'antifection

Une autre stratégie a été de stimuler les CSH résiduelles en les ciblant *in vivo* au moyen d'un anticorps couplé à un gène de facteur de croissance (Durrbach *et al.*, 1999, Chapel *et al.*, 1999, 2004, Hirsch *et al.*, 2003). L'anticorps cible l'antigène CD-117 (c-Kit), qui est le récepteur au facteur de croissance Stem Cell Factor (SCF) présent sur les CSH. Le complexe anticorps plus plasmide est internalisé dans les CSH, puis le plasmide migre dans le noyau cellulaire. Le transgène porté par le plasmide est l'interleukine-3, son expression par les CSH, induit leur prolifération cellulaire grâce à un promoteur fort (cytomégalovirus CMV). Le plasmide possédant une origine de réplication eukaryote, il peut être conservé en partie par duplication lors de la division cellulaire. Le transgène est ainsi conservé partiellement dans la descendance des CSH, afin de prolonger son effet. Les CSH transfectées produisent donc les facteurs de croissance nécessaires à leur prolifération permettant ainsi la reprise de l'hématopoïèse. Nous avons démontré l'efficacité et la spécificité du système *in vitro* sur lignées cellulaires et sur des cultures primaires de CSH et également *in vivo* chez la souris (Chapel *et al.*, 1999, 2004).

## 3. Les cellules souches mésenchymateuses (CSM)

Les CSM sont présentes dans divers tissus de l'organisme adulte, dont la moelle osseuse. *In vitro*, les CSM peuvent se différencier en de nombreux types cellulaires du mésoderme, de l'endoderme et de l'ectoderme ; *in vivo*, les CSM ont la capacité de migrer vers un organe lésé ; les CSM favorisent la reprise de l'hématopoïèse (Bensidhoum *et al.*, 2004 ; Mourcin *et al.*, 2004 ; Drouet *et al.*, 2005). Il existe cependant peu d'informations sur le devenir et le potentiel thérapeutique lors de l'injection de ces cellules souches dans un organisme ayant subi une irradiation accidentelle ou thérapeutique.

Nos travaux ont permis de mettre en évidence que les cellules injectées migrent jusqu'aux tissus irradiés. Les premiers travaux ont montré que les CSM de primates non humains (Chapel *et al.*, 2003) et humains (Bensidhoum *et al.*, 2004) avaient la capacité de migrer vers les tissus lésés, avec un taux de CSM implantées plus important dans les zones irradiées à forte dose (François *et al.*, 2006 a ; Mouiseddine *et al.*, 2007). Le prolongement de ce travail a consisté à évaluer le bénéfice thérapeutique de la greffe de CSM dans un contexte d'atteintes tissulaires radio-induites. Ces travaux de recherche s'inscrivaient dans le cadre d'un contrat européen intitulé « *FURTHER IMPROVEMENT OF RADIOTHERAPY OF CANCER THROUGH SIDE EFFECT REDUCTION BY INNOVATIVE APPLICATION OF ADULT STEM CELLS* » (6ème PCRD).

En conclusion, les CSM sont un outil thérapeutique pour obtenir une régénération tissulaire en cas d'atteintes multi-organes lors du traitement du SAI (Eaton *et al.*, 2015)

**Les résultats obtenus dans ces études précliniques ont permis l'élaboration de nouvelles stratégies thérapeutiques pour le traitement des irradiations là où la pharmacologie et la chirurgie avaient atteint leurs limites ; la thérapie cellulaire par les CSM est une alternative thérapeutique pour le traitement des irradiés accidentels ainsi que des patients soumis à une radiothérapie (revue François *et al.*, 2007a).**

***Premiers résultats cliniques chez des patients présentant une insuffisance médullaire secondaire à une prise de greffe incomplète après un conditionnement de chimio-radiothérapie.***

Les CSM ont été utilisées pour le traitement des atteintes secondaires chroniques des radiothérapies. Les premiers résultats positifs ont été obtenus chez des patients présentant une insuffisance médullaire suite à une prise de greffe incomplète survenue après transplantation de CSH autologues. Après chimiothérapie, l'injection de CSM a amélioré le stroma de la moelle osseuse (Fouillard *et al.*, 2003) et induit une récupération rapide et à long terme de l'hématopoïèse (Fouillard *et al.*, 2007). Une diminution de la toxicité hématopoïétique et une amélioration de la reconstitution hématopoïétique ont été mises en évidence (Fouillard *et al.*, 2013). Cette preuve de la greffabilité des CSM a ouvert la voie à de nombreuses applications pour le traitement d'aplasies sévères. Ces résultats ont permis la mise en place d'un protocole de recherche clinique auquel l'IRSN a participé. (2004 Protocoles hospitaliers de recherches cliniques PHRC nationaux (demande de financement pour les investigations biologiques). Responsable des investigations biologiques Essai clinique de phase I-II (recherche de doses) : efficacité et tolérance de l'apport de cellules souches mésenchymateuses au cours d'une autogreffe ou une allogreffe de cellules souches hématopoïétiques.).

#### 4. Facteurs de croissance

Bien que les lignes directrices ont été proposées afin d'aider les cliniciens à l'évaluation, au tri et à la prise en charge médicale des victimes d'accident d'irradiation aiguë, le contrôle des données supportant les recommandations actuelles est basé pour partie sur les données précliniques de l'IRSN. L'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) a réuni un panel d'experts à Genève, en Suisse,

du 16 au 18 mars 2009, pour développer une approche harmonisée pour la prise en charge médicale de la radio-exposition aiguë. Les experts ont examiné les données permettant de proposer une prise en charge clinique du syndrome hématoïétique en utilisant le système de classement des recommandations (*Grading of Recommendations Assessment Development and Evaluation, GRADES*). Un consensus mondial sur l'administration des facteurs de croissance pour la gestion du SH a ainsi émergé (Dainiak *et al.*, 2011), basé sur les données obtenues sur les modèles des gros animaux et, plus récemment, sur la survie de 14 des 15 personnes exposées à des doses inférieures à 5 Gy et traitées avec du G-CSF et du GM-CSF (Dainiak *et al.* 2015). Ces travaux ont abouti à la proposition d'un protocole de prise en charge des irradiés accidentels, dont nos travaux sur le primate non humain, a contribué à la mise en place du traitement en utilisant des facteurs de croissance afin de mettre en prolifération les cellules souches résiduelles (Bertho *et al.*, 2005).

Le traitement de référence passe par l'injection, le plus tôt possible après l'exposition, de facteurs de croissance et de cytokines afin de stimuler l'hématopoïèse résiduelle (Gourmelon *et al.*, 2010 ; Graessle *et al.* ; 2015, Dörr *et al.*, 2017 ; De Revel *et al.*, soumis). Ce traitement stimule la production des CSH et favorise leur mobilisation à partir des territoires sains vers les territoires irradiés. Ceci n'est possible que dans le cas d'une irradiation hétérogène avec présence d'une hématopoïèse résiduelle (Drouet *et al.*, 2010). Il faut noter que le G-CSF ne prévient pas l'apoptose des CSH et il n'a pas d'efficacité sur les autres pathologies du SAI, il n'intervient pas sur le syndrome digestif. Des molécules comme la TPO sont en cours d'investigation (Hérodin *et al.*, 2005). Un projet exploratoire a été mené par Alexandra Sémont au sein de l'Institut sur la niche hématoïétique afin de rationaliser les traitement du SAI.

En conclusion 29 patients ont déjà pu bénéficier du traitement par des facteurs de croissance dont 19 ont survécu (Gourmelon *et al.*, 2010 ; De Revel *et al.*, soumis).

## 5. Les cellules souches pluripotentes induites (iPS)

Pour les patients ayant été exposés à des doses comprises entre 1 et 6-8 Gy, si le traitement cytokinique ne permet pas la sortie d'aplasie du patient, une greffe de cellules souches doit être envisageable. Cependant, le bilan des 48 patients ayant reçu des greffes de CSH (issu de moelle, sang périphérique ou placentaire) de 1958 à 1999 suite à des accidents d'irradiation montre que 48% des receveurs sont morts dans les 50 jours (IAEA, *Training in Emergency Preparedness and Response. Medical management of ARS*). L'une des causes principale de décès a été le rejet de greffe. Une solution alternative serait donc de proposer des greffes autologues.

Cependant, le domaine de la recherche sur les cellules souches a été modifié de manière profonde, et probablement durable, par la description récente de la 'technologie de reprogrammation de cellules adultes (iPS)' : à partir de cellules souches issues de cellules adultes reprogrammées (iPS), il est théoriquement possible d'obtenir toutes les cellules nécessaires à la réparation des tissus, voir à la création d'organes complets et fonctionnels (Takahashi *et al.*, 2007). Cette reprogrammation doit permettre d'obtenir des CSH adultes autologues multipotentes à partir de n'importe quelle source de tissu adulte et de traiter ainsi le syndrome hématopoïétique.

Un programme de recherche intitulé « Génération de CSH à partir d'iPS extra-hématopoïétiques chez les patients atteints d'un syndrome aigu d'Irradiation : une stratégie thérapeutique innovante du Syndrome hématopoïétique (acronyme GIPSIS)» a été initié en 2014. Notre objectif a été de proposer une alternative thérapeutique innovante au traitement des syndromes hématologique et digestif en revisitant la greffe autologue, jusque-là impensable pour les individus irradiés accidentellement. La première originalité était de générer les CSH à partir d'iPS provenant d'un tissu extra-hématopoïétique sain, et préservé de l'irradiation, pour restaurer chez ces patients une hématopoïèse fonctionnelle. Nous avons ainsi généré des CSH saines à partir d'iPS autologues pour le traitement de l'aplasie médullaire radio-induite (Kobari *et al.*, 2012, Larbi *et al.*, 2012, 2014), puis du syndrome digestif. Le développement d'une telle approche autologue, supprimant les dangers d'un transfert de cellules allogéniques, est un progrès important dans la thérapeutique des aplasies. La seconde originalité a été de démontrer, pour la première fois, que ces CSH dérivées d'iPs ont un potentiel hématopoïétique de reconstitution multilignage à long terme. Les perspectives de cette étude sont de dépasser le cadre de l'aplasie médullaire secondaire radio-induite pour appliquer les résultats à d'autres pathologies hématologiques telles que les aplasies du sujet âgé, ou idiopathiques, et les leucémies aiguës.

Ce programme, financé par l'ANR (ANR-ASTRID 2014-2017), propose un nouveau traitement du SH pour des victimes d'une exposition nucléaire ou d'un acte de malveillance (Figure 2). Les participants de ce projet sont des experts issus de différents instituts de recherche tel que l'IRSN, l'INSERM, ainsi que du domaine clinique (Assistance publique - Hôpitaux de Paris, AP-HP). Ce consortium est renforcé par la participation d'un expert du Service d'Hématologie de l'HIA-Percy du Service de Santé des Armées (SSA).

L'originalité de ce programme est d'avoir démontré pour la première fois que ces CSH dérivées d'iPs ont un potentiel hématopoïétique de reconstitution multi lignages à long terme post greffe (Harmand *et al.*, soumis). Le futur le plus proche des iPs est très certainement la création de banques d'iPS choisies pour un phénotype d'intérêt. Il est ainsi possible d'imaginer la création de

lignées permettant de répondre aux besoins de la transplantation de CSH, notamment en termes de compatibilité HLA. Appliquer les résultats de ce projet à des lignées couvrant la majorité des schémas de compatibilité d'allogreffe, permettrait d'avoir, en permanence, une source illimitée de cellules souches disponibles pour la régénération des organes lésés par l'irradiation.

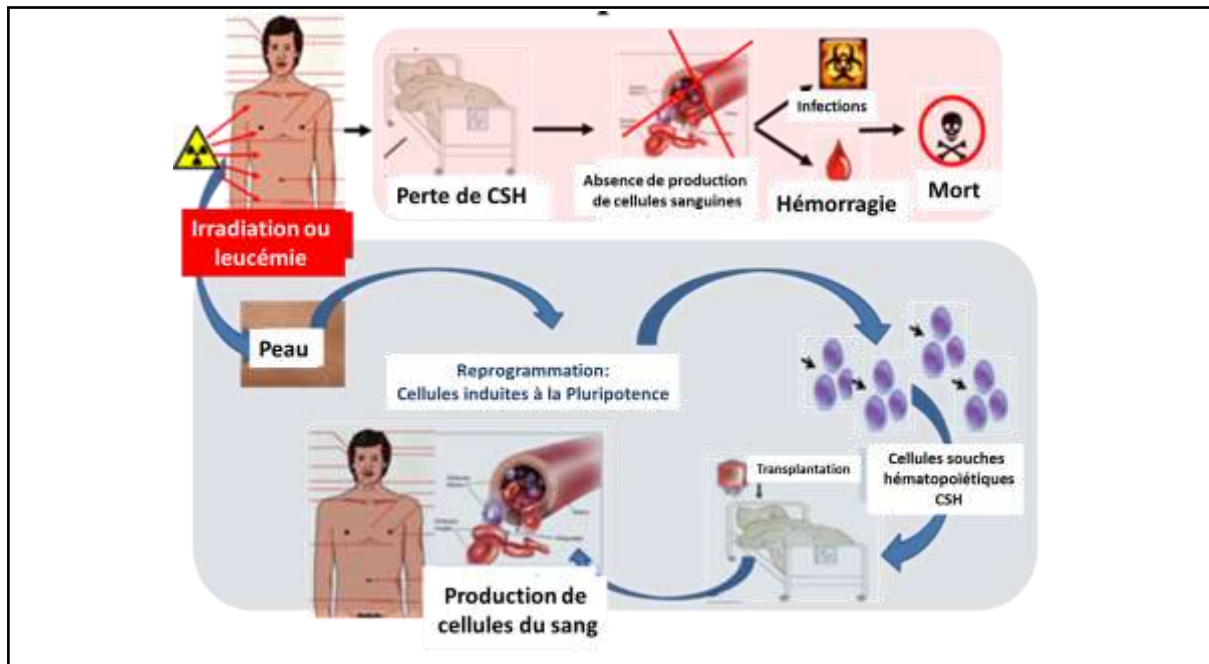


Figure 2 : Principe de l'utilisation des iPS comme alternative thérapeutique au syndrome hématopoïétique. La perte de CSH peut aboutir à la mort de l'irradié. La reprogrammation de cellules de la peau permet de fournir les cellules souches et de constituer des banques. A partir de ces banques nous serions capables, à l'avenir, de reconstituer tous les tissus.

Un tel projet est une première mondiale de démonstration de la régénération d'un tissu dans son intégralité et sa fonctionnalité à partir d'iPS humaines. Ces résultats sont précurseurs à une nouvelle approche thérapeutique de l'ingénierie tissulaire.

**Ce travail amène une première preuve de concept pour une nouvelle approche de greffe de cellules souches après irradiation. Il ouvre potentiellement la voie à la création des banques universelles de cellules souches «médicament», ce qui augmenterait radicalement les capacités de prise en charge et de traitement des irradiés à forte dose.**

Une banque composée de lignes d'iPS représentant les 20 haplotypes les plus fréquents des caucasiens permettrait d'assurer la greffe de 50% de la population caucasienne. Vingt haplotypes les plus fréquents des afro-américains permettraient d'assurer la greffe de 22% des afroaméricains. Une banque comprenant les 100 lignées iPS avec le HLA le plus fréquent dans chaque population (afro+caucasien+asiatique+hispanique) couvrirait les besoins de 22 % des caucasiens, 37 % des asiatiques, 48 % des hispaniques et 55 % des afro-américains. En conclusion, la constitution d'une haplo-banque de lignes d'iPS semble réalisable grâce à une collaboration mondiale concertée à grande échelle (Gouraud *et al.*, 2012).

### **3. Comment améliorer la prise en charge des brûlures cutanées ?**

Les irradiations externes et localisées (54% des accidents d'irradiation) se caractérisent par l'apparition de brûlures radiologiques dont l'évolution clinique est très différente de celles des brûlures thermiques. A la différence des lésions induites par la chaleur apparaissant dès l'évènement initial, les brûlures radiologiques poursuivent leur évolution pendant des mois en vagues successives inflammatoires hyperalgiques. La phase tardive aboutie à une nécrose ischémique de la masse musculaire et à une ulcération profonde. La brûlure entraîne des lésions dont l'importance est imprévisible, les tissus cutanés et musculaires irradiés subissent alors une nécrose irréversible. Le traitement de ces brûlures radiobiologiques consiste en une exérèse des tissus nécrosés suivie d'une greffe de peau. Les approches thérapeutiques classiques échouent le plus souvent, en particulier dans les cas les plus sévères où un processus morbide auto-entretenu apparaît.

Les premiers résultats pré-cliniques obtenus par l'IRSN ont permis d'initier une approche thérapeutique innovante. En effet, nous avons démontré, chez la souris immuno-tolérante, que l'injection précoce de CSM issues de la moelle osseuse humaine (CSMh) limite les atteintes cutanées induites par une irradiation à forte dose et est associée à une cicatrisation plus rapide de ces lésions (Bensidhoum *et al.* ; 2005, Francois *et al.* ; 2006b). L'injection de CSMh permet donc de limiter la fonte musculaire et accélère la récupération fonctionnelle du membre irradié (Francois *et al.*, 2006b, 2007a). La détection de ces cellules humaines dans les zones cutanées en cours de cicatrisation montre que les CSMh sont capables de coloniser la peau altérée par les rayonnements ionisants et favorisent la réparation tissulaire, en limitant les complications tissulaires radio-induites (Figure 3).

**En conclusion, nous avons pu observer que chez les souris greffées avec des CSMh, le niveau d'atteintes cutanées radio-induites est significativement moins important. Les scores cliniques**

utilisés pour l'étude de l'évolution des lésions cutanées sont significativement améliorés. Une cicatrisation plus rapide est mesurée en présence de CSMh.

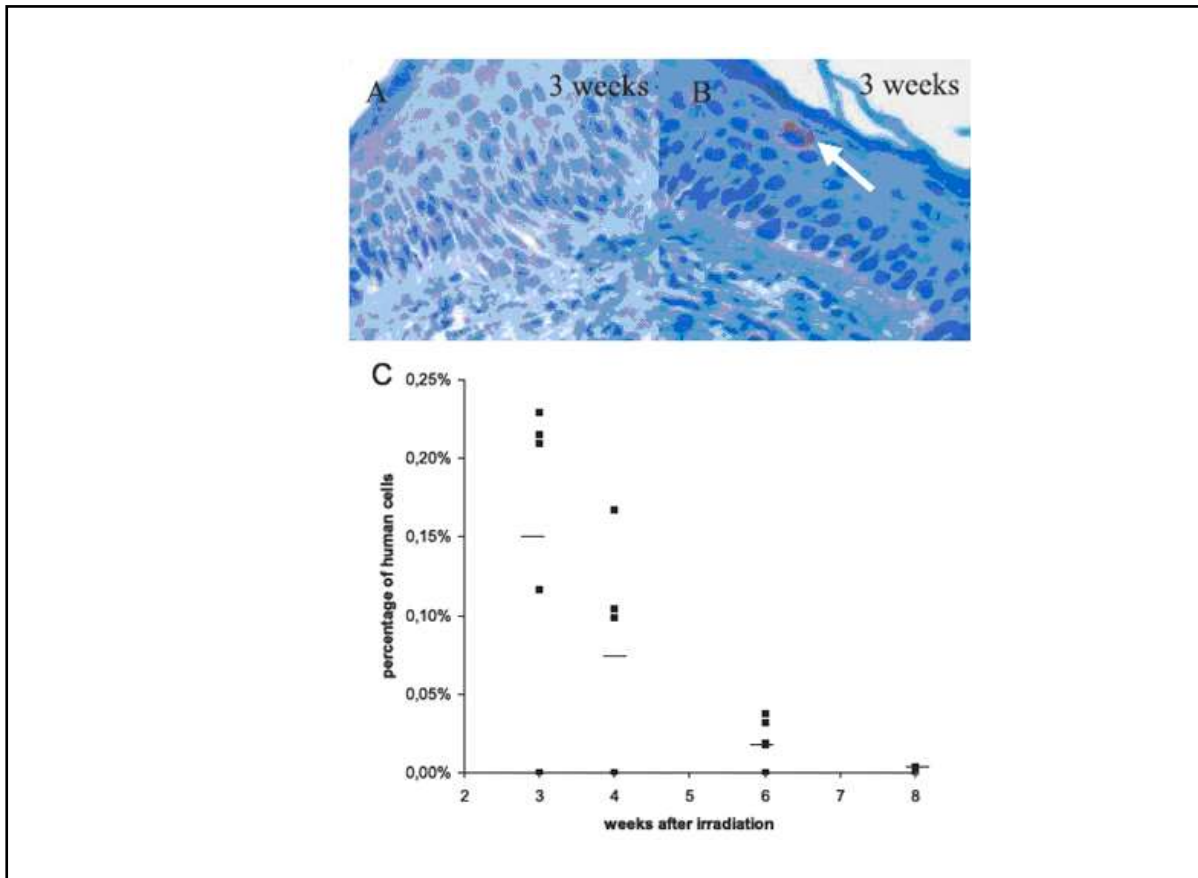


Figure 3: L'implantation de CSM humaines dans la peau de souris a été mise en évidence en immunohistologie par un anticorps anti-beta 2 microglobuline humaine (coloration brune). A : contrôle négatif. B : Cellule souche mésenchymateuse humaine (flèche blanche) implantée dans l'épiderme de souris. Grossissement initial  $\times 50$ . C : pourcentage de CSM implantées dans la peau au cours du temps.

Nous avons également démontré que l'injection locale de CSM au niveau d'une lésion établie (desquamation humide) permettait d'inverser le processus (Figure 4). Après traitement, la desquamation humide est 3,5 fois moins importante ( $p < 0,001$ ), l'inflammation est réduite de 20% ( $p < 0,001$ ), et un gain de mobilité de 70% est mesuré ( $p = 0,01$ ). Les CSM sont retrouvés dans le muscle

7 jours après l'injection. Les CSM agissent à la fois sur les fibroblastes du derme et la migration des kératinocytes (Walter *et al.*, 2010). Les CSM induisent l'accumulation des lymphocytes dans le derme et favorisent la vascularisation dans la zone en régénération (Agay *et al.*, 2010). Des résultats similaires sont observés avec la fraction vasculaire stromale (Forcheron *et al.*, 2012, Domergue *et al.*, 2016)).

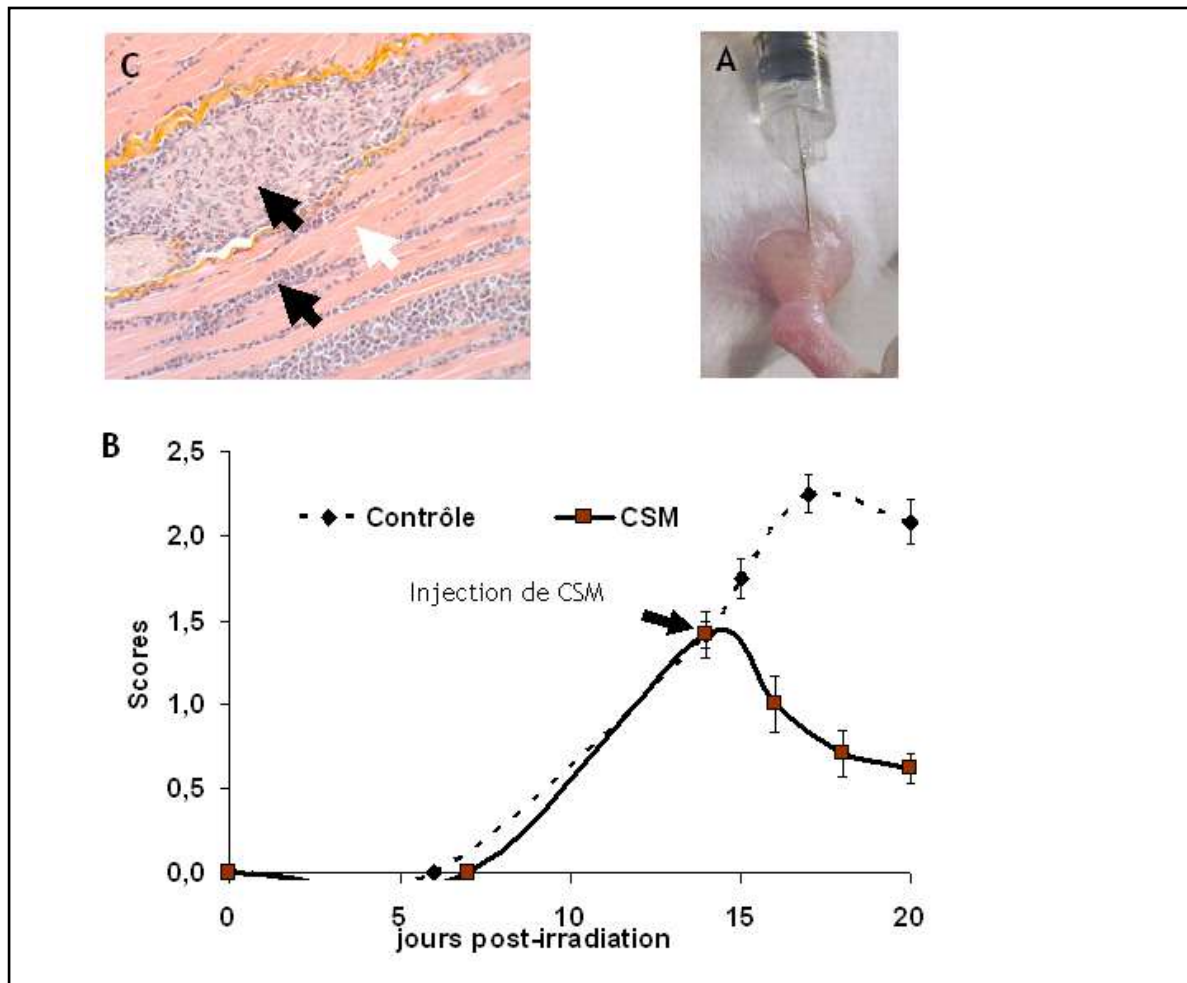


Figure 4 : L'injection locale de CSM diminue la desquamation humide. A : Injection intramusculaire de CSM sur une patte postérieure de souris en desquamation humide. B : Mesure de la desquamation humide au cours du temps après irradiation. Avant injection de CSM il n'y a pas de différence significative entre les deux groupes. Après injection de CSM (flèche noire) la desquamation humide diminue rapidement. C : L'implantation de CSM a été mise en évidence sur coupe histologique du muscle 7 jours après l'injection. Les flèches noires indiquent un foyer cellulaire et une infiltration de CSM, parmi les fibres musculaires (indiquée par la flèche blanche). Grossissement  $\times 200$ .



Dans le but de potentialiser le bénéfice thérapeutique des CSM, nous avons étudié l'effet de la co-injection des CSM avec le facteur pro-angiogénique BMP-2 (*bone morphogenetic protein-2*) sur la cicatrisation du tissu irradié chez le rat, en collaboration avec la faculté de médecine de Tours (Dr V Eder, LAB.P.ART.-EA3852). Nous avons montré que la co-injection de BMP-2 et de CSM accélère la cicatrisation, en favorisant la réparation de l'endothélium et le renouvellement des structures tissulaires, aboutissant ainsi à la régénération de l'épiderme, des follicules pileux et des glandes sébacées, tout en augmentant la densité des fibres de collagène et des vaisseaux sanguins (Figure 5). La co-localisation des CSM avec les cellules CD31+ (marqueur des cellules endothéliales) suggère le recrutement des cellules endothéliales au site d'injection. Dans ce modèle, l'effet du BMP-2 était associé à une activation de la voie de signalisation du HIF-1 $\alpha$ . Ces résultats suggèrent que de nouvelles stratégies thérapeutiques de potentialisation pharmacologique combinant des cytokines aux CSM pourraient être proposées aux cliniciens pour le traitement des brûlures radiologiques (François S. *et al.*, 2017).

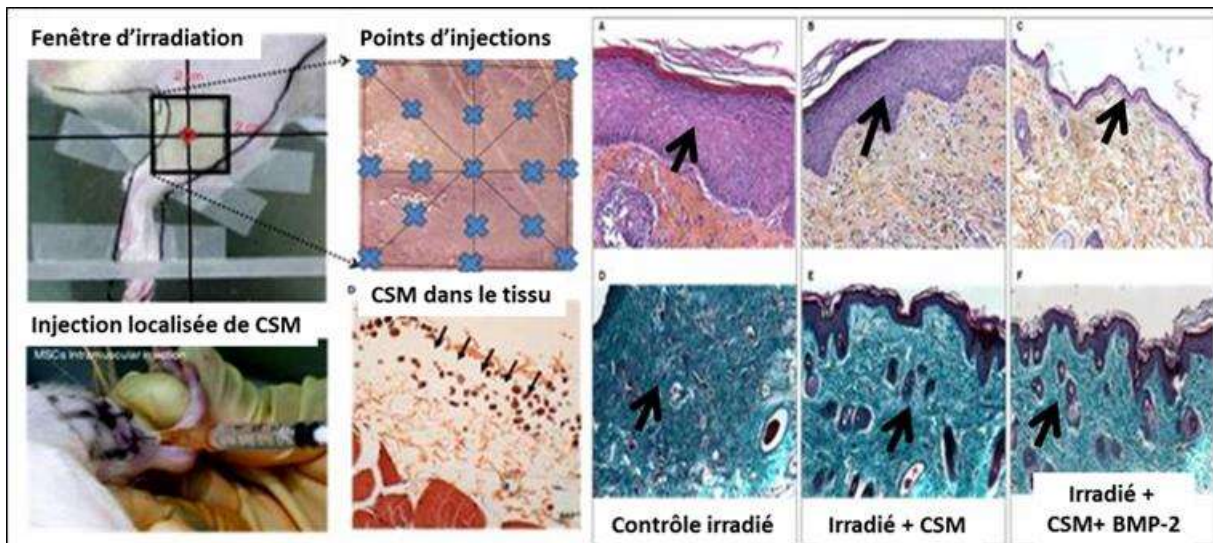


Figure 5 : Illustration de la co-injection locale de BMP-2 et de CSM. et de leurs effets sur la réparation cutanée après irradiation locale de la patte de rat. A gauche, zone de la patte irradiée et points d'injections (croix bleues). A droite, coupes histologiques de la peau irradiée, avec traitement CSM, avec traitement CSM plus BMP-2.

**L'ensemble de ces résultats expérimentaux a permis de proposer un protocole thérapeutique par injection de CSM dans le traitement de victimes ayant subi des brûlures cutanées radiologiques accidentelles. Ce travail a permis de consolider le dossier de demande à l'AFSSAPS.**

#### 1. Utilisation des CSM en clinique : traitements compassionnels

En 2006 à l'HIA Percy, une première victime d'irradiation accidentelle (accident du Chili-2006) a pu bénéficier, à titre compassionnel, d'une thérapie cellulaire consistant en l'administration de CSM médullaires autologues produites *ex-vivo* (Lataillade *et al.*, 2007). Ce patient présentait des lésions radio-induites au niveau de la main et de la région gluteale gauche. Le transfert du patient et sa prise en charge ont été réalisés sur la base des données précliniques générées par l'IRSN, en lien avec l'HIA de Percy, en tant que référents dans le domaine de la prise en charge des patients irradiés. Le patient a été traité dans les 100 jours suivant l'irradiation par l'association d'actes chirurgicaux (parage, autogreffe) et d'injections locales de CSM. La chirurgie a été guidée par la reconstruction dosimétrique réalisée par l'IRSN, conduisant à l'exérèse de tous les tissus ayant reçu une dose supérieure à 20 Gy. Des injections de CSM autologues issues de la moelle osseuse ont été réalisées par voie sous-cutanée et intramusculaire au niveau des lésions et dans les zones péri-lésionnelles. Une diminution significative des douleurs a été observée dans les 48 heures suivant l'injection des CSM. De plus, très rapidement, l'évolution clinique est devenue favorable et la prise de greffe s'est avérée d'excellente qualité. Onze mois de suivi post-transplantation ont permis d'observer une évolution positive de la lésion, sans résurgence de la brûlure. De plus, aucune altération de la fonctionnalité de la zone lésée n'a été notée (Lataillade *et al.*, 2007). Depuis, une dizaine de patients victimes d'irradiation accidentelle à forte dose, d'origine industrielle, et ayant développé des brûlures radio-induites extrêmement sévères, a été traité par des injections locales et répétées de CSM autologues. Ce traitement a été réalisé en association avec une excision chirurgicale des zones nécrosées, guidée par dosimétrie, suivie d'une autogreffe de peau ou d'un lambeau musculo-cutané. Les résultats obtenus ont été spectaculaires et ont permis aux patients traités de recouvrer l'usage de leurs membres, ce qui aurait été impossible avec une prise en charge conventionnelle (Bey *et al.*, 2010). Le suivi de ces patients, jusqu'à 9 ans après traitement, a montré une cicatrisation de bonne qualité sans résurgence de la lésion initiale ou d'effets secondaires. Une diminution de la douleur soutenue dans le temps, de 80 à 40% sur l'échelle de douleur numérique (VAS), a été observée. Ces résultats montrent que la thérapie utilisant les cellules souches est de haute importance en clinique (Lataillade *et al.*, 2007 ; Tamarat *et al.*, 2012).

**La prise en charge médicale du patient chilien constitue le fondement d'une doctrine clinique pour la prise en charge médicale des brûlures radiologiques graves, faisant référence auprès de l'Agence Internationale de l'Energie atomique (AIEA).**

Afin de démontrer l'efficacité des CSM dans la cicatrisation, un programme de recherche cofinancé par la Direction Générale de l'Armement (DGA) (2009-2011) a été réalisé. L'objectif était de mieux comprendre l'effet bénéfique des CSM (issus du tissu adipeux ou de la moelle osseuse) pour le traitement des lésions radiologiques musculo-cutanées sur deux modèles précliniques : rongeur et *mini-pig*. La démonstration de l'efficacité thérapeutique sur deux modèles différents est un prérequis nécessaire pour le transfert clinique. Le modèle préclinique *mini-pig* permettait de combiner l'injection de CSM de la moelle osseuse avec l'acte chirurgical de résection de la partie musculo-cutanée fibro-nécrotique, suivi de son recouvrement par un lambeau cutané vascularisé prélevé en région inguinale non irradiée (collaboration HIA Percy). Le bénéfice thérapeutique de l'injection répétée de CSM sur la cicatrisation des tissus et la qualité de la revascularisation des tissus musculaires sous-jacents ont pu être démontré. (Linard *et al.*, en préparation).

#### **4. Peut-on proposer un traitement pour les complications gastro-intestinales ?**

Le traitement du SGI (doses > 6 Gy) constitue encore un 'mur thérapeutique'. Un traitement asymptotique par prise d'analgésiques, d'antiémétiques, d'antiulcéreux, d'anti-diarrhéiques, d'antibiotiques et d'antipyrétiques est recommandé. Enfin la supplémentation en eau - électrolytes – nutriments pour compenser la perte hydrique massive et l'utilisation de vasopressine pour traiter les hémorragies digestives complètent la panoplie thérapeutique. Les patients développant un SGI ne survivent malheureusement pas au-delà de deux semaines.

L'irradiation induit des atteintes structurales et fonctionnelles de l'intestin. Les conséquences cliniques sont des vomissements, puis des diarrhées aiguës, des saignements et des infections. L'agression sévère du tractus gastro-intestinal se caractérise par la perte d'intégrité de la barrière intestinale. D'un point de vue physiopathologique, le syndrome gastro-intestinal est associé à une rupture de la barrière intestinale suite à un dommage sévère des cellules la constituant (dont les cellules souches intestinales) favorisant ainsi la pénétration, au sein du tissu, d'agents pathogènes activant une forte réaction inflammatoire. Les patients développent une septicémie sévère et souffrent d'une perte de fluide et d'électrolytes massive.

Nous avons démontré la capacité des CSM à migrer spécifiquement vers l'intestin après irradiation (Chapel *et al.*, 2003), résultat confirmé ensuite par d'autres études (Francois *et al.*, 2006, Mouiseddine *et al.*, 2007 ; Zhang *et al.*, 2008). Les CSM peuvent se localiser dans la muqueuse entérique dans laquelle elles inhibent l'ulcération tout en favorisant la régénération (Semont *et al.*, 2006 ; Kudo *et al.*, 2010 ; Semont *et al.*, 2010).

En 2010, une étude chez la souris humanisée a permis de montrer que la transplantation de CSM améliore l'homéostasie cellulaire de l'intestin, notamment au niveau de la muqueuse, en augmentant la prolifération cellulaire et en inhibant l'apoptose (Semont *et al.*, 2010 ; Francois *et al.*, 2012). Cet effet passe en particulier par la stimulation de la prolifération des cellules épithéliales, potentialisée par la sécrétion autocrine de WNT4 (*Wingless Type 4*) par les cellules épithéliales (Sémont *et al.*, 2013). La transplantation de cellules stromales dérivées de la moelle osseuse augmente la concentration sanguine de facteurs de croissance intestinaux et induit la régénération des villosités, accélérant ainsi la récupération fonctionnelle de l'intestin (Saha *et al.*, 2011). Une étude *in vitro* sur des organoïdes issus de l'épithélium intestinal de souris indique que les CSM exercent un effet anti-apoptotique et de stimulation de la prolifération sur les cellules des cryptes (Chang *et al.*, 2016). De plus, les CSM améliorent la régénération musculaire au niveau intestinal (Semont *et al.*, 2010) et augmentent notamment la fonction contractile des sphincters de l'anus (Lorenzi *et al.*, 2008). Gao *et al.* ont montré que l'injection répétée de milieu conditionné par les CSM augmente la survie et diminue la fréquence des diarrhées sur un modèle murin d'irradiation intestinale (Gao *et al.*, 2012). Ce résultat suggère une action paracrine des CSM, ne nécessitant pas de contacts intercellulaires. Dans un modèle d'irradiation colorectale chez le rat, la transplantation de CSM induit la production de glucocorticoïdes qui participent à la diminution de la migration des cellules T, ayant pour résultat de diminuer l'inflammation et de favoriser la régénération de l'épithélium (Bessout *et al.*, 2014). Cet effet immunosuppresseur a également été identifié après irradiation abdominale chez le rat, où une diminution de l'infiltration des polymorphonucléaires a été observée (Chang *et al.*, 2013).

Chez le cochon, les CSM améliorent la rectite radique par un effet pro-angiogénique associé au remodelage de la Matrice Extra Cellulaire (MEC). La régression de la fibrose, ainsi que la diminution de l'inflammation, ont également été observées dans ce modèle (Linard *et al.*, 2013). Enfin, les CSM induisent une réversion de l'hypersensibilité viscérale dans un modèle d'irradiation colorectale chez le rat. Cet effet a été attribué à la diminution des interactions entre mastocytes et fibres nerveuses (Tableau 1, Durand *et al.*, 2015).

Tableau 1: effet des CSM sur les modèles précliniques de complications intestinales des radiothérapies abdomino-pelviennes

Effet	Référence
Migration dans la muqueuse entérique	Chapel <i>et al.</i> , 2003 ; François <i>et al.</i> , 2006 ; Mouseddine <i>et al.</i> , 2007 ; Zhang <i>et al.</i> , 2008 ; Sémont <i>et al.</i> , 2010
Amélioration de l'architecture intestinale	Sémont <i>et al.</i> , 2006 ; Sémont <i>et al.</i> , 2010 ; Kudo <i>et al.</i> , 2010 ; Saha <i>et al.</i> , 2011
Augmentation de la prolifération/diminution de l'apoptose	Sémont <i>et al.</i> , 2010 ; François <i>et al.</i> , 2012, Chang <i>et al.</i> , 2016
Effet pro-angiogénique	Linard <i>et al.</i> , 2013 ; Chang <i>et al.</i> , 2013
Effet immunosuppresseur	Bessout <i>et al.</i> , 2014 ; Chang <i>et al.</i> , 2013
Augmentation de la survie	Gao <i>et al.</i> , 2012
Diminution des diarrhées	Gao <i>et al.</i> , 2012
Réversion de l'hypersensibilité viscérale	Durand <i>et al.</i> , 2015

Les maladies inflammatoires chroniques de l'intestin (ou MICI) regroupent la maladie de Crohn et la rectocolite hémorragique. Toutes deux se caractérisent par une inflammation de la paroi d'une partie du tube digestif. Dans la maladie de Crohn, l'inflammation peut être localisée à tous les niveaux du système digestif, de la bouche à l'anus, même si on la retrouve le plus souvent au niveau de l'intestin. Dans la rectocolite hémorragique, elle est localisée au niveau du rectum et du côlon. Andreyev *et al.* ont proposé, en 2011, d'établir un nouveau formalisme pour les atteintes secondaires des radiothérapies abdomino-pelviennes liées à des altérations fonctionnelles multi-organes. L'ensemble des troubles liés à l'utilisation thérapeutique des rayonnements ionisants au niveau abdomino-pelvien est à présent désigné par le terme « *Pelvic Radiation Disease* » (PRD). Les syndromes observés dans les MICI et la PRD sont très proches. Les CSM ont également été utilisées sur des modèles précliniques et clinique pour traiter avec succès les MICI. Ainsi, la transplantation de CSM a un effet bénéfique sur des modèles expérimentaux de colite. Cet effet se traduit par une diminution de la perte de poids et des saignements rectaux, ainsi que par une amélioration de la consistance des fèces. L'effet des CSM sur ces modèles repose en partie sur leurs propriétés immunomodulatrices, en particulier par la diminution de l'expression de cytokines pro-inflammatoires, telles que le TNF- $\alpha$  et l'IL-1 $\beta$  (Castelo-Branco *et al.*, 2012 ; He *et al.*, 2012). Plus

généralement, l'injection de CSM permet de limiter l'infiltrat inflammatoire dans ces modèles (Duijvestein *et al.*, 2011 ; He *et al.*, 2012).

La régénération de la muqueuse colique a également été observée au cours de ces études, associée à la réduction du nombre d'évènements apoptotiques (Castelo-Branco *et al.*, 2012). Enfin, la transplantation de CSM a induit une diminution du dépôt de collagène au sein du tissu (Castelo-Branco *et al.*, 2012).

### 1. La régénération de l'intestin par les CSM peut-elle prévenir les effets néfastes, induits par l'irradiation, sur d'autres tissus du tube digestif tel que le foie ?

Nous avons montré que l'irradiation induit une altération de l'intégrité hépatique, avec une élévation du taux des transaminases associée à une augmentation du nombre de cellules lysées autour des vaisseaux et des canaux biliaires (Scanff *et al.*, 2004 ; Souidi *et al.*, 2007). L'injection de CSM permet le retour à la normale. Selon que le foie est atteint, ou non, par l'irradiation, les CSM rétablissent l'intégrité hépatique par des mécanismes qui diffèrent. Si le foie est irradié dans sa totalité, les CSM colonisent les zones périvasculaires du foie, protégeant ainsi la vascularisation et évitant la cytolyse des hépatocytes (Figure 6) : elles permettent la restauration du taux plasmatique des transaminases et la diminution de l'apoptose des hépatocytes et des cellules endothéliales (François *et al.*, 2013).

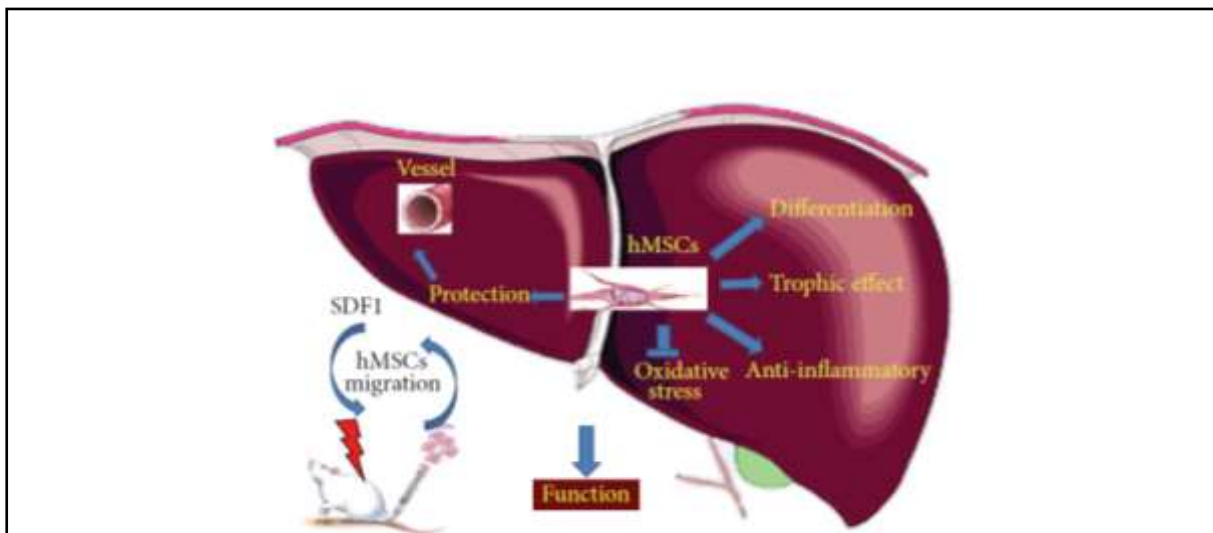


Figure 6 : Effet de l'implantation de CSM dans le foie. Les CSM migrent dans le foie pour la correction des dysfonctions hépatiques après irradiation par une action simultanée de protection vasculaire, de différenciation et par la correction de facteurs trophiques et anti-inflammatoires (de François *et al.* 2013).

Au contraire, lors d'une irradiation abdominale, les CSM ne s'implantent pas dans le foie : la restauration de l'intégrité hépatique par les CSM résulte d'un effet indirect. On observe une augmentation du taux d'un acide biliaire hydrophobe dans le foie, l'acide desoxycholique (ADC) connu comme cytotoxique. Or, l'ADC provient de l'intestin et fait partie du cycle entéro-hépatique. La lésion de l'intestin, consécutive à l'irradiation abdominale, entraîne un dysfonctionnement du transport des acides biliaires. L'injection de CSM, en induisant la régénération de l'épithélium intestinal permet de ramener le taux d'ADC hépatique à son niveau physiologique et de limiter l'apoptose des hépatocytes, protégeant ainsi l'intégrité hépatique de la toxicité des acides biliaires hydrophobes (Mouiseddine *et al.*, 2008).

**En conclusion, cette étude montre que l'effet thérapeutique des CSM passe majoritairement par une action paracrine.** Nos études apportent de nouveaux éléments concernant les mécanismes d'action des CSM. Nous avons mis en évidence que les CSM ont une action réparatrice indirecte sur le foie, directement liée au rétablissement de l'homéostasie intestinale (Mouiseddine *et al.*, 2012). Ainsi, en prévenant les dommages radio-induits de l'intestin, les CSM réduisent le relargage d'acide biliaire et donc la toxicité hépatique caractérisée par une réduction des cellules apoptotiques dans le foie.

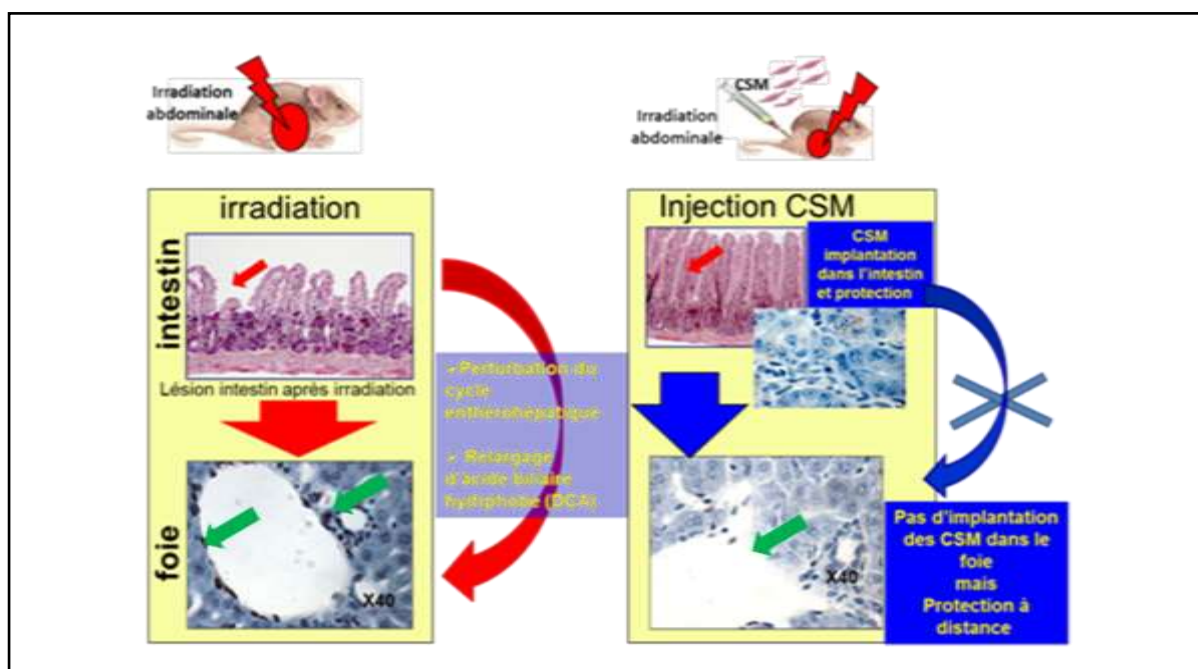


Figure 7: Effet indirect des CSM sur les atteintes du foie après irradiation. Après irradiation les dommages de l'épithélium intestinal (réduction de la taille des villosités, flèche rouge) induisent une perturbation du cycle entéro-hépatique et un relargage d'acide déoxycholique (DCA). La conséquence, dans le foie, est une augmentation du processus apoptotique (cellules en apoptose indiquées par une flèche verte).

L'injection de CSM, 24h après l'irradiation d'un modèle murin protège l'épithélium intestinal et réduit le nombre de cellules apoptotiques dans le foie. La réparation des dommages du foie peut être considérée comme indirecte, car, dans cette étude, l'implantation des CSM n'est observée que dans l'intestin-même (

Figure 7).

En conclusion, le traitement des atteintes digestives par les CSM est un domaine où les applications cliniques se développent comme le montrent les traitements par les CSM des atteintes digestives de la GVHD (*Graft versus host disease*) ou des MICI (clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT00420134) :

- En effet, les CSM limitent l'inflammation, le saignement, la fibrose et la nécrose des tissus sains exposés à une irradiation, là, où, dans le passé, toutes les autres stratégies thérapeutiques ont échoué (Usunier *et al.* 2014). Ces progrès dans la thérapie cellulaire ont ouvert de nouvelles options



de traitement pour les radiodermites (accidents de rayonnement) et les séquelles de radiothérapie pour les cancers du sein, prostate, vessie et utérus (Benderitter *et al.*, 2014).

- Les résultats cliniques actuels sont très prometteurs ; l'efficacité clinique de la thérapie cellulaire, par injection de CSM, a été largement documentée. Six essais cliniques pour le traitement des complications pelviennes sont actuellement en cours. Ils suggèrent une inhibition de l'inflammation chronique et de la fistulization (40 à 80 % de la guérison à 12 mois) et l'interruption des syndromes hémorragiques (70 % des patients à 8 mois). Six essais incluant au total 656 patients utilisant l'injection intraveineuse de CSM pour le traitement des complications abdomino-pelviennes sont actuellement en cours (clinicaltrials.gov).

**- En se basant sur les résultats acquis par l'IRSN et par l'ensemble de la communauté scientifique, nous pouvons dire que la thérapie par les cellules souches s'impose comme une alternative de traitement prometteur face aux complications digestives que ce soit dans le traitement des MICI ou de la PRD. A l'heure actuelle, la thérapie cellulaire n'est pas la référence. Toutefois, elle peut potentiellement devenir l'alternative thérapeutique, surtout chez les patients développant un MICI ou une PRD sévère et réfractaire aux traitements actuels car il est urgent d'améliorer les traitements afin d'éviter des complications systémiques avec prise en charge médicale aboutissant à une intervention chirurgicale.**

## C. LA RADIOTHERAPIE

L'exposition d'un individu à une irradiation, d'origine accidentelle ou thérapeutique, entraîne une atteinte des tissus sains. Le nombre d'irradiations accidentelles est réduit mais la prise en charge est complexe (Thierry *et al.*, 2005). En revanche, le nombre de traitements par radiothérapie, effectués dans le monde entre 1991 et 1996, est estimé à 5,1 millions, la majorité d'entre eux étant réalisée dans les pays développés. Le but de l'irradiation thérapeutique est d'utiliser une dose suffisante pour tuer les cellules tumorales en lésant le moins possible les tissus sains. Cependant, ces traitements sont souvent accompagnés d'effets secondaires dus aux atteintes des tissus sains. Les doses d'irradiation nécessaires au contrôle du développement tumoral engendrent des phénomènes de toxicité aiguë, qui affectent la qualité de vie des patients. Actuellement, il n'existe aucun traitement des complications issues de l'exposition aux fortes doses. Les seuls traitements disponibles en post-exposition, particulièrement pour la sphère abdominale, sont de type palliatif et associent des : analgésiques, des anti-émétiques, des anti-ulcérant, des anti-diarrhéiques, des antibiotiques, des anti-pyrétiques. Dans un domaine où les approches pharmacologiques seules sont un échec depuis plusieurs décennies, la médecine régénérative est des plus prometteuses pour les traitements des séquelles des irradiations.

L'enjeu majeur du programme de thérapie cellulaire initié par l'IRSN, est le développement d'une recherche fondée sur une étroite collaboration entre les chercheurs et les cliniciens avec pour finalité une application clinique.

Ce programme s'appuie sur la connaissance de la physiopathologie des tissus sains irradiés afin de proposer un traitement de thérapie cellulaire. Compte tenu de leurs nombreuses applications cliniques, le type de cellules retenues est la CSM. Les CSM constituent aujourd'hui un des outils thérapeutiques les plus avancés pour la régénération et la réparation tissulaire avec plus de 263 essais cliniques en cours dans le monde actuellement (<https://clinicaltrials.gov>).

## 1. Cancer et organes à risques (OAR)

Le dernier rapport de l'Institut National du Cancer sur les cancers en France fait état d'une projection de 384 442 nouveaux cas de cancers en France pour 2015. Ce chiffre est en augmentation constante depuis le XX<sup>ème</sup> siècle. Entre 1980 et 2012, le nombre de nouveaux cas de cancers a augmenté de 109%. La sphère abdomino-pelvienne concentre la plus grande incidence de cancers : chez l'homme, la prostate, le côlon-rectum, la vessie, les testicules. Chez la femme, le côlon-rectum, et le col de l'utérus, les ovaires font partie des organes à taux de cancer élevé. Ces cancers et leur incidence respective en France sont détaillés dans le Tableau 2.

Tableau 2 : projections en 2015 de l'incidence des cancers de la zone abdomino-pelvienne par sexe en France (Source : Institut National du Cancer - Les cancers en France - édition 2015).

Organe	Sexe	Incidence
Prostate*	Hommes	53 913
Côlon-rectum	Hommes	23 535
	Femmes	19 533
Vessie	Hommes	9 758
	Femmes	2 547
Corps de l'utérus	Femmes	8 151
Ovaire	Femmes	4 575
Col de l'utérus	Femmes	2 797
Testicule	Hommes	2 300

Environ 60% des patients atteints de cancer seront traités par radiothérapie au cours de leur parcours de soins. En 2014, 198 168 personnes ont été traitées par radiothérapie. De nombreux OAR sont compris dans cette zone et sont donc impactés par ces protocoles : intestin grêle, vessie, testicules.

Le Tableau 3, ci-dessous, liste les OAR concernés lors des radiothérapies de la sphère abdomino-pelvienne.

Tableau 3 : organes à risque en fonction de l'organe de la sphère abdomino-pelvienne traité par radiothérapie (Source : Institut National du Cancer - Les cancers en France - édition 2015). Les organes les plus fréquemment retrouvés sont soulignés.

Organe traité par radiothérapie	Organes à risque
Rectum	Intestin grêle
Canal anal	Intestin grêle, vessie, vulve, grandes lèvres
Col de l'utérus	<u>Rectum, vessie</u> , canal anal, intestin grêle, <u>colon</u> sigmoïde, vagin
Endomètre	<u>Rectum, vessie</u> , canal anal, intestin grêle, <u>côlon</u> sigmoïde, vagin
Vulve	<u>Rectum, vessie</u> , urètre, canal anal, intestin grêle, côlon sigmoïde,
Prostate	<u>Rectum, vessie</u> , canal anal
Vessie	<u>Rectum</u> , canal anal, intestin grêle, <u>colon sigmoïde</u>
Testicule	Moelle épinière, rein, estomac, intestin grêle, côlon
Vessie	<u>Rectum</u> , canal anal, intestin grêle, <u>côlon sigmoïde</u>

Comme indiqué sur le Tableau 3, le côlon, la vessie et le rectum sont fréquemment à risque lors des radiothérapies de la zone pelvienne. Il existe des méthodes permettant de limiter les effets secondaires à ces tissus sains. Par exemple, réaliser la séance de radiothérapie sur un patient ayant la vessie pleine limite l'exposition de cette dernière lors de l'irradiation du rectum ou du col de l'utérus. A l'inverse, il est difficile de protéger l'intestin grêle qui est très mobile et pourra donc avoir changé de position entre deux séances. Il est impossible à l'heure actuelle de prévenir totalement les atteintes aux tissus sains et une forte proportion de ces patients développera des complications aiguës, voire tardives dans un nombre plus limité de cas.

## 2. Complications des radiothérapies abdomino-pelviennes

L'exposition des organes sains entourant la tumeur lors d'une séance de radiothérapie induit une toxicité forte au niveau de ces organes. De nombreux patients subissent des effets secondaires après radiothérapie, allant de l'érythème cutané à des pathologies potentiellement létales, telle que la fibrose. En raison de l'incidence des cancers abdomino-pelviens et de la forte radiosensibilité des organes y siégeant, les effets secondaires au côlon et au rectum sont particulièrement fréquents.

Les effets secondaires des radiothérapies dans la zone abdomino-pelvienne sont classés par le délai d'apparition : aigus (0-3 mois) et tardifs (supérieurs à 3 mois). La toxicité tardive peut se manifester jusqu'à 30 ans après le traitement. Les effets tardifs atteignent majoritairement les tissus de soutien avec développement d'une fibrose pouvant entraîner la perte de fonctionnalité de l'organe atteint. L'activation d'oncogènes par les rayonnements ionisants peut également engendrer l'apparition de tumeurs radio-induites à des temps tardifs. Il est à l'heure actuelle impossible de circonscrire l'effet de l'irradiation aux seules cellules tumorales et le traitement des effets secondaires reste un enjeu prioritaire dans l'amélioration de la prise en charge des patients.

Lors du traitement des cancers abdomino-pelviens, les organes du tractus gastro-intestinal (intestin grêle, côlon et rectum) sont donc à risque. Aux États-Unis, environ 300 000 patients reçoivent une radiothérapie abdominale ou pelvienne chaque année. L'incidence des effets aigus au tractus gastro-intestinal est d'environ 60 à 80% (Hauer-Jensen *et al.*, 2014). Les effets tardifs sont moins fréquents, mais leur incidence augmente avec la survie des patients. Ainsi, on compte 4 à 10% de patients atteints de complications chroniques 5 à 10 ans après radiothérapie, et jusqu'à 20% sur 20 ans (Andreyev *et al.*, 2011). Il y a plus de 13 millions de survivants de cancers aux États-Unis et des estimations projettent une augmentation jusqu'à 18 millions en 2022. Plus de la moitié de ces patients ont subi une radiothérapie abdominale ou pelvienne. Il est donc probable que le nombre de patients souffrant de séquelles tardives de radiothérapies abdomino-pelviennes croitra dans les mêmes proportions au cours de cette période. La réduction de l'incidence et le traitement de ces complications est donc une priorité.

Andreyev *et al.* ont proposé en 2011 d'établir un nouveau formalisme pour les atteintes secondaires des radiothérapies abdomino-pelviennes. L'ensemble des troubles liés à l'utilisation thérapeutique des rayonnements ionisants au niveau abdomino-pelvien est à présent désigné par le terme PRD. Cette nouvelle terminologie est destinée à mettre en avant cette pathologie, mal connue des médecins et à laquelle peu d'attention est apportée d'après les auteurs (Andreyev *et al.*, 2011).

La Figure 8 présente les mécanismes d'apparition de la PRD ainsi que les manifestations physiopathologiques et cliniques de cette pathologie.

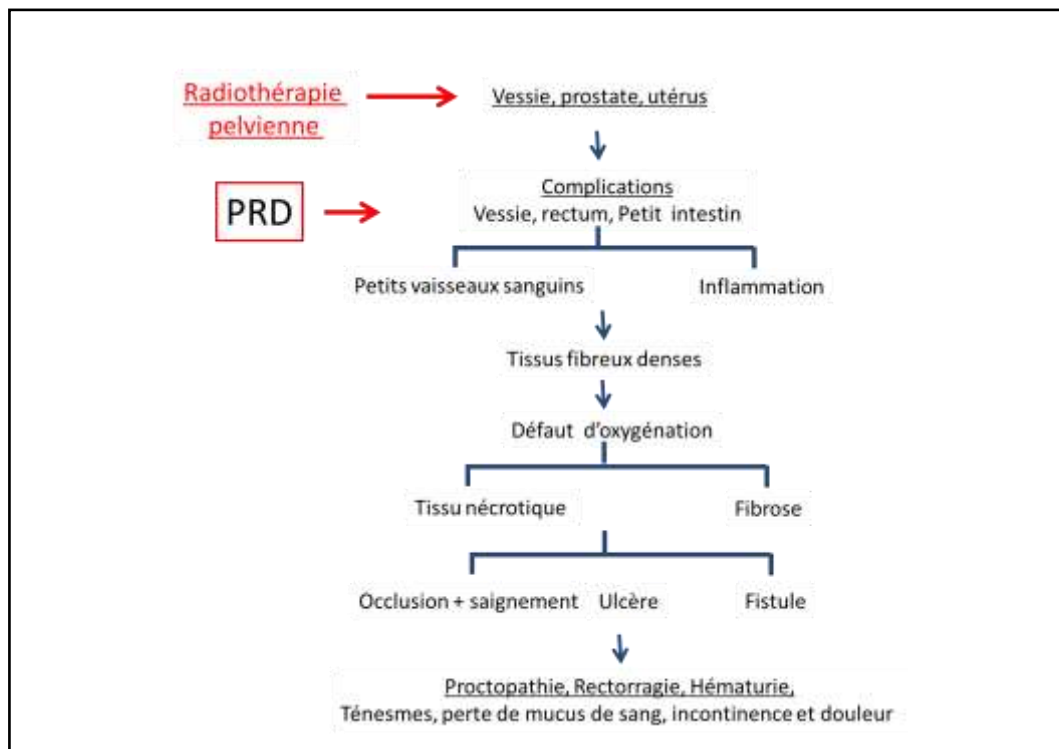


Figure 8 : Mécanismes et manifestations de la PRD

### 1. Dommages chroniques au côlon-rectum

Vingt ans après la radiothérapie, le nombre de patients souffrant de complications intestinales chroniques peut atteindre 20%. Les symptômes apparaissent typiquement dans un délai de 6 mois à 3 ans, mais la période de latence peut, dans certains cas, atteindre 20 ans. En situation de complication chronique, l'activation des fibroblastes et des cellules musculaires lisses du côlon-rectum se traduit par l'accumulation de collagène menant à la fibrose. Cette activation des cellules résidentes résulte de la mise en place d'une réaction inflammatoire chronique, permettant l'activation de facteurs de croissance pro-fibrosant. La mort des cellules endothéliales, associée à la production de matrice extracellulaire (MEC) dense, induit l'ischémie du tissu, pouvant mener à la nécrose. Ces modifications peuvent résulter en une dégénération vasculaire, une formation de vaisseaux télangiectasiques, une ulcération de la muqueuse et une adhésion de la séreuse. Les principales caractéristiques cliniques de ces pathologies sont : l'altération du transit intestinal (diarrhées, constipation), l'incontinence, les vomissements, les saignements et des douleurs viscérales chroniques. Les modifications pathologiques de la barrière intestinale peuvent conduire à

l'obstruction par perte des mouvements péristaltiques et sténose. Certains patients développent des fistules suite aux effets décrits ci-dessus (Hamama *et al.*, 2012).

Il est important de noter que l'association de la radiothérapie avec d'autres types de traitements, tels que la chimiothérapie ou la chirurgie, peut augmenter les risques de complications. Les facteurs augmentant le risque sont également nombreux : MICI, diabète, pathologies vasculaires, collagénoses des vaisseaux, tabagisme... Ces facteurs sont à prendre en compte lors des prises en charge de patients atteints de complications radio-induites chroniques.

## 2. Effets secondaires aux autres organes de la sphère abdomino-pelvienne

### a) Vessie

La cystite radique est une lésion de la vessie associée aux radiothérapies pelviennes externes qui peut survenir des années après le traitement (Crew *et al.*, 2001). La cystite radique se traduit par l'apparition d'hématurie caractérisée par une inflammation hémorragique de la muqueuse du tractus urinaire (

Figure 9). Les symptômes cliniques varient de l'hématurie microscopique asymptomatique à l'apparition de caillots et la survenue de l'obstruction du tractus urinaire (Trotman *et al.*, 1999 ; Lee *et al.*, 2003). Cette pathologie provoque des douleurs sévères, une hématurie importante ainsi que des incontinenances et des syndromes d'irritation. Dans sa forme sévère, la cystite hémorragique détériore la qualité de vie des patients, prolonge leur hospitalisation et peut devenir létale. De plus, les patients en rémission de cette pathologie présentent une survie sans maladie plus faible que les patients n'ayant pas présenté ce type de troubles (Cesaro *et al.*, 2003 ; 2008). Les dommages causés par les rayonnements aux muscles et aux cellules endothéliales de la vessie compromettent l'apport sanguin et de nutriments aux tissus (Neheman *et al.*, 2005, Haldar *et al.*, 2014 a et b). La survenue de la cystite radique est difficile à prévenir, en particulier car les vaisseaux endommagés peuvent survivre des mois voire des années.

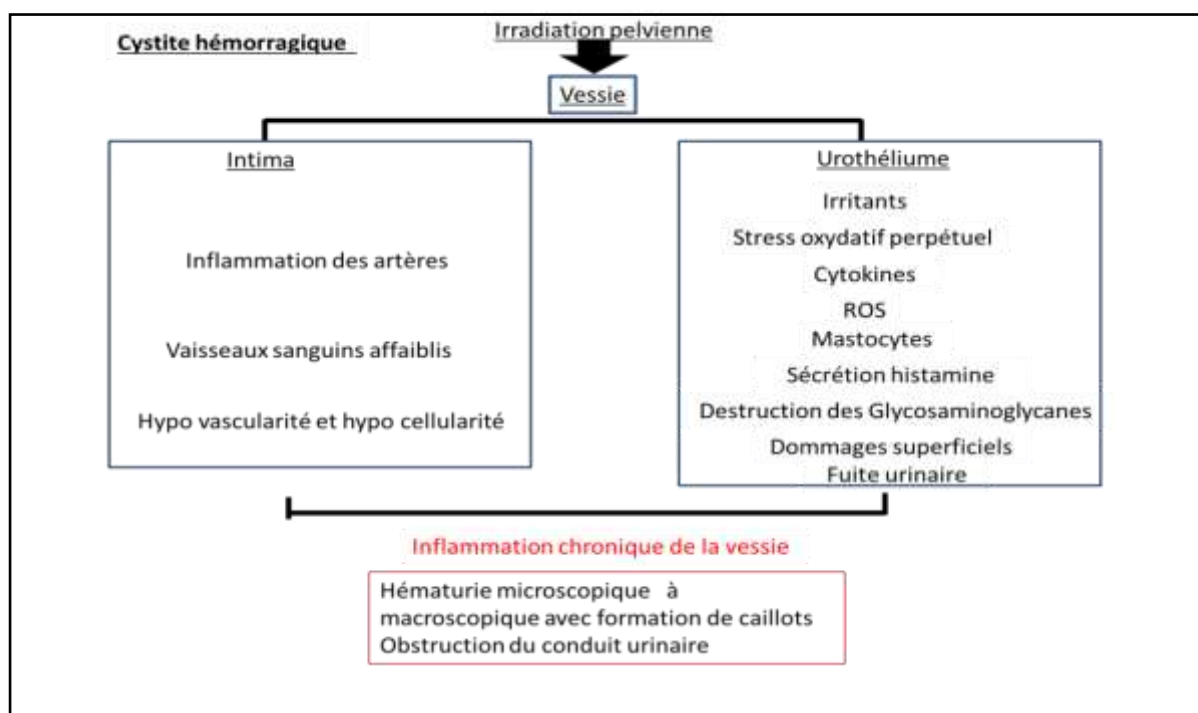


Figure 9 : Mécanismes de la cystite hémorragique.

#### b) Traitements des effets secondaires au côlon-rectum

La plupart des traitements existant sont symptomatiques. Il existe trois types de thérapies possibles pour traiter la PRD : pharmacologique, endoscopique et chirurgicale. Trois mécanismes à l'origine des symptômes de la PRD ont particulièrement été visés : l'inflammation, l'hypoxie et le stress oxydant. Hanson *et al.* ont réalisé une méta-analyse des résultats obtenus lors d'essais cliniques de thérapies innovantes pour la PRD (Hanson *et al.*, 2012). Ces traitements sont décrits dans le Tableau 4.

La méthode endoscopique de coagulation par plasma argon (APC : *Argon Plasma Coagulation*) a fait l'objet de nombreuses études cliniques. L'APC consiste à appliquer un courant à haute fréquence sur le tissu afin de cautériser les vaisseaux hémorragiques. Les essais cliniques réalisés jusqu'à présent montrent que cette méthode permet de réduire les saignements rectaux à court et long terme. Des cas de résolution complète de ces symptômes ont également été observés. Néanmoins, les effets secondaires sont nombreux et parfois lourdement impactant pour la qualité de vie des patients. En effet, le plasma produit des brûlures sur le tissu environnant les vaisseaux à traiter. Ces lésions peuvent par conséquent donner lieu à divers effets secondaires dont les plus fréquents sont des crampes abdominales et des ulcérations. En revanche, des lésions plus sévères apparaissent avec une fréquence moindre : explosion gazeuse, perforation, fistule, sténose et douleur chronique (Frazzoni *et al.*, 2015). D'autres méthodes reposant sur un principe similaire, telles



que la coagulation par laser Nd:YAG, ont été utilisées sans succès en raison d'effets secondaires lourds ou d'un manque de données fiables en clinique. En ce qui concerne l'APC, il est encore nécessaire de réaliser des essais sur des cohortes plus importantes, randomisés, en double aveugle et contre placebo, à court et long terme.

Les méthodes pharmacologiques sont à l'heure actuelle considérées comme moins prometteuses. Le formaldéhyde peut être appliqué directement sur les vaisseaux hémorragiques afin de stopper les saignements, mais les effets secondaires sont sévères (ulcérations, incontinence, colite...). Le stress oxydant est un mécanisme majeur d'induction des dommages radio-induits. Différents agents ont été utilisés pour limiter ce stress oxydant chez les patients irradiés : le tocophérol et la pentoxifylline par exemple (Hamama *et al.*, 2012). Cependant, aucune de ces molécules n'a pour l'instant produit un effet satisfaisant sur la réduction des lésions radio-induites (Hanson *et al.*, 2012).

Des stratégies visant à favoriser l'angiogenèse au sein du tissu lésé sont à l'étude. La thérapie par oxygène hyperbare induit la régénération des tissus endothéliaux et épithéliaux. Les méthodologies employées lors des essais cliniques correspondant ne permettent pas à l'heure actuelle de conclure sur l'efficacité du traitement. Un essai sur 120 patients souffrant de saignements rectaux réfractaires aux traitements médicamenteux a permis de montrer une diminution de 32% du risque de nouvelles hémorragies chez ces patients. En revanche, une analyse rétrospective sur des patients souffrant de cancers récurrents de la tête et du cou a montré une augmentation significative du risque de récurrence cancéreuse chez les patients traités par oxygène hyperbare.

Enfin, la chirurgie est la méthode actuellement la plus employée en dernière intention, mais les taux de morbidité et de mortalité qui y sont associés sont élevés.

Un registre du suivi des patients ayant eu un traitement par radiothérapie est nécessaire. Une optimisation de la balistique pour un ciblage plus précis de la tumeur telle que la radiothérapie conformationnelle par modulation d'intensité (RCMI) ou les méthodes de stéréotaxie, la tomothérapie ou le *Cyberknife*. Cependant ce type d'appareillage est rare en France, la conséquence est que seul un nombre réduit de patients peut bénéficier du *Cyberknife*, de plus les effets à long terme sont encore inconnus.

Il est donc nécessaire de développer des marqueurs prédictifs de radiosensibilité (Bourgier *et al.*, 2012), afin d'identifier les patients qui ont des risques élevés de développer des séquelles tardives des radiothérapies (Bourgier *et al.*, 2015). L'apoptose radio-induite des lymphocytes T CD8 positif semble un marqueur prédictif (Azria *et al.*, 2015). Afin de permettre une meilleure

optimisation des protocoles de radiothérapie, un programme intitulé « ROSIRIS » a été développé par l'IRSN. Il a pour but la compréhension et l'identification de marqueurs de la radiosensibilité permettant d'attribuer un risque individuel à chaque patient subissant une radiothérapie (<http://www.irsn.fr/FR/Larecherche/Organisation/Programmes/rosiris/Pages/presentation-rosiris.aspx#.WPsA5FWLSUk>).

En conclusion, il n'existe aucun traitement validé en termes d'efficacité et d'innocuité pour la PRD.

Tableau 4 : Interventions chirurgicales et non-chirurgicales pour le traitement des complications colorectales chroniques et sévères des radiothérapies (D'après Denton *et al.*, 2002 ; Hong *et al.*, 2001 ; Rustagi *et al.*, 2011)

Thérapie	Mécanisme	Résultat	Effets secondaires
<b>Anti-inflammatoires :</b> Prednisolone Sulfasalazine Hydrocortisone Bétaméthasone Métronidazole	Traitement anti-inflammatoire de première intention	Réduction des saignements, des ulcères de la muqueuse (4 semaines) des diarrhées, des œdèmes, des érythèmes rectaux (1 an, 22/24 patients)	Pas d'effets secondaires enregistrés
<b>Acide gras à chaînes courtes</b>	Effet trophique sur la muqueuse colique, dilatation des parois des artères : entraîne l'amélioration du flux sanguin	Efficace à court terme : diminution des saignements (5 semaines), pas d'effet significatif à long terme	Pas d'effets secondaires enregistrés
<b>Sucralfate</b> <b>Polysulfate de pentosane</b>	Stimulation de la régénération de l'épithélium, formation d'une barrière protectrice, réduction de la perméabilité épithéliale et prévention de l'adhérence	Amélioration de l'état clinique et de la muqueuse sans score permettant de démontrer l'efficacité	Un cas d'éruption cutanée avec le pentosane
<b>Formaline</b>	Sclérose et fermeture de la néovascularisation prévenant les saignements. L'application locale induit la cautérisation	208 patients suivis en moyennes sur 6 mois. Réduction des saignements pendant au moins 3 mois	11 cas d'effets secondaires sévères : 5 cas d'ulcérations anales, 2 cas de sténose rectale, 2 cas d'incontinence et 2 cas de douleurs anales
<b>Thérapies par coagulation thermique :</b> <b>Laser ND :YAG</b> <b>Laser argon</b> <b>Ablation par radiofréquence</b> <b>Cryoablation</b>	Coagulation locale des vaisseaux télangiectasiques, cicatrisation et ré-épithélialisation avec apparition de tissu normal à long terme	Diminution des saignements rectaux (80 – 90% des cas), des ténèsmes (60 – 75%) et de la qualité de vie	19 à 35% de complications Nécrose transmurale, fibrose, sténose, fistules recto-vaginales, douleurs.
<b>Oxygène hyperbare</b>	Effet pro-angiogénique, particulièrement adapté aux phases chroniques des lésions radio-induites	Pas d'évaluation de l'efficacité disponible	Augmentation du risque de résurgence dans le cas des cancers de la tête et du cou (67,3% contre 30% chez les patients non traités)
<b>Autres traitements :</b> <b>Vitamine C et E</b> <b>Pentoxifylline</b>	Antioxydants	Pas d'évaluation de l'efficacité disponible	1 cas de douleurs abdominales et 1 cas de perforation
<b>Chirurgie</b>	Généralement réservé aux cas sévères et réfractaires aux traitements conventionnels impliquant : hémorragies, occlusions, sténoses, fistules et/ou perforations	-	Taux de morbidité et de mortalité élevés

### c) *Traitement des séquelles des radiothérapies abdomino-pelviennes par thérapie cellulaire*

Récemment les recherches se sont focaliser ses recherches sur les effets toxiques de l'irradiation au niveau du côlon et du rectum (organe particulièrement radiosensible) compte tenu de la fréquence et de la sévérité des lésions post-radiothérapie. L'altération structurale du côlon ainsi que l'inflammation radio-induite peuvent entraîner des dommages fonctionnels en cascade à d'autres organes présents, ou non, dans le champ d'irradiation par sensibilisation croisée. Ainsi, le tableau clinique s'échelonne selon sa gravité, de la diarrhée légère et précoce à des complications tardives plus sévères telles que les rectites radiques. Dans le cas de rectites radiques, le point de non-retour est la fibrose. Elle se caractérise par un épaissement et une rigidité du tissu pouvant aboutir à une occlusion létale. Les inconforts de vie des patients liés aux dysfonctionnements du tractus digestif sont accentués par la présence, dans 50% des cas, de douleurs abdominales décrites comme extrêmement intenses. La chronicité et l'intensité des symptômes peuvent, dans certains cas, entraîner chez les patients souffrant de PRD, une prédisposition au développement de comorbidité psycho-affective. Une méta-analyse a démontré que les traitements conventionnels des PRD ont une efficacité très limitée et transitoire, en revanche la thérapie cellulaire semble pouvoir apporter une alternative thérapeutique prometteuse. L'efficacité de la thérapie cellulaire par injection de CSM a été documentée lors de six essais cliniques portant sur le traitement de pathologies pelviennes autres que la PRD (656 patients), dont 3 de phase III. Les résultats suggèrent une inhibition de l'inflammation chronique et de la fistulisation (pour 40 à 80 % des patients à 12 mois) et des syndromes hémorragiques (pour 70 % des patients à 8 mois) (Hanson *et al.*, 2012 ).

## **3. L'accident d'irradiation d'Épinal**

Entre 2001 et 2006, 397 patients ont reçu une surdose d'irradiation d'environ 10% au centre hospitalier d'Épinal, lors d'un protocole de radiothérapie pour le cancer de la prostate (Peiffert *et al.*, 2007). Vingt-quatre patients ont reçu une surdose d'irradiation de plus de 20%. Quelques mois plus tard, la plupart de ces patients souffraient de rectites et de cystites invalidantes, nécessitant pour certains de lourdes interventions chirurgicales (Peiffert *et al.*, 2007, Marchesi *et al.*, 2009). Plusieurs de ces patients ont subi une colostomie ou une urétérostomie et présentaient des douleurs intenses résistantes aux traitements morphiniques. Sept patients présentaient des lésions de grade III à IV avec colostomie de décharge et des fistules complexes ou recto-vésiculaires.

En l'absence de traitements efficaces pour ces patients et en se basant sur nos résultats précliniques, en collaboration avec le service de radiothérapie de la Pitié Salpêtrière (Dr Simon) et le service d'hématologie et de thérapie cellulaire de l'Hôpital Saint Antoine, Paris (Pr Gorin et Pr Mothy,) un essai compassionnel de thérapie par les CSM a été proposé à quatre patients atteints de colites hémorragiques radio-induites (2007-2012, Figure 10). Pour ce traitement, les CSM ont été produites à partir de la moelle osseuse de donneurs intrafamiliaux par ECellFrance (Etablissement Français du Sang (EFS) Mondor, Dr H Rouard ; Centre de Transfusion des Armées (CTSA) Clamart, Pr JJ Lataillade). Conformément aux Bonnes Pratiques de Fabrication des médicaments à usage humain, des contrôles qualité ont été réalisés afin de s'assurer que la matière première biologique de départ, les produits intermédiaires, vrac et finis de production étaient conformes aux spécifications définies par les deux plateformes de production (EFS et CTSA) et le promoteur de l'essai clinique (Hôpital Saint-Antoine).

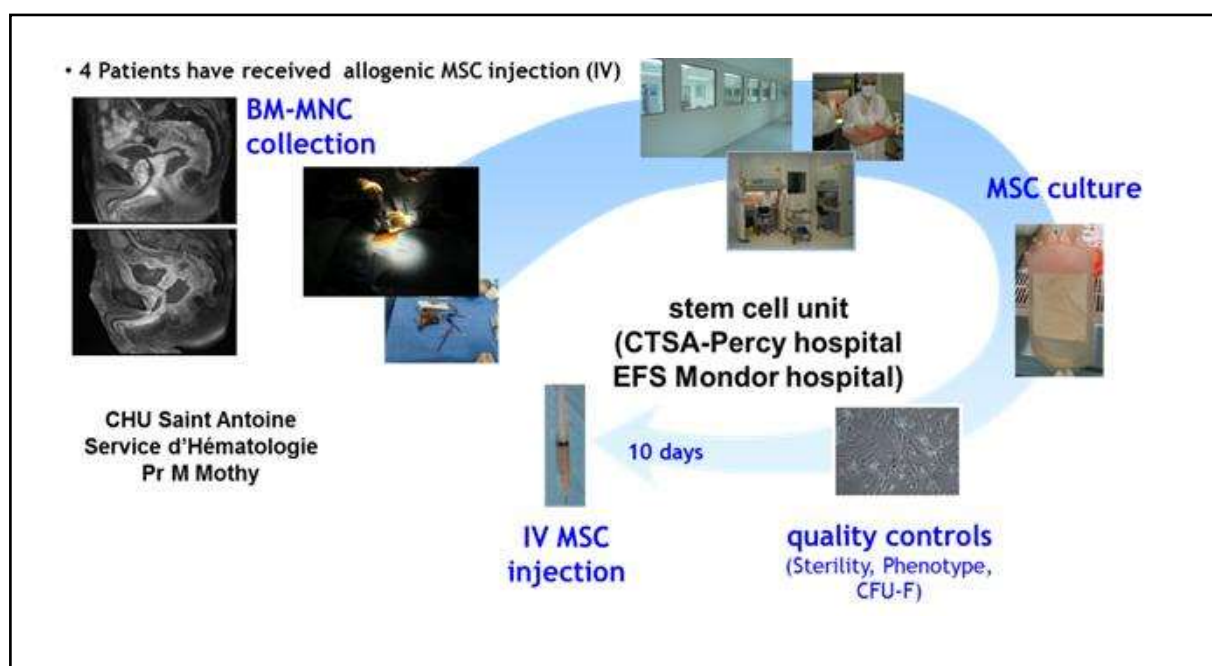


Figure 10 : Protocole de traitement compassionnel de 4 patients atteint de PRD. Les CSM ont été obtenues à partir d'un prélèvement de moelle chez un donneur intrafamilial et amplifiées sur les 2 plateformes *ECellFrance* (EFS, CTSA) puis réinjectées par voie intraveineuse (IV) dans le service d'hématologie des Pr. Gorin et Pr. Mothy.

Les quatre patients ont reçu entre 0,8 et  $5.10^6$  cellules/kg par voie intraveineuse (Figure 10). La transplantation de CSM a induit un effet analgésique, anti-inflammatoire et a permis de réduire les hémorragies (Chapel *et al.*, 2013). Ces résultats étaient associés à une réduction de l'activation des lymphocytes T et une hausse du nombre de lymphocytes T régulateurs, soulignant l'importance des effets immunomodulateurs des CSM. La douleur est réapparue chez un de ces patients 6 mois après transplantation, et une nouvelle injection de CSM a été réalisée. Ce deuxième traitement a permis de réduire la douleur de façon significative. La transplantation de CSM a également stoppé la progression d'une fistule chez l'un de ces patients. Chez l'ensemble de ces patients, le cancer de la prostate est resté en rémission stable. Aucune toxicité n'a été observée (Voswinkel *et al.*, 2013). Les résultats de cet essai sont rapportés dans le Tableau 5. Cet essai compassionnel permet d'envisager de traiter des patients pour les séquelles des radiothérapies abdomino-pelviennes notamment pour les rectites radiques. Il est donc fondamental de déterminer l'effet de cette thérapie sur la fibrose radio-induite. Actuellement, un nouveau Protocole Hospitalier de Recherche Clinique est financé par l'INCa (Institut National du Cancer) en prolongement de l'essai compassionnel d'Épinal. Cet essai thérapeutique de phase II a pour but d'évaluer l'efficacité de l'injection de CSM sur la symptomatologie de complications chroniques sévères des radiothérapies abdomino-pelviennes, après échec des thérapeutiques conventionnelles (Acronyme « PRISME », numéro de protocole d'étude: P130935 ; EUDRACT 2014-001462-99 ; NCT02814864 <https://clinicaltrials.gov/>). Cette étude a pour objectif de mesurer l'efficacité de trois injections intraveineuses de CSM sur la fréquence des rectorragies et des hématuries chez des patients souffrant de PRD.

Tableau 5 : Caractéristiques cliniques des patients d'Épinal traités par transplantation de CSM

Patient	Complications radio-induites	Traitement après radiothérapie	Résultats de la transplantation de CSM
<b>N°1</b> <b>78 Gy</b> <b>93,2 Gy</b>	Écoulements d'urine dans le rectum Pollakiurie Douleurs mictionnelles Saignements Large zone nécrotique Fistule dans la cavité prostatique	Colostomie Cathéter sous-pubien	Disparition de la douleur 10 jours après injection et réapparition 3 semaines plus tard
<b>N°2</b> <b>73 Gy</b> <b>91 Gy</b>	Douleurs chroniques Saignements rectaux permanents Rétraction vésicale Cystite et rectite actives Perte du lien vessie – prostate Fistule recto-prostatique	Colostomie de décharge Application d'une sonde de Foley	Suppression de la douleur et des saignements 4 semaines après injection et rechute 6 semaines après Suite à la deuxième injection de CSM : disparition de la douleur et des saignements et rechute 3 mois après
<b>N°3</b> <b>69 Gy</b> <b>86 Gy</b>	Réduction de la capacité de la vessie due à l'épaississement des parois vésicales Atrophie des glandes séminales Conversion des acides gras suite à l'irradiation de l'épine sacro-iliaque	Colostomie de décharge 20 séances d'oxygénothérapie	Réponse clinique 6 mois après transplantation avec réduction de la thérapie analgésique
<b>N°4</b> <b>70 Gy</b> <b>78 Gy</b>	Rectorragie de grade 3 et diarrhées de grade 2 Cystite de grade 1 associée à une pollakiurie de grade 1 Douleur permanente accompagnée de crises de douleurs plus intenses une ou deux fois par semaine	Colostomie de décharge 20 séances d'oxygénothérapie	Réponse clinique 6 mois après transplantation : réduction stable des saignements, diarrhées et douleurs Amélioration de la qualité de vie

L'essai compassionnel sur les 4 patients de l'accident d'Épinal a été la preuve que l'injection de CSM permet transitoirement de limiter la PRD chez l'homme (Chapel *et al.*, 2014). Ainsi, plus largement, cet essai laisse espérer que l'injection de CSM est une alternative prometteuse pour la prise en charge des complications chroniques sévères des radiothérapies.

Malgré ce succès thérapeutique, une résolution complète de la pathologie n'a pas été mise en évidence.

Dans ce contexte, l'IRSN a orienté son programme de recherche afin d'optimiser ce nouveau traitement en ciblant les points particuliers suivants :

- la quantité de CSM injectées et la fréquence des injections,
- la méthode et la voie d'administration,
- l'efficacité de la source de CSM et la possibilité d'autres sources tissulaires,
- la nécessité d'un traitement associé pour une meilleure efficacité,
- le recours à l'ingénierie tissulaire.

Bien qu'aucune toxicité n'ait été observée lors de cet essai compassionnel, le passage en clinique (phase II) sur un plus grand nombre d'individus impose de démontrer l'innocuité d'un tel traitement dans des conditions précliniques similaires.



## 4. CSM et correction des atteintes colorectales

Afin d'optimiser l'efficacité du traitement par thérapie cellulaire, il est nécessaire de s'interroger sur la voie d'administration, la fréquence d'injection, le taux d'implantation et la survie des cellules injectées. Si le questionnement autour de la modalité d'injection ne se pose pas dans le cadre de lésions musculo-cutanées, où le choix s'oriente fort logiquement vers une délivrance locale, la question garde tout son sens en revanche dans le cas des lésions d'organes internes notamment digestifs. Le retour d'expérience concernant les essais menés en clinique, nous a permis de retenir la voie systémique comme voie de référence. Pour autant, il nous paraît pertinent de ne pas se priver d'une délivrance localisée, directement au niveau de la zone à réparer, afin d'augmenter le taux d'implantation dans le but de diminuer le nombre de cellules à injecter pour une même efficacité. Compte tenu du caractère transitoire de l'efficacité thérapeutique, il convient de s'interroger sur le bénéfice d'injections répétées afin de prolonger le bénéfice thérapeutique. La thérapie cellulaire comporte une étape d'amplification des cellules qui pourrait être limitante dans le cas d'un acte de malveillance. Le passage en clinique impose également de s'assurer de la non-toxicité du produit de thérapie cellulaire injecté. Pour cela, il est nécessaire d'évaluer le devenir à long terme des cellules injectées et l'effet des CSM sur le processus de tumorigénèse et la fibrogénèse.

Afin d'optimiser le traitement, un modèle d'irradiation localisée au niveau de la zone colorectale a été développé chez le rat. La caractérisation histologique des lésions induites chez l'animal a montré des dommages similaires aux atteintes observées chez les patients développant des complications sévères suite à un traitement de radiothérapie pour un adénocarcinome rectal (ulcération, œdème, sclérose vasculaire et fibrose, Figure 11, Sémont *et al.*, 2013). Ce modèle a permis au laboratoire de décrire les processus physiopathologiques qui s'opèrent après une irradiation localisée sur différents compartiments essentiels du côlon (Moussa *et al.*, 2016).

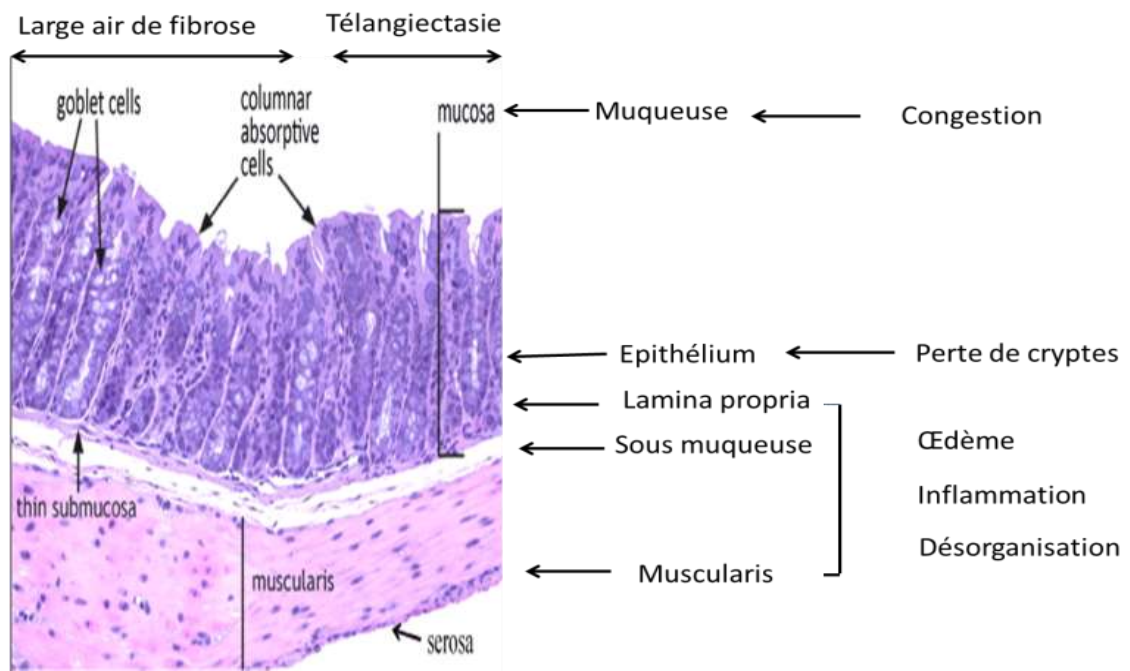


Figure 11 : Illustration des différentes atteintes au niveau des différents compartiments du colon après irradiation.

Le modèle développé chez le rat a également été caractérisé comme un bon modèle d'étude de l'hypersensibilité viscérale radio-induite et des troubles affectifs de type comportements anxieux et dépressifs. Sur ce modèle, la preuve de concept de l'efficacité thérapeutique des CSM a été réalisée en utilisant des conditions d'administrations définies sur le retour d'expérience de : 1) le traitement de pathologies gastro-intestinales (la maladie de Crohn et de réaction du greffon contre l'hôte) décrits dans la littérature, 2) le retour d'expérience du traitement des patients sur-dosés d'Epinal, 3) les données expérimentales obtenues chez la souris traitée pour un syndrome gastro-intestinal.

Dans le contexte de l'irradiation localisée colo-rectale, le traitement par CSM injectées 24 h post-irradiation (inflammation aiguë) ou 3 semaines après irradiation (inflammation chronique) réduit significativement l'infiltrat de la population lymphocytaire T CD4-CD8 dans la muqueuse (Bessout *et al.*, 2013 et 2015), ce qui n'est pas le cas lorsque l'injection est réalisée entre ces deux phases inflammatoires (Linard C. *et al.*, 2016). Les données de la littérature avaient mis en évidence l'importance du contexte inflammatoire pour l'activation des propriétés immunosuppressives des CSM. Les résultats obtenus confirment ainsi le rôle immuno-modulateur des CSM dans différents contextes (aigu/ subaigu) de l'inflammation radio-induite.

Afin d'optimiser les protocoles cliniques, nous avons développé un modèle gros animal (porc) d'exposition radiologique localisée (à dose unique) générant des lésions histopathologiques semblables à celles observées cliniquement dans la *proctitis* chronique et caractérisées par une fibrogénèse. Afin d'optimiser le protocole, 3 injections systémiques de  $2 \times 10^6$  CSM/kg, de CSM dérivés de la moelle osseuse, ont été réalisées lorsque la lésion était établie. Ce protocole a nécessité la mise au point et la production de CSM porcines issues de la moelle osseuse par le CTSA, Clamart). Ces cellules présentent les caractéristiques phénotypiques (CD90+, CD29+, CD44+, SLA-1+ et CD45-) et de différenciation semblables aux cellules d'origine humaine. Les injections répétées de CSM ont réduit considérablement la gravité des lésions anorectales et coliques liées à l'inflammation, en diminuant l'expression des cytokines inflammatoires, l'infiltration des macrophages en modifiant leur phénotype avec une prédominance de macrophage de type M2 et en favorisant la génération de Tregs caractérisés par leur facteur de transcription spécifique Foxp3, et l'expression d'IL-10.

En favorisant la prédominance des macrophages M2 agissant sur la phase de régulation de l'inflammation aiguë/chronique et sur le remodelage matriciel, les CSM ont limité la fibrose anorectale radio-induite. Le calcul du ratio "collagen-to-MMP-to-TIMP", indicateur de la tendance à l'accumulation/dégradation, a permis de démontrer une nette fibrolyse suite à la transplantation de CSM. **En conclusion, ce modèle pré-clinique a permis d'asseoir le potentiel thérapeutique des CSM, dont la pleine efficacité sur l'inflammation et la fibrose nécessite des injections répétées** (Linard C. *et al.*, 2013, Figure 12).

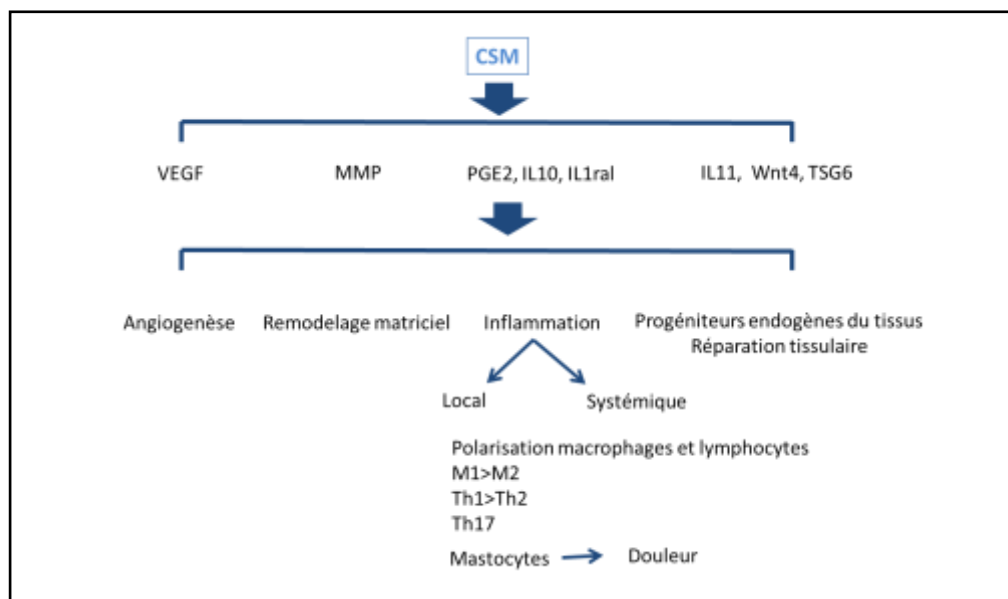


Figure 12 : Mécanismes d'action des CSM

## 5. Absence de toxicité des CSM

L'absence de toxicité du traitement par CSM a été évaluée par un suivi sur le long terme des animaux injectés. Nous avons ainsi pu montrer que l'injection systémique de 5 millions de CSM humaines, 24h après une irradiation corps entier d'un modèle de souris immunotolérante n'a engendré aucune anomalie histo-pathologique, même après 4 mois, sur l'ensemble des organes ni aucune tumeur. (Francois *et al.*, 2012, grant IdF). Les toxicités hépatique et rénale que pourrait induire l'injection intraveineuse ont aussi été vérifiées. Aucune variation significative des transaminases, urée et créatinine n'ont été observées (Mouiseddine *et al.*, 2012, grant IdF).

## 6. CSM et cancer colorectaux

En clinique, le blocage majeur lié à l'utilisation des CSM dans le contexte des complications de la radiothérapie est le risque de récurrence tumorale ou de potentialisation des cellules tumorales résiduelles. À nouveau, la problématique naît de la difficulté à prédire l'effet des CSM transplantées et du large panel de facteurs de croissance produits par les CSM, dont certains sont pro-tumoraux. Les modèles précliniques tumoraux avec l'administration exogène de CSM ont abouti à des résultats contradictoires quant à leur capacité à soutenir ou à inhiber le développement de tumeurs (Lee *et al.*, 2012). Selon l'expérience, il a été suggéré que les CSM inhibent ou augmentent l'immunité, l'angiogenèse et l'apoptose. Ce qui est important, c'est que la plupart de ces études ont utilisé des souris déficientes en lymphocytes T (Zhao *et al.*, 2010) bien que ces cellules sont des cibles importantes des CSM pour la modulation du microenvironnement tumoral (Lazennec *et al.*, 2010). Il a été nécessaire de développer un modèle au plus près des traitements des patients. En collaboration avec le laboratoire de cancérologie du Pr AK Larsen (INSERM UMRS\_938). Nous avons développé chez le rat un modèle de cancérogenèse colorectale similaire à celle de l'homme et étudié l'influence de la transplantation de CSM sur son évolution. L'effet anti-tumoral des CSM a été associé à la modification du statut immunitaire au niveau du microenvironnement tumoral, en particulier à la polarisation des macrophages et lymphocytes T ainsi qu'à une modification de la balance entre miRNA anti et pro-oncogéniques (François *et al.*, soumis) Dans un second temps après avoir généré des tumeurs, les animaux ont subi une stérilisation tumorale par radiothérapie. Après exposition à des doses fractionnées mimant les protocoles de radiothérapie sur des tumeurs induites chez le rat, nous avons observé que la transplantation de CSM a induit une diminution du volume des tumeurs résiduelles au sein du côlon et une augmentation significative de la survie des animaux. Les CSM

permettent une régénération du tissu sain dans la zone irradiée. Une modification immunitaire dans l'environnement tumoral a été observée notamment par une augmentation du phénotype Th1 des lymphocytes CD3+. Au niveau du tissu sain irradié la transplantation de CSM permet une protection du colon (

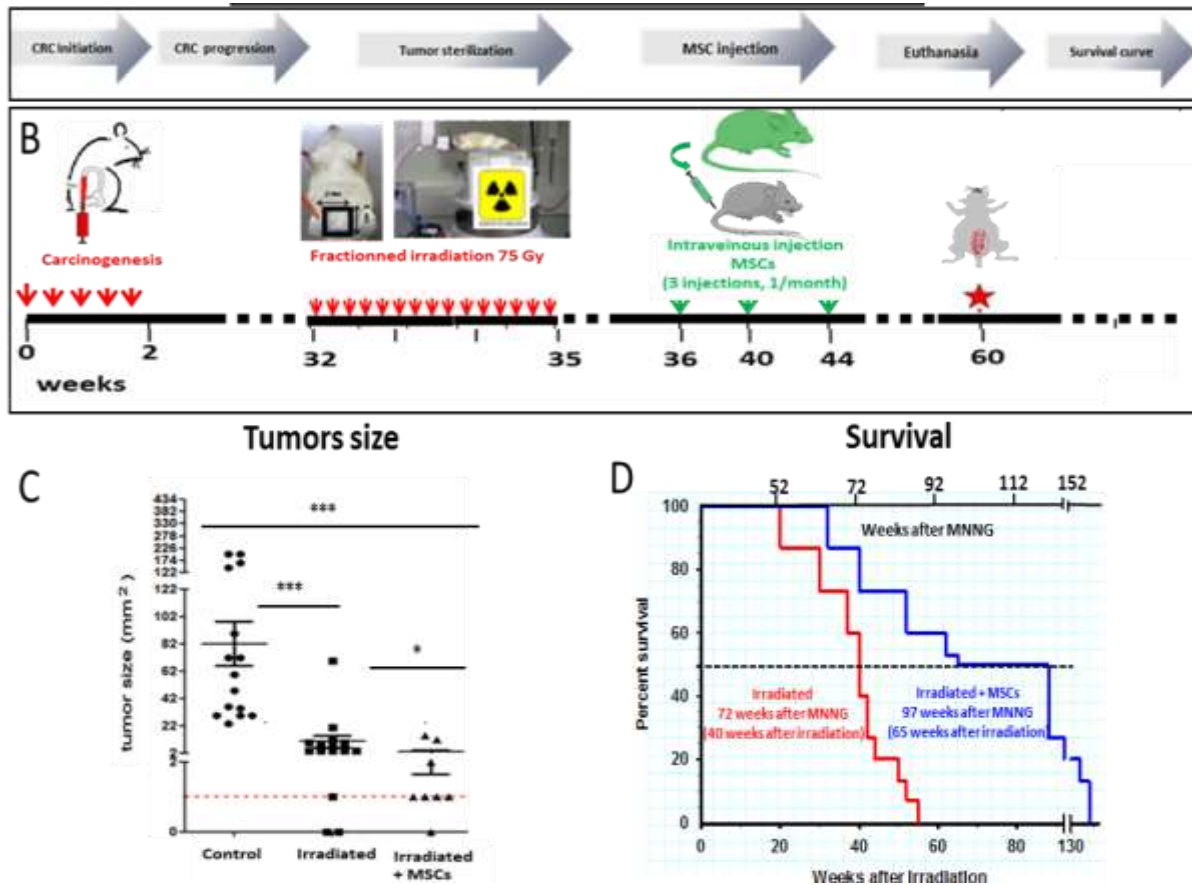


Figure 13).

Figure 13: Effet des CSM administrés après irradiation fractionnée sur la taille des tumeurs et la survie. Trois groupes d'animaux ont été utilisés pour évaluer l'influence de l'administration de CSM (non irradié, irradié, irradié plus CSM). B Protocole d'étude. Après induction de tumeurs colorectales, les animaux ont reçu une série d'irradiations fractionnées pour stériliser les tumeurs, puis ils ont reçus 3 injections de CSM, à 60 semaines les animaux ont été euthanasiés, puis les tumeurs et les tissus sains irradiés ont été étudiés. C taille des tumeurs pour les 3 groupes. D survie des animaux en rouge le groupe irradié et bleu le groupe irradié ayant reçu des CSM.

Il existe un antagonisme entre la présence très transitoire des CSM exogènes et leur effets durables sur la cancérogénèse colique, que ce soit avec ou sans radiothérapie. Ce phénomène pourrait être expliqué par une reprogrammation durable des CSM résidentes et des macrophages endogènes. **L'ensemble de ces résultats suggèrent que les CSM modulent durablement l'environnement immunitaire tumoral. La conséquence est une inhibition de la progression du cancer colorectal ainsi qu'une protection du tissu sain des séquelles des radiothérapies (Figure 14).**

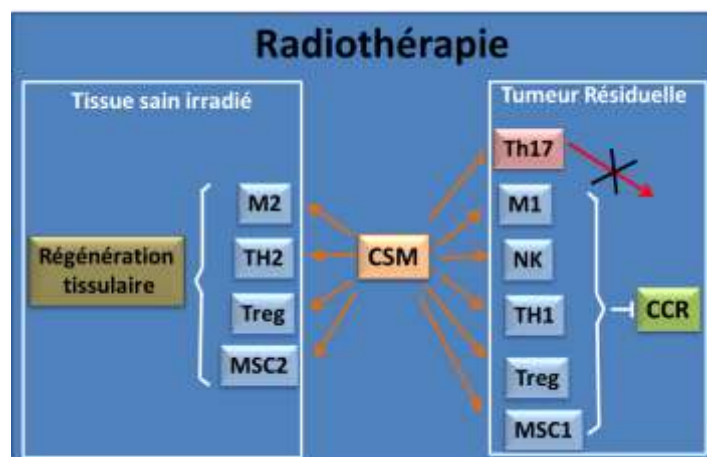


Figure 14: Mécanisme d'action des CSM sur le tissu sain et le microenvironnement tumoral. Les CSM en modulant la réponse inflammatoire favorisent la régénération tissulaire et inhibent la croissance tumorale.

**En conclusion, cette étude a permis de s'assurer que l'utilisation des CSM pour le traitement des complications chroniques sévères des radiothérapies abdomino-pelviennes est sans effet secondaire en ce qui concerne la tumorigenèse et est un traitement prometteur des complications chroniques sévères des radiothérapies abdomino-pelviennes.**

## 7. CSM et fibrose

La fibrose est la première cause mondiale de décès et la composante la plus délétère pour la qualité de vie des patients souffrants de PRD. Il n'existe pas, à l'heure actuelle, de protocoles efficaces de traitement de la fibrose, les thérapeutiques actuelles ont un effet palliatif. Les CSM sont une alternative thérapeutique qui a déjà démontré son efficacité dans les pathologies fibrotiques non radio induites (Usunier *et al.*, 2014 ; Maria *et al.*, 2016). Le potentiel anti-fibrosant des CSM sur des modèles de fibroses chimio-induites a été mis en évidence sur le foie, les reins, les poumons et le cœur (Li *et al.*, 2008). Hardjo *et al.*, (2009) ont observé une diminution pouvant aller jusqu'à la suppression de la fibrose dans certains cas.

Les dommages tissulaires chroniques, tels que ceux causés par une inflammation persistante, empêchent la régénération des tissus et activent en permanence les voies de réparation. Alors que la production de la matrice extracellulaire (MEC) par les myofibroblastes est nécessaire pour la formation du tissu de granulation, l'activation constante des myofibroblastes conduit à l'accumulation du tissu conjonctif, qui ne peut pas être corrigée par les systèmes de dégradation de la MEC de l'hôte. Le remplacement progressif par la MEC élimine les cellules fonctionnelles et structurelles, induit une rigidité de tissu et la perte de fonctionnalité. Dans le côlon et le rectum, la perte de la contractilité musculaire et la sténose peut conduire à l'occlusion fatale. De même, pour les maladies intestinales de l'intestin (*Intestinal Bowel Disease IBD*), la lésion colorectale induite par la radiothérapie induit de graves lésions de la muqueuse, une inflammation chronique et l'activation de facteurs profibrosants tel que le *Transforming Growth Factor Beta* (TGF- $\beta$ ) / voie Smad, qui est un contributeur majeur du processus de la fibrogénèse (Meng *et al.*, 2016). Tous ces dommages conduisent à la différenciation des myofibroblastes résidents et au recrutement des cellules musculaires lisses (CML) de la couche musculaire, avec acquisition d'un phénotype profibrosant en passant d'un phénotype contractile à un phénotype sécrétoire (Graham *et al.*, 1990 ; Haydont *et al.*, 2005, 2007). L'augmentation concomitante des composants de la MEC, des enzymes dégradant la MEC (métalloprotéinases matricielles : MMP) et de leurs inhibiteurs (inhibiteurs tissulaires des métalloprotéinases : TIMPs) provoque un défaut dans le renouvellement de cette MEC (Strup-Perrot *et al.*, 2004). La phase tardive de la fibrose colorectale est caractérisée par : 1) l'accumulation de la MEC, qui parfois, s'infiltré dans les couches musculaires, 2) un micro-environnement paucicellulaire du à l'ischémie et aux stress mécaniques (Francois *et al.*, 2013).

Dans un modèle d'irradiation colorectale chez le rat, reproduisant les atteintes proches de celles observées après radiothérapie et lors des MICI, nous avons démontré l'effet anti-fibrosant des CSM. Cet effet est majoritairement supporté par un effet inhibiteur exercé par les CSM sur les cellules productrices de MEC : myofibroblastes, cellules musculaires lisses et macrophages (Figure 15). En particulier, nous avons mis en évidence une stimulation intense de l'activation des macrophages M2, anti-inflammatoires et intervenant dans le remodelage matriciel. *In vitro*, nous avons également démontré un effet paracrine direct des CSM sur les myofibroblastes et sur les cellules musculaires lisses (CML). Nous avons identifié deux effecteurs majeurs de l'effet pro-fibrosant des CSM sur la fibrose, les facteurs : l'HGF (Hepatocyte Growth Factor) et le TSG-6 (Tumor necrosis factor Stimulated Gene-6). Ces protéines agissent, respectivement, en inhibant la voie de signalisation pro-fibrosante du TGF- $\beta$  et en régulant la polarisation des macrophages. Des expériences *in vitro* de coculture nous ont permis de démontrer un effet différentiel de l'HGF et le TSG-6 sur chaque type cellulaire. L'amélioration de la lésion induite par les CSM était accompagnée d'une amélioration de la survie (Thèse Usunier B. 2016 ; Usunier *et al.*, Soumis).

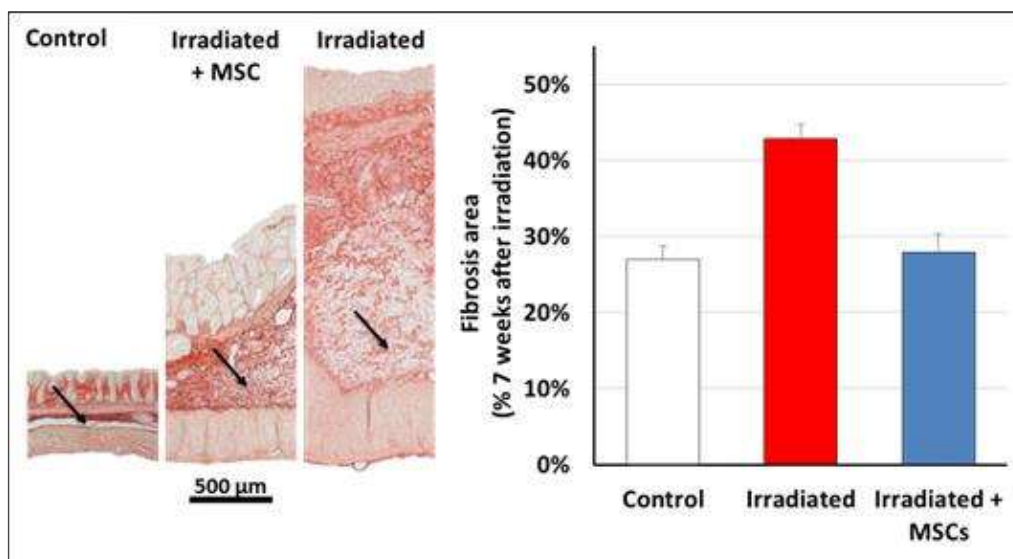


Figure 15: La transplantation de CSM inhibe le remodelage de la matrice extracellulaire après irradiation du côlon. A gauche marquage au rouge Sirius de tissu montrant l'inhibition de la déposition de matrice extracellulaire (flèches noires). A droite quantification de la fibrose (histogrammes).

**En conclusion, nos résultats confirment l'intérêt de l'utilisation des CSM après radiothérapie abdomino-pelvienne et dans le cas de la fibrose colorectale. Ils soulignent également l'intérêt de la réponse orchestrée des CSM, capables de produire de nombreux facteurs solubles,**



par rapport aux traitements pharmacologiques classiques. La thérapie cellulaire par les CSM semble être une alternative thérapeutique solide pour traiter les séquelles tardives des irradiations (Chapel *et al.*, 2013 ; Nicolay *et al.*, 2015)

## **8. Transfert vers la clinique humaine: Programme Hospitalier de Recherche Clinique(PHRC) PRISME**

Les résultats des études précliniques et l'essai compassionnel sur les 4 patients d'Epinal ont permis, en 2013, de proposer de traiter des patients pour leurs complications des post-radiothérapies abdomino-pelviennes, notamment pour les rectites radiques. Un consortium a été formé autour de ce projet fédératif impliquant : l'Hôpital Saint-Antoine (SAT-APHP), l'INSERM, (EFS+CTSA), ECellFrance, l'IRSN, l'Institut Gustave Roussy (IGR) et l'Institut de Cancérologie de l'Ouest. L'intérêt de ce consortium est de regrouper des experts pour la maîtrise de la gestion médicale de la PRD par thérapie cellulaire. Une demande de PHRC a été déposée durant l'année 2013, ce PHRC a obtenu un financement par l'Institut National du Cancer (INCa) en 2014. L'essai thérapeutique de phase II a pour but d'évaluer l'efficacité de l'injection des CSM sur la symptomatologie des complications chroniques sévères des radiothérapies abdomino-pelviennes (acronyme « PRISME » numéro de protocole d'étude : P130935; EUDRACT 2014-001462-99 ; NCT02814864, <https://clinicaltrials.gov/>). En particulier, l'objectif est d'évaluer l'efficacité sur les rectorragies et les hématuries d'un traitement de 3 injections intraveineuses de CSM chez 12 patients présentant des rectites ou cystites de grade 3 (saignements journaliers) et ayant subi au moins trois lignes de traitements conventionnels. Le succès du traitement sera objectivé par une diminution d'un grade sur l'échelle LENT-SOMA, 4 mois après la première injection de CSM, soit un passage de saignements journaliers à hebdomadaires. Les critères secondaires sont d'évaluer l'efficacité du traitement sur la consommation d'analgésiques, la fréquence des diarrhées, la qualité de vie et la douleur. L'inclusion des premiers patients est attendue prochainement (Figure 16).

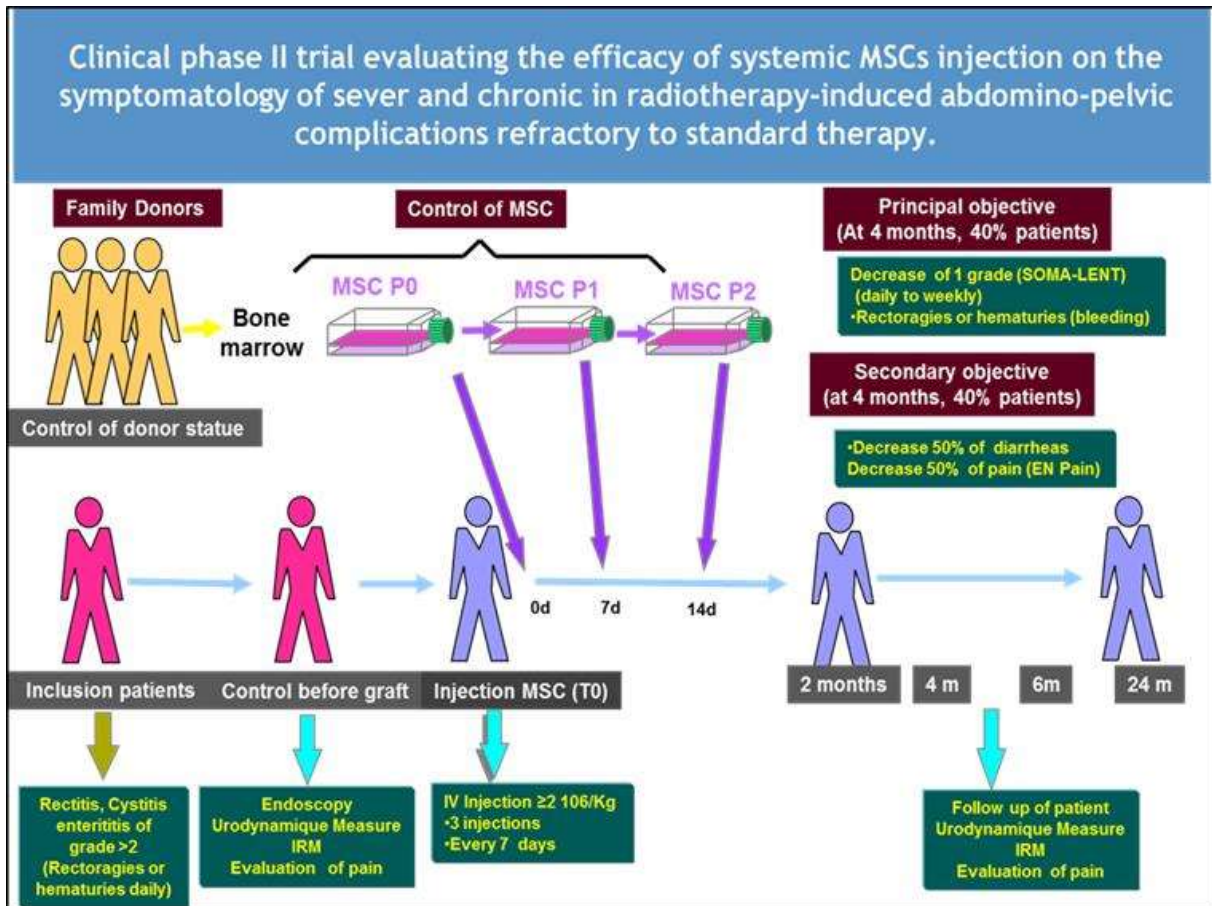


Figure 16: Protocole d'étude clinique de phase II. Les services de radiologie sélectionneront des patients avec des rectites ou des cystites de grade 3. Les patients recevront 3 injections intraveineuses de CSM allogéniques (donneurs intrafamiliaux). Les patients seront suivis sur 2 ans pour les diarrhées, rectoscopies, saignements, douleurs, qualité de vie, immunomonitoring.

## D. CONCLUSION

Les traitements pharmacologiques des dernières décennies n'ont pas permis de juguler les dommages radio-induits, que ce soit pour les complications chroniques des radiothérapies ou bien les irradiations accidentelles. En revanche, la thérapie cellulaire a permis de limiter, voire de reverser, ces lésions. Nous avons retenu d'utiliser le type de cellules souches les mieux caractérisées et ayant une efficacité démontrée dans de nombreux essais cliniques : les cellules souches mésenchymateuses. Les succès précliniques, puis cliniques, de cette stratégie thérapeutique dans le traitement des séquelles des irradiations ont soulevé de nombreux questionnements.

En effet, pourquoi une cellule souche peut-elle corriger les dommages des rayonnements ionisants alors que les traitements pharmacologiques, même les plus complexes, ont échoué ? Cette question sous-tend un certain nombre d'interrogations comme l'adressage des cellules aux tissus endommagés, puis les mécanismes de corrections de ces dommages. Différents mécanismes peuvent être envisagés pour expliquer la restauration de l'homéostasie tissulaire, comme le remplacement des cellules endommagées par les cellules souches injectées ou bien un effet trophique sur les cellules souches endogènes. Nos études sont en faveur du second mécanisme.

Cependant, les résultats obtenus dans le cas des injections systémiques soulèvent une seconde question. Lorsque nous observons l'implantation des cellules souches exogènes, une très faible implantation se fait dans le tissu lésé et leur présence est transitoire. Dans ces conditions, comment expliquer cet effet à long terme, aussi bien sur la structure et sur la fonction de l'organe, et ce quel que soit le modèle animal utilisé et quelle que soit la configuration d'irradiation ? La première réponse vient de la « cible » des cellules souches exogènes. En effet, chaque tissu a besoin d'un très faible nombre de cellules souches endogènes afin de maintenir son intégrité. Nous avons montré que les cellules souches transplantées potentialisent leur effet en agissant sur les cellules souches endogènes afin de les protéger de la mort cellulaire et de favoriser leur prolifération. Le résultat est, qu'avec très peu de cellules exogènes présentes dans un tissu, on préserve le tissu des effets délétères de l'irradiation.

Reste à expliquer comment agissent à long terme ? Cela suppose que les CSM agissent sur des cellules qui sont elles-mêmes présentes à long terme dans les tissus et qui ont un effet délétère sur ce tissu. Elles peuvent laisser une 'empreinte épigénétique' au niveau des cellules résidentes. Les CSM peuvent également laisser une 'empreinte durable au niveau de la matrice-extracellulaire'. Un

des acteurs essentiels de l'irradiation est l'inflammation chronique du tissu aboutissant à une fibrose, puis une ulcération du tissu radiosensible. Nous avons montré qu'en agissant sur les effecteurs de l'inflammation, les cellules souches injectées modifient la réponse inflammatoire. En effet, les CSM modifient la polarisation des lymphocytes et des macrophages résidents et permettent de reverser à long terme leurs effets inflammatoires. Ces cellules agissent donc comme des relais de l'information qui conserve à long terme les instructions des CSM. La question qui en découle est quel sont les effecteurs impliqués ? Nous avons identifiés plusieurs effecteurs comme le PGE2, Wnt, HGF et TSG6.

Puisque très peu de cellules s'implantent dans le tissu et uniquement pendant quelques jours, la question d'augmenter la quantité et la fréquence d'injection est une étape incontournable vers la clinique ? Nous avons déterminé la quantité optimale de cellules à injecter et montré que des injections répétées permettent d'améliorer l'effet.

De nombreux pharmacologistes ont alors émis la question suivante : si le rôle de ces cellules est anti-inflammatoire, pourquoi ne pas utiliser un anti-inflammatoire classique, beaucoup moins onéreux. En fait, de nombreux travaux ont constaté que la propriété majeure des cellules souches transplantées est d'avoir un « dialogue » avec le tissu lésé afin de fournir les molécules nécessaires à la régénération tissulaire. Cette capacité s'adaptant en fonction du type de dommage et également dans le temps et impliquant des récepteurs appelés *Toll-like-receptor*. Nous avons donc essayé d'agir sur ces récepteurs afin de potentialiser les traitements.

La notion de potentialisation soulève une autre question, est ce que le cotraitement pharmacologique des cellules permettrait de potentialiser leur effet ? Nous avons effectivement montré que dans le cas des dommages colorectaux, ou musculo-cutanés, les co-traitement potentialisaient la régénération tissulaire.

Cette thérapie a-t-elle des limites ? C'est une question à laquelle nous ne pouvons répondre que sur les lésions colorectales où nous avons observé que les cellules transplantées permettent la régénération à la marge de la zone ulcérée. En ce qui concerne les dommages musculo-cutanés nous avons constaté une action pour des zones irradiées à moins de 20 Gy (en combinaison avec un acte chirurgical). Pour des dommages plus importants, il faut envisager une stratégie de reconstruction, à savoir avoir une stratégie d'ingénierie tissulaire qui consisterait à développer des modèles de culture en 3 dimensions pour remplacer les zones totalement lésées. Bien qu'ayant évalué l'efficacité des CSM dans ces deux pathologies, la question demeure de leur efficacité dans d'autres pathologies radio-induites, notamment au niveau de la vessie pour les radiothérapies pelviennes. Afin de

répondre à cette question, notre laboratoire a débuté l'évaluation du traitement par thérapie cellulaire des séquelles des cystites radiques ainsi que celles des radiothérapies ostéo-mandibulaire.

Le passage en clinique impose de répondre à la question suivante existe-t-il une toxicité de ce traitement ? Que ce soit une méta-analyse réalisée sur l'ensemble des essais cliniques ou bien nos études précliniques, aucun effet secondaire n'a été mis en évidence.

Quelles sont les questions qui demeurent non résolues ?

D'autres types de cellules souches sont-elles utilisables dans ces pathologies ? Compte tenu des avancées technologiques très rapides dans ce domaine, nous avons débuté l'évaluation d'autres sources de tissus et de cellules souches, comme les progéniteurs endothéliaux, les cellules gingivales ou les iPS. Les avancées dans le domaine des microparticules nous ont permis de tester également l'utilisation des exosomes dans le traitement des lésions musculo-cutanées.

Dans le cas d'un acte de malveillance, avons-nous des solutions pour traiter un grand nombre de patients rapidement ? Une des étapes onéreuse et longue de la thérapie cellulaire est la culture cellulaire. L'idéal serait de pouvoir prélever les cellules et de les réinjecter sans étape de culture. Nous venons de débiter l'évaluation d'une telle stratégie pour le traitement des lésions intestinales lors d'un syndrome aigu d'irradiation.

## E. PERSPECTIVES

Les travaux auxquels j'ai participé, ainsi que ceux de la communauté scientifique mondiale ont démontré ces dernières années que le traitement des lésions radio-induites par injection systémique, ou localisée, de CSM présente une certaine efficacité thérapeutique. Cependant, ce type de traitement se heurte encore à certaines limites, notamment lorsque les dommages sont particulièrement importants (volume tissulaire concerné, sévérité de la lésion).

Pour les prochaines années, le programme de recherche de l'IRSN en thérapie cellulaire aura pour objectif de repousser les limites du traitement en potentialisant l'efficacité des cellules souches tout en identifiant les modalités optimales d'administration. Les approches envisagées feront appel aux dernières avancées de la thérapie cellulaire, associées aux techniques utilisées en médecine régénérative.

L'expertise du laboratoire et les nouvelles connaissances scientifiques dans le domaine de la biologie des cellules souches seront utilisées pour le développement de traitements innovants, qui en synergie avec l'injection des CSM, permettraient leur meilleure efficacité.

Dans l'objectif d'améliorer la régénération du tissu irradié, différentes approches ont été sélectionnées : les iPS représentent une rupture technologique en thérapie cellulaire et offrent de nouvelles possibilités de traitement. A partir de cellules souches issues de cellules adultes reprogrammées (iPS), il est théoriquement possible d'obtenir toutes les cellules nécessaires à la réparation des tissus, voire à la création d'organes complets et fonctionnels (Takahashi *et al.*, 2007 ). Par ailleurs, la bio-ingénierie tissulaire utilisant les CSM est un domaine de la thérapie cellulaire en fort développement et offre de nouvelles perspectives de traitements. Cette approche combine l'utilisation de matrices, de cellules souches et de cellules différenciées ; elle permettrait de reconstruire des tissus complexes altérés par l'irradiation.

# 1. La thérapie cellulaire pour le traitement des séquelles des radiothérapies.

Dans le secteur médical, une expérience forte a été acquise par l'IRSN sur la compréhension de l'action des cellules souches sur les processus physiopathologiques des complications des radiothérapies de la sphère abdomino-pelvienne. Les différentes études ont permis de proposer aux cliniciens de nouvelles stratégies thérapeutiques. L'efficacité du traitement par CSM, démontré dans différents modèles animaux, a permis d'assurer un premier transfert clinique de ce traitement et une première étude clinique de phase II a été initiée. Ces interactions étroites avec les cliniciens ont permis d'identifier une nouvelle problématique de lésions importantes au niveau de la vessie (cystite radique), très invalidantes, suite aux radiothérapies abdomino-pelviennes et pour lesquelles aucun traitement n'est disponible.

## 1. La thérapie cellulaire par les CSM pour le traitement des complications des PRD : essai clinique de phase II.

Nos travaux expérimentaux, effectués sur des modèles précliniques, ont montré une action pléiotropique des CSM leur permettant d'induire un bénéfice thérapeutique significatif sur les lésions colorectales radio-induites. Sur la base de plusieurs de ces résultats, des traitements par CSM ont été réalisés à titre compassionnel, chez 4 patients sur-irradiés d'Epinal souffrant de rectites radiques grave (grade IV selon l'échelle SOMA-LENT) et réfractaires aux traitements symptomatiques (collaboration CHU-Saint-Antoine/IRSN/Percy). Bien que l'efficacité du traitement ait été difficilement appréciable du fait de son caractère compassionnel, une efficacité des CSM a été constatée concernant la diminution du nombre de diarrhées, l'arrêt des rectorragies (chez 1 patient) et la diminution des douleurs abdominales (chez 2 patients).

L'essai clinique PRISME est l'aboutissement de 10 années de recherches de notre Institut en étroite collaboration avec des unités cliniques et de recherche. Cependant, ce n'est pas un aboutissement mais le début d'un programme plus large. En effet, il s'agit de l'évaluation de l'efficacité thérapeutique chez 12 patients atteints de PRD. La demande de financement a été déposée fin 2013 et, depuis le protocole a été affiné en étroite concertation avec les cliniciens, les radiothérapeutes, les chercheurs, les unités de thérapie cellulaire et également les autorités réglementaires (DRCD, ANSM). Cet échange constant enrichit notre recherche en permanence et nous permet de mieux l'orienter en fonction des attentes de tous ces partenaires. La place de notre laboratoire dans le déroulement du protocole clinique PRISME est une recherche translationnelle.

Elle est basée sur notre forte expérience de l'action des CSM sur cette pathologie. Les principaux modes d'action des CSM sur cette pathologie sont leur effet anti-inflammatoire, leur capacité régénérative et leur effet sur la douleur. L'objectif de cette étude est de vérifier le bénéfice fonctionnel d'une injection intraveineuse de CSM chez les patients. Les résultats cliniques montrent que l'injection de CSM induit une régénération tissulaire, diminue les saignements et la douleur comme cela a été démontré dans les maladies inflammatoires intestinales et confirmé dans un modèle préclinique de PRD. Les patients traités par CSM seront suivis depuis deux mois avant l'injection de CSM et jusqu'à deux ans après traitement. Durant cette période, un grand nombre de paramètres seront mesurés pour évaluer l'effet des CSM et également surveiller l'absence d'effets secondaires. L'objectif de cette étude est de vérifier le bénéfice fonctionnel d'une injection intraveineuse de CSM chez les patients. L'injection de CSM module la réponse immunitaire. La modification du pourcentage de circulation des sous-populations de lymphocytes T, de lymphocytes B, de *natural killer* et de cellules présentatrices d'antigènes comme les monocytes et les cellules dendritiques avant et après injection de CSM sera étudiée (cette étude s'effectuera avant le traitement de CSM, juste avant la troisième injection et à 4 mois de suivi). Tous ces tests d'immunomonitoring seront réalisés en collaboration avec le Pr. K. Tarte (EFS Rennes) sur la plateforme standardisée de France E-cell. En collaboration avec l'INSERM, l'UMR 938, CRA, équipe du Pr F Delhommeau, les marqueurs de régénération tissulaire, d'angiogenèse, de stress oxydatif, d'hypoxie et d'angiogenèse seront mesurés chez les patients avant traitement, puis après l'injection de CSM. Les mesures seront réalisées dans le sang, les selles et les urines (2 mois et 15 jours avant traitement, puis aux jours 0, 7, 15, 2 mois et 4 mois après la première injection). Les résultats seront corrélés à un suivi clinique très complet de chaque patient.

Dans le cadre de PRISME et de façon complémentaire, nous souhaiterions mettre en place un Programme de Recherche Translationnelle visant à améliorer le diagnostic et les indicateurs d'efficacité du traitement par CSM et ce, concernant la douleur viscérale. L'évaluation clinique de la douleur passe par des réponses subjectives des patients à des questionnaires sur le retentissement de leur douleur chronique au niveau de leur qualité de vie (ANAES), sur leur état émotionnel (HADS), sur leur état global de santé et, enfin, sur l'intensité de la douleur qu'ils perçoivent. Il est donc important, pour une étude robuste, d'identifier des bio-marqueurs d'efficacité thérapeutique. Une étude sur une cohorte de 72 patients traités pour des radiothérapies du cancer du sein a montré une diminution significative de la douleur (Cavigioli *et al.*, 2013). Cette étude confirme nos résultats précliniques et cliniques (Tamarat *et al.*, 2012 ; Voswinkel *et al.*, 2013) Au regard des résultats de la littérature (Erikson *et al.*, 2002 ; Wilkinson *et al.*, 2006 ; Kuo *et al.*, 2014) et de nos propres résultats expérimentaux (Durand *et al.*, 2015), les cibles identifiées et testées seront les facteurs libérés par les



mastocytes. Nous nous intéresserons plus particulièrement à une des sérines protéinases, la tryptase et à son récepteur PAR-2.

Au final, PRISME montre que notre compétence est de plus en plus cruciale pour élaborer des stratégies thérapeutiques, que les recherches translationnelles menées sur les essais cliniques sont un puissant outil pour améliorer nos stratégies thérapeutiques et qu'il est nécessaire d'étendre rapidement le réseau des laboratoires capables de participer à ces types d'essais cliniques au niveau national (le service de chirurgie générale et digestive (Chef de service : Pr. Emmanuel TIRET sera intégré à PRISME). Il est également indispensable d'intégrer des réseaux de radiothérapeutes (Société Française de radiothérapie Oncologique) afin de créer une alternative thérapeutique fiable pour tous les patients souffrant de séquelles chroniques sévères de radiothérapies et pour lesquels les traitements actuels sont palliatifs.

## 2. Utilisation de la bio-ingénierie tissulaire pour limiter les cystites radiques

Les cystites hémorragiques induites suites aux radiothérapies sont caractérisées par une détérioration progressive, induite par une réduction de la densité des petits vaisseaux sanguins et par l'inflammation tissulaire chronique. Le tissu normal est progressivement remplacé par du tissu fibreux dense (fibrose). Cela est souvent aggravé par les dégâts secondaires en raison d'infection ou d'une intervention chirurgicale dans la zone touchée. Cette lésion, induite par les rayonnements, est progressive et peut atteindre un point critique où les tissus se décomposent et forment un ulcère ou des tissus nécrosés (Lee *et al.*, 2003, Trotman *et al.*, 1999).

Les mécanismes d'induction de la cystite radique incluent :

- Le passage d'irritants tels que la caféine ou l'urokinase à travers l'urothélium, causant l'inflammation chronique de la vessie ainsi que la destruction ou la dysfonction de la couche de glycosaminoglycanes (Parsons *et al.*, 2011)

- La sécrétion chronique d'histamine par les mastocytes, induisant des dommages à l'urothélium, une inflammation chronique et des douleurs (Sant *et al.*, 2007).

- La pyroptose, principale cause d'hyperplasie et de mort des cellules musculaires de la vessie au cours de la cystite hémorragique. Ce phénomène entraîne notamment la production de ROS ainsi que la sécrétion de cytokines par les cellules immunitaires (Lee and Lee, 2013).

Les cystites hémorragiques provoquent des douleurs extrêmes et des hématuries. Dans sa forme sévère, la cystite hémorragique détériore la qualité de vie, prolonge l'hospitalisation et peut être une complication mortelle. La gestion actuelle des cystites hémorragiques réfractaires implique des agents oraux et intravésicaux qui ont un effet transitoire et peuvent induire de graves complications. Ces agents agissent en provoquant la corrosion chimique de l'urothélium de vessie et coagulent les tissus pour arrêter le saignement. Par exemple, le traitement par le formol comporte des effets secondaires graves, y compris la fibrose de la vessie, la rupture de la vessie, une insuffisance rénale et la mort. L'oxygénothérapie a un effet transitoire et augmente le risque de récurrence du cancer. Le traitement chirurgical, la cystectomie, est associé à un risque élevé de complications opératoires et de mortalité et, en tant que tel, doit rester un dernier recours pour contrôler le saignement (Haldar *et al.*, 2010 ; Liem *et al.*, 2015). Il existe actuellement plusieurs essais cliniques en cours de phase à phase III pour le traitement de la cystite hémorragique sans résultat pour l'instant (NCT01561352, NCT01659723, NCT00134628, NCT01295645, NCT02174536). La phase III consiste en une étude comparative d'efficacité proprement dite. Elle compare le traitement soit à un placebo, soit à un traitement de référence. En revanche, les CSM ont démontré leur efficacité thérapeutique. La cystite hémorragique est l'une des conséquences des greffes de CSH lors d'une transplantation allogénique. Dix patients ont été traités avec des CSM par voie intraveineuse. Chez cinq patients, la cystite hémorragique sévère a été supprimée après un délai de 1 à 14 jours après l'injection de CSM (Ringden *et al.* ; 2007).

A notre connaissance il existe une lacune au niveau du traitement par thérapie cellulaire des cystites hémorragiques induite par l'irradiation, alors que le modèle est bien documenté chez le rat pour des inflammations vésicales induites par injection intrapéritonéal de cyclophosphamide (Bury *et al.*, 2015).

En collaboration avec le professeur René You (Hôpital Henri Mondor, service d'Urologie) , nous étudierons l'efficacité des CSM sur cette pathologie. Dans un premier temps nous déterminerons la configuration d'irradiation (en dose unique) permettant d'obtenir sur la vessie une inflammation sévère, une congestion vasculaire, un œdème sévère, une hémorragie, une infiltration de cellules inflammatoires dans la *lamina propria*, et une dénudation épithéliale. Dans un second temps, en se basant sur le protocole de l'essai clinique qui a montré un bénéfice thérapeutique par les CSM, nous évaluerons l'efficacité du traitement par injection intraveineuse sur l'évolution de la cystite. Puis, nous nous intéresserons à des lésions plus sévères. Pour des ulcérations graves correspondant à des patients qui ont besoin de cystoplastie, des techniques d'ingénierie tissulaire seront envisagées. Il a été précédemment montré que des feuillets cellulaires composés de cellules

souches implantées dans les vessies repeuplent et réorganisent l'organe plus rapidement et limitent la fibrose. De plus, un essai clinique mené chez 7 patients a montré que l'implantation d'un tissu de vessie, créée à partir de cellules autologues cultivées sur un feuillet et enveloppé dans l'épiploon (*omentum*), permet un bénéfice thérapeutique durable chez les patients qui ont besoin de cystoplastie. Ces résultats sont en faveur de l'utilisation de feuillets de CSM pour le traitement des cystites hémorragiques induites par l'irradiation.

Nous évaluerons l'apport des CSM dans des biomatériaux comme nouvelle approche thérapeutique. Dans de nombreuses applications cliniques, l'utilisation de biomatériaux permet de potentialiser l'efficacité de la thérapie cellulaire. Des résultats prometteurs ont été obtenus par notre laboratoire au niveau du colon irradié en utilisant des CSM protégées dans un hydrogel. En collaboration avec le Professeur René You (Hôpital Henri Mondor, Service d'Urologie), nous mettrons en place un « nouveau » biomatériau afin d'augmenter l'efficacité thérapeutique des CSM. L'intérêt des biomatériaux en thérapie cellulaire est d'offrir un microenvironnement adapté à l'implantation des cellules souches, en favorisant notamment les interactions nécessaires à la survie et à la différenciation cellulaire. Cette stratégie de médecine régénérative sera utilisée afin de proposer une alternative thérapeutique, non invalidante, aux cystites radiques. L'objectif est de préserver les propriétés anti-inflammatoires, pro-angiogéniques et antifibrotiques des CSM. Le bénéfice thérapeutique de cette stratégie sera évalué sur un modèle de cystite radique chez le rat (Soler *et al.* 2011 ; Giglio *et al.*, 2016).

## **2. La thérapie cellulaire pour le traitement des syndromes radio-induits (SGI) résultant d'expositions accidentelles; Stratégies thérapeutiques du syndrome gastro-intestinal.**

Les différents scénarios de crise radiologique et nucléaire incluent des risques liés aux expositions externes induisant potentiellement des syndromes musculo-cutané, hématopoïétique, gastro-intestinal et des lésions combinées. Les recherches menées dans ce programme ont pour objectif de faire émerger, et de valider, de nouveaux traitements en particulier pour les syndromes ne disposant pas de traitement efficace à ce jour, i.e. le syndrome cutané radio-induit et le syndrome gastro-intestinal. La question se pose de savoir si ces traitements par injection de produit de thérapie cellulaire peuvent s'appliquer à de nouvelles cibles tissulaires. Par ailleurs, ces traitements restent, à ce jour, lourds à mettre en œuvre. Ils nécessitent l'identification de donneurs compatibles et des procédures longues et complexes de préparation des produits de thérapie cellulaire. Les situations d'accident radiologique ou nucléaire peuvent engager un nombre important de victimes, ce qui pose également la question de la disponibilité de ces produits. Mes recherches, au cours de ces 5 prochaines années participeront au développement de nouveaux traitements pour le SGI dont la prise en charge à ce jour est inefficace. Mon travail s'inscrira au sein de trois approches développées par l'Institut à des degrés d'avancement technologique différents : les thérapies développées seront évaluées au regard de leur potentiel transfert clinique à court terme (différentes fractions du tissu adipeux), à moyen terme (exosomes) ou à long terme (haplobanque de cellules souches issues d'IPS).

Le SGI est un syndrome complexe engageant rapidement le pronostic vital du patient. A ce jour, il n'existe pas de traitement efficace pour ces patients, la prise en charge est de type palliatif.

Pour traiter un grand nombre de patients dont aucune autre pathologie n'est décelable au moment du traitement, seule une biothérapie à faible coût et sans grande contrainte réglementaire est envisageable. Une seule source de cellules souches répond à ces critères, il s'agit de la fraction vasculaire stromale issue du tissu adipeux (SVF). Le traitement a déjà démontré son efficacité dans le traitement des séquelles tardives de la radiothérapie pour le traitement du cancer du sein (Rigotti *et al.*, 2007, 210, 2012 ; Akita *et al.*, 2010, 2012 ; Villani *et al.*, 2010 ; Cavigioli *et al.*, 2011, 2012). Les cellules sont isolées du tissu adipeux en une heure. Les cellules générées par ce processus sont constituées de cellules endothéliales micro-vasculaires, de cellules musculaires lisses vasculaires et de péricytes, des CSH, des cellules mésenchymateuses et des cellules immunitaires. Le patient n'a pas besoin d'être hospitalisé, seule une anesthésie locale est requise, le traitement est réalisable

rapidement et ne nécessite pas d'autorisation de l'AFSSAPS, son cout est d'une centaine d'euro. Une étude préclinique sera mise en place afin de démontrer la faisabilité d'un tel traitement.

D'autre part, les IPS paraissent dans un avenir assez proche pouvoir révolutionner l'ensemble des pratiques médicales. Le recours à des haplo banques de cellules souches issues d'iPS couvrirait les besoins de la population (Gouraud *et al.*, 2015). Un essai clinique a déjà eu lieu au Japon pour traiter la dégénérescence maculaire (Mandai *et al.*, 2017). Le besoin de banque d'iPS est immense et est illustré par les dons d'organes. En 2015, 21400 personnes étaient en attente d'un organe et seules 5746 ont été greffées, 553 sont décédés de ne pas avoir reçu d'organe (source *dondorgane.fr*). La pénurie d'organes conjuguée au développement rapide de la bioingénierie tissulaire impliquent qu'à l'avenir la thérapie cellulaire aura recours à ces techniques, notamment pour le traitement des séquelles des irradiations. Avec le projet GIPSSIS, nous avons franchi une étape cruciale en ce sens, à savoir la reconstitution d'un tissu humain fonctionnel. Nous avons montré que ces cellules ont la capacité de générer des CSH et des cellules endothéliales. Notre objectif est de progresser vers la clinique. Un projet « *Astrid-maturation* » sera déposé avec l'ensemble des partenaires académiques spécialistes en ce domaine (Pr Jaffredo, UPMC Laboratoire de Biologie du Développement, Dr Raslova INSERM, UMR 1170, Équipe labellisée Ligue Nationale contre le Cancer, Gustave Roussy, Pr Delhommeau AP-HP, Hôpital Saint-Antoine & Hôpital Armand-Trousseau, service d'hématologie biologique), et une unité de thérapie cellulaire (Ecell-France, EFS H Mondor, Dr. Rouard et Dr. Chevaillier) en concertation avec l'URC-Est (unité de recherche clinique de l'est parisien). Ce projet permettra d'apporter l'ensemble des réponses pour un dépôt de protocole clinique à l'ANSM (reprogrammation non intégrative, choix du clone, absence de mutations sur 50 *hot spots*, process GMP, greffon sans contamination d'iPS, biodistribution à long terme et absence de tératome, production par une unité de thérapie cellulaire labellisée). L'absence de traitement pour les complications digestives ainsi que les propriétés des greffons issus d'iPS (hémangioblastes) nous focaliseront sur les capacités de ces cellules à préserver l'intestin des dommages du SAI. S'appuyant sur les cibles thérapeutiques identifiées qui sont la protection de la muqueuse et la vascularisation, nous vérifierons l'hypothèse suivant laquelle l'utilisation des hémangioblastes différenciés à partir des iPS permettrait le traitement des complications digestives. Nous nous focaliserons sur les capacités de ces cellules à préserver l'intestin des dommages du SAI et sur l'ensemble des différents paramètres physiopathologiques du SGI décrit précédemment.

La conjonction de greffon de grade clinique, associée à la protection des dommages à l'intestin pourrait fournir la nouvelle alternative thérapeutique au SAI dans la prochaine décennie.

## F. PUBLICATIONS PERSONNELLES

Étudiants en thèse et post-doctorants encadrés / facteur d'impact

### Articles soumis en 2017 (titre, auteurs, cible)

L. Guyonneau-Harmand, B. L'Homme, B. Birebent, L. Garçon, H. Lapillonne, M. Benderitter, T. Jaffredo, **A. Chapel** and L. Douay. Reconstitution of hematopoiesis using human induced pluripotent stem cells. : (Soumis Nature)

**B. Usunier**, B. L'Homme, V. Holler, C. Linard, O. Guipaud, M. Benderitter, **A. Chapel**. HGF and TSG-6 are the key effectors secreted by Mesenchymal Stem Cells to reverse chronic severe damage of pelvic cancer radiotherapy through the reduction of NF-kB inducing macrophage polarization in M2 phenotype (Soumis Nature communication)

**S. François**, **B. Usunier** , M.-E. Forgue-Lafittede, Thi Cam Ha Chee, B. L'Homme, S. Bouchet, F. Hached, D. Benaoumeur, M. Benderitter, L. Douay, N.-C. Gorin, A.K. Larsen, **A. Chapel**. Reprogramming by mesenchymal stem cells inhibits colorectal cancer progression and preserves tissue integrity after radiotherapy (Soumis Cancer Cells).

J. Voswinkel, J.J. Lataillade, **S. François** , N.C. Gorin, J.M. Simon , M. Benderitter, P. Gourmelon, Michaël Chaquin, L. Fouillard, M. Mohty, **A. Chapel**. Successful therapy by allogeneic Mesenchymal Stem Cells (MSC) – first clinical experiences in Pelvic Radiation Disease patients (Soumis à Science reports)

### Articles publiés

**2017 S. François**, V. Eder, K. Belmoktar, M.-C. Machet, L. Douay, N.-C. Gorin, M. Benderitter, **A. Chapel**. Synergistic effect of BMP-2 and Mesenchymal Stromal Cells on the healing of radiodermatitis through HIF-1 $\alpha$  induction (En révision à Science reports) [5.20 Impact Factor](#)

**2014** M. Benderitter, F. Caviggioli, **A. Chapel**, R. Coppes, C. Guha, M. Klinger, O. Malard, F. Stewart, R. Tamarat, P. Van Luijk, C. Limoli. Stem cell therapies for the treatment of radiation-induced normal tissue side effects. Antioxid Redox Signal. 21(2):338-55. 2014. [8.20 Impact Factor](#)

**2014 Usunier B**, Benderitter M, Tamarat R, Chapel A. Management of fibrosis: the mesenchymal stromal cells breakthrough. Stem Cells Int. 340257. 2014; [2.81 Impact Factor](#)

**2014** Larbi A, Mitjavila-Garcia MT, Flamant S, Valogne Y, Clay D, Usunier B, l'Homme B, Féraud O, Casal I, Gobbo E, Divers D, **Chapel A**, Turhan AG, Bennaceur-Griscelli A, Haddad R. Generation of Multipotent Early Lymphoid Progenitors from Human Embryonic Stem Cells. *Stem Cells Dev.* 2014.

[4.202 Impact Factor](#)

**2014** François S, Usunier B, Douay L, Benderitter M, **Chapel A**. Long-Term Quantitative Biodistribution and Side Effects of Human Mesenchymal Stem Cells (hMSCs) Engraftment in NOD/SCID Mice following Irradiation. *Stem Cells Int.* 939275. 2014. [2.806 Impact Factor](#)

**2014** Fouillard L, Francois S, Bouchet S, Bensidhoum M, Elm'selmi A, **Chapel A**. Innovative cell therapy in the treatment of serious adverse events related to both chemo-radiotherapy protocol and acute myeloid leukemia syndrome: the infusion of mesenchymal stem cells post-treatment reduces hematopoietic toxicity and promotes hematopoietic reconstitution. *Curr Pharm Biotechnol.* 14(9): 842-8. 2014. [3,40 Impact Factor](#)

**2013** Francois S, Mouiseddine M, Allenet-Lepage B, Voswinkel J, Douay L, Benderitter M, **Chapel A**. Human mesenchymal stem cells provide protection against radiation-induced liver injury by antioxidative process, vasculature protection, hepatocyte differentiation, and trophic effects. *Biomed Res Int.* 151679. 2013. [2.88 Impact Factor](#)

**2013** Chapel A, Francois S, Douay L, Benderitter M, Voswinkel J. New insights for pelvic radiation disease treatment: Multipotent stromal cell is a promise mainstay treatment for the restoration of abdominopelvic severe chronic damages induced by radiotherapy. *World J Stem Cells.* 5(4):106-11. 2013. [2.471 impact factor](#)

**2013** Chapel A, Francois S, Douay L, Benderitter M, Voswinkel J. Fifteen years of preclinical and clinical experiences about biotherapy treatment of lesions induced by accidental irradiation and radiotherapy. *World J Stem Cells.* 5(3):68-72. 2.471. 2013. [2.471 impact factor](#)

**2013** Voswinkel J, Francois S, Gorin NC, **Chapel A**. Gastro-intestinal autoimmunity: preclinical experiences and successful therapy of fistulizing bowel diseases and gut Graft versus host disease by mesenchymal stromal cells. *Immunol Res.* 56(2-3). 241-8. 2013. [3.525 Impact Factor](#)

**2013** Voswinkel J, Francois S, Simon JM, Benderitter M, Gorin NC, Mohty M, Fouillard L, **Chapel A**. Use of mesenchymal stem cells (MSC) in chronic inflammatory fistulizing and fibrotic diseases: a comprehensive review. *Clin Rev Allergy Immunol.* 45(2):180-92. Review. 2013. [5.59 Impact Factor](#)

**2013** L Fouillard, S Francois, S Bouchet, M Bensidhoum, A Elm Selmi, **Chapel A**. Innovative Cell Therapy In The Treatment Of Serious Adverse Events Related To Both Chemo-Radiotherapy Protocol And Acute Myeloid Leukemia Syndrome: The Infusion Of Mesenchymal Stem Cells Post-Treatment Reduces Hematopoietic Toxicity And Promotes Hematopoietic Reconstitution. *Curr Pharm Biotechnol*. Dec 27. 2013. [3.40 Impact Factor](#)

**2012** **Mouiseddine M, François S, Souidi M, Chapel A**. Intravenous human mesenchymal stem cells transplantation in NOD/SCID mice preserve liver integrity of irradiation damage. *Methods Mol Biol*. 826:179-88. 2012. [1.29 Impact Factor](#)

**2012** Larbi A, Gombert JM, Auvray C, L'homme B, Magniez A, Féraud O, Coulombel L, **Chapel A**, Mitjavila-Garcia MT, Turhan AG, Haddad R, Bennaceur-Griscelli A. The HOXB4 Homeoprotein Promotes the Ex Vivo Enrichment of Functional Human Embryonic Stem Cell-Derived NK Cells. *PLoS One*. 7(6):e39514. 2012; [3.23 Impact Factor](#).

**2012** Kobari L, Yates F, Oudrhiri N, Francina A, Kiger L, Mazurier C, Rouzbeh S, El Nemer W, Hebert N, Giarratana MC, Francois S, **Chapel A**, Lapillonne H, Luton D, Bennaceur-Griscelli A, Douay L. Human induced pluripotent stem cells can reach complete terminal maturation: in vivo and in vitro evidence in the erythropoietic differentiation model. *Haematologica*. 24. 2012. [5.81 Impact Factor](#)

**2012 Chapel A**. MSC therapy to repair radiation-induced intestinal damage: Implications for treatment of abdomino-pelvic malignancy. *Cytotherapy* 14 issue 10 :1157-8. 2012. [3.29 Impact Factor](#)

**2012** Voswinkel J, **Chapel A**. Mesenchymal stem cells and rheumatism: State of the art.. *Z Rheumatol*. 25. 2012. [0.61 Impact Factor](#)

**2010 Semont A, Mouiseddine M, Francois A, Demarquay C, Mathieu N, Chapel A, Sache A, Thierry D, Laloi P and Gourmelon P**. Mesenchymal Stem Cells improve small intestinal integrity through regulation of endogenous epithelial cell homeostasis. *Cell Death Differ*. 17(6):952-61. 2010. [8.18 Impact Factor](#)

**2010** Benderitter M, Gourmelon P, Bey E, **Chapel A**, Clairand I, Prat M, Lataillade JJ. New emerging concepts in the medical management of local radiation injury. *Health Phys*. 98(6):851-7. 2010.

**2010 Che TC, François S, Bouchet S, Chapel A, Forgue-Lafitte ME**. Early lesions induced in rat colon epithelium by N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine. *Tissue Cell*. 42(3):190-4. 2010. [1.25 Impact Factor](#)



**2009 Nasef A**, Zhang YZ, Mazurier C, Bouchet S, Bensidhoum M, **Francois S**, Gorin NC, Lopez M, Thierry D, Fouillard L and **Chapel A**. Selected STRO-1-enriched bone marrow stromal cells display a major suppressive effect on lymphocyte proliferation International Journal of Laboratory Hematology. 31. 9-19. 2009. [1.81 Impact Factor](#)

**2009** Vauchez Karine, Marolleau Jean-Pierre, Schmid Michel, Khattar Patricia, **Chapel A**, Catelain Cyril, Lecourt Séverine, Larghéro Jérôme, Fiszman Marc and Vilquin Jean-Thomas. Aldehyde Dehydrogenase Activity Identifies a Population of Human Skeletal Muscle Cells With High Myogenic Capacities. Mol Ther. 17(11):1948-58. 2009. [6.23 Impact Factor](#)

**2008 Chapel A**. Cellules Souches et médecine régénérative, application en radiobiologie. Bulletin de l'Académie Vétérinaire de France.

**2008 Nasef A**, Mazurier C, Bouchet S, **François S**, **Chapel A**; Fouillard L : Leukaemia inhibitory Factor: Role in Human Mesenchymal Stem Cells Mediated Immunosuppression. Cellular immunology 2008: 253, 1-2, 16-22. 2008. [1.92 Impact Factor](#)

**2007 François S**, **Mouiseddine M**, Mathieu N, Semont A, Monti P, Dudoignon N, Saché A, Boutarfa A, Thierry D, Voisin P, Gourmelon P, **Chapel A** : Thérapie cellulaire par cellules souches mésenchymateuses d'une atteinte multi-organes radio-induite : modèle expérimental. Radioprotection. 42 : 351-367. 2007. [0.58 Impact Factor](#)

**2007** Fouillard L, **Chapel A**, Bories D, Bouchet S, Costa JM, Rouard H, Herve P, Gourmelon P, Thierry D, Lopez M and Gorin NC: Infusion of allogeneic-related HLA mismatched mesenchymal stem cells for the treatment of incomplete engraftment following autologous haematopoietic stem cell transplantation. Leukemia. 21 568-70. 2007. [10.43 Impact Factor](#)

**2007 Mouiseddine M**, **Francois S**, Semont A, Sache A, Allenet B, Mathieu N, FrickJ, Thierry D, **Chapel A**. Human Mesenchymal Stem Cells home specifically to radiation-injured tissues in a Non Obese Diabetes/Severe Combined Immunodeficiency mouse model. British Journal of Radiology. 80, 49-55. 2007. [2.3 Impact Factor](#)

**2007 Nasef A**, **Chapel A**, Mazurier C, Bouchet S, Lopez M, Mathieu N, Sensebe L, Zhang Y, Gorin NC, Thierry D and Fouillard L: Identification of IL-10 and TGF-beta transcripts involved in the inhibition of T-lymphocyte proliferation during cell contact with human mesenchymal stem cells. Gene Expr. 13 217-26. 2007. [2.23 Impact Factor](#)

**2007 Nasef A**, Mathieu N, **Chapel A**, Frick J, Francois S, Mazurier C, Boutarfa A, Bouchet S, Gorin NC, Thierry D and Fouillard L: Immunosuppressive effects of mesenchymal stem cells: involvement of HLA-G. Transplantation. 84 231-7. 2007. [3.83 Impact Factor](#)

**2007 Francois S**, **Mouiseddine M**, Mathieu N, Semont A, Monti P, Dudoignon N, Sache A, Boutarfa A, Thierry D, Gourmelon P and **Chapel A**: Human mesenchymal stem cells favour healing of the cutaneous radiation syndrome in a xenogenic transplant model. Ann Hematol. 86 1-8. 2007. [2.86 Impact Factor](#)

**2007 Mouiseddine M**, **Francois S**, Semont A, Sache A, Allenet B, Mathieu N, Frick J, Thierry D, **Chapel A**. Human mesenchymal stem cells home specifically to radiation-injured tissues in a non-obese diabetes/severe combined immunodeficiency mouse model. Br J Radiol. 80 Spec No 1:S49-55. 2007. [2.03 Impact Factor](#)

**2007 Nasef A**, **Chapel A**, Mazurier C, Bouchet S, Lopez M, Mathieu N, Sensebe L, Zhang Y, Gorin NC, Thierry D, Fouillard L. "Identification of IL-10 and TGF-beta transcripts involved in the inhibition of T-lymphocyte proliferation during cell contact with human mesenchymal stem cells Gene Expr. 13(4-5): 217-26. 2007. [3.83 Impact Factor](#)

**2007 Garderet L**, Mazurier C, **Chapel A**, Ernou I, Boutin L, Holy L, Gorin NC, Lopez M, Doucet C, Lataillade, JJ : Mesenchymal stem cells abnormalities in patients with multiple myeloma. Leuk Lymphoma. 48. 2032-41 2007. [2.89 Impact Factor](#)

**2007 Fouillard L**, **Chapel A**, Bories D, Costa JM, Bouchet S, Rouard H, Hervé P , Gourmelon P, Thierry D, Gorin NC. Infusion of allogeneic-related HLA mismatched mesenchymal stem cells for the treatment of incomplete engraftment following autologous haematopoietic stem cell transplantation. Leukemia. 21. 568-570. 2007. [10.43 Impact Factor](#)

**2007 Lataillade J**, Doucet C, Bey E, Carsin H, Huet C, Clairand I, Bottolier-Depois JF, **Chapel A**, Ernou I, Gourven M, Boutin L, Hayden A, Carcamo C, Buglova E, De Revel T, Gourmelon P. A new approach of radiation-burn treatment by dosimetry-guides surgery combined with autologous mesenchymal stem cells therapy. Regen Med. 2(5): 785-9. 2007. [2.79 Impact Factor](#)

**2006 Francois S**, Bensidhoum M, Mouiseddine M, Mazurier C, Allenet B, Semont A, Frick J, Sache A, Bouchet S, Thierry D, Gourmelon P, Gorin NC and **Chapel A**. Local irradiation not only induces homing of human mesenchymal stem cells at exposed sites but promotes their widespread

engraftment to multiple organs: a study of their quantitative distribution after irradiation damage. Stem Cells. 24 1020-9. 2006. [6.52 Impact Factor](#)

**2006** François S, Mouiseddine M, Mathieu N, Semont A, Monti P, Dudoignon N, Saché A, Boutarfa A, Thierry D, Voisin P, Gourmelon P, Chapel A. Mesenchymal Stem cells Favour healing of the cutaneous radiation syndrome. Radioprotection. 41, 441-454. 2006. [2.63 Impact Factor](#)

**2005.** Zhang YZ, Fouillard L, Chapel A, Bensidhoum M, Mazurier C, Nasef A, Bouchet S, Lopez M, Thierry D, Gorin NC. Mesenchymal stem cells from human proximal femurs possess immunosuppressive activity National Medical Journal of China 85, 2780-2784. 2005.

**2005** Bensidhoum M, Gobin S, Chapel A, Lemaitre G, Bouet S, Waksman G, Thierry D, Martin MT. Therapeutic effect of human mesenchymal stem cells in skin after radiation damage. Journal de la Societe de Biologie, 199, 337-341. 2005.

**2005** Bourgier C, Mouiseddine M, Haydont V, Bourhis J, Chapel A, Vozenin-Brotans MC. The micro-environment triggered fibrogenic differentiation in human mesenchymal stem cells. Radiotherapy and Oncology 78. 80611-0. 2006; [4.36 Impact Factor](#)

**2005** Carvalho G, Lefaucheur C, Cherbonnier C, Métivier D, Chapel A, Pallardy M, Bourgeade MF, Charpentier B, Hirsch F, Kroemer G. Chemosensitization by erythropoietin through inhibition of the NF-kB rescue pathway. Oncogene 24, 737 – 745. 2005. [8.46 Impact Factor](#)

**2005** Bertho JM, Prat M, Frick J, Demarquay C, Gaugler MH, Dudoignon N, Clairand I, Chapel A, Gorin NC, Thierry D, Gourmelon P. Application of autologous hematopoietic cell therapy to a non human primate model of heterogeneous high dose irradiation. Radiation research. 2005. [2.91 Impact Factor](#)

**2004.** Ropenga A, Chapel A, Vandamme M, Griffiths N : Use of reference gene expression in rat distal colon following radiation exposure: a caveat Radiation Research 161(5):597-602. 2004.

**2004** Ropenga A, Combes O, Chapel A, Griffiths N. Persistent altered 5-HT turnover following hemibody X irradiation in the rat distal colon. Internat. J. Rad. Biol. 80 ( 6) : 399-411. 2004. [2.91 Impact Factor](#)

**2004** Thierry D, Bertho JM, Chapel A, Gourmelon P. Cell Therapy for the Treatment of Accidental Radiation Overexposure. British J Radiology. 22, 203-21. 2004. [2.03 Impact Factor](#)

**2004** Chapel A, Deas O, Bensidhoum M, Bouchet S, Guillaume T, Poncet P, Hirsch F, Thierry D. In vivo gene targeting of IL-3 into hematopoietic progenitor cells through CD117 receptor mediated

antibody gene delivery : possible implication for the treatment of aplastic anemia by gene therapy. Genetic vaccines and gene therapy. 2.16. 2004. [2.10 Impact Factor](#)

**2004** Bensidhoum M, **Chapel A**, **Francois S**, Demarquay C, Mazurier C, Fouillard L, Bouchet S, Bertho JM, Gourmelon P, Aigueperse J, Charbord P, Gorin NC, Thierry D and Lopez M. Homing of in vitro expanded Stro-1- or Stro-1+ human Mesenchymal Stem Cells into the NOD/SCID mouse and their role in supporting human CD34 cell engraftment. Blood. 103. 3313-9. 2004. [10.45 Impact Factor](#)

**2003 Chapel A**, Bertho JM, Bensidhoum M, Fouillard L, Young RG, Frick J, Demarquay C, Cuvelier F, Mathieu E, Trompier F, Dudoignon N, Germain C, Mazurier C, Aigueperse J, Borneman J, Gorin NC, Gourmelon P, Thierry D. Mesenchymal Stem Cells home in injured tissues when co-infused with hematopoietic cells to treat a radiation-induced multiorgan failure syndrome. Journal of Gene Medecine. volume 5, issue 12: 1028-1038, 2003. [2.47 Impact Factor](#)

**2003** Hirsch F, Deas O, Carvallo G, Thierry D, **Chapel A**. Antibodies, a potent tool to target genes into designated cells and tissues. In Biopharmaceutical Antibodies: Vol II, Novel technologies, G. Subramania editor , Kluwer Academic/Plenum Publishers, London, 141-155, 2003.

**2003** Linard C, Ropenga A, **Chapel A**, Mathe D. Abdominal irradiation increases inflammatory cytokine expression and activates NFkB in rat ileal muscularis layer. American J of Physiol. 285(3):G556-65. 2003. [3.80 Impact Factor](#)

**2003** Huchet A, Belkacemi Y, Frick J, Prat M, Muresan-Kloos I, Altan D, **Chapel A**, Gorin NC, Gourmelon P, Bertho JM. Plasma Flt-3 ligand concentration correlated with radiation-induced bone marrow damage during local fractionated radiotherapy. Int J Radiat Oncol Biol Phys. 57(2):508-15. 2003. [4.26 Impact Factor](#)

**2003** Tuikue Ndam NG, Dumont B, Demanche C, **Chapel A**, Lacube P, Guillot J, Roux P. Developement of a real-time PCR-based fluorescence assay for rapid detection of point mutations in Pneumocystis jiroveci dihydropteroate synthase gene. Journal of Eukaryotic Microbiology. 50 Suppl:658-60. 2003. [3.22 Impact Factor](#)

**2002** Bertho JM, Frick J, Demarquay C, Lauby A, Mathieu E, Dudoignon N, Jacquelin, Chau Q, Joubert C, **Chapel A**, Lopez M, Aigueperse J, Gorin, NC, Gourmelon P, Thierry D. ReInjection of ex vivo expanded primate bone marrow mononucleated cells strongly reduces radiation-induced aplasia. J. Hematother. Stem cell Research, 11(3):549-564, 2002. [2.54 Impact Factor](#)

**2002** Thierry D., **Chapel A.**, Bertho J.M. De la greffe à la thérapie cellulaire. La Recherche, n° 352, pp32-35, Avril 2002.

**2000** **N. Brouard**, **A. Chapel**, D. Thierry, P. Charbord, B. Peault. Transplantation of modified bone marrow stromal cell into mouse-human bone chimeras. J Hemat. & Stem Cell Research. 9, 2, 175-182, 2000.

**2000** Bertho JM, **Chapel A**, Loilleux S, Frick J, Aigueperse J, Gorin NC, Gourmelon P. CD135 (flk2 :flt3) expression by human thymocytes delineates a possible role of FLT3-ligand in T cell precursor proliferation and differentiation.. Scand. J. of Immunol. 51, 2000. [1.74 Impact Factor](#)

**1999** **Chapel A**, Poncet P. **Neildez-Nguyen TMA**, **Véillard J**, **Brouard N**, Goupy C, Chavanel G, Hirsch F, Thierry D. Targeted transfection of the IL-3 gene into primary human hematopoietic progenitor cells through the c-kit receptor. Exp. Hematol. 27, 250-258, 1999. [2.48 Impact Factor](#)

**1999** Durrbach A, Angevin E, Poncet P, Chavanel G, **Chapel A**, Thierry **D**, Gorter A, Senik A, Hirsch F. In vitro targeted cytokine gene transfert to human renal-cell carcinoma through the antibody-mediated endocytosis of G250 tumour-associated antigen. Cancer Gene Therapy. 6, 564-571, 1999. [3.1 Impact Factor](#)

**1999** Thierry D, **Chapel A**, Bertho JM, Gourmelon P. Radioprotection accidentelle : l'Institut de Protection et de Sûreté Nucléaire et le CHU St-Antoine. Le Quotidien du Médecin 6452, 24-25, 1999.

**1998** **Brouard N**, **Chapel A**, **Neildez-Nguyen T.M.A**, Granotier C, Casal I, Peault B, Thierry D. Distribution of transplanted stromal cells transduced with human IL3 gene to stimulate the hematopoiesis in human fetal bone grafts in non-obese diabetic-severe combined immunodeficiency mice. Leukemia, 12, 1128-1135, (1998) [10.43 Impact Factor](#)

**1998** **Chapel A**, "Hématopïèse et irradiation, radiopathologie expérimentale", Radiohématologie, les acquis récents. EDF-Service de radioprotection vol 13, 9-20, Sept 1998.

**1998** **Neildez-Nguyen TMA**, **Chapel A**, M. Arock, **Véillard J**, Thierry D. Gamma-irradiation does not impair atra-induced maturation of myeloid leukaemic cells : implication for combined radiation and differentiation therapy. Brit. J. Hematol. 103, 79-86, 1998. [4.71 Impact Factor](#)

**1992** **Chapel A**, Bensussan A, Vilmer E, Dormont D. Differential HIV expression in CD4+ cloned lymphocytes : from viral latency to replication. Journal of Virology, 66, 3966-3970, 1992. [4.44 Impact Factor](#)

**1991** Legrand R, Vogt G, **Chapel A**, Dormont D. Antibody enhancement and neutralization pattern of sera from SIV-infected or HIV-2 vaccinated rhesus monkeys. *Journal of Medical Primatology*. 20, 172-176, 1991. [0.82 Impact Factor](#)

**1990 Chapel A**, Bourges JF, Bensussan A, Vilmer E, Dormont D. Lack of permissivity of human monoclonal CD4+ lymphocytes to HIV. *Cancer detection and prevention*, 14, 445-455, 1990. [2.52 Impact Factor](#)

**1990** Pathey O, Breuil J, Israel G, **Chapel A**, Dormont D, Dublanchaix A, Lafaix C. Latent HIV infection following a low degree of exposure and the importance of repeated western blot. *Journal of infection*, 21, 225-227, 1990. [4.44 Impact Factor](#)

### Livres

**2012** Cellules souches et irradiations: Cellules souches & thérapie cellulaire dans le traitement des effets secondaires de la radiothérapie et des irradiations. **A. Chapel** et **S. François**

**2012** Biothérapie; les effets indésirables des cellules souches: La thérapie cellulaire peut-elle guérir les dommages tardifs de la radiothérapie? **A. Chapel**

### Communications Orales

**2016** **Benoît Usunier**, Bruno L'Homme, Radia Tamarat, Marc Benderitter and **Alain Chapel** . Mesenchymal Stem Cell (MSC) therapy for the treatment of severe and chronic radiotherapy-induced abdomino-pelvic complications refractory to standard therapy. **Young Investigator Award**, 42nd Annual Meeting of the European Radiation Research Society – ERR 2016, 2016

**2013** J Voswinkel, JJ Lataillade, **S Francois**, M Mohty, NC Gorin, M Benderitter, **A Chapel**. Changes in T lymphocyte subsets accompany the clinical response to Mesenchymal Stem Cell (MSC) therapy – first experiences in irradiation-induced colitis. *15th International Congress of immunology 22-27 août Milan. Italy*

**2013.** **A Chapel**, J Voswinkel, C Linard, A Semont, N Mathieu, NC Gorin and M Benderitter. Stem Cell therapy for the treatment of severe tissue damage after radiation exposure *40th Annual meeting of European Radiation Research Society ERR 2013 Dublin Ireland. September 1-5.*

**2012** J Voswinkel, S Francois, NC Gorin, JM Simon , JJ Lataillade , M Benderitter, P Gourmelon, JY Perrot L. Fouillard, **A. Chapel**. Successful therapy by allogenic Mesenchymal Stem Cells infusion in

irradiated colitis: what we can learn for inflammatory bowel diseases *ESH-EHA Scientific workshop Anti-inflammatory and immune modulatory properties of MSC April 20-22* .

**2012** J Voswinkel, S Francois, NC Gorin, JM Simon , JJ Lataillade, M Benderitter, P Gourmelon, JY Perrot, L Fouillard, A Chapel. Successful therapy by allogenic Mesenchymal Stem cells infusion in irradiated colitis: what we can learn for inflammatory bowel diseases *8th International Congress on Autoimmunity Granada, Spain. May 9-13*

**2012** J Voswinkel, S Francois, NC Gorin , JM Simon, JJ Lataillade, M Benderitter, P Gourmelon, L Fouillard, A Chapel. Mesenchymal Stromal Cells (MSC) for irradiation-induced gastrointestinal lesions: First experiences in four overirradiated patients *Suisse, Geneva, 1-4 Avril, 38th Annual meeting of European bone marrow transplantation.*

**2012** J. Voswinkel, S. Francois , N.C. Gorin, J.M. Simon , J.J. Lataillade, M. Benderitter, P. Gourmelon, J.Y. Perrot , L. Fouillard, A. Chapel. Successful therapy by allogenic Mesenchymal Stem Cells infusion in irradiated colitis: what we can learn for inflammatory bowel diseases, *Paediatric reumatology European society 7-10 march.*

**2010** Che C.H.T. , Francois S, Bouchet S, Larsen A.K, Gorin N.C., Douay L, Chapel A, Forgue-Lafitte M.-E. Effets des cellules souches mésenchymateuses (CSM) sur les premières étapes de la cancérogénèse chimio-induite chez le rat. *Congrès du club d'étude des cellules épithéliales digestives, Palais des Congrès de Paris les 25 et 26 mars.*

**2009** Chapel A. Mesenchymal Stem Cells in radiation injuries. : *The stem cell congress 2009: contributing to the future of regenerative medicine. San Francisco USA, 24-28 Février* .

**2009.** Chapel A. Rôle potentiel des cellules souches mésenchymateuses après radiothérapie anticancéreuse. *XXVII<sup>e</sup> Colloque du CECED (Club d'Etudes des Cellules Epithéliales Digestives). 19-20 Mars. Forum de la Faculté de Médecine, Strasbourg.*

**2009.** Chapel A. Rôle des Cellules Souches Mésenchymateuses dans la réparation tissulaire des tissus sains lésés par la radiothérapie anticancéreuse. *5<sup>ème</sup> Séminaire du Centre de Recherche Saint-Antoine. 2-3 octobre.*

**2009.** Chapel A. Rôle des Cellules Souches Mésenchymateuses (CSM) dans la réparation tissulaire des tissus sains lésés par la radiothérapie anticancéreuse. *5<sup>ème</sup> congrès de la société française de bioingénierie cellulaire et tissulaire. 30 septembre au 2 octobre. Grenoble.*

- 2008. Francois S, Chapel A.** Innocuité et effets bénéfiques des Cellules Souches Mésenchymateuses (CSM) dans la réparation tissulaire des tissus sains lésés par la radiothérapie anticancéreuse de la zone pelvienne. *Journée des Doctorants et post-doctorants de l'IFR 65. Juin. Hôpital Trousseau IFR 65, Paris.*
- 2007 Dudoignon N, Baudelin C, Bertho JM, Chapel A, François A, François S, Holler V, Monti P, Saché A, Semont A, Benderitter M.** *Colloque Evolution of animal experimental models of radiation injury: towards stem cell therapy. FELASA-ICLAS.*
- 2007 Nasef A, Chapel A.** Role of HLA-G in Human Mesenchymal Stem Cell mediated immuosuppressive effect. *Hospices de Beaune.*
- 2007 Francois S, Bouchet S., Gorin N.C., Douay L., Chapel A.** Mesenchymal Stem Cells accelerate the healing of skin after radiation injury *Annual meeting of the International Society for Stem Cell Research. Cairns Australia June 24-27th.*
- 2006 L Fouillard, A Chapel, D Bories, S Bouchet, D Thierry, NC Gorin.** Rescue of hemopoiesis following prolonged aplasia post autologous bone marrow transplantation for acute myeloid leukemia, by infusion of mesenchymal stem cells *EBMT.*
- 2006 J Lataillade, C Doucet, H Carsin, E Bey, A Chapel, M Benderiter, JF Bottolier-Depois, D Thierry, T De Revel, P Gourmelon.** Successful treatment of accidental radiation burns by local administration of autologous Mesenchymal Stem Cells; *35th Annual Scientific Meeting of the International Society for Experimental Hematology, September 27-30 Minneapolis, USA.*
- 2006 S. Gobin, A. Chapel, P. Le Minter, G. Waksman, D. Thierry, MT Martin.** Stem cell therapy with human mesenchymal stem cells for mouse skin radiation damage. *ESTRO 25, Leipzig 8-12 October.*
- 2005 A Semont, S.François, M Mouiseddine, B Allenet, N Mathieu, J Frick, D Thierry, A Chapel.** Multiple human mesenchymal stem cells engraftment and specific homing to injured tissues *2nd international conference on tissues engineering CRETE (GRECE).*
- 2004 S Francois, M Bensidhoum, M Mouiseddine, C Mazurier, S Bouchet, J Frick, P Richard, L Fouillard, M. Lopez, NC Gorin, D Thierry, P Charbord, A Chapel.** Mesenchymal Stem Cells expanded from stro+ cells are multipotential progenitors that home to multiple mesoderm and non-mesoderm-derived tissues and take part in the formation of the hematopoietic niche. *4Th Annual Conference on Annual Conference on Mesenchymal and Non Hematopoietic Stem Cells. October 14-16.*



**2003 A Chapel**, JM Bertho, M Bensedhoum, J Frick, C Demarquay, F Cuvelier, E Mathieu, C Germain, C Mazurier, N Dudoignon, F. Trompier, J Aigueperse, NC Gorin, P Gourmelon, D Thierry. Traitement du syndrome aigu d'irradiation accidentel par la greffe combinée de Cellules Souches Mésoenchymateuses et de Cellules Souches hématopoïétiques. *SFRP 11-13 juin session 1.*

**2003 S François**, M Bensedhoum, **M Mouseddine**, C Mazurier, S. Bouchet, J Frick, C Demarquay, L. Fouillard, M Lopez, D Thierry, NC Gorin, **A Chapel**. Human Mesenchymal Stem Cells home specifically to the radiation injured tissues in a NOD/SCID mouse model. *ISEH Paris 5-8 juillet.*

**2003 M Bensedhoum, A Chapel, C Demarquay, C Mazurier, L Fouillard, S Bouchet, P Charbord, S Francois, P Gourmelon, J Aigueperse, N Gorin, D Thierry, M Lopez.** Homing of in vitro expanded Stro-1- or Stro-1+ human mesenchymal stem cells into the NOD/SCID mouse. Their role in supporting human CD34 cell engraftment. *ISEH Paris 5-8 juillet.*

**2003 JM Bertho, J Frick, C Demarquay, M Prat, N Dudoignon, A Chapel, D Thierry.** Application de la thérapie par expansion ex vivo de cellules hématopoïétiques à un modèle d'irradiation accidentelle *CIRFA Batz sur mer 30 juin -4 juillet.*

**2003 Chapel A,** M Bensedhoum, JM Bertho, J Frick, C Demarquay, C Mazurier, S François, M Mouseddine, S Bouchet, M Lopez, N Dudoignon, J Aigueperse, NC Gorin, P Gourmelon and D Thierry. Cell therapy, a new approach to multiorgan failure syndrome following severe irradiation. *IRPA Madrid.*

**2003 M Mouseddine,** M Bensedhoum, S François, J Frick, S Bouchet, C Mazurier, C Demarquay, JM Bertho, D Thierry, M Lopez, **A Chapel**. Modulation de l'expression des gènes des CSM humaines avant et après greffes dans le modèle murin NOD/SCID irradié. *SFBCT Société Française de Bioingénierie Cellulaire et Tissulaire Paris, Val de Grâce, 24-27 septembre.*

**2003 S François,** M Bensedhoum, M Mouseddine, C Mazurier, S Bouchet, J Frick, C Demarquay, JM Bertho, D Thierry, M Lopez, **A Chapel**. Etude de l'implantation des CSM dans le modèle murin NOD/SCID irradié corps entier ou localement. *SFBCT Société Française de Bioingénierie Cellulaire et Tissulaire Paris, Val de Grâce, 24-27 septembre.*

**2003 S François,** M Bensedhoum, M Mouseddine, C Mazurier, S Bouchet, J Frick, C Demarquay, JM Bertho, D Thierry, M Lopez, **A Chapel**. Advanced Research Workshop on "Radiation-Induced Multi-Organ Involvement and Failure: A Challenge for Pathogenetic Diagnostic and Therapeutic Approaches and Research" *ULM.*

**2003** M Benshidoum, S Bouchet, Ch Mazurier, **A Chapel**, D Thierry, P Coppo, N-C Gorin, M Lopez et L Fouillard . Intérêt du test in vitro des Colony Forming Unit-Fibroblast (CFU-F) dans l'évaluation initiale du microenvironnement médullaire des aplasies médullaires sévères. *XXVème congrès de la Société Française d'Hématologie, Paris.*

**2003** M. Bensidhoum, **S. François**, C. Mazurier, S. Bouchet, N.C. Gorin, D. Thierry, M. Lopez, A. **Chapel**. Cellules Souches Mésoenchymateuses humaine Stro-1+ et Stro-1- dans le modèle NOD/SCID : leurs rôles dans la bio distribution et le soutien hématopoïétique. *3eme Congrès annuel de la Société Francophone de Thérapie et Cellulaire Génique. 28 et 29 Juin.*

### **Communications orales invitées et chairman**

**2016 A Chapel**. Stem cell therapy for the treatment of severe tissue damage after radiation exposure *Biotechnology 4th Biotechnology World Congress july. Boston.*

**2015 A Chapel**. Stem cell therapy for the treatment of severe tissue damage after radiation exposure *Biotechnology 3rd Biotechnology World Congress 22-25 july. Boston.*

**2014 A Chapel**. Effets biologiques des rayonnements ionisants *Programme EPU : Radiologie interventionnelle (SFPM) Les salons du Relais - Hôtel KYRIAD Cour d'honneur de la gare de l'Est (Paris 10ème) 2, 3 et 4 avril.*

**2014 A Chapel**. Stem cell therapy for the treatment of severe tissue damage after radiation exposure *3rd International Conference and Exhibition on Cell & Gene Therapy, Las vegas, USA October 27-29.*

**2012 A Chapel, Francois S**, Benderitter M, Gorin NC, Woswinkel J. Stem cell therapy for the treatment of radiation - induced normal tissue **damage**. *BITS 5th Annual world congress of regenerative medicine and stem cells 2012, A new round of medical revolution hina (Guangzhou). December 4-6, 2012, chair at Track 4 9: Wounded Skin, Skin Ulcers and Burn Injuries Repair for the 5th Annual Congress of Regenerative Medicine and Stem Cell.*

**2012 Francois S**, ME Elisabeth Forgue-Lafite, L Douay, **A Chapel**. L'Etude des risques potentiels liés à l'utilisation des Cellules Souches Mésoenchymateuses (CSM) pour le traitement des effets secondaires de la radiothérapie dans le modèle du cancer colorectal. *5ème journée des doctorants et post doctorants du centre de recherche saint antoine.. 10 May. Hopital trousseau.*

**2012** NC Gorin , M Benderitter, **A Chapel**, Voswinkel, P Gourmelon. Mesenchymal Stromal Cells (MSC) and irradiation. *Suisse, Geneva, 1-4 Avril, 2012, 38th Annual meeting of European bone marrow transplantation.*

**2012 A Chapel.** Stem Cell Therapy for the Treatment of Radiation-induced Normal Tissue Damage *Allemagne, Gottingen , 16 & 17th April Host a SCID immune/inflammatory workshop at the Gottingen Max Planck Institute in association with the medical school.*

**2012 A Chapel.** Cellules Souches Mésenchymateuses et réparation tissulaire *Paris 15-16 décembre Hôpital Pitié-Salpêtrière, 2ème Colloque du réseau USCI (UPMC Stem Cell Initiative).*

**2012 A Chapel,** Benderitter M, Lataillade JJ, GorinNC, and Gourmelon P. Stem cell therapy for the treatment of radiation - induced normal tissue damage. *USA, 2-3 février, San Diego, Stem cell conference.*

**2012. A Chapel,** Benderitter M, Lataillade JJ, GorinNC, and Gourmelon P. Stem cell therapy for the treatment of radiation - induced normal tissue damage. *EBMT 2012 - Geneva, Switzerland - 1- 4. April.*

**2012** NC Gorin, M Benderitter, **A Chapel.** Nuclear Accidents Session: Controversies in Emergency Preparedness for a major radiation incident Is multi-organ dysfunction/failure an inevitable consequence of high-dose total body irradiation? *EBMT 2012 - Geneva, Switzerland - 1- 4. April .*

**2012** Jan Voswinkel, Norbert Claude Gorin, Jean-Marc Simon, Jean-Jaques Lataillade, Marc Benderitter, Patrick Gourmelon, Loic Fouillard, **S. Francois, A. Chapel.** Mesenchymal stromal cells for irradiation-induced gastro-intestinal lesions: first experiences in four over-irradiated patients. *Cellular, Gene therapies and Cytokines.*

**2012 A Chapel .** Cellules souches mésenchymateuses et radiothérapie *Cergy-Pontoise, 06 décembre , Xi ème Journée de la Génomique de l'EBI : Thérapie cellulaire et innovations thérapeutiques.*

**2011 A Chapel.** Successful therapy by allogeneic Mesenchymal Stem Cells (MSC) in three patients with irradiation-induced gastrointestinal lesions *Paris, Jeudi 27 et vendredi 28 octobre 2011 - Pullman Rive Gauche, Congres de la SFGM-TC (Société Francaise de Greffe de moelle et de Thérapie Cellulaire).*

**2011 A Chapel.** Cellules Souches Mésenchymateuses et biosécurité. *Reims 28-30 septembre, Société française de bioingénierie Cellulaire et Tissulaire.*

**2011 A Chapel.** Mesenchymal Stem Cell ameliorates severe radiation pelvic complication: clinical transfer *Warszawa, Poland, 27 August – 1 September, 14th International Congress of Radiation Research.*

**2011 A Chapel.** Stem Cell; a review of preclinical data *Paris, 6 Avril 2011, European group for Blood and marrow transplantation. Mesenchymal.*

**2011 A Chapel.** Cellules souches mésenchymateuses et stratégies antitumorales *Cergy-Pontoise, 15 avril, X<sup>ème</sup> Journée de la Génomique de l'EBI : Thérapie cellulaire et innovations thérapeutiques.*

**2008 A Chapel, A Semont, S Francois, M Mouiseddine,** NC Gorin, P Gourmelon Human Mesenchymal Stem Cells accelerate the healing of skin and increase intestinal recovery after radiation injury 29 febr-01 march *30th Annual Meeting of Japan Society Hematopoietic Cell Transplantation.*

#### **Organisateur de congrès**

**2016** World Biotechnology Congress July, Boston USA. Scientific comity, **Chair at Session** Regenerative Medicine: stem cells, gene therapy, tissue engineering, cell based therapy, cell cultivation. Organisation d'une Session de 7 speakers.

**2013** World Biotechnology Congress June 3-6, Boston USA. Scientific comity, **Chair at Session** Regenerative Medicine: stem cells, gene therapy, tissue engineering, cell based therapy, cell cultivation. Organisation d'une Session de 15 Speakers.

**2011** EBMT, Paris, 3rd - 6th April, Annual Congress of European Bone Marrow Transplantation, France.

**2003** ISEH , Paris, France, July 5-8, 2003 : 32nd Annual Meeting of the International Society for Experimental Hematology, France.

#### **Expertise de programmes de recherche**

**2017** «Ecole Centrale Paris, Institut Pasteur, Réseau International des Instituts Pasteur, Ecole Polytechnique, Arts et Métiers ParisTech, Ecole Supérieure de Physique et de Chimie Industrielles de la Ville de Paris, Université de Technologie de Compiègne, CEA, Labex BioPsy, AP-HP» Appel à candidature poste d'accueil 2015

**2016** «Ecole Centrale Paris, Institut Pasteur, Réseau International des Instituts Pasteur, Ecole Polytechnique, Arts et Métiers ParisTech, Ecole Supérieure de Physique et de Chimie Industrielles de

la Ville de Paris, Université de Technologie de Compiègne, CEA, Labex BioPsy, AP-HP» Appel à candidature poste d'accueil 2015

**2015** Agence de biomédecine. *Appel d'offres 2015 recherche et greffe. Projet 81 : Ingénierie cellulaire par les cellules souches mésenchymateuses de la gelée de Wharton dans la réaction du greffon contre l'hôte*

**2015** «Ecole Centrale Paris, Institut Pasteur, Réseau International des Instituts Pasteur, Ecole Polytechnique, Arts et Métiers ParisTech, Ecole Supérieure de Physique et de Chimie Industrielles de la Ville de Paris, Université de Technologie de Compiègne, CEA, Labex BioPsy, AP-HP» Appel à candidature poste d'accueil 2015

**2015** The Romanian National Council for Scientific Research *evaluation of the project proposals for "Young Research Teams" –, Human Resources Programme*

- *PN-II-RU-TE-2014-4-0716.* Development and experimental validation of a distal model for simulation and control of the thermal effect induced by radiation for medical use
- *PN-II-RU-TE-2014-4-0977* Potential of Biological Waste Derived Human Mesenchymal Stem Cells as Seed in Bone Tissue Engineering
- *PN-II-RU-TE-2014-4-1298.* Adaptive radiotherapy treatment planning using Diffusion - MR Tractography
- *PN-II-RU-TE-2014-4-1513;* Investigation of the vascular regenerative capacity of multipotent stem cells using a novel tissue experimental model.
- *PN-II-RU-TE-2014-4-1614.* Ischemic tissue engineering by combinatorial transplant: piecing together the puzzle to gain mutual benefits for graft survival and host tissue repair
- *PN-II-RU-TE-2014-4-2054.* Laser beam interaction with colloidal systems of drugs presented as microdroplets.
- *PN-II-RU-TE-2014-4-2113.* Attempt for obtaining in vitro auditory sensory cells from mesenchymal stem cells transfected with MATH-1 gene
- *PN-II-RU-TE-2014-4-2431.* Reactivity of neoplastic and normal cells to the action of cold atmospheric plasma
- *PN-II-RU-TE-2014-4-2854.* Clinical utility of DNA based biomarkers in prostate cancer hormonal treatment decision making.
- *PN-II-RU-TE-2014-4-2868.* Study of the structure, thermal stability and interactions of some proteins with possible nanobiomedical and nanobiotechnological applications
- *PN-II-ID-JRP-RO-FR-2015-0006* (Hetero)aromatic amino acids containing peptides for pain treatment

**2015** National Medical Research Council Ministry of Health, Singapore, *National Medical Research Council (NMRC), Clinicians-Scientists Individual Research Grant (CIRG) and the Cooperative Basic Research Grant (CBRG), "Mechanisms of Group A Streptococcus Biofilm Formation".*

**2014** The Romanian National Council for Scientific Research *Evaluation of the project proposals for 2014 national funding call. devices*

- *PN-II-PT-PCCA-2013-4-1493* Innovative therapy of bone fractures

- *PN-II-PT-PCCA-2013-4-1077* Amniotic Fluid Stem Cell Banking for Basic Research and Cell Therapy
- *PN-II-PT-PCCA-2013-4-0030* Modulation of pro/anticarcinogenic effect of toxic chemical agents in breast cancer multitargeted therapy
- *PN-II-PT-PCCA-2013-4-1496* Treatment of neurological over a bladder with botulinum toxin and Neuromodulation with Real time evolution tracking using a monitoring system of bladder behavior
- *PN-II-PT-PCCA-2013-4-1589*. Development of a quantitative videocapillaroscopy method for the longitudinal assessment of patients with systemic sclerosis
- *PN-II-PT-PCCA-2013-4-0008*. Obtaining of an innovative natural product with hypocholesterolemic and hypoglycemic effect through modern biotechnologies
- *PN-II-PT-PCCA-2013-4-0752* Development, characterization and testing of modern modified release pharmaceutical formulations loaded with ibuprofen, propyphenazone, olanzapine and pramipexole
- *PN-II-PT-PCCA-2013-4-1620* Pediatric heart failure - a clinical, imaging, biohumoral, pharmacokinetic and pharmacodynamic multidisciplinary approach for the development of modern therapies oriented towards chemical support
- *PN-II-PT-PCCA-2013-4-2306* Comparative evaluation of tissue and circulating biomarkers of angiogenesis, inflammation and fibrosis in patients with hepatocellular carcinoma with HBV versus HCV etiology
- *PN-II-PT-PCCA-2013-4-0705* Innovative Targeted Microbubbles for Ultrasound Imaging Diagnosis and Therapy in Cancer
- *PN-II-PT-PCCA-2013-4-1577* Development of novel multifunctional cyclodextrin-based nanocarriers intended for reducing the oxidative and inflammatory stress in atherosclerosis through gene therapy
- *PN-II-PT-PCCA-2013-4-1577* Development of novel multifunctional cyclodextrin-based nanocarriers intended for reducing the oxidative and inflammatory stress in atherosclerosis through gene therapy
- *PN-II-PT-PCCA-2013-4-0596* Novel Multifunctional Nanosystems for Diagnosis, Monitoring and Therapy -“theranostic”- in Personalized Cancer Treatment

**2014** National Medical Research of Ireland

- *HRA-2014-DI-67* Phase IIb randomized controlled trial of bone marrow-derived mesenchymal stromal cells for refractory fistulizing Crohn disease

**2014** National Medical Research Council Ministry of Health, Singapore, National Medical Research Council (NMRC), Clinicians-Scientists Individual Research Grant (CIRG) and the Cooperative Basic Research Grant (CBRG),

- "Mechanisms of Group A Streptococcus Biofilm Formation on Mammalian Cells" – CBRG.

**2013** The Romanian National Council for Scientific Research, Evaluation of the project proposals for 2013 national funding call.

- Broad Medical Research Program for IBD
- Engineering Transplantable Mesenchymal Stem Cell Spheroids for Treatment of Inflammatory Bowel Disease”,

**2013** National Medical Research Council Ministry of Health, Singapore, National Medical Research Council (NMRC), Clinicians-Scientists Individual Research Grant (CIRG) and the Cooperative Basic Research Grant (CBRG),

- "Genetic and Epigenetic Regulation of Embryonic Stem Cells " - CBRG12nov098

- Hydrolock Particle Glue for Bridging Implanted Material and Tissue Interface" - CBRG12nov125

**2013** Agence National de Recherche (ANR) Appel à projet Technologies pour la santé et l'autonomie, Edition 2013 projet 48076 "PRADO « Modélisation pour la prédiction de la dose additionnelle due à l'imagerie de positionnement en radiothérapie externe »

**2013** The Romanian National Council for Scientific Research Evaluation of the project proposals for 2013 national funding call. devices

- PN-II-PT-PCCA-2013-4-1620 Pediatric heart failure, a multidisciplinary clinical, echocardiographic approach, based on cardiac biomarkers and pharmacokinetic and pharmacodynamic studies, for the development of modern therapies oriented towards chemical support.
- PN-II-PT-PCCA-2013-4-1605 Effect of gamma-sterilization on Parylene-C coating for biomedical implantable
- PN-II-PT-PCCA-2013-4-1575 DNA based porous three-dimensional (3D) nano-biotechnological scaffold modified with DNA for specific hepatitis B virus genotypes detection and clinical diagnosis
- PN-II-PT-PCCA-2013-4-0976 Development of an original therapy based on Trichuris suis in inflammatory bowel disease
- PN-II-PT-PCCA-2013-4-0530 Assessment of biological effects of certain polyfullerene-type carbon nanostructures enriched in oxygen and nitrogen in cancer

*PN-II-PT-PCCA-2013-4-1567* Developing Techniques to Successfully Identify Companion Diagnostic and Novel Therapeutic Strategies in Breast Cancer

- *PN-II-PT-PCCA-2013-4-0497* Balkan endemic nephropathy etiology: role of environmental and epigenetic factors
- *PN-II-PT-PCCA-2013-4-1523* Innovative Protocol for Selection of The Voice Prosthesis for Voice Rehabilitation in Patients with Total Laryngectomy
- *PN-II-PT-PCCA-2013-4-0752* Development, characterization and testing of modern modified release pharmaceutical formulations loaded with ibuprofen, propyphenazone, olanzapine and pramipexole
- *PN-II-PT-PCCA-2013-4-2133* Innovative therapy for recovery after spinal cord injuries
- *PN-II-PT-PCCA-2013-4* Comparative evaluation of tissue and circulating biomarkers of angiogenesis, inflammation and fibrosis in patients with hepatocellular carcinoma with HBV versus HCV etiology
- *PN-II-PT-PCCA-2013-4-0294* Validation of the combined use of RNAi and mass spectrometry for the identification of microglial therapeutic targets important for neuropathic pain and Alzheimer disease

**2012** The Romanian National Council for Scientific Research Evaluation of the project proposals for 2012 national funding call. devices

- New anticancer compounds identified in potato, Solanum chacoense and their derived fusion hybrids
- In silico modelling of biological processes in hypoxic tumours towards an individualized treatment protocol

**2011** Ligue contre le cancer - Comité Loire-Atlantique. Appel d'offre de recherche 2011 – Subvention 2012. *Rôle des Cellules Souches Mésoenchymateuses de la moelle osseuse dans l'angiogenèse médullaire des leucémies aigües myéloblastiques.*

**2009** AFSSAPS Etude ORN (Osteoradionécrose Rennes-Nantes) : Traitement curateur de l'ostéoradionécrose par substitution osseuse hybride. ID RCB : n°2008-A01593-52 Ref BRD 08/10-H

**2008** Appels à projets « recherche » région centre : *Vasculogénèse induite par la co-administration de rhBMP2 et de Cellules Souches Mésoenchymateuses.*

**2007** Israel Science Foundation (ISF) research proposal Uri Oron, Application no: 757/08: *Beneficial effects of implantation and recruitment of stem cells after low energy laser irradiation on the ischemic rat heart*

**2007** AERES member du visiting committee Research unit : Cell therapy and tissue engineering for clinical use – EA 3952 University of Paris 12.

**2006** Medical and Health Research ELA foundation. 2006 research grant or fellowship application. *Analyze myelinating or remyelinating potentiality of adult bone marrow and umbilical cord stem cells in different models of leucodystrophy.*

#### **Editeur associé**

- World Journal of Stem Cells
- World Journal of Gastrointestinal Surgery
- World Journal of Radiology
- The Open Gene Therapy Journal
- Journal of Clinical Rehabilitative Tissue Engineering Research
- Research Journal of Developmental Biology
- Journal of Toxicology and Health
- Recent patents on regenerative medicine
- Zeal Scienza
- Analytical cellular pathology
- Scientific Reports, journal from Nature Publishing Group,
- Austin Leukemia
- Translational Genetics and Genomics
- AIMS Cell and Tissue Engineering
- Journal of Stem Cell Research
- Annals of Stem Cell Research & Therapy
- American Journal of Leukemia research



### **Editeur en chef**

- World Research Journal of Gene Therapy (octobre 2012)
- Translational Genetics and Genomics (mai 2016)

### **Sociétés savantes**

- ASH American Society of Hematology
- EBMT European Bone Marow transplantation
- ISCT International Society of Cell Therapy
- SFGM-TC Société Française de Greffe moelle et de thérapie cellulaire
- ISSCR International Society for Stem Cell research

## G. RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Agay D, Scherthan H, Forcheron F, Grenier N, Hérodin F, Meineke V, Drouet M. Multipotent mesenchymal stem cell grafting to treat cutaneous radiation syndrome: development of a new minipig model. *Exp Hematol*. 2010 Oct;38(10):945-56.

Akita S, Akino K, Hirano A, Ohtsuru A, Yamashita S. Mesenchymal stem cell therapy for cutaneous radiation syndrome. *Health Phys*. 2010 Jun;98(6):858-62.

Akita S, Akino K, Hirano A, Ohtsuru A, Yamashita S. Non cultured autologous adipose-derived stem cells therapy for chronic radiation injury. *Stem Cells Int*. 2012.

Andreyev HJ, Wotherspoon A, Denham JW, Hauer-Jensen M. "Pelvic radiation disease": new understanding and new solutions for a new disease in the era of cancer survivorship. *Scand J Gastroenterol*. 2011 Apr;46(4):389-97.

Azria D, Riou O, Castan F, Nguyen TD, Peignaux K, Lemanski C, Lagrange JL, Kirova Y, Lartigau E, Belkacemi Y, Bourgier C, Rivera S, Noël G, Clippe S, Mornex F, Hennequin C, Kramar A, Gourgou S, Pèlerin A, Fenoglio P, Ozsahin EM. Radiation-induced CD8 T-lymphocyte Apoptosis as a Predictor of Breast Fibrosis After Radiotherapy: Results of the Prospective Multicenter French Trial. *EBioMedicine*. 2015 Oct 25;2(12):1965-73.

Benderitter M, Caviggioli F, Chapel A, Coppes RP, Guha C, Klinger M, Malard O, Stewart F, Tamarat R, Luijk PV, Limoli CL. Stem cell therapies for the treatment of radiation-induced normal tissue side effects. *Antioxid Redox Signal*. 2014 Jul 10;21(2):338-55.

Benderitter M, Gourmelon P, Bey E, Chapel A, Clairand I, Prat M, Lataillade JJ. New emerging concepts in the medical management of local radiation injury. *Health Phys*. 2010 Jun;98(6):851-7.

Bensidhoum M, Chapel A, Francois S, Demarquay C, Mazurier C, Fouillard L, Bouchet S, Bertho JM, Gourmelon P, Aigueperse J, Charbord P, Gorin NC, Thierry D, Lopez M. Homing of in vitro expanded Stro-1- or Stro-1+ human mesenchymal stem cells into the NOD/SCID mouse and their role in supporting human CD34 cell engraftment. *Blood*. 2004 May 1;103(9):3313-9. Epub 2004 Jan 8.

Bensidhoum M, Gobin S, Chapel A, Lemaitre G, Bouet S, Waksman G, Thierry D, Martin MT. Therapeutic effect of human mesenchymal stem cells in skin after radiation damage]. *J Soc Biol*. 2005;199(4):337-41. French.

Bertho JM, Frick J, Demarquay C, Lauby A, Mathieu E, Dudoignon N, Jacquet N, Trompier F, Chapel A, Joubert C, Lopez M, Aigueperse J, Gorin NC, Gourmelon P, Thierry D. ReInjection of ex vivo-expanded primate bone marrow mononuclear cells strongly reduces radiation-induced aplasia. *J Hematother Stem Cell Res.* 2002 Jun;11(3):549-64.

Bertho JM, Mathieu E, Lauby A, Frick J, Demarquay C, Gourmelon P, Gorin NC, Thierry D. Feasibility and limits of bone marrow mononuclear cell expansion following irradiation. *Int J Radiat Biol.* 2004 Jan;80(1):73-81.

Bertho JM, Prat M, Frick J, Demarquay C, Gaugler MH, Dudoignon N, Clairand I, Chapel A, Gorin NC, Thierry D, Gourmelon P. Application of autologous hematopoietic cell therapy to a nonhuman primate model of heterogeneous high-dose irradiation. *Radiat Res.* 2005 May;163(5):557-70.

Bertho JM, Mathieu E, Lauby A, Frick J, Demarquay C, Gourmelon P, Gorin NC, Thierry D. Feasibility and limits of bone marrow mononuclear cell expansion following irradiation. *Int J Radiat Biol.* 2004 Jan;80(1):73-81.

Bertho JM, Frick J, Demarquay C, Lauby A, Mathieu E, Dudoignon N, Jacquet N, Trompier F, Chapel A, Joubert C, Lopez M, Aigueperse J, Gorin NC, Gourmelon P, Thierry D. ReInjection of ex vivo-expanded primate bone marrow mononuclear cells strongly reduces radiation-induced aplasia. *J Hematother Stem Cell Res.* 2002 Jun;11(3):549-64.

Bertho JM, Chapel A, Loilleux S, Frick J, Aigueperse J, Gorin NC, Gourmelon P. CD135 (Flk2/Flt3) expression by human thymocytes delineates a possible role of FLT3-ligand in T-cell precursor proliferation and differentiation. *Scand J Immunol.* 2000 Jul;52(1):53-61.

Bessout R, Demarquay C, Moussa L, René A, Doix B, Benderitter M, Sémont A, Mathieu N. TH17 predominant T-cell responses in radiation-induced bowel disease are modulated by treatment with adipose-derived mesenchymal stromal cells. *J Pathol.* 2015 Dec;237(4):435-46.

Bessout R, Sémont A, Demarquay C, Charcosset A, Benderitter M, Mathieu N. Mesenchymal stem cell therapy induces glucocorticoid synthesis in colonic mucosa and suppresses radiation-activated T cells: new insights into MSC immunomodulation. *Mucosal Immunol.* 2014 May;7(3):656-69.

Bourgier C, Levy A, Vozenin MC, Deutsch E. Pharmacological strategies to spare normal tissues from radiation damage: useless or overlooked therapeutics? *Cancer Metastasis Rev.* 2012 Dec;31(3-4):699-712.

Bourgier C, Lacombe J, Solassol J, Mange A, Pèleguin A, Ozsahin M, Azria D. Late side-effects after curative intent radiotherapy: Identification of hypersensitive patients for personalized strategy. *Crit Rev Oncol Hematol*. 2015 Mar;93(3):312-9.

Brouard N, Chapel A, Neildez-Nguyen TM, Granotier C, Khazaal I, Péault B, Thierry D. Transplantation of stromal cells transduced with the human IL3 gene to stimulate hematopoiesis in human fetal bone grafts in non-obese, diabetic-severe combined immunodeficiency mice. *Leukemia*. 1998 Jul;12(7):1128-35.

Brouard N, Chapel A, Thierry D, Charbord P, Péault B. Transplantation of gene-modified human bone marrow stromal cells into mouse-human bone chimeras. *J Hematother Stem Cell Res*. 2000 Apr;9(2):175-81.

Bury MI, Fuller NJ, Wethekam L, Sharma AK. Bone marrow derived cells facilitate urinary bladder regeneration by attenuating tissue inflammatory responses. *Cent European J Urol* 2015; 68: 115-120.

Castelo-Branco MT, Soares ID, Lopes DV, Buongusto F, Martinusso CA, do Rosario A Jr, Souza SA, Gutfilen B, Fonseca LM, Elia C, Madi K, Schanaider A, Rossi MI, Souza HS.

Intraperitoneal but not intravenous cryopreserved mesenchymal stromal cells home to the inflamed colon and ameliorate experimental colitis. *PLoS One*. 2012;7(3):e33360.

Caviggioli F, Maione L, Forcellini D, Klinger F, Klinger M. Autologous fat graft in postmastectomy pain syndrome. *Plast Reconstr Surg*. 2011 Aug;128(2):349-52.

Caviggioli F, Vinci V, Maione L, Lisa A, Klinger M. Autologous fat grafting in secondary breast reconstruction. *Ann Plast Surg*. 2013 Jan;70(1):119.

Caviggioli F, Vinci V, Codolini L. Autologous fat grafting: an innovative solution for the treatment of post-mastectomy pain syndrome. *Breast Cancer*. 2013 Jul;20(3):281-2.

Caviggioli F, Maione L, Klinger F, Lisa A, Klinger M. Autologous Fat Grafting Reduces Pain in Irradiated Breast: A Review of Our Experience. *Stem Cells Int*. 2016;2016:2527349.

Caviggioli F, Lisa A, Klinger F, Pajardi G, Vinci V, Maione L, Rimondo A, Klinger M. External Volume Expansion in Irradiated Tissue: Effects on the Recipient Site. *Plast Reconstr Surg*. 2017 Jan;139(1):313e-314e.

Cavaggioli F, Vinci V, Vappiani M, Lisa A, Maione L, Klinger M. Response to "Evidence-Based Scar Management: How to Improve Results with Technique and Technology". *Plast Reconstr Surg.* 2017 Feb 15.

Cesaro S, Brugiolo A, Faraci M, et al. Incidence and treatment of hemorrhagic cystitis in children given hematopoietic stem cell transplantation: A survey from the Italian association of pediatric hematology oncology-bone marrow transplantation group. *Bone Marrow Transplant* 2003; 32: 925–931,

Cesaro S, Facchin C, Tridello G, et al. A prospective study of BK-virus-associated haemorrhagic cystitis in paediatric patients undergoing allogeneic haematopoietic stem cell transplantation. *Bone Marrow Transplant* 2008; 41:363–370

Chapel A, Poncet P, Neildez-Nguyen TM, Vétillard J, Brouard N, Goupy C, Chavanel G, Hirsch F, Thierry D. Targeted transfection of the IL-3 gene into primary human hematopoietic progenitor cells through the c-kit receptor. *Exp Hematol.* 1999 Feb;27(2):250-8.

Chapel A, Bertho JM, Bensidhoum M, Fouillard L, Young RG, Frick J, Demarquay C, Cuvelier F, Mathieu E, Trompier F, Dudoignon N, Germain C, Mazurier C, Aigueperse J, Borneman J, Gorin NC, Gourmelon P, Thierry D. Mesenchymal stem cells home to injured tissues when co-infused with hematopoietic cells to treat a radiation-induced multi-organ failure syndrome. *J Gene Med.* 2003 Dec;5(12):1028-38.

Chapel A, Deas O, Bensidhoum M, François S, Mouiseddine M, Poncet P, Dürrbach A, Aigueperse J, Gourmelon P, Gorin NC, Hirsch F, Thierry D. In vivo gene targeting of IL-3 into immature hematopoietic cells through CD117 receptor mediated antibody gene delivery. *Genet Vaccines Ther.* 2004 Oct 27;2(1):16.

Chang P, Qu Y, Liu Y, Cui S, Zhu D, Wang H, Jin X. Multi-therapeutic effects of human adipose-derived mesenchymal stem cells on radiation-induced intestinal injury. *Cell Death Dis.* 2013 Jun 20;4:e685.

Chapel A. Mesenchymal stromal cell therapy to repair radiation-induced intestinal damage: implications for treatment of abdominopelvic malignancy. *Cytotherapy.* 2012 Nov;14(10):1157-8.

Chapel A, Francois S, Douay L, Benderitter M, Voswinkel J. Fifteen years of preclinical and clinical experiences about biotherapy treatment of lesions induced by accidental irradiation and radiotherapy. *World J Stem Cells.* 2013 Jul 26;5(3):68-72.

Chapel A, Francois S, Douay L, Benderitter M, Voswinkel J. New insights for pelvic radiation disease treatment: Multipotent stromal cell is a promise mainstay treatment for the restoration of abdominopelvic severe chronic damages induced by radiotherapy. *World J Stem Cells*. 2013 Oct 26;5(4):106-11.

Che TC, François S, Bouchet S, Chapel A, Forgue-Lafitte ME. Early lesions induced in rat colon epithelium by N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine. *Tissue Cell*. 2010 Jun;42(3):190-4.

Chiba S, Saito A, Ogawa S, Takeuchi K, Kumano K, Seo S, Suzuki T, Tanaka Y, Saito T, Izutsu K, Yuji K, Masuda S, Futami S, Nishida M, Suzuki G, Gale RP, Fukayama M, Maekawa K, Hirai H. Transplantation for accidental acute high-dose total body neutron- and gamma-radiation exposure. *Bone Marrow Transplant*. 2002 Jun;29(11):935-9.

Crew JP, Jephcott CR, Reynard JM. Radiation-induced haemorrhagic cystitis. *Eur Urol* 2001; 40: 111–123.

Dainiak N, Gent RN, Carr Z, et al. First global consensus for evidence-based management of the hematopoietic syndrome resulting from exposure to ionizing radiation. *Disaster Med Public Health Prep* 2011;5:202-212.

Denton A, Forbes A, Andreyev J, Maher EJ. Non surgical interventions for late radiation proctitis in patients who have received radical radiotherapy to the pelvis. *Cochrane Database Syst Rev*. 2002;(1):CD003455. Review. Update in: *Cochrane Database Syst Rev*. 2016;4:CD003455.

Denton AS, Andreyev HJ, Forbes A, Maher EJ. Systematic review for non-surgical interventions for the management of late radiation proctitis. *Br J Cancer*. 2002 Jul 15;87(2):134-43. Review.

Denton AS, Clarke NW, Maher EJ. Non-surgical interventions for late radiation cystitis in patients who have received radical radiotherapy to the pelvis. *Cochrane Database Syst Rev*. 2002;(3):CD001773. Review.

Domergue S, Bony C, Maumus M, Toupet K, Frouin E, Rigau V, Vozenin MC, Magalon G, Jorgensen C, Noël D. Comparison between Stromal Vascular Fraction and Adipose Mesenchymal Stem Cells in Remodeling Hypertrophic Scars. *PLoS One*. 2016 May 26;11(5):e0156161.

Dörr H, Abend M, Blakely WF, Bolduc DL, Boozer D, Costeira T, Dant T, De Amicis A, De Sanctis S, Dondey M, Drouet M, Entine F, Francois S, Gagna G, Guitard N, Hérodin F, Hoefler M, Lamkowski A, La Sala G, Lista F, Loiacono P, Majewski M, Martigne P, Métivier D, Michel X, Pateux J, Pejchal J, Reeves

G, Riccobono D, Sinkorova Z, Soyez L, Stricklin D, Tichy A, Valente M, Woodruff CR Jr, Zarybnicka L, Port M. Using Clinical Signs and Symptoms for Medical Management of Radiation Casualties - 2015 NATO Exercise. *Radiat Res.* 2017 Mar;187(3):273-286.

Dörr H, Meineke V. Acute radiation syndrome caused by accidental radiation exposure - therapeutic principles. *BMC Med.* 2011 Nov 25;9:126.

Drouet M, Hérodin F. Radiation victim management and the haematologist in the future: time to revisit therapeutic guidelines? *Int J Radiat Biol.* 2010 Aug;86(8):636-48.

Drouet M, Mourcin F, Grenier N, Delaunay C, Mayol JF, Lataillade JJ, Peinnequin A, Hérodin F. Mesenchymal stem cells rescue CD34+ cells from radiation-induced apoptosis and sustain hematopoietic reconstitution after coculture and cograftering in lethally irradiated baboons: is autologous stem cell therapy in nuclear accident settings hype or reality? *Bone Marrow Transplant.* 2005 Jun;35(12):1201-9.

Durand C, Pezet S, Eutamène H, Demarquay C, Mathieu N, Moussa L, Daudin R, Holler V, Sabourin JC, Milliat F, François A, Theodorou V, Tamarat R, Benderitter M, Sémont A. Persistent visceral allodynia in rats exposed to colorectal irradiation is reversed by mesenchymal stromal cell treatment. *Pain.* 2015 Aug;156(8):1465-76.

Dürrbach A, Angevin E, Poncet P, Rouleau M, Chavanel G, Chapel A, Thierry D, Gorter A, Hirsch R, Charpentier B, Senik A, Hirsch F. Antibody-mediated endocytosis of G250 tumor-associated antigen allows targeted gene transfer to human renal cell carcinoma in vitro. *Cancer Gene Ther.* 1999 Nov-D 15.

Duijvestein, M., A. C. Vos, H. Roelofs, M. E. Wildenberg, B. B. Wendrich, H. W. Verspaget, E. M. Kooy-Winkelaar, F. Koning, J. J. Zwaginga, H. H. Fidder, A. P. Verhaar, W. E. Fibbe, G. R. van den Brink and D. W. Hommes (2010). "Autologous bone marrow-derived mesenchymal stromal cell treatment for refractory luminal Crohn's disease: results of a phase I study." *Gut* 59(12): 1662-1669.

Duijvestein, M., M. E. Wildenberg, M. M. Welling, S. Hennink, I. Molendijk, V. L. van Zuylen, T. Bosse, A. C. Vos, E. S. de Jonge-Muller, H. Roelofs, L. van der Weerd, H. W. Verspaget, W. E. Fibbe, A. A. te Velde, G. R. van den Brink and D. W. Hommes (2011). "Pretreatment with interferon-gamma enhances the therapeutic activity of mesenchymal stromal cells in animal models of colitis." *Stem Cells* 29(10): 1549-1558.

Eaton EB Jr, Varney TR. Mesenchymal stem cell therapy for acute radiation syndrome: innovative medical approaches in military medicine. *Mil Med Res*. 2015 Jan 30;2:2.

Ebrahimian TG, Pouzoulet F, Squiban C, Buard V, André M, Cousin B, Gourmelon P, Benderitter M, Casteilla L, Tamarat R. Cell therapy based on adipose tissue-derived stromal cells promotes physiological and pathological wound healing. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2009 Apr;29(4):503-10. ec;6(6):564-71.

Erickson DR, Xie SX, Bhavanandan VP, Wheeler MA, Hurst RE, Demers LM, Kushner L, Keay SK. A comparison of multiple urine markers for interstitial cystitis. *J Urol*. 2002 Jun;167(6):2461-9.

Flamant S, Tamarat R. Extracellular Vesicles and Vascular Injury: New Insights for Radiation Exposure. *Radiat Res*. 2016 Aug;186(2):203-18.

Fliedner TM, Powles R, Sirohi B, Niederwieser D; European Group for Blood and Marrow Transplantation (EBMT) Nuclear Accident Committee (NAC).. Radiologic and nuclear events: the METREPOL severity of effect grading system. *Blood*. 2008 Jun 15;111(12):5757-8; author reply 5758-9.

Forcheron F, Agay D, Scherthan H, Riccobono D, Herodin F, Meineke V, Drouet M. Autologous adipocyte derived stem cells favour healing in a minipig model of cutaneous radiation syndrome. *PLoS One*. 2012;7(2):e31694.

Fouillard L, Chapel A, Bories D, Bouchet S, Costa JM, Rouard H, Hervé P, Gourmelon P, Thierry D, Lopez M, Gorin NC. Infusion of allogeneic-related HLA mismatched mesenchymal stem cells for the treatment of incomplete engraftment following autologous haematopoietic stem cell transplantation. *Leukemia*. 2007 Mar;21(3):568-70.

Fouillard L, Francois S, Bouchet S, Bensidhoum M, Elm'selmi A, Chapel A. Innovative cell therapy in the treatment of serious adverse events related to both chemo-radiotherapy protocol and acute myeloid leukemia syndrome: the infusion of mesenchymal stem cells post-treatment reduces hematopoietic toxicity and promotes hematopoietic reconstitution. *Curr Pharm Biotechnol*. 2013;14(9):842-8.

Fouillard L, Bensidhoum M, Bories D, Bonte H, Lopez M, Moseley AM, Smith A, Lesage S, Beaujean F, Thierry D, Gourmelon P, Najman A, Gorin NC. Engraftment of allogeneic mesenchymal stem cells in the bone marrow of a patient with severe idiopathic aplastic anemia improves stroma. *Leukemia*. 2003 Feb;17(2):474-6.



François, A., Milliat, F., Guipaud, O. & Benderitter, M. Inflammation and immunity in radiation damage to the gut mucosa. *BioMed Res. Int.* 2013, 123241.

François S, Bensidhoum M, Mouiseddine M, Mazurier C, Allenet B, Semont A, Frick J, Saché A, Bouchet S, Thierry D, Gourmelon P, Gorin NC, Chapel A. Local irradiation not only induces homing of human mesenchymal stem cells at exposed sites but promotes their widespread engraftment to multiple organs: a study of their quantitative distribution after irradiation damage. *Stem Cells.* 2006 Apr;24(4):1020-9.

François S, Mouiseddine M, Mathieu N, Semont A, Monti P, Dudoignon N, Saché A, Boutarfa A, Thierry D, Gourmelon P, Chapel A. Human mesenchymal stem cells favour healing of the cutaneous radiation syndrome in a xenogenic transplant model. *Ann Hematol.* 2007 Jan;86(1):1-8.

François S, Mouiseddine M, Allenet-Lepage B, Voswinkel J, Douay L, Benderitter M, Chapel A. Human mesenchymal stem cells provide protection against radiation-induced liver injury by antioxidative process, vasculature protection, hepatocyte differentiation, and trophic effects. *Biomed Res Int.* 2013;2013:151679.

François S, Usunier B, Douay L, Benderitter M, Chapel A. Long-Term Quantitative Biodistribution and Side Effects of Human Mesenchymal Stem Cells (hMSCs) Engraftment in NOD/SCID Mice following Irradiation. *Stem Cells Int.* 2014;2014:939275.

Frazzoni, L., M. La Marca, A. Guido, A. G. Morganti, F. Bazzoli and L. Fuccio (2015). "Pelvic radiation disease: Updates on treatment options." *World J Clin Oncol* 6(6): 272-280.

Friesecke I, Beyrer K, Wedel R, Reimers K, Fliedner TM. SEARCH: a system for evaluation and archiving of radiation accidents based on case histories. *Radiat Environ Biophys.* 2000 Sep;39(3):213-7.

Friesecke I, Beyrer K, Fliedner TM; METREPOL team. How to cope with radiation accidents: the medical management. Medical treatment protocols for radiation accident victims as a basis for a computerised guidance system. *Br J Radiol.* 2001 Feb;74(878):121-2.

Gao, Z., Q. Zhang, Y. Han, X. Cheng, Y. Lu, L. Fan and Z. Wu (2012). "Mesenchymal stromal cell-conditioned medium prevents radiation-induced small intestine injury in mice." *Cytotherapy* 14(3): 267-273.

Garderet L, Mazurier C, Chapel A, Ernou I, Boutin L, Holy X, Gorin NC, Lopez M, Doucet C, Lataillade JJ. Mesenchymal stem cell abnormalities in patients with multiple myeloma. *Leuk Lymphoma*. 2007 Oct;48(10):2032-41.

Graham, M. F., Bryson, G. R. & Diegelmann, R. F. Transforming growth factor beta 1 selectively augments collagen synthesis by human intestinal smooth muscle cells. *Gastroenterology* 1990; 99, 447-453

Gorin NC, Fliedner TM, Gourmelon P, Ganser A, Meineke V, Sirohi B, Powles R, Apperley J. Consensus conference on European preparedness for haematological and other medical management of mass radiation accidents. *Ann Hematol*. 2006 Oct;85(10):671-9.

Gourmelon P, Benderitter M, Bertho JM, Huet C, Gorin NC, De Revel P. European consensus on the medical management of acute radiation syndrome and analysis of the radiation accidents in Belgium and Senegal. *Health Phys*. 2010 Jun;98(6):825-32.

Gourraud PA, Gilson L, Girard M, Peschanski M. The role of human leukocyte antigen matching in the development of multiethnic "haplobank" of induced pluripotent stem cell lines. *Stem Cells*. 2012;30(2):180-6

Graessle DH, Dörr H, Bennett A, Shapiro A, Farese AM, MacVittie TJ, Meineke V. Comparing the Hematopoietic Syndrome Time Course in the NHP Animal Model to Radiation Accident Cases From the Database Search. *Health Phys*. 2015 Nov;109(5):493-501.

Haldar S, Dru C, Bhowmick Mechanisms of hemorrhagic cystitis. *NA Am J Clin Exp Urol*. 2014 Oct 2;2(3):199-208. eCollection 2014.

Haldar S, Dru C, Bhowmick NA. Mechanisms of hemorrhagic cystitis. *Am J Clin Exp Urol*. 2014 Oct 2;2(3):199-208.

Hamama S, Delanian S, Monceau V, Vozenin MC. Therapeutic management of intestinal fibrosis induced by radiation therapy: from molecular profiling to new intervention strategies et vice et versa. *Fibrogenesis Tissue Repair*. 2012 Jun 6;5(Suppl 1):S13 2012.

Hanson B, MacDonald R, Shaukat A. Endoscopic and medical therapy for chronic radiation proctopathy: a systematic review. *Dis Colon Rectum*. 2012 Oct;55(10):1081-95.

Hardjo M, Miyazaki M, Sakaguchi M, Masaka T, Ibrahim S, Kataoka K, Huh NH. Suppression of carbon tetrachloride-induced liver fibrosis by transplantation of a clonal mesenchymal stem cell line derived from rat bone marrow. *Cell Transplant*. 2009;18(1):89-99.

Hauer-Jensen M, Denham JW, Andreyev HJ. Radiation enteropathy--pathogenesis, treatment and prevention. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*. 2014 Aug;11(8):470-9.

Haydont V, Mathé D, Bourgier C, Abdelali J, Aigueperse J, Bourhis J, Vozenin-Brotons MC. Induction of CTGF by TGF-beta1 in normal and radiation enteritis human smooth muscle cells: Smad/Rho balance and therapeutic perspectives. *Radiother Oncol*. 2005 Aug;76(2):219-25

Haydont, V. & Vozenin-Brotons, M. C. Maintenance of radiation-induced intestinal fibrosis: cellular and molecular features. *World J. Gastroenterol*. 2007; 13, 2675-2683.

He XW, He XS, Lian L, Wu XJ, Lan P. Systemic infusion of bone marrow-derived mesenchymal stem cells for treatment of experimental colitis in mice. *Dig Dis Sci*. 2012 Dec;57(12):3136-44.

Hérodin F, Mayol JF, Mourcin F, Drouet M. Which place for stem cell therapy in the treatment of acute radiation syndrome? *Folia Histochem Cytobiol*. 2005;43(4):223-7. Review.

Hérodin F, Drouet M. Cytokine-based treatment of accidentally irradiated victims and new approaches. *Exp Hematol*. 2005 Oct;33(10):1071-80. Review

Hirsch F, Poncet P, Freeman S, Gress RE, Sachs DH, Druet P, Hirsch R. Antifection: a new method for targeted gene transfection. *Transplant Proc*. 1993 Feb;25(1 Pt 1):138-9.

Huchet A, Belkacémi Y, Frick J, Prat M, Muresan-Kloos I, Altan D, Chapel A, Gorin NC, Gourmelon P, Bertho JM. Plasma Flt-3 ligand concentration correlated with radiation-induced bone marrow damage during local fractionated radiotherapy. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. 2003 Oct 1;57(2):508-15.

Kobari L, Yates F, Oudrhiri N, Francina A, Kiger L, Mazurier C, Rouzbeh S, El-Nemer W, Hebert N, Giarratana MC, François S, Chapel A, Lapillonne H, Luton D, Bennaceur-Griscelli A, Douay L. Human induced pluripotent stem cells can reach complete terminal maturation: in vivo and in vitro evidence in the erythropoietic differentiation model. *Haematologica*. 2012 Dec;97(12):1795-803.

Koc S, Hagglund H, Ireton RC, Perez-Simon JA, Collins SJ, Appelbaum FR. Successful treatment of severe hemorrhagic cystitis with cystectomy following matched donor allogeneic hematopoietic cell transplantation. *Bone Marrow Transplant*. 2000 Oct;26(8):899-901.

Kuo HC. Potential urine and serum biomarkers for patients with bladder pain syndrome/interstitial cystitis. *Int J Urol*. 2014 Apr;21 Suppl 1:34-41.

Kursova LV, Konoplyannikov AG, Pasov VV, Ivanova IN, Poluektova MV, Konoplyannikova OA. Possibilities for the use of autologous mesenchymal stem cells in the therapy of radiation-induced lung injuries. *Bull Exp Biol Med*. 2009 Apr;147(4):542-6.

Larbi A, Mitjavila-Garcia MT, Flamant S, Valogne Y, Clay D, Usunier B, l'Homme B, Féraud O, Casal I, Gobbo E, Divers D, Chapel A, Turhan AG, Bennaceur-Griscelli A, Haddad R. Generation of multipotent early lymphoid progenitors from human embryonic stem cells. *Stem Cells Dev*. 2014 Dec 15;23(24):2983-95.

Larbi A, Gombert JM, Auvray C, l'Homme B, Magniez A, Féraud O, Coulombel L, Chapel A, Mitjavila-Garcia MT, Turhan AG, Haddad R, Bennaceur-Griscelli A. The HOXB4 homeoprotein promotes the ex vivo enrichment of functional human embryonic stem cell-derived NK cells. *PLoS One*. 2012;7(6):e39514.

Lataillade JJ, Doucet C, Bey E, Carsin H, Huet C, Clairand I, Bottollier-Depois JF, Chapel A, Ernou I, Gourven M, Boutin L, Hayden A, Carcamo C, Buglova E, Joussemet M, de Revel T, Gourmelon P. New approach to radiation burn treatment by dosimetry-guided surgery combined with autologous mesenchymal stem cell therapy. *Regen Med*. 2007 Sep;2(5):785-94.

Lazennec G, Richmond A Chemokines and chemokine receptors: new insights into cancer-related inflammation. *Trends Mol Med*. 2010; 16, 133-44

Li L, Zhang Y, Li Y, Yu B, Xu Y, Zhao S, Guan Z. Mesenchymal stem cell transplantation attenuates cardiac fibrosis associated with isoproterenol-induced global heart failure. *Transpl Int*. 2008 Dec;21(12):1181-9.

Liem X, Saad F, Delouya G. A Practical Approach to the Management of Radiation-Induced Hemorrhagic Cystitis. *Drugs*. 2015 Aug 14

Linard C, Busson E, Holler V, Strup-Perrot C, Lacave-Lapalun JV, Lhomme B, Prat M, Devauchelle P, Sabourin JC, Simon JM, Bonneau M, Lataillade JJ, Benderitter M. Repeated autologous bone marrow-derived mesenchymal stem cell injections improve radiation-induced proctitis in pigs. *Stem Cells Transl Med*. 2013 Nov;2(11):916-27.

Lee GW, Lee JH, Choi SJ, et al. Hemorrhagic cystitis following allogeneic hematopoietic cell transplantation. *J Korean Med Sci.* 2003 Apr;18(2):191-5.

Lee JD, Lee MH. Activation of extrinsic apoptotic pathway from bladder biopsy in patients with interstitial cystitis/painful bladder syndrome. *Urology* 2013; 82: 1451, e7-11., Shie JH, Liu HT, Kuo HC. Increased cell apoptosis of urothelium mediated by inflammation in interstitial cystitis/painful bladder syndrome. *Urology* 2012; 79: 484, e7-13.

Lee RH, Yoon N, Reneau JC, Prockop DJ. Preactivation of human MSCs with TNF- $\alpha$  enhances tumor-suppressive activity. *Cell Stem Cell.* 2012; 11, 825-35.

Linard C, Tessedre F, Busson E, Holler V, Leclerc T, Strup-Perrot C, Couty L, L'homme B, Benderitter M, Lafont A, Lataillade JJ, Coulomb B. Therapeutic potential of gingival fibroblasts for cutaneous radiation syndrome: comparison to bone marrow-mesenchymal stem cell grafts. *Stem Cells Dev.* 2015 May 15;24(10):1182-93.

Linard C, Strup-Perrot C, Lacave-Lapalun JV, Benderitter M. Flagellin preconditioning enhances the efficacy of mesenchymal stem cells in an irradiation-induced proctitis model. *J Leukoc Biol.* 2016 Sep;100(3):569-80.

Lorenzi, B., F. Pessina, P. Lorenzoni, S. Urbani, R. Vernillo, G. Sgaragli, R. Gerli, B. Mazzanti, A. Bosi, R. Saccardi and M. Lorenzi (2008). "Treatment of experimental injury of anal sphincters with primary surgical repair and injection of bone marrow-derived mesenchymal stem cells." *Dis Colon Rectum* 51(4): 411-420.

Maria AT, Toupet K, Bony C, Pirot N, Vozenin MC, Petit B, Roger P, Batteux F, Le Quellec A, Jorgensen C, Noël D, Guilpain P. Antifibrotic, Antioxidant, and Immunomodulatory Effects of Mesenchymal Stem Cells in HOCl-Induced Systemic Sclerosis. *Arthritis Rheumatol.* 2016 Apr;68(4):1013-25.

Mandai M, Watanabe A, Kurimoto Y, Hiramami Y, Morinaga C, Daimon T, Fujihara M, Akimaru H, Sakai N, Shibata Y, Terada M, Nomiya Y, Tanishima S, Nakamura M, Kamao H, Sugita S, Onishi A, Ito T, Fujita K, Kawamata S, Go MJ, Shinohara C, Hata KI, Sawada M, Yamamoto M, Ohta S, Ohara Y, Yoshida K, Kuwahara J, Kitano Y, Amano N, Umekage M, Kitaoka F, Tanaka A, Okada C, Takasu N, Ogawa S, Yamanaka S, Takahashi M. Autologous Induced Stem-Cell-Derived Retinal Cells for Macular Degeneration. *N Engl J Med.* 2017 Mar 16;376(11):1038-1046.

Meng, X. M., Nikolic-Paterson, D. J. & Lan, H. Y. TGF- $\beta$ : the master regulator of fibrosis. *Nat. Rev. Nephrol.* 2016;. 12, 325-338.

Mourcin F, Grenier N, Mayol JF, Lataillade JJ, Sotto JJ, Hérodin F, Drouet M. Mesenchymal stem cells support expansion of in vitro irradiated CD34(+) cells in the presence of SCF, FLT3 ligand, TPO and IL3: potential application to autologous cell therapy in accidentally irradiated victims. *Radiat Res.* 2005 Jul;164(1):1-9.

Mouiseddine M, François S, Semont A, Sache A, Allenet B, Mathieu N, Frick J, Thierry D, Chapel A. Human mesenchymal stem cells home specifically to radiation-injured tissues in a non-obese diabetes/severe combined immunodeficiency mouse model. *Br J Radiol.* 2007 Sep;80 Spec No 1:S49-55.

Mouiseddine M, François S, Souidi M, Chapel A. Intravenous human mesenchymal stem cells transplantation in NOD/SCID mice preserve liver integrity of irradiation damage. *Methods Mol Biol.* 2012;826:179-88.

Moussa L, Usunier B, Demarquay C, Benderitter M, Tamarat R, Sémont A, Mathieu N. Bowel Radiation Injury: Complexity of the pathophysiology and promises of cell and tissue engineering. *Cell Transplant.* 2016 May 18.

Moussa L, Pattappa G, Doix B, Benselama SL, Demarquay C, Benderitter M, Sémont A, Tamarat R, Guicheux J, Weiss P, Réthoré G, Mathieu N. A biomaterial-assisted mesenchymal stromal cell therapy alleviates colonic radiation-induced damage. *Biomaterials.* 2017 Jan;115:40-52.

Nasef A, Chapel A, Mazurier C, Bouchet S, Lopez M, Mathieu N, Sensebé L, Zhang Y, Gorin NC, Thierry D, Fouillard L. Identification of IL-10 and TGF-beta transcripts involved in the inhibition of T-lymphocyte proliferation during cell contact with human mesenchymal stem cells. *Gene Expr.* 2007;13(4-5):217-26.

Nasef A, Mathieu N, Chapel A, Frick J, François S, Mazurier C, Boutarfa A, Bouchet S, Gorin NC, Thierry D, Fouillard L. Immunosuppressive effects of mesenchymal stem cells: involvement of HLA-G. *Transplantation.* 2007 Jul 27;84(2):231-7.

Nasef A, Mazurier C, Bouchet S, François S, Chapel A, Thierry D, Gorin NC, Fouillard L. Leukemia inhibitory factor: Role in human mesenchymal stem cells mediated immunosuppression. *Cell Immunol.* 2008 May-Jun;253(1-2):16-22.

Nasef A, Zhang YZ, Mazurier C, Bouchet S, Bensidhoum M, François S, Gorin NC, Lopez M, Thierry D, Fouillard L, Chapel A. Selected Stro-1-enriched bone marrow stromal cells display a major suppressive effect on lymphocyte proliferation. *Int J Lab Hematol.* 2009 Feb;31(1):9-19.

Neheman A, Nativ O, Moskovitz B, Melamed Y and Stein A. Hyperbaric oxygen therapy for radiation-induced haemorrhagic cystitis. *BJU Int* 2005; 96: 107-109.

Neildez-Nguyen TM, Vétillard J, Drouet M, Hérodin F, Brouard N, Mestries JC, Thierry D. *J Hematother*. Functional studies of maturing myeloid cells during ex vivo expansion for treatment of aplasia: feasibility of ex vivo expansion from cryopreserved bone marrow cell samples. 1998 Feb;7(1):69-79

Neildez-Nguyen TM, Chapel A, Arock M, Vétillard J, Thierry D. Gamma-irradiation does not impair ATRA-induced maturation of myeloid leukaemic cells: implication for combined radiation and differentiation therapy. *Br J Haematol*. 1998 Oct;103(1):79-86.

Nicolay NH, Lopez Perez R, Debus J, Huber PE. Mesenchymal stem cells – A new hope for radiotherapy-induced tissue damage? *Cancer Lett*. 2015 Oct 1;366(2):133-40.

Reyes EH, Baciú F, Benderitter M, Lataillade JJ, Bey E, Trompier F, Tamarat R. Medical Response to Radiological Accidents in Latin America and International Assistance. *Radiat Res*. 2016 Apr;185(4):359-65.

Parsons CL. The role of a leaky epithelium and potassium in the generation of bladder symptoms in interstitial cystitis/overactive bladder, urethral syndrome, prostatitis and gynaecological chronic pelvic pain. *BJU Int* 2011; 107: 370-375.

Port M, Hérodin F, Valente M, Drouet M, Lamkowski A, Majewski M, Abend M. Gene expression signature for early prediction of late occurring pancytopenia in irradiated baboons. *Ann Hematol*. 2017 May;96(5):859-870.

Port M, Hérodin F, Valente M, Drouet M, Ullmann R, Majewski M, Abend M. Pre-Exposure Gene Expression in Baboons with and without Pancytopenia after Radiation Exposure. *Int J Mol Sci*. 2017 Mar 2;18(3). pii: E541.

Rigotti G, Marchi A, Galiè M, Baroni G, Benati D, Krampera M, Pasini A, Sbarbati A. Clinical treatment of radiotherapy tissue damage by lipoaspirate transplant: a healing process mediated by adipose-derived adult stem cells. *Plast Reconstr Surg*. 2007 Apr 15;119(5):1409-22; discussion 1423-4.

Rigotti G, Marchi A, Stringhini P, Baroni G, Galiè M, Molino AM, Mercanti A, Micciolo R, Sbarbati A. Determining the oncological risk of autologous lipoaspirate grafting for post-mastectomy breast reconstruction. *Aesthetic Plast Surg*. 2010 Aug;34(4):475-80.

Rigotti G, Marchi A, Micciolo R, Baroni G. Autologous fat grafting in breast cancer patients. *Breast*. 2012 Oct;21(5):690.

Trotman J, Nivison-Smith I, Dodds A. Haemorrhagic cystitis: Incidence and risk factors in a transplant population using hyperhydration. *Bone Marrow Transplant* 1999; 23:797–801.

Saha, S., P. Bhanja, R. Kabarriti, L. Liu, A. A. Alfieri and C. Guha (2011). "Bone marrow stromal cell transplantation mitigates radiation-induced gastrointestinal syndrome in mice." *PLoS One* 6(9): e24072.

Sant GR, Kempuraj D, Marchand JE and Theoharides TC. The mast cell in interstitial cystitis: role in pathophysiology and pathogenesis. *Urology* 2007; 69: 34-40.

Scanff P, Souidi M, Grison S, Griffiths NM, Gourmelon P. Alteration of the enterohepatic recirculation of bile acids in rats after exposure to ionizing radiation. *Can J Physiol Pharmacol*. 2004 Feb;82(2):114-24.

Sémont A, François S, Mouiseddine M, François A, Saché A, Frick J, Thierry D, Chapel A. Mesenchymal stem cells increase self-renewal of small intestinal epithelium and accelerate structural recovery after radiation injury. *Adv Exp Med Biol*. 2006;585:19-30.

Sémont A, Mouiseddine M, François A, Demarquay C, Mathieu N, Chapel A, Saché A, Thierry D, Laloï P, Gourmelon P. Mesenchymal stem cells improve small intestinal integrity through regulation of endogenous epithelial cell homeostasis. *Cell Death Differ*. 2010 Jun;17(6):952-61.

Sémont A, Demarquay C, Bessout R, Durand C, Benderitter M, Mathieu N. Mesenchymal stem cell therapy stimulates endogenous host progenitor cells to improve colonic epithelial regeneration. *PLoS One*. 2013 Jul 29;8(7):e70170.

Strup-Perrot, C. et al. Global gene expression profiles reveal an increase in mRNA levels of collagens, MMPs, and TIMPs in late radiation enteritis. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol*. 2004; 287, G875-G885.

Souidi M, Scanff P, Grison S, Gourmelon P, Aigueperse J. Effects of ionizing radiation on the activity of the major hepatic enzymes implicated in bile acid biosynthesis in the rat. *C R Biol*. 2007 Dec;330(12):861-70.



Takahashi K, Tanabe K, Ohnuki M, Narita M, Ichisaka T, Tomoda K, Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell*. 2007 Nov 30;131(5):861-72.

Tamarat R, Lataillade JJ, Bey E, Gourmelon P, Benderitter M. Stem cell therapy: from bench to bedside. *Radiat Prot Dosimetry*. 2012 Oct;151(4):633-9. Epub 2012 Sep 10. Review.

Thierry D, Cosset JM, Van der Meeren A, Gourmelon P, Nénot JC. Therapeutic approaches of hematopoietic syndrome following accidental total whole body irradiation. *Bull Cancer*. 1996 May;83(5):361-70. Review. French.

Thierry D, Gourmelon P, Parmentier C, Nénot JC. Haematopoietic growth factors in the treatment of therapeutic and accidental irradiation-induced bone marrow aplasia. *Int J Radiat Biol*. 1995 Feb;67(2):103-17. Review.

Trotman J, Nivison-Smith I, Dodds A. Haemorrhagic cystitis: Incidence and risk factors in a transplant population using hyperhydration. *Bone Marrow Transplant* 1999; 23:797–801.

Usunier B, Benderitter M, Tamarat R, Chapel A. Management of fibrosis: the mesenchymal stromal cells breakthrough. *Stem Cells Int*. 2014;2014:340257.

Valente M, Denis J, Grenier N, Arvers P, Foucher B, Desangles F, Martigne P, Chaussard H, Drouet M, Abend M, Hérodin F. Revisiting Biomarkers of Total-Body and Partial-Body Exposure in a Baboon Model of Irradiation. *PLoS One*. 2015 Jul 15;10(7):e0132194.

Vauche K, Marolleau JP, Schmid M, Khattar P, Chapel A, Catelain C, Lecourt S, Larghéro J, Fiszman M, Vilquin JT. Aldehyde dehydrogenase activity identifies a population of human skeletal muscle cells with high myogenic capacities. *Mol Ther*. 2009 Nov;17(11):1948-58.

Vetillard J, Drouet M, Neildez-Nguyen TM, Mestries JC, Mathieu J, Thierry D, Herodin F. Interleukine-8 acts as a strong peripheral blood granulocyte-recruiting agent rather than as a hematopoietic progenitor cell-mobilizing factor. *J Hematother Stem Cell Res*. 1999 Aug;8(4):365-79.

Villani F, Caviggioli F, Klinger F, Maione L, Klinger M. Fat Graft before breast reconstruction by latissimus dorsi. *Plast Reconstr Surg*. 2010 Oct;126(4):190e-192e.

Villani F, Caviggioli F, Giannasi S, Klinger M, Klinger F. Current applications and safety of autologous fat grafts: a report of the ASPS Fat Graft Task Force. *Plast Reconstr Surg*. 2010 Feb;125(2):758-9.

Voswinkel J, Francois S, Gorin NC, Chapel A. Gastro-intestinal autoimmunity: preclinical experiences and successful therapy of fistulizing bowel diseases and gut Graft versus host disease by mesenchymal stromal cells. *Immunol Res.* 2013 Jul;56(2-3):241-8.

Voswinkel J, Francois S, Simon JM, Benderitter M, Gorin NC, Mohty M, Fouillard L, Chapel A. Use of mesenchymal stem cells (MSC) in chronic inflammatory fistulizing and fibrotic diseases: a comprehensive review. *Clin Rev Allergy Immunol.* 2013 Oct;45(2):180-92.

Voswinkel J, Chapel A. Mesenchymal stem cells and rheumatism. State of the art. *Z Rheumatol.* 2012 Sep;71(7):619-23.

Walter MN, Wright KT, Fuller HR, MacNeil S, Johnson WE. Mesenchymal stem cell-conditioned medium accelerates skin wound healing: an in vitro study of fibroblast and keratinocyte scratch assays. *Exp Cell Res.* 2010 Apr 15;316(7):1271-81.

Wilkinson DR, Erickson AD. Urinary and Serologic Markers for Interstitial Cystitis: An Update. *Curr Urol Rep.* 2006 Sep;7(5):414-22.

Zhang YZ, Fouillard L, Chapel A, Bensidhoum M, Mazurier C, Nasef A, Bouchet S, Lopez M, Thierry D, Gorin NC, Da WM. Mesenchymal stem cells from human proximal femurs possess immunosuppressive activity. *Zhonghua Yi Xue Za Zhi.* 2005 Oct 19;85(39):2780-4.

Zhao S, Wehner R, Bornhauser M, Wassmuth R, Bachmann M, Schmitz M. Immunomodulatory properties of mesenchymal stromal cells and their therapeutic consequences for immune-mediated disorders. *Stem Cells Dev* 2010; 19, 607-14.





See discussions, stats, and author profiles for this publication at: <https://www.researchgate.net/publication/8971856>

# Mesenchymal stem cells home to injured tissues when co-infused with hematopoietic cells to treat a radiation-induced...

Article in *The Journal of Gene Medicine* · January 2004

DOI: 10.1002/jgm.452 · Source: PubMed

CITATIONS

298

READS

60

18 authors, including:



**Alain Chapel**

Institut de Radioprotection et de Sûreté Nucl...

111 PUBLICATIONS 2,746 CITATIONS

SEE PROFILE



**Christelle Demarquay**

Institut de Radioprotection et de Sûreté Nucl...

35 PUBLICATIONS 966 CITATIONS

SEE PROFILE



**Francois Trompier**

Institut de Radioprotection et de Sûreté Nucl...

138 PUBLICATIONS 2,123 CITATIONS

SEE PROFILE



**Mazurier Christelle**

Pierre and Marie Curie University - Paris 6

35 PUBLICATIONS 1,633 CITATIONS

SEE PROFILE

Some of the authors of this publication are also working on these related projects:



EPR dosimetry on human nails [View project](#)



molecular diagnostic en d cell therapy [View project](#)

# Mesenchymal stem cells home to injured tissues when co-infused with hematopoietic cells to treat a radiation-induced multi-organ failure syndrome

Alain Chapel<sup>1,2\*</sup>

Jean Marc Bertho<sup>1,2</sup>

Morad Bensidhoum<sup>2</sup>

Loïc Fouillard<sup>2,4</sup>

Randell G. Young<sup>3</sup>

Johanna Frick<sup>1,2</sup>

Christelle Demarquay<sup>1</sup>

Frédérique Cuvelier<sup>1</sup>

Emilie Mathieu<sup>1</sup>

François Tromprier<sup>1</sup>

Nicolas Dudoignon<sup>1</sup>

Claire Germain<sup>1</sup>

Christelle Mazurier<sup>2</sup>

Jocelyne Aigueperse<sup>1</sup>

Jade Borneman<sup>3</sup>

Norbert Claude Gorin<sup>2,4</sup>

Patrick Gourmelon<sup>1,2</sup>

Dominique Thierry<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Institut de Radioprotection et de Sûreté Nucléaire, IRSN/DPHD/SARAM, Fontenay aux roses, France

<sup>2</sup>Laboratoire de Thérapie Cellulaire et de Radioprotection Accidentelle, LTCRA, UPRES 1632, CHU Saint Antoine, Paris, France

<sup>3</sup>Osiris Therapeutics Inc, Baltimore, MD, USA

<sup>4</sup>Service des maladies du sang, Hôpital Saint Antoine, Paris, France

\*Correspondence to:

Dr Alain Chapel, Institut de Radioprotection et de Sûreté Nucléaire, DPHD, IRSN. B.P. no 17, F-92262 Fontenay aux Roses Cedex, France.  
E-mail: alain.chapel@irsn.fr

Received: 20 February 2003

Revised: 25 April 2003

Accepted: 21 May 2003

## Abstract

**Background** Recent studies have suggested that *ex vivo* expansion of autologous hematopoietic cells could be a therapy of choice for the treatment of bone marrow failure. We investigated the potential of a combined infusion of autologous *ex vivo* expanded hematopoietic cells with mesenchymal (MSCs) for the treatment of multi-organ failure syndrome following irradiation in a non-human primate model.

**Methods** Hematopoietic cells and MSCs were expanded from bone marrow aspirates. MSCs were transduced with the gene encoding for the green fluorescent protein (e-GFP), in order to track them following infusion. Twelve animals were studied. Nine animals received total-body irradiation at 8 Gy from a neutron/gamma source thus resulting in heterogeneous exposure; three animals were sham-irradiated. The animals were treated with expanded hematopoietic stem cells and MSCs, expanded hematopoietic stem cells alone, or MSCs alone. Unmanipulated bone marrow cell transplants were used as controls.

**Results** Depending on the neutron/gamma ratio, an acute radiation sickness of varying severity but of similar nature resulted. GFP-labeled cells were found in the injured muscle, skin, bone marrow and gut of the treated animals via PCR up to 82 days post-infusion.

**Conclusions** This is the first evidence of expanded MSCs homing in numerous tissues following a severe multi-organ injury in primates. Localization of the transduced MSCs correlated to the severity and geometry of irradiation. A repair process was observed in various tissues. The plasticity potential of the MSCs and their contribution to the repair process *in vivo* remains to be studied. Copyright © 2003 John Wiley & Sons, Ltd.

**Keywords** *ex vivo* expansion; hematopoietic cell; mesenchymal stem cell; irradiation; homing; aplasia

## Introduction

The therapeutic potential of bone marrow derived mesenchymal stem cells (MSCs) has recently been brought into the spotlight of many fields of research. The therapeutic potential of bone marrow derived mesenchymal stem cells (MSCs) has recently been brought into the spotlight of many fields of research. Not only are these

cells able to migrate to injured or defective tissues of different origin, but their progenies are also able to acquire a different phenotype in accordance with tissues to which they home [1]. Furthermore, it has been shown that MSCs of bone marrow origin could hasten the hematopoietic recovery when infused simultaneously with hematopoietic stem cells in non-human primates [2] and in humans [3–5]. Altogether, the therapeutic potential associated with these properties appears significant and may have many applications. One such application is the repair of injured tissues arising from side effects of radiation treatments or accidental radiation exposure. Accidental acute radiation sickness may be a model to study both the transdifferentiation potential of MSCs and the power to accelerate hematopoietic recovery. Indeed, following a radiation accident, a multi-organ failure occurs. Depending on the energy, the dose, the dose rate and the geometry of the exposure, bone marrow aplasia can be combined with gastrointestinal syndrome, skin burns, muscle radiolysis, lung injury and/or central nervous system failure among other problems [6]. Until now, each of the main aspects of these disorders has been handled separately as a single disease. Bone marrow transplantation or administration of hematopoietic growth factor has been used with mitigated success to treat radiation-induced bone marrow aplasia, the first organ failure to appear due to the high radiation sensitivity of the hematopoietic system. Recent works have suggested that *ex vivo* expansion of hematopoietic stem cells (HSCs) could be a therapeutic option in this setting [7–9]. However, no therapeutic strategy taking into account the injuries to the other organs has proven successful. We hypothesized that using MSCs as a source of cells able to home to various tissues and to repair the widespread damage induced by irradiation might be an interesting therapeutic strategy. We therefore investigated the potential of combining *ex vivo* expansion of HSCs with *ex vivo* expanded MSCs for the treatment of acute radiation syndrome in a non-human primate (NHP) model. HSCs and MSCs were taken from the bone marrow and expanded. A sample of MSCs was transduced with the gene encoding for the enhanced green fluorescent protein (eGFP), in order to track them in the organism. Twelve animals were studied. Nine animals received total-body irradiation at 8 Gy from a neutron/gamma source, thus resulting in heterogeneous exposure; three animals were sham-irradiated. Depending on the neutron/gamma ratio, an acute radiation sickness of varying severity, but of the same nature, could be produced. Three animals received expanded HSCs alone, one animal received expanded MSCs alone, two animals received unmanipulated bone marrow, and three animals received expanded HSCs and MSCs. We report on the results of this study, which showed that both therapeutic objectives were reached, namely the presence of MSCs in the injured tissues and a better hematopoietic recovery for the surviving animals treated with expanded cells than for animals treated with unmanipulated bone marrow cells.

## Materials and methods

### Animals

A group of 12 healthy young male macaques (*Macaca fascicularis*), mean weight  $5.2 \pm 1.5$  kg (range 3.5–7.9 kg), was used as previously described [8]. All experimental procedures for NHP were approved by the Animal Care Committee of the Institute of Nuclear Radioprotection and Safety (IRSN) and conformed to the French regulations for animal experimentation (Ministry of Agriculture Act no 87-848, October 19th, 1987, modified May, 2001).

### *Ex vivo* expansion of MSCs

#### Isolation of NHP-MSCs from bone marrow aspirate samples

Bone marrow aspirates were drawn bilaterally into sodium heparin (final concentration of 200 U/ml) from the iliac crest of animals anesthetized under Ketamine/Xylazine anesthesia. Samples were shipped at room temperature (between 19–23 °C) via overnight service for processing in the cell culture laboratory within 48 h. The bone marrow was processed according to procedures previously described [2] with some modifications. Briefly, marrows were diluted 1:2 with ~25 ml of Dulbecco's phosphate-buffered saline (DPBS; Gibco, Grand Island, NY, USA) and centrifuged at ~900 g (2000 rpm) for 10 min at 21 °C. Pellets were collected, resuspended at 1:20 with ~25 ml DPBS and counted. The resulting cell pellet was layered onto an ACT density gradient (1.072 gm/ml; Dendreon, Seattle, WA, USA) with up to  $3.5 \times 10^8$  nucleated cells and centrifuged at 1100 g (2200 rpm) for 30 min at 21 °C. Light density layers were collected and rinsed again in DPBS as described above and then nucleated cells were counted on a haemocytometer. The cells were plated onto culture plastic (Nunc, Naperville, IL, USA) at  $\sim 1.6 \times 10^5$  nucleated cells per  $\text{cm}^2$  in 'complete' medium, which consisted of Dulbecco's modified Eagle's medium-low glucose (DMEM-LG; Gibco, Grand Island, NY, USA), 1% penicillin-streptomycin solution (Gibco) and 10% FBS (Hyclone, Logan, UT, USA), which was prescreened for MSCs according to previously described methods [10]. Medium was replaced every third or fourth day for approximately 3 weeks or until primary (P0) confluence, when swirling colonies had occupied most space on the culture plastic.

#### Culture and subculture of NHP marrow

Primary cultures (P0) were released from culture with 0.25% trypsin in 1.0 mM (Gibco). The cell suspension was collected off the plates, centrifuged, and rinsed again as described above. Cells were resuspended in serum-containing medium and counted, then replated onto culture plastic at  $5\text{--}6 \times 10^3$  cells/cm [2]. Complete medium was replaced every 3 or 4 days for 7–10 days, until the culture surface comprised a confluent monolayer of cells.

At that time the trypsinization process was repeated and cultures were cryopreserved for shipping [2,10].

### Viral vector and packaging cell line

The pSF-EGFP plasmid was kindly provided by H. de Verneuil (Laboratoire de biochimie médicale et biologie moléculaire, université de Bordeaux II). The pseudotyped retrovirus producer cell line PG13/pSF-EGFP was developed by transducing the PG13 packaging cell line (ATCC-CRL 10686) [11]. The producer cell line was cloned and subcloned as previously described [12]. PG13/SF-EGFP subclone was propagated in culture in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM; Invitrogen, Groningen, The Netherlands) supplemented with 10% fetal calf serum (FCS) and kept at 37 °C with 5% CO<sub>2</sub> in a humidified atmosphere. The viral titer of the cell lines used was 10<sup>5</sup> to 10<sup>6</sup> infectious particles/ml as determined by supernatant titration on cultured human HeLa cells.

### Retrovirus-mediated transductions of MSCs

A fraction of expanded MSCs was thawed 2 weeks before NHP irradiations. The MSCs were seeded at 0.25 × 10<sup>6</sup> cells in T 75-cm<sup>2</sup> flasks in 10 ml of DMEM supplemented with 10% FCS (Invitrogen). MSCs were transduced 2 days following plating, when a standard of 40% confluence of MSCs was reached. An untransduced control was performed. Supernatants containing recombinant retroviral particles were generated by culturing 80% confluent producer cells for 12 h. The cultures were maintained at 37 °C with 5% CO<sub>2</sub> in a humidified atmosphere. The culture supernatant was subsequently produced and filtered through a 0.45-µm filter. The MSCs were incubated with the supernatant for 5 h in the presence of 10 µg/ml of Polybrene (Sigma-Aldrich, St Louis, MI, USA). The supernatant was then removed and replaced by fresh DMEM supplemented with 10% FCS for 19 h of culture. This procedure was repeated daily for 4 days. The expression of the eGFP transgene was evaluated daily by *in situ* visualization of the cells with an inverted fluorescence microscope. Following transduction, MSCs were harvested and the transduction efficiency was assessed by flow cytometry. Counterstaining of the cells with monoclonal antibodies against CD73 (SH3, CD73 PE, Becton-Dickinson) and CD105 (SH2, CD-105 PE, Argene SA) was performed. Lack of hematopoietic cell contaminants was controlled by counterstaining the cells with monoclonal antibodies against CD45 (CD-45 PE, Argene SA).

### Ex vivo expansion of BMMNCs

Bone marrow mononuclear cells (BMMNCs, 2 × 10<sup>5</sup> cells/ml) were cultured as previously described [8]. Briefly, cells were cultured in the presence of recombinant

human (rh) stem cell factor (SCF, 100 ng/ml), Flt3-ligand (FL, 100 ng/ml), thrombopoietin (TPO, 100 ng/ml), Interleukin-6 (IL-6, 5 ng/ml) (all from R&D Systems, Abingdon, UK), and recombinant primate IL-3 (5 ng/ml, a generous gift from G. Wagemaker) [12]. Cultures were incubated for 7 days at 37 °C in humidified atmosphere with 5% CO<sub>2</sub> without any medium change. The cells were stained with CFSE (5-(and 6-)carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester; Molecular Probes, Leiden, The Netherlands) by incubating for 15 min at 37 °C in the presence of 5 µM final concentration of CFSE, washed and immediately reinjected intravenously (i.v.) into irradiated animals.

Apoptosis estimate procedures, phenotyping of hematopoietic cells, hematopoietic progenitor and long-term culture-initiating cell (LTC-IC) assays were performed as previously described [8].

### Animal irradiation

Animals were given a single dose of 8 Gy total-body irradiation from an experimental nuclear reactor (Silene reactor, Valduc, France) delivering a mixed field of either 90% gamma rays and 10% neutrons, or 50% gamma rays and 50% neutrons, with a mean dose rate of 6.7 Gy/min. Physical dosimetry by a thermoluminescence dosimeter [13] indicated that the expected doses were obtained in the median plane of the animal body. This was confirmed with biological dosimetry by scoring of dicentric chromosomes [14], which indeed gave estimated whole body doses of irradiation in the range of ±5 to 10% as compared with the expected dose.

### Experimental schedule

A summary of the experimental schedule is presented in Table 1. Five treatment groups were used. Group 1

Table 1. Weight, age, and irradiation conditions for each animal used in this study

Treatment group	Animal identification	Weight	Age	γ/n ratio	Irradiation dose*
Sham	M383	6.55	7**	–	0 Gy
	1735	4.3	3.5**	–	0 Gy
	Y856	4.05	2	–	0 Gy
Unmanipulated BMMNCs	1682	5.15	3.5**	1:1	8 Gy
	Y182	3.75	2.5	9:1	8 Gy
7-day expanded HSCs	Q554	7.05	6**	1:1	8 Gy
	1597	4.80	3.5**	1:1	8 Gy
	AA212	3.450	2	9:1	8 Gy
7-day expanded HSCs and MSCs	Q720	7.450	6**	1:1	8 Gy
	1760	4.1	3.5**	1:1	8 Gy
	Y636	4.05	2.5	9:1	8 Gy
MSCs alone	S076	6.650	6**	1:1	8 Gy
M ± SD		5.15 ± 1.49	4 ± 1.77	n.a.	n.a.
Range		3.45–7.85	2–7		

\*Irradiation dose indicated is the mean dose obtained in the median plane of the body according to physical dosimetry (not shown).

\*\*Estimated age, on the basis of animal morphology.



consisted of three sham-irradiated animals that did not receive any graft. Group II consisted of two animals that received  $3 \times 10^7$ /kg unmanipulated BMMNCs after TBI; group III comprised three animals that after TBI received the 7 days *ex vivo* expansion product of  $3 \times 10^7$  BMMNC per kg of body weight. Group IV consisted of three animals receiving *ex vivo* expanded BMMNCs and expanded MSCs post TBI. Group V included one animal that received only an MSC transplantation post TBI. Bone marrow sampling for *ex vivo* expanded BMMNCs and unmanipulated BMMNC transplantation was made 6 days before irradiation, and bone marrow sampling for MSC expansion was made 8 weeks before irradiation.

## Follow-up

Animals were treated post-irradiation as previously described [8]. At autopsy, organ samples were harvested and fixed in formalin for 24 h and paraffin-embedded. Samples were then cut in 3- $\mu$ m sections, fixed on histological slides and stained with hematoxylin-eosin-safran (HES). Organ samples were also frozen rapidly in liquid nitrogen for PCR detection of MSCs.

## PCR analysis

Genomic DNA for PCR analysis was prepared from tissues using a QIAmp tissue kit (Qiagen, Hilden, Germany). Amplification was performed using manufacturer-provided reagents following the standard recommended amplification conditions (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) as previously described [15,16]. Purified DNA (100 ng) from various tissues was amplified using the TaqMan universal PCR master mix 4304437 (Applied Biosystems), with eGFP and beta-actin primers and probe (Taq man beta-actin control reagent 401846; Applied Biosystems). The primers and probe were designed with Primer Express software (Applied Biosystems). The primers and probe for eGFP were forward primer 5'ctcgtgaccacctgacctac 3' and 3' reverse primer 5'aagaagatggtgctcgc3'. The probe labeled with fluorescent reporter and quencher was: 5'FAM-cccgaccacatgaagcagcaeg-TAMRA-3'. FAM (6-carboxyfluorescein) was used as a reporter fluorochrome and TAMRA (6-carboxytetramethylrhodamine) was used as quencher. The probe was chosen in order to hybridize with an internal sequence of the PCR target sequence. With each cycle, the fluorescence intensity of additional reporter dye molecules was monitored. Threshold cycles (Ct) were selected in the line in which all samples were in logarithmic phase. The quantity of the PCR product was calculated by the Ct value.

Negative controls consisted of normal tissues from control NHPs extracted concurrently with each set of test samples and a reagent control. In order to determine the efficiency of amplification and the assay precision, calibration curves were constructed with a 0.99 correlation ( $r^2$ ) and efficiencies greater than 98%.

Titration curves were established by making serial dilutions of eGFP plasmid (pEGFP, Clontech) or serial dilutions of genomic NHP DNA. The copy number of eGFP plasmid was assessed following 260 nm optical density (OD) measurement. Ten-fold dilution series were performed for  $1-5 \times 10^6$  eGFP plasmid copies per assay in PCR-grade water containing 100 ng of salmon sperm DNA per assay as carrier. No cross reactivity with NHP DNA was observed when amplification of eGFP was performed with our primers-probe set. The NHP DNA concentration was estimated by OD measurement and a 10-fold dilution was performed in PCR-grade water containing 100 ng of salmon sperm DNA per assay as carrier.

## Hematological evaluation of irradiated animals

Peripheral blood (PB) sampling was performed using EDTA-coated tubes for daily blood counts on an ADVIA120 (Bayer Diagnostics, Puteaux, France). The remaining blood was centrifuged at 800 g for 10 min and plasma was collected and cryopreserved at  $-80^\circ\text{C}$ . White blood cells were then subjected to phenotypic analysis, as previously described. Flt3-ligand (FL) concentration was measured by ELISA, according to the manufacturer's recommendations (R&D Systems) [17].

## Statistical analysis

Data from *in vivo* irradiation experiments are data from individual animals. Results of *ex vivo* expansion are expressed as fold increase. Values are reported as mean  $\pm$  standard deviation (SD). Statistical significance, calculated using the Mann-Whitney rank sum test, was set for a value of  $p < 0.05$ .

## Results

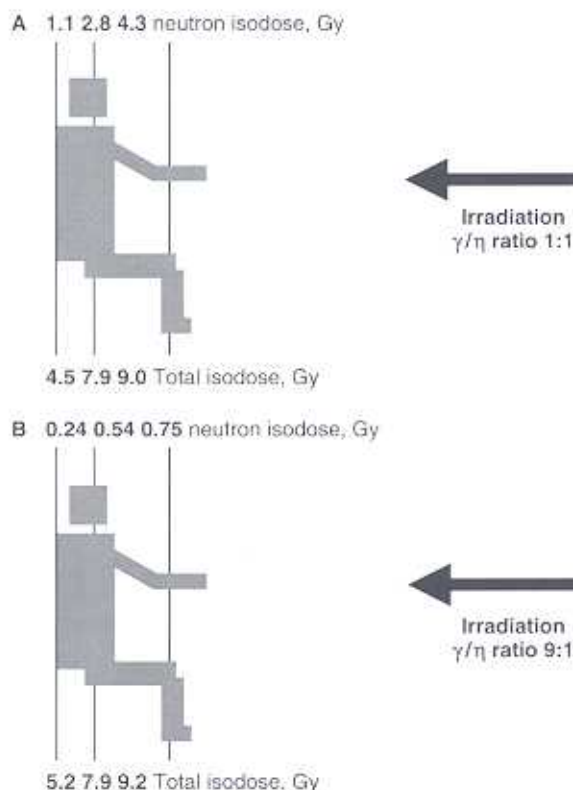
### Irradiation and HSC infusion

A total of 12 animals were used for these experiments. Table 1 summarizes age, weight and irradiation conditions for each animal for all treatment groups. Three animals were sham-irradiated, two animals received an unmanipulated BMMNC graft of  $3 \times 10^7$  MNC/kg of body weight, three animals received the *ex vivo* expansion of  $3 \times 10^7$  marrow MNC/kg of body weight, three animals received both MSCs and the *ex vivo* expansion product of  $3 \times 10^7$  MNCs, and one animal received only a graft of MSCs. Two irradiation protocols were used, the first one with a gamma/neutron ratio of 1, and the second one with a gamma/neutron ratio of 9. A mean dose of 8 Gy in the body mid-plane was obtained according to the physical dosimetry (Figure 1). However, since irradiation consisted of either 50 or 10% neutrons, which are strongly attenuated by live tissues, the front of the animals received a higher neutron irradiation dose as compared

Table 2. Results of *ex vivo* expansion of BMMNCs and number of hematopoietic cells infused according to the treatment groups

Treatment group	Animal identification	BMMNC		CFU-GM		BFU-E		LTC-IC	
		Expansion fold	Number infused/kg	Expansion fold	Number infused/kg	Expansion fold	Number infused/kg	Expansion fold	Number infused/kg
Sham irradiated	M383	-	-	-	-	-	-	-	-
	1735	-	-	-	-	-	-	-	-
	Y856	-	-	-	-	-	-	-	-
Unmanipulated BMMNCs	1682	-	$30 \times 10^6$	-	$0.46 \times 10^5$	-	$0.32 \times 10^5$	-	$0.55 \times 10^4$
	Y182	-	$30 \times 10^6$	-	$0.57 \times 10^5$	-	$0.33 \times 10^5$	-	$0.47 \times 10^4$
	mean	-	$30 \times 10^6$	-	$0.515 \times 10^5$	-	$0.325 \times 10^5$	-	$0.51 \times 10^4$
7-day expanded HSCs	Q554	3.5	$79.4 \times 10^6$	15.1	$0.62 \times 10^6$	0.97	$0.16 \times 10^5$	nd*	nd
	1597	4.8	$151 \times 10^6$	17.2	$0.96 \times 10^6$	4.03	$1.36 \times 10^5$	0.85	$1.02 \times 10^4$
	AA212	6.27	$178 \times 10^6$	16.6	$1.91 \times 10^6$	8.96	$3.66 \times 10^5$	0.27	$0.93 \times 10^4$
7-day expanded HSCs and MSCs	Q720	3.73	$114 \times 10^6$	13.6	$0.83 \times 10^6$	2.23	$0.91 \times 10^5$	nd	nd
	1760	6.04	$184 \times 10^6$	15.6	$1.17 \times 10^6$	3.42	$1.1 \times 10^5$	nd	nd
	Y636	8.74	$269 \times 10^6$	19.9	$2.07 \times 10^6$	3.89	$3.77 \times 10^5$	0.64	$1.71 \times 10^4$
MSCs alone	S076	-	-	-	-	-	-	-	-
Mean $\pm$ SD		5.51	$162.6 \times 10^6$	16.3	$1.26 \times 10^6$	3.92	$1.83 \times 10^5$	0.59	$1.22 \times 10^4$
Expanded HSCs		$\pm 1.95$	$\pm 65.5 \times 10^6$	$\pm 2.15$	$\pm 0.6 \times 10^6$	$\pm 2.73$	$\pm 1.52 \times 10^5$	$\pm 0.29$	$\pm 0.43 \times 10^4$

\*nd; not determined.

Figure 1. Results of physical dosimetry, indicating the estimated isodoses for neutron irradiation and for total irradiation for (A) animal Q554, with a  $\gamma/\eta$  ratio of 1:1, and (B) animal Y182, with a  $\gamma/\eta$  ratio of 9:1

with the back, resulting in an heterogeneity of neutron irradiation dose of 50% when comparing animal front and back (Figure 1).

Bone marrow sampling was made 6 days before irradiation for all animals. BMMNCs were either frozen or used for *ex vivo* expansion protocols as previously

described [8]. Results of *ex vivo* expansion protocols as well as evaluation of progenitors contents in unmanipulated BMMNCs are presented in Table 2. The mean  $\pm$  SD fold expansion were of  $5.51 \pm 1.95$  for MNC,  $16.3 \pm 2.15$  for CFU-GM,  $3.92 \pm 2.73$  for BFU-E and  $0.59 \pm 0.29$  for LTC-IC. These results are in accordance with previous results obtained in our laboratory [17]. As a result, a mean of  $162.6 \times 10^6$  MNC,  $1.26 \times 10^6$  CFU-GM,  $1.86 \times 10^5$  BFU-E and  $1.22 \times 10^4$  LTC-IC per kg of body weight were reinfused to animals (Table 2). For comparison, animals receiving unmanipulated BMMNCs received  $30 \times 10^6$  MNC,  $0.515 \times 10^5$  CFU-GM,  $0.325 \times 10^5$  BFU-E and  $0.51 \times 10^4$  LTC-IC per kg of body weight. The phenotypic analysis of expanded cells indicated an expansion of  $CD34^+$  hematopoietic cells (mean of  $21.5 \pm 8.3$  fold expansion), together with the expansion of  $CD11b^- CD14^+$  monocytic cells and  $CD11b^+ CD16^+$  granulocytic cells (data not shown). Thus animals receiving expanded cells were infused with a mean of  $19.1 \pm 8.3 \times 10^6$   $CD34^+$  cells per kg of body weight, vs.  $0.79 \pm 0.45 \times 10^6$   $CD34^+$  cells for animals engrafted with unmanipulated BMMNCs.

### MSC expansion, transfection and reinfusion

Table 3 summarizes the number of MSCs grafted. Three animals received both *ex vivo* expansion of  $3 \times 10^7$  CMN/kg of body weight and  $5.36\text{--}18.1 \times 10^6$  MSC/kg of body weight. One animal received only a graft of  $7.51 \times 10^6$  MSC/kg of body weight. In order to follow MSCs after reinjection, NHPs received a fraction of expanded MSC eGFP transduced, eGFP MSCs represented  $0.60\text{--}4.94 \times 10^6$  cells/kg of body weight. Flow cytometric analysis of MSCs before transplant demonstrated that 0–41% of cells were SH2+ and 57.26–69% were SH3+.

Table 3. Results of *ex vivo* expansion, gene transfection, and number of MSCs reinfused to the animals

Treatment group	Animal identification	MSC phenotype			MSC transfection			Total number of MSCs
		SH2 %	SH3 %	CFU-F $\times 1000$ cells	CFU-F eGFP %	MSC eGFP %	MSC eGFP infused $\times 10^6$ /kg	Number infused $\times 10^6$ /kg
7-day expanded HSCs and MSCs	Q720	41	ND	7	38	4.34	2.32	5.36
	1760	0	57.26	ND	ND	5.58	0.39	7.07
	Y636	1.7	69	ND	ND	27.28	4.94	18.1
MSCs alone	S076	40	ND	7.5	40	8.01	0.60	7.51
Mean		14.23	63.13	7.25	39	12.40	2.55	10.18
Range		0–41	57.26–69	7–7.5	38–40	4.34–27.28	0.60–4.94	7.07–18.1

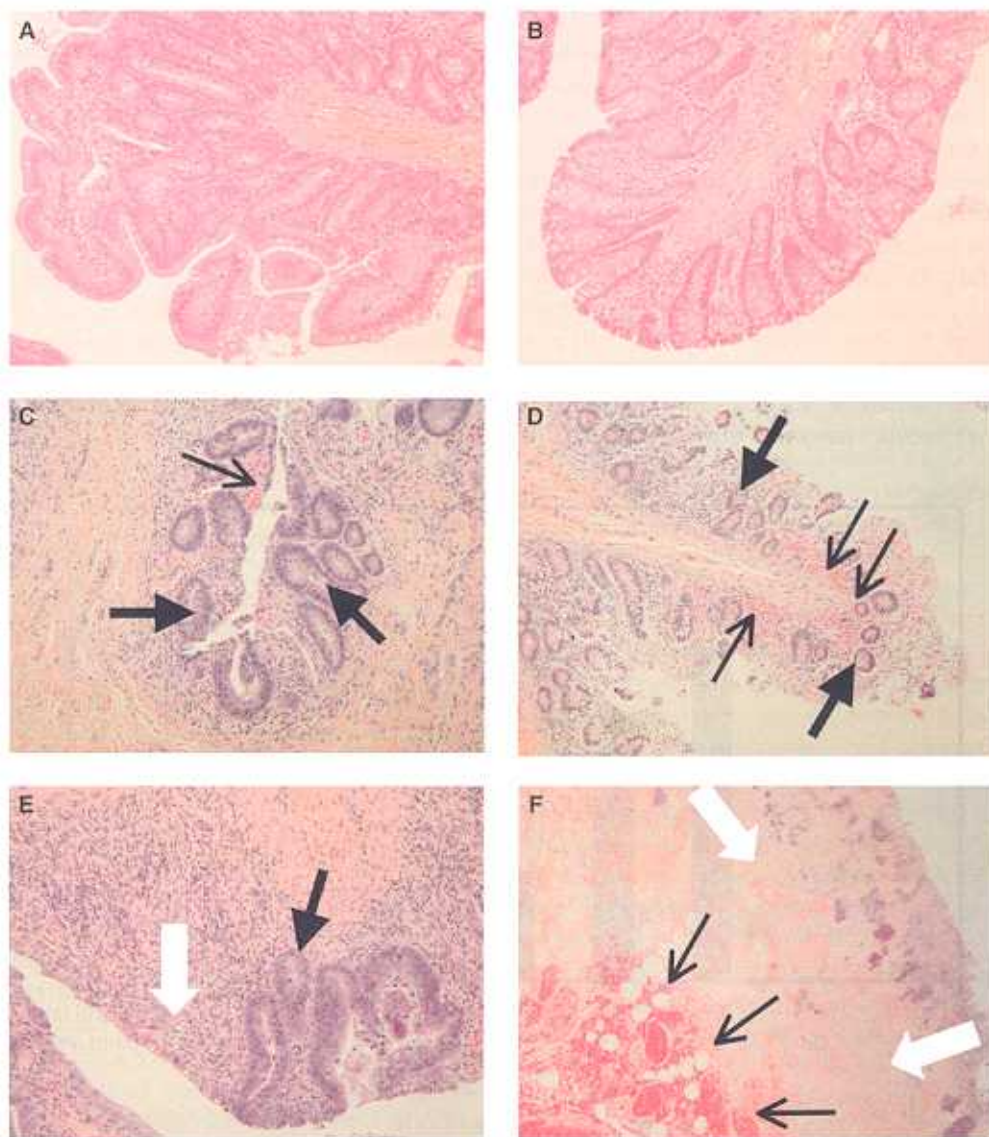


Figure 2. Representative histological imaging of animals Q554 (A and B), 1597 (C and E), 1760 (D) and S076 (F) for small intestine (A, C and E) and large intestine (B, D and F). Normal appearance of small (A) and large (B) intestine on day 11. On days 11 (C, E and F) and 23 (D), a disorganization of intestinal epithelium was observed with haemorrhages (thin arrows) and regenerative crypts (bold arrows). Areas of necrosis (white arrows) were also observed on day 11 (E and F)

Table 4. Clinical outcome for individual animals

Treatment group	Animal identification	$\gamma/\eta$ ratio	Irradiation dose	Survival (days)	Cause of death*
Sham	M383	—	Sham	>1 year	
	1735	—	Sham	>1 year	
	Y856	—	Sham	>1 year	
Unmanipulated BMMNCs	1682	1:1	8 Gy	23	Hemorrhages
	Y182	9:1	8 Gy	82	Sacrificed
7-day expanded BMMNCs	Q554	1:1	8 Gy	111	Lung fibrosis and inflammatory disease
7-day expanded BMMNCs and MSCs	1597	1:1	8 Gy	11	Digestive disease
	AA212	9:1	8 Gy	82	Sacrificed
MSCs alone	Q720	1:1	8 Gy	12	Digestive disease
	1760	1:1	8 Gy	23	digestive and liver disease, diffuse hemorrhages
	Y636	9:1	8 Gy	82	Sacrificed
	S076	1:1	8 Gy	12	Diffuse hemorrhages, infection, digestive disease

\*As determined by autopsy.

Frequencies of CFU-F were 7–7.5 CFU-F per 1000 MSCs, of which 38–40% were eGFP+. Flow cytometric analysis showed that CD45+ cells were not present in MSCs, thus excluding the presence of hematopoietic cells as a source of transduced cells in MSC grafts.

## Clinical outcome

All animals showed an initial radiation syndrome during the 24 h post-irradiation. All animals experienced gastro-intestinal disease between days 5 and 15, with diarrhea and reduced food and water intake during this period. This early phase of the gastro-intestinal disease was treated with Granisetron (0.2 mg/kg of body weight SQ; Kitril, Roche, France), which in fact reduced diarrhea.

Survival of animals and causes of death are summarized in Table 4. Most animals irradiated with a  $\gamma/\eta$  ratio of 1:1 died between days 11 and 23, with a general picture of digestive disease, including a disorganization of intestinal epithelium, a disappearance of colonic and small bowel crypts (Figures 2C and 2D) and necrotic areas along small and large bowels (Figures 2E and 2F), generally associated with hemorrhage, especially in animals that died on day 23. However, clear-cut evidence of crypt regeneration was observed as soon as day 11 (Figure 2C) but also on day 23 (Figure 2D), with a complete regeneration of the intestinal epithelium on day 82 (not shown) and day 111 (Figures 2A and 2B). By contrast, all three animals irradiated with a  $\gamma/\eta$  ratio of 9:1 survived the acute phase of radiation syndrome, despite a moderate gastro-intestinal disease with reduced drinking and food intake and mild diarrhea between days 5 and 13 post-irradiation.

## Follow-up of hematological parameters

All animals including sham-irradiated animals were followed daily for WBC and Plt counts (Figures 3A

and 3B, respectively). Irradiated animals showed a rapid decrease in WBC numbers during the first 7 days after irradiation. Thereafter, some differences appeared between the treatment groups, whatever the  $\gamma/\eta$  ratio used. Animals receiving the MSC graft alone showed a rapid and continuous decrease in WBC until day 12. Animals receiving the unmanipulated BMMNC graft alone showed a similar initial decrease in WBC counts during the first 10 days. However, the nadir in WBC took place on day 11 for the two animals, and a progressive recovery of WBC numbers was observed on day 11, until complete recovery by day 40 for the surviving animal (which was sacrificed on day 82 for tissue analyses). In contrast, with *ex vivo* expanded BMMNCs, an initial decrease in WBC counts was observed, but stopped as soon as day 6. A progressive recovery was observed from day 15 in parallel with animals receiving unmanipulated BMMNCs. These results indicated that *ex vivo* expanded BMMNCs were effective in the treatment of radiation-induced bone marrow aplasia, in accordance with our previous results [8]. Animals receiving both expanded BMMNCs and MSCs behaved as those receiving expanded BMMNCs alone but the early WBC peak as well as the secondary count drop were more pronounced. Similar results were observed on platelet counts. The amount of blood products transfused could be compared in the three animals that received a 9:1 gamma/neutron ratio irradiation and surviving long enough for evaluation. Animal Y636 who received both expanded BMMNCs and MSCs received 14 platelet transfusions and 4 red cell transfusions, animal AA212 who received expanded HSCs alone received 11 platelet transfusions and 2 red cell transfusions, whereas animal Y182 who received unmanipulated BMMNCs had 23 platelet transfusions and 4 red cell transfusions. Obviously, the number of animals was too small to observe statistically significant differences in these kinetics of hematopoietic recovery. The plasma FL concentration was monitored in all

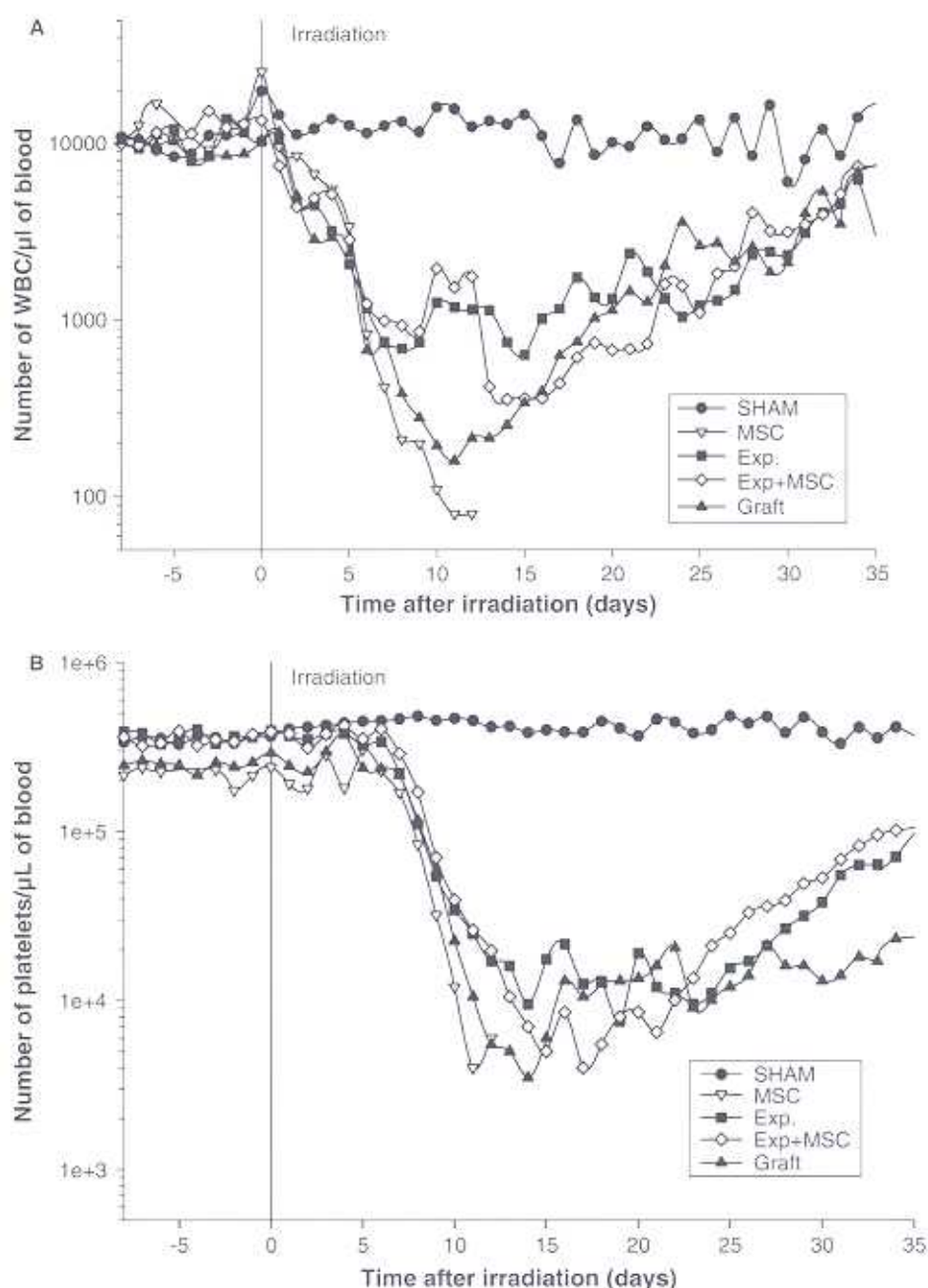


Figure 3. Follow-up of (A) WBC and (B) Plt for each treatment group. Results are given as mean for sham-irradiated animals (closed circles), BMMNC expansion-treated animals (closed squares), BMMNC expansion- and MSC-treated animals (open diamonds), and unmanipulated BMMNC grafts (closed triangles), and as an individual value for the MSC-treated animal (open triangles)

irradiated animals. Sham-irradiated animals showed plasma FL levels ranging from 100.2 to 196.9 pg/ml during the experimental period (Figure 4), which was in accordance with previously defined FL levels under normal physiological conditions. All irradiated animals showed an initial increase in plasma FL concentrations during the first 4 days after irradiation. However, marked differences appeared thereafter, with the stabilization of plasma FL levels between approximately 400 and 1200 pg/ml of plasma for animals that received expanded BMMNCs alone (Figure 4) until day 18, after which a progressive decrease in plasma FL levels was observed, in parallel with the recovery of blood cell populations.

Higher levels of plasma FL concentrations were observed in all other treatment groups.

### Detection of eGFP in NHP tissues

A part of the MSCs was transduced with the gene encoding for the green fluorescent protein (eGFP) in order to track where the MSCs had engrafted. Tissues from multiple organs were collected and frozen after euthanasia except for Y636 where biopsies of skin and muscle were performed 2 weeks after graft. Because a gradient of doses occurred during radiation that induced higher damage

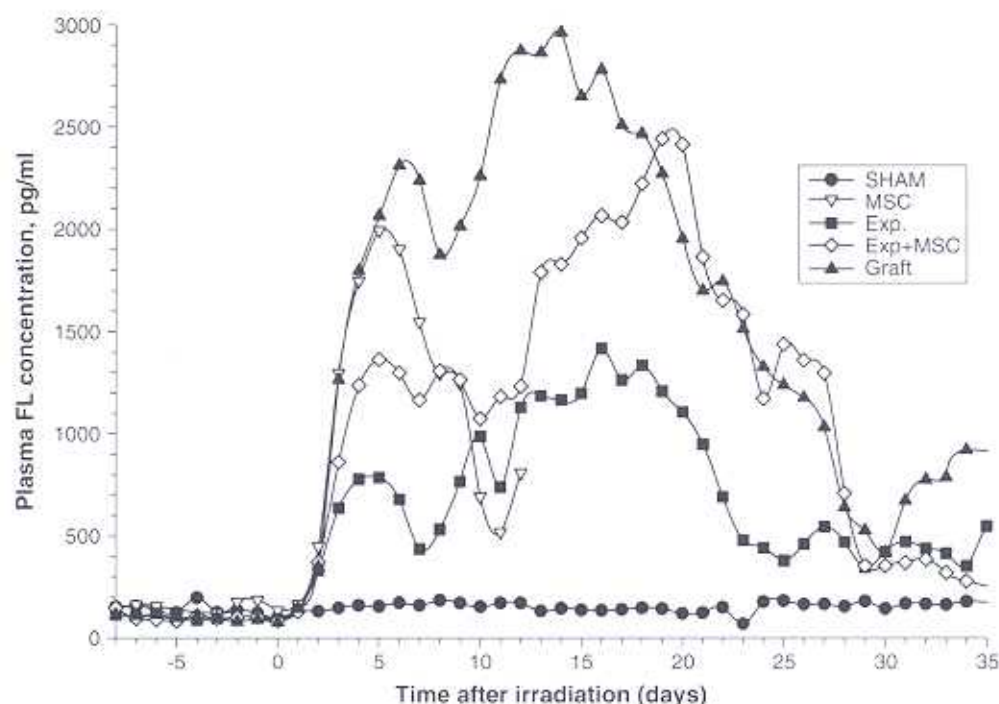


Figure 4. Follow-up of plasma FL concentration for each treatment group. Results are given as mean for sham-irradiated animals (closed circles), BMMNC expansion-treated animals (closed squares), BMMNC expansion and MSC-treated animals (open diamonds), and unmanipulated BMMNC grafts (closed triangles), and as individual values for MSC-treated animals (open triangles)

Table 5. Biodistribution of MSCs in tissues by the detection of MSC engraftment (eGFP detection by real-time PCR)

Tissues	eGFP copies/100 ng DNA					Tissues	eGFP copies/100 ng DNA			
	Animals						Animals			
	Q720	1760	S076	Y636			Q720	1760	S076	Y636
	Day after radiation						Day after radiation			
	12	23	12	15*	86		12	23	12	86
Gut jejunum	nd**	0	nd	nd	400	Spleen	0	0	0	1
Bone marrow, femur	376	0	0	nd	1	Lung	0	0	0	0
Muscle, shoulders	370	0	11	10	1	Kidney	0	0	0	0
Skin, legs	116	0	63	nd	120	Brain	0	0	0	0
Tendon, legs	105	0	0	nd	0	Thymus	0	0	0	0
Bone marrow, humerus	64	0	1	1	1	Heart	0	0	0	0
Skin, shoulders	262	165	54	1	0	Liver	0	0	0	0
Muscle, legs	0	0	12	nd	0	Tendon, thorax	nd	nd	nd	0
Stomach	0	0	7	nd	0	Tendon, shoulders	nd	nd	nd	0
Muscle, thorax	nd	nd	nd	0	7	Bone, humerus	nd	nd	nd	0
Proximal colon	nd	0	nd	nd	7	Gut duodenum	nd	0	nd	0
Cecum	nd	0	nd	nd	7	Gut transverse colon	nd	0	nd	0
Skin, thorax	nd	nd	nd	0	5	Gut distal colon	nd	0	nd	0
Ileum	nd	0	nd	nd	4	Rectum	nd	0	nd	0
Bone, femur	nd	nd	nd	nd	2	Testicle	nd	0	nd	0

\*On day 15 post-irradiation in animal Y636 skin, muscle and bone marrow biopsies were obtained and analyzed for the presence of eGFP DNA.  
\*\*nd: not determined.

in front tissues than in the back, we investigated the potential spatial distribution of MSCs by taking samples of skin, skeletal muscle and tendon from leg, thorax and shoulders. A quantitative analysis of MSCs engrafted in each of the organs examined is presented in Table 5a. Significant engraftment occurred in hematopoietic tissues (bones 2.2 copies/100 ng DNA, bone marrow 22–188 copies/100 ng DNA, spleen 1 copy/100 ng DNA), in the

skin (5–110 copies/100 ng DNA), skeletal muscle (7–11 copies/100 ng DNA), tendon (105 copies/100 ng DNA), stomach (7.15 copies/100 ng DNA) and gut (4–400 copies/100 ng DNA) tissues. No GFP presence was detected in the brain, liver, kidney, lung, cardiac muscle, thymus, rectum, and testicle of any recipient animals.

At 12–23 days post-irradiation, the highest engraftment (16.5–262 eGFP copies/100 ng DNA, or up to

13.1% cells) occurred in the skin of the shoulders, which corresponded to the anatomic aspect least exposed to the neutron effects.

Skin samples had the highest frequency of eGFP+ cells of all the tissues in all subjects. Biopsies from NHP Y636 at 2 weeks revealed that MSCs were engrafted in the skin (1 copy/100 ng DNA) and the skeletal muscle (10 copies/100 ng) of the shoulder (Table 5b). This was consistent with necropsy results of skin and skeletal muscle in those animals (NHP Q720 & 1760) sampled at 2 weeks post-infusion. When comparing skin and skeletal muscle from one anatomical site with another, a spatial distribution pattern of MSCs is revealed at 2 weeks post-engraftment in which these tissues over the shoulder were more positive than the same tissues from the legs in those NHPs grafted with both BMMNCs and MSCs. This distribution might be explained by a preferential implantation of MSCs to regenerative areas rather than areas of necrosis.

In NHP1760, only the skin was positive; this may be due to the low number of eGFP+ MSCs ( $0.39 \times 10^6$  cells) infused into NHP1760 compared with the other NHPs ( $2.32$ – $4.94 \times 10^6$  cells). The animal that received only a MSC graft (S076) had MSCs engrafted in stomach (7.15 copies/100 ng), skin (54–63 copies/100 ng), skeletal muscle (11 copies/100 ng), although there were no significant differences between the levels in legs and shoulders. NHP S076 also had a lower percentage of MSCs in humeral bone marrow (1.45 copies) than in animals transplanted with expanded MSCs and bone marrow (4–376 copies/100 ng). At 2 months post-infusion, eGFP+ MSCs were still detectable by PCR in bone marrow (1 copy/100 ng) and in femoral bone (2.2 copies/100 ng). Considering that only a fraction of the MSCs transplanted was eGFP+, and assuming that there is one copy of the eGFP gene per transduced cells, MSCs engrafted from 0.11% in bone up to 7% of the cells in gut jejunum in this animal (Y636).

Further analysis was performed on mononucleated cells from peripheral blood in order to investigate MSC migrations. We were never able, at any time post-infusion, to detect MSCs in peripheral blood from days 1 to 82. Finally, to characterize the frequency of MSCs present in regenerating bone marrow, CFU-F cultures from bone marrow aspirates were established. In all cases these cultures were PCR+ (as high as 10 copies/100 ng DNA for NHP Y636 at 82 days post-irradiation). Also, the presence of eGFP+ cells in CFU-F assays was demonstrated by fluorescent microscopy at 82 days post-irradiation for Y636.

## Discussion

Combined HSC and MSC infusion has been proposed as therapy for radio-chemotherapy induced aplasia [2]. It has been shown in humans that, after autologous as well as allogenic HSC transplantation, hematological parameters can be improved after infusion of MSCs [3–5]. HSC transplantations in primates are difficult to realize and are very expensive. All studies performed so far have therefore been based on a limited number of animals and statistical analyses are usually impossible. However, when combining our present observations with our previous studies [8] and comparing with reports from other teams [2], the data suggested that animals receiving expanded HSCs and MSCs or expanded HSCs alone did better than animals receiving unmanipulated bone marrow. No conclusion can however be drawn from the survival data since three animals surviving on day 82 were sacrificed for tissue analyses.

We have previously shown that it is possible to use the follow-up of plasma FL concentration as a biologic indicator of marrow function [17]. The unmanipulated BMMNC-treated group showed an initial increase higher than the group receiving expanded BMMNCs and MSCs, suggesting that the co-infusion of MSCs with expanded

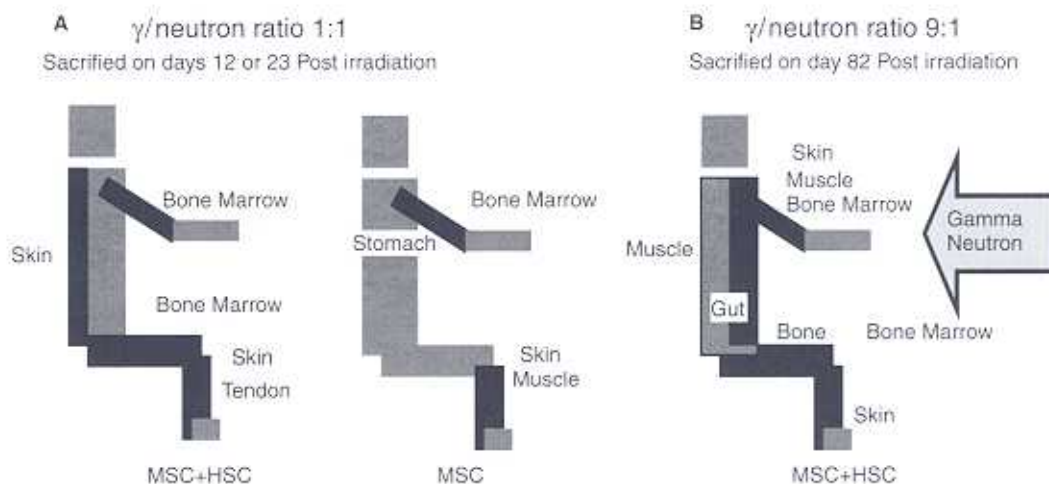


Figure 5. Spatial distribution of MSCs (in black) from days 12 to 82 post-irradiation according to the position of the animals in the gamma/neutron irradiation field. Neutrons are strongly attenuated by live tissue, thus the front of the animals received a higher neutron irradiation as compared with the back

BMMNCs was contributing to correction of bone marrow aplasia. From day 20 until recovery in surviving animals, higher plasma FL levels were observed for animals receiving expanded MSCs and HSCs than for those receiving HSCs alone. This is in accordance with results demonstrating the production of FL by marrow stromal cells [18]. This may be explained by homing of FL-producing MSCs to the marrow and the restoration of the bone marrow stromal function. The animals receiving expanded HSCs and MSCs had a hematopoietic recovery similar to animals receiving expanded HSCs alone. This might reflect that the homing of MSCs over a large territory rather than limited to the bone marrow may have relatively impaired their ability to enhance hematopoiesis. Indeed, in previous reports involving NHPs but with milder irradiation, infused MSCs were demonstrated at very limited numbers in the bone marrow [2]. Furthermore, in clinical settings, expanded MSCs were found in scarce quantities in the recipients [2]. This current study demonstrates that, following a very severe multi-organ injury involving neutron/gamma irradiation, transplanted MSCs can be found in numerous injured tissues up to 81 days post-transplant. In some organs the grafted MSCs represent a large part of the assayed samples (up to 7% for jejunum, taking into account that only a part of MSCs are EGFP-labeled). Our report is the first evidence of the long-term ability of MSCs to home in numerous tissues of a primate as a response to a severe radiation injury.

Our results might suggest a MSC distribution kinetic as a function of the degree of severity of the lesions (and the state of regeneration of damaged tissues). The kinetics of MSC biodistribution might be explained by a specific migration of MSCs to tissues in the process of regeneration rather than to necrotic tissues. Our data supports this hypothesis since tissues receiving the higher level of neutron radiation exhibited less homing of MSCs than other tissues (Figure 5). For the animal receiving MSCs alone, eGFP+ MSCs were limited to those tissues receiving highest radiation doses. For the animal irradiated with a neutron/gamma ratio of 1 : 1 receiving MSCs and HSCs, MSCs were mostly found in the less severely irradiated tissues whereas the inverse was observed for the animal receiving less neutrons. This discrepancy might indicate that MSC homing is related to the dose of irradiation and the time post-transplant. These findings may indicate the contribution of MSCs to tissue repair at 2 weeks and after more than 2 months. The presence of eGFP+ cells in the CFU-F assays from the bone marrow of an animal receiving expanded HSCs and MSCs suggests that the transplanted MSCs may directly contribute to the restoration of bone marrow functions. Whether the homing of MSCs in numerous other tissues involves transdifferentiation or plasticity of the cells remains to be studied.

## Acknowledgement

This work was sponsored by Electricité De France EDF-Comité de Radioprotection.

## References

- Horwitz EM, Gordon PL, Koo WK, et al. Isolated allogeneic bone marrow-derived mesenchymal cells engraft and stimulate growth in children with osteogenesis imperfecta: implications for cell therapy of bone. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002; **99**: 8932–8937.
- Devine SM, Bartholomew AM, Mahmud N, et al. Mesenchymal stem cells are capable of homing to the bone marrow of non-human primates following systemic infusion. *Exp Hematol* 2001; **29**: 244–255.
- Koc ON, Lazarus HM. Mesenchymal stem cells: heading into the clinic. *Bone Marrow Transplant* 2001; **27**: 235–239.
- Koc ON, Gerson SL, Cooper BW, et al. Rapid hematopoietic recovery after coinfusion of autologous-blood stem cells and culture-expanded marrow mesenchymal stem cells in advanced breast cancer patients receiving high-dose chemotherapy. *J Clin Oncol* 2000; **18**: 307–316.
- Koc ON, Peters C, Aubourg P, et al. Bone marrow-derived mesenchymal stem cells remain host-derived despite successful hematopoietic engraftment after allogeneic transplantation in patients with lysosomal and peroxisomal storage diseases. *Exp Hematol* 1999; **27**: 1675–1681.
- Nénot JC, Thierry D. Clinical approaches to treatment of radiation-induced haemopoietic injury. In *Radiation Toxicology: Bone Marrow and Leukemia*, Hendry J, Lord B (eds). Taylor and Francis: London, 1995; 195–243.
- Norol F, Drouet M, Mathieu J, et al. Ex vivo expanded mobilized peripheral blood CD34+ cells accelerate haematological recovery in a baboon model of autologous transplantation. *Br J Haematol* 2000; **109**: 162–172.
- Bertho JM, Frick J, Demarquay C, et al. Rejection of ex vivo expanded primate bone marrow mononucleated cells strongly reduces radiation-induced aplasia. *J Hematother Stem Cell Res* 2002; **11**: 549–564.
- Brandt JE, Bartholomew AM, Fortman JD, et al. Ex vivo expansion of autologous bone marrow CD34(+) cells with porcine microvascular endothelial cells results in a graft capable of rescuing lethally irradiated baboons. *Blood* 1999; **94**: 106–113.
- Lennon DP, Haynesworth SE, Bruder SP, Jaiswal N, Caplan AL. Human and animal mesenchymal progenitor cells from bone marrow: identification of serum for optimal section and proliferation. *In Vitro Cell Dev Biol-Animal* 1996; **32**: 602–611.
- Miller AD, Garcia JV, Von SN, Lynch CM, Wilson C, Eiden MV. Construction and properties of retrovirus packaging cells based on gibbon ape leukaemia virus. *J Virol* 1991; **65**: 2220–2224.
- Bierhuizen MF, Westerman Y, Visser TP, Dimjati W, Wognum AW, Wagemaker G. Enhanced green fluorescent protein as selectable marker of retroviral-mediated gene transfer in immature hematopoietic bone marrow cells. *Blood* 1997; **90**: 3304–3315.
- Zoetelief J, Wagemaker G, Broerse JJ. Dosimetry for total body irradiation of rhesus monkeys with 300 kV X-rays. *Int J Radiat Biol* 1998; **74**: 265–272.
- Voisin P. Chromosome lesions as a short and medium term biological indicator of acute irradiation. In: *L'Homme blessé*, Court LA, Lallemand J (eds). Jouve: Paris, 1997; 137–150.
- Heid CA, Steven J, Livak KJ, William PM. Real time quantitative PCR. *Genome Res* 1996; **6**: 9986–9994.
- Kimura H, Morita M, Kuzushima Y, et al. Quantitative analysis of Epstein-Barr virus load by using real time PCR assay. *J Clin Microbiol* 1999; **37**: 132–136.
- Bertho JM, Demarquay C, Frick J, et al. Level of Flt3-ligand in plasma: a possible new bio-indicator for radiation-induced aplasia. *Int J Radiat Biol* 2001; **77**: 703–712.
- Livosky M, Braun SE, Ge Y, et al. FLT3-ligand production by human bone marrow stromal cells. *Leukemia* 1996; **10**: 1012–1018.



See discussions, stats, and author profiles for this publication at: <https://www.researchgate.net/publication/7429446>

# Local Irradiation Not Only Induces Homing of Human Mesenchymal Stem Cells at Exposed Sites but Promotes Their Widespread...

Article *in* Stem Cells · May 2006

DOI: 10.1634/stemcells.2005-0260 · Source: PubMed

CITATIONS

263

READS

241

13 authors, including:



[Mazurier Christelle](#)

Pierre and Marie Curie University - Paris 6

35 PUBLICATIONS 1,631 CITATIONS

[SEE PROFILE](#)



[Alexandra Semont](#)

Institut de Radioprotection et de Sûreté Nu...

30 PUBLICATIONS 1,238 CITATIONS

[SEE PROFILE](#)



[Sandrine Bouchet](#)

Pierre and Marie Curie University - Paris 6

38 PUBLICATIONS 1,242 CITATIONS

[SEE PROFILE](#)



[Alain Chapel](#)

Institut de Radioprotection et de Sûreté Nu...

111 PUBLICATIONS 2,741 CITATIONS

[SEE PROFILE](#)

Some of the authors of this publication are also working on these related projects:



Clinical Trial Cell therapy of Chronic Radiotherapy-induced Abdomino-pelvic Complications (Pelvic Radiation Disease, PRD) Refractory to Standard Therapy ClinicalTrials.gov Identifier: NCT02814864

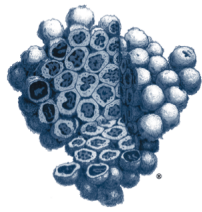
[View project](#)



molecular diagnostic en d cell therapy [View project](#)

All content following this page was uploaded by [Alain Chapel](#) on 20 April 2017.

The user has requested enhancement of the downloaded file. All in-text references [underlined in blue](#) are added to the original document and are linked to publications on ResearchGate, letting you access and read them immediately.



# STEM CELLS<sup>®</sup>

## **Local Irradiation Not Only Induces Homing of Human Mesenchymal Stem Cells at Exposed Sites but Promotes Their Widespread Engraftment to Multiple Organs: A Study of Their Quantitative Distribution After Irradiation Damage**

Sabine François, Morad Bensidhoum, Moubarak Mouiseddine, Christelle Mazurier, Bénédicte Allenet, Alexandra Semont, Johanna Frick, Amandine Saché, Sandrine Bouchet, Dominique Thierry, Patrick Gourmelon, Norbert-Claude Gorin and Alain Chapel

*Stem Cells* 2006;24;1020-1029; originally published online Dec 8, 2005;  
DOI: 10.1634/stemcells.2005-0260

**This information is current as of June 28, 2006**

The online version of this article, along with updated information and services, is located on the World Wide Web at:

<http://www.StemCells.com/cgi/content/full/24/4/1020>

STEM CELLS<sup>®</sup>, an international peer-reviewed journal, covers all aspects of stem cell research: embryonic stem cells; tissue-specific stem cells; cancer stem cells; the stem cell niche; stem cell genetics and genomics; translational and clinical research; technology development.

STEM CELLS<sup>®</sup> is a monthly publication, it has been published continuously since 1983. The Journal is owned, published, and trademarked by AlphaMed Press, 318 Blackwell Street, Suite 260, Durham, North Carolina, 27701. © 2006 by AlphaMed Press, all rights reserved. Print ISSN: 1066-5099. Online ISSN: 1549-4918.

 **AlphaMed Press**

## Local Irradiation Not Only Induces Homing of Human Mesenchymal Stem Cells at Exposed Sites but Promotes Their Widespread Engraftment to Multiple Organs: A Study of Their Quantitative Distribution After Irradiation Damage

SABINE FRANÇOIS,<sup>a</sup> MORAD BENSIDHOUM,<sup>b</sup> MOUBARAK MOUSEDDINE,<sup>a</sup> CHRISTELLE MAZURIER,<sup>b</sup> BÉNÉDICTE ALLENET,<sup>a</sup> ALEXANDRA SEMONT,<sup>a</sup> JOHANNA FRICK,<sup>a</sup> AMANDINE SACHÉ,<sup>a</sup> SANDRINE BOUCHET,<sup>b</sup> DOMINIQUE THIERRY,<sup>a</sup> PATRICK GOURMELON,<sup>a</sup> NORBERT-CLAUDE GORIN,<sup>b,c</sup> ALAIN CHAPEL<sup>a</sup>

<sup>a</sup>Laboratoire de Thérapie Cellulaire et Radioprotection Accidentelle, Institut de Radioprotection et de Sécurité Nucléaire, Fontenay aux Roses CEDEX, France; <sup>b</sup>EA 1638, Laboratoire de Thérapie Cellulaire et Radioprotection Accidentelle, Faculté de Médecine Saint Antoine, Université Paris VI Pierre et Marie Curie, Paris, France; <sup>c</sup>Service d'Hématologie et de Thérapie cellulaire, Hôpital Saint Antoine, Paris, France

**Key Words.** Mesenchymal stem cell • Injured tissues • Homing • Transplantation • Irradiation

### ABSTRACT

Mesenchymal stem cells (MSCs) have been shown to migrate to various tissues. There is little information on the fate and potential therapeutic efficacy of the reinfusion of MSCs following total body irradiation (TBI). We addressed this question using human MSC (hMSCs) infused to nonobese diabetic/severe combined immunodeficient (NOD/SCID) mice submitted to TBI. Further, we tested the impact of additional local irradiation (ALI) superimposed to TBI, as a model of accidental irradiation. NOD/SCID mice were transplanted with hMSCs. Group 1 was not irradiated before receiving hMSC infusion. Group 2 received only TBI at a dose of 3.5 Gy, group 3 received local irradiation to the abdomen at a dose of 4.5 Gy in addition to TBI, and group 4 received local irradiation to the leg at 26.5 Gy in addition to TBI. Fifteen days after irradiation, quantitative and spatial distribution of the hMSCs were studied. Histological analysis of mouse tissues confirmed the presence of radio-induced lesions in the irradiated fields. Following their infusion into nonirradiated animals, hMSCs homed at a very low level to various tissues (lung, bone marrow, and muscles) and no significant engraftment was found in other

organs. TBI induced an increase of engraftment levels of hMSCs in the brain, heart, bone marrow, and muscles. Abdominal irradiation (AI) as compared with leg irradiation (LI) increased hMSC engraftment in the exposed area (the gut, liver, and spleen). Hind LI as compared with AI increased hMSC engraftment in the exposed area (skin, quadriceps, and muscles). An increase of hMSC engraftment in organs outside the fields of the ALI was also observed. Conversely, following LI, hMSC engraftment was increased in the brain as compared with AI. This study shows that engraftment of hMSCs in NOD/SCID mice with significantly increased in response to tissue injuries following TBI with or without ALI. ALI induced an increase of the level of engraftment at sites outside the local irradiation field, thus suggesting a distant (abscopal) effect of radiation damage. This work supports the use of MSCs to repair damaged normal tissues following accidental irradiation and possibly in patients submitted to radiotherapy. *STEM CELLS* 2006; 24:1020–1029

### INTRODUCTION

Mesenchymal stem cells (MSCs) have been identified in the bone marrow (BM) as multipotent progenitor cells that differentiate into osteocytes, chondrocytes, adipocytes, and stromal cells [1, 2]. Irradiation can induce severe complications, hemopoietic stem cell depletion, multiorgan failure, and death. Inflammation due to irradiation can mobilize hematopoietic stem cells into the circulation;

irradiation can activate molecular pathways that increase the release of tissue chemokines, which attract stem cells to tissues where they may home and differentiate [3]. Therefore, stem cell therapy may be a promising therapeutic approach to improve radiotherapy-induced tissue damages.

In several animal models, it has been shown that syngeneic or xenogeneic MSCs administered intravenously are able to

Correspondence: Alain Chapel, Ph.D., IRSN, DRPH/SRBE/LTCRA, BP17 Fontenay aux Roses Cedex 92262, France. Telephone: 33 1 58 35 95 46; Fax: 33 1 58 35 84 67; e-mail: alain.chapel@irsn.fr Received June 10, 2005; accepted for publication November 16, 2005; first published online in *STEM CELLS EXPRESS* December 8, 2005. ©AlphaMed Press 1066-5099/2006/\$20.00/0 doi: 10.1634/stemcells.2005-0260

engraft into the BM and other tissues in animals with [4–6] or without a pretransplant total body irradiation (TBI) [7, 8]. However, the levels of engraftment in these two different settings have not been compared. MSCs engraft *in vivo* in several injured tissues [9–14] such as the liver [15, 16]; moreover, primary researches showed that MSCs can graft themselves in muscles [17, 18] and myocardium [19]. In humans, the use of MSCs is being tested for tissue remodeling, including cardiovascular repair, treatment of lung fibrosis, spinal cord injury, bone and cartilage repair (reviewed in [17, 20]). Regarding radio-induced lesions, multiple studies have shown engraftment of MSCs at the site of injury [21–23] but very few have evaluated MSC engraftment in other tissues (outside the irradiation field). The amount of MSCs detected in most tissues is exceedingly low. The signaling pathways responsible for their directed migration still remain unknown, although recent reports have suggested a role for chemokines in human MSC (hMSC) migration [3]. Several studies have begun to elucidate the mechanisms by which stem cells are mobilized from BM to a particular organ and the molecular mediators that orchestrate this process [24–26].

For these studies, xenogenic models are powerful but somewhat controversial models. Essential signals such as cytokine/receptor interactions may be hampered by species differences. Although the xenogeneity does not prevent the differentiation, it slightly decreases the migratory ability of the MSCs toward different tissues. This decrease seems to be the result of weak connection between the receptors and ligands of different species [19]. Although it was described that both human and murine MSCs are immunosuppressive, major differences exist between MSCs from the two species. Murine MSCs, unlike their human equivalent, lack major histocompatibility complex class II expression [27]. The host's crippled immune system could also somehow hinder engraftment but transplant rejection can occur in xenogenic models. However, when transplanted into an immunoincompetent host, adult hMSCs showed persistent engraftment [28].

The first challenge in therapeutic MSC transplantation is efficient delivery to the sites of intended action. In this paper, we describe a xenogenic experimental transplant model we built to evaluate the full potential of hMSC engraftment and we compare TBI with and without additional localized exposures (leg and abdominal areas). In this study, we used the nonobese diabetic/severe combined immunodeficient (NOD/SCID) mouse model to evaluate the engraftment of hMSCs in irradiated mice and to have the minimum of animals developing a transplant rejection. Our results showed that after transplantation into adult unconditioned mice, hMSCs migrate not only in BM and lungs as previously reported but also into muscle tissues [6]. TBI increased hMSC implantation in BM and muscle and, furthermore, led to engraftment in brain, heart, and liver. Local irradiation, in addition to TBI, increased specific homing of injected cells both to the injured tissues and to other tissues outside the local irradiation field. We feel these observations may be relevant to several clinical situations such as TBI given as a pretransplant conditioning regimen, radiotherapy for the treatment of cancer, and accidental irradiation, in promoting the use of MSC infusion as part of the therapeutic scheme.

## MATERIALS AND METHODS

### Isolation, Purification, and Expansion of hMSCs

BM cells were obtained from iliac crest aspirates from healthy volunteers after informed consent and were used in accordance with the procedures approved by the human experimentation and ethic committees of Hôpital St. Antoine. As previously described [7], 50 ml of BM were taken from different donors over heparin (Choay de Sanofi-Synthélabo, Paris, <http://www.sanofi-adventis.com>). Low-density mononuclear cells (MNCs) were separated on Ficoll Hypaque density gradient (1.077). MNCs were plated at a concentration of  $10^7$  cells per 10 ml of dexter medium (McCoy's 5A medium) in 75 cm<sup>2</sup> tissue culture flasks (supplemented with 12.5% fetal calf serum, 12.5% horse serum), 1% sodium bicarbonate, 1% sodium pyruvate, 0.4% MEM nonessential amino acids, 0.8% minimum essential medium (MEM) essential amino acids, 1% MEM vitamin solution, 1% L-glutamine (200 mM), 1% penicillin-streptomycin solution (all from Invitrogen, Groningen, The Netherlands, <http://www.invitrogen.com>),  $10^{-6}$  M hydrocortisone (StemCell Technologies, Vancouver, BC, Canada, <http://www.stemcell.com>), and 2 ng/ml human basic recombinant fibroblast growth factor (R&D Systems, Abington, U.K., <http://www.rndsystems.com>) and incubated at 37°C in humidified, 5% CO<sub>2</sub> atmosphere. After 1 week, nonadherent cells were washed, removed, and replaced with the same complete fresh medium (without Hydrocortisone), and hMSCs at first passage (P1 hMSCs) were plated at a density of  $4 \times 10^5$  per T-75 cm<sup>2</sup> flask; at second passage (P2 hMSCs) when reaching 80% of confluence, the cells were collected and counted, and viability was assessed by trypan blue assay. Before transplant, a sample of the hMSCs prepared was taken for fluorescence-activated cell sorting (FACS) analysis.

### FACS Analysis

After trypsin EDTA treatment, the human cells were washed and resuspended in phosphate-buffered saline (PBS) supplemented with 0.5% bovine serum albumin (BSA; Sigma, St. Louis, <http://www.sigmaaldrich.com>) in aliquots of  $2 \times 10^5$  cells. Stainings were done with phycoerythrin (PE)-conjugated monoclonal antibody against CD105 (SH2), CD73 (SH3), and CD45 (Becton, Dickinson and Company, Franklin Lakes, NJ, <http://www.bd.com>) for 30 minutes at 4°C followed by two washes in PBS containing 0.5% BSA. Cells were resuspended in 200  $\mu$ l of PBS, 0.5% BSA, and analyzed at 10,000 events per test by FACScalibur BD Pharmingen (San Diego, <http://www.bdbiosciences.com/pharmingen>). Mouse immunoglobulin G1 (IgG1) were used as isotopic controls (Beckman Coulter, Fullerton, CA, <http://www.beckmancoulter.com>).

### hMSC Infusion into NOD/SCID Mouse Model

All experiments and procedures were performed in compliance with the French Ministry of Agriculture regulations for animal experimentation (Act no. 87–847, October 19, 1987, modified May 2001). NOD-LtSz-*scid/scid* (NOD-SCID) mice from breeding pairs originally purchased from Jackson Laboratory (Bar Harbor, ME, <http://www.jax.org>) were bred in our pathogen-free unit and maintained in sterile micro-isolator cages. A total of 60 8-week-old mice, divided in five groups, were used for this study. The hMSCs were delivered intravenously by tail vein injection into each mouse with Myjector syringe of 1 ml, TERUMO (Terumo Medical Cor-

poration, Somerset, NJ, <http://www.terumomedical.com>) 29-gauge  $\times .05$ . Twenty-four hours after radiation exposure (using a  $^{137}\text{Cs}$  source), four groups of these NOD/SCID mice were transplanted with a dose of  $5 \times 10^6$  P2 hMSCs in 100  $\mu\text{l}$  of PBS 1X; the fifth group was used as a control group and did not receive hMSC infusion. On average, one BM was used to inject five mice. Group 1 was not irradiated before receiving hMSC infusion. Groups 2–4 received TBI at a sublethal dose of 3.5 Gy before hMSC infusion as follows: Group 2 received TBI only; group 3 received local irradiation to the abdomen (IA) at a dose of 4.5 Gy in addition to TBI; and group 4 received local irradiation to the right posterior leg (irradiation leg) at 26.5 Gy in addition to TBI. Each group had its own control of five animals that did not receive hMSCs. The animals were sacrificed 15 days after irradiation, and the quantitative and spatial distribution of the hMSCs was studied through polymerase chain reaction (PCR) and immunohistochemistry analysis. Peripheral blood, BM (femur), heart, lungs, liver, kidneys, spleen, stomach, gut, brain, right and left posterior legs, quadriceps muscles, tibias, and skin were collected. Before infusion when hMSCs at second passage were collected, the rates of viability to trypan blue were 98%.

#### Detection and Quantitative Analysis of Engrafted hMSCs: DNA Extraction and PCR Analysis

The biological samples were submitted to DNA extraction and PCR analysis to detect the presence of human cells in mice recipients. Genomic DNA for PCR analysis was prepared from tissues using the QIAamp DNA Mini Kit (Qiagen, Valencia, CA, <http://www1.qiagen.com>). Amplifications were performed in accordance with the standard recommended amplification conditions (Applied Biosystems, Foster City, CA, <http://www.appliedbiosystems.com>) as previously described by Heid and colleagues [29]. The value of DNA contained in each somatic cell (diploid) is 6.16 pg with two copies of nonrepeated gene. This value was used to calculate the number of gene copies that contain a certain amount of human or mouse DNA (measured by PCR). Therefore, DNA and copy number are proportional to the number of cells. The ratio of human DNA to mouse DNA directly gives the number of human cell in mouse cell tissues. Amplification of human  $\beta$ -GLOBIN gene was used to quantify the amount of human DNA in each sample of mouse tissue after DNA extraction. Endogenous mouse RAPSIN (receptor-associated protein at the synapse) gene was also amplified, as an internal control. Absolute standard curves were generated for the human  $\beta$ -GLOBIN and mouse RAPSIN genes and used to quantify the amount of human DNA in each mouse tissue. Evaluation of human specificity of human  $\beta$ -GLOBIN amplification was demonstrated using tenfold dilution for 100 ng–0.05 ng of hMSC DNA with mouse DNA, without cross-reactivity, to quantify human cells in mouse tissue. One hundred nanograms of purified DNA from various tissues were amplified using TaqMan universal PCR master mix (Applied Biosystems). The primers and probe for human  $\beta$ -GLOBIN were forward primer 5'GTGCACCTGACTCCTGAGGAGA3' and reverse primer 5'CCTTGATACCAACCTGCCAGG3', and the probe labeled with fluorescent reporter and quencher was 5'FAM-AAGGT-GAACGTGGATGAAGTTGGTGG-TAMRA-3'. The primers and probe for mouse RAPSIN gene were forward primer 5'AC-CCACCCATCCTGCAAAT3' and reverse primer 5'ACCT-GTCCGTGCTGCAGAA3'. To determine the efficiency of am-

plification and the assay precision, calibration curves for human  $\beta$ -GLOBIN and mouse RAPSIN genes were constructed with a 0.99 correlation ( $r^2$ ) and efficiency superior to 98%. A 100% efficiency corresponded to a slope of  $-3.32$  as determined by the following equation:  $\text{efficiency} = 10(-1/\text{slope}) - 1$ . Mouse DNA was isolated from the identical tissues of nontransplanted NOD/SCID mice and used as a negative control. Also, human DNA was isolated from hMSC culture and used as a positive control. The results were expressed in number of human cells per 100 mouse cells in each tissue (directly related to the numbers of copies of human  $\beta$ -GLOBIN and mouse RAPSIN genes).

#### Immunohistochemistry

After paraformaldehyde fixation, the organs were rinsed with distilled water and dehydrated. Blocks were cut at 5  $\mu\text{m}$  on a rotary microtome (Leica, Heerbrugg, Switzerland, <http://www.leica.com>). For immunohistochemical staining of the paraffin-embedded samples, microtomed sections were deparaffinized in xylene and rehydrated through ethanol baths and PBS. After being rinsed with distilled water bath for 5 minutes, the sections were dipped into PBS-Triton in order to increase tissue permeability. The sections were digested with 2% trypsin for 30 minutes, thus exposing masked epitopes. The polyclonal anti- $\beta$ -2-microglobuline antibody (product NCL-B2Mp; Novocastra Ltd., Newcastle upon Tyne, U.K., <http://www.novocastra.co.uk>) was added at a dilution of 1:50. Negative controls were incubated with rabbit IgG diluted to 1:100. Detection of bound primary antibody was carried out with biotinylated secondary antibody. The biotinylated anti-rabbit IgG secondary antibody was diluted to 1:200, in PBS, and applied for 8 minutes. The slides were subsequently incubated with six-solution Ventana kit to make alkaline phosphatase reaction with FARED substrate for 30 minutes. For antibody detection, the Ventana kit (Ventana Medical Systems, Illkirch Cedex, France, <http://www.ventanamed.com>) was used, followed by counterstaining with hemalyn for 4 minutes. This procedure was controlled by NEXES 8 software. On successive sections, we carried out an hematoxylin-eosin-safran staining.

#### Statistical Analysis

To determine the effect of exposure radiation on engraftment of hMSCs, the rates of implantation were compared; statistical significance was calculated using *t*-test. Significance for all analysis was set at  $p < .05$ . We have used Sigmastats software (Sigma Statistical Solutions, Calgary, AB, Canada, <http://www.sigmastats.com>). All values were expressed as the mean and SEM. Each irradiation group consisted of 10 animals ( $n = 10$ ). The nonirradiated control group consisted of five animals ( $n = 5$ ).

## RESULTS

#### Isolation and Characterization of hMSCs Expanded from BM

Phenotypic analysis showed that hMSCs used in these experiments were strongly positive for the specific surface antigens SH2 and SH3 ( $37.3\% \pm 4.0\%$  and  $72.9\% \pm 3.7\%$ , respectively). Almost no contamination ( $0.2\% \pm 0.1\%$  CD 45<sup>+</sup> cells) by hematopoietic cells was evidenced in the samples (Fig. 1). In vitro culture experiments

showed that the cells were still able to differentiate into the osteoblast, chondrocyte, and adipocyte lineages (data not shown).

For the different BM samples studied, amplification factor from MNC to grafting sample cells has been estimated *ex vivo* to range from 3,443 to 20,663. From the second to the 15th passage, the published doubling time of the cultured hMSCs is 1.7 days [30].

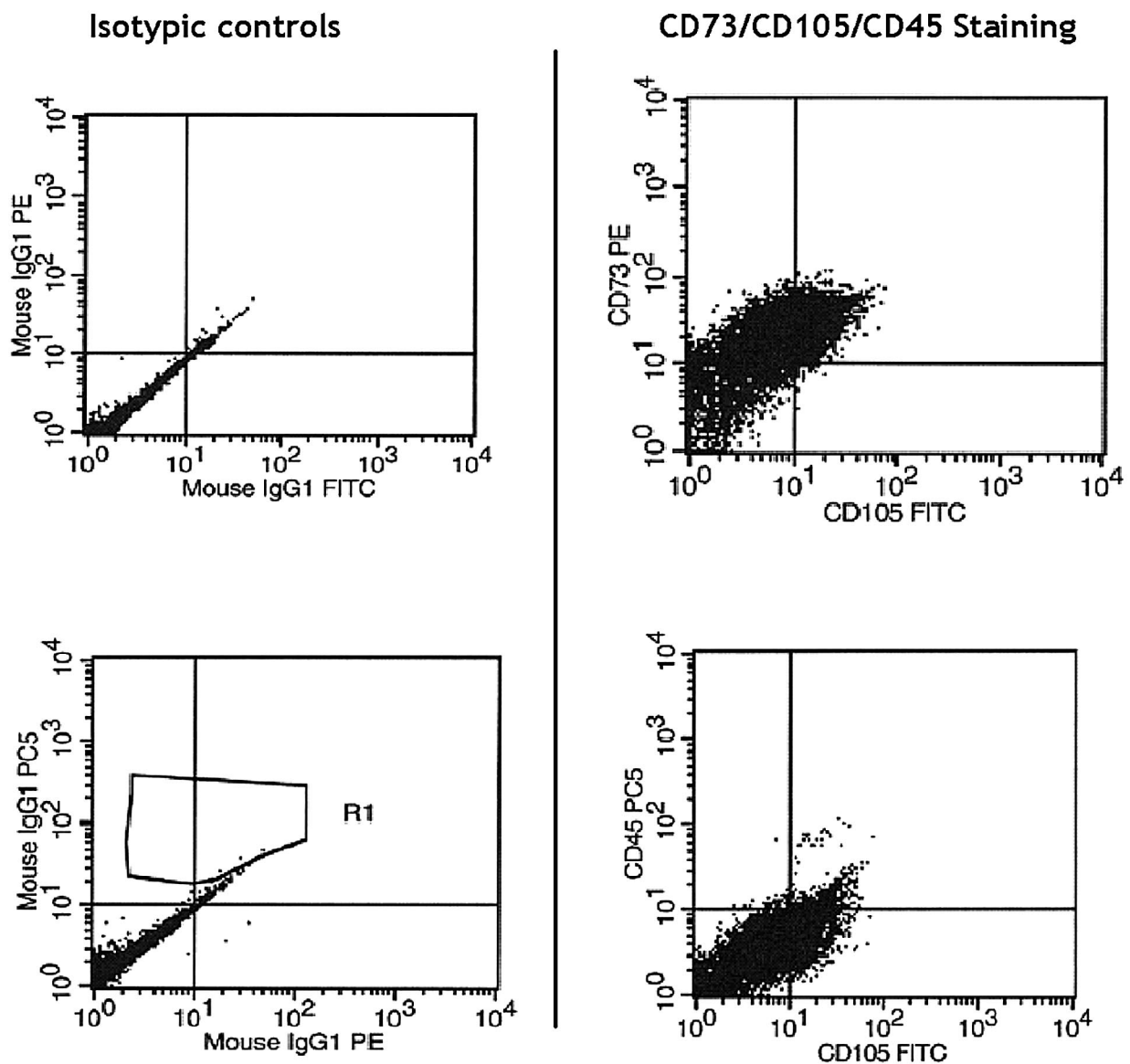
### Irradiation Induces Tissue Injuries in the Untransplanted NOD/SCID Controls as Shown by Histological Analysis

Fifteen days after a 3.5-Gy TBI, cellular depletion was observed in the spleen (Fig. 2A), and hemorrhage was observed in the BM (Fig. 2B). After 8-Gy abdominal irradiation, villus atrophy, marked crypt loss, and inflammatory infiltrate (Fig. 2C, green

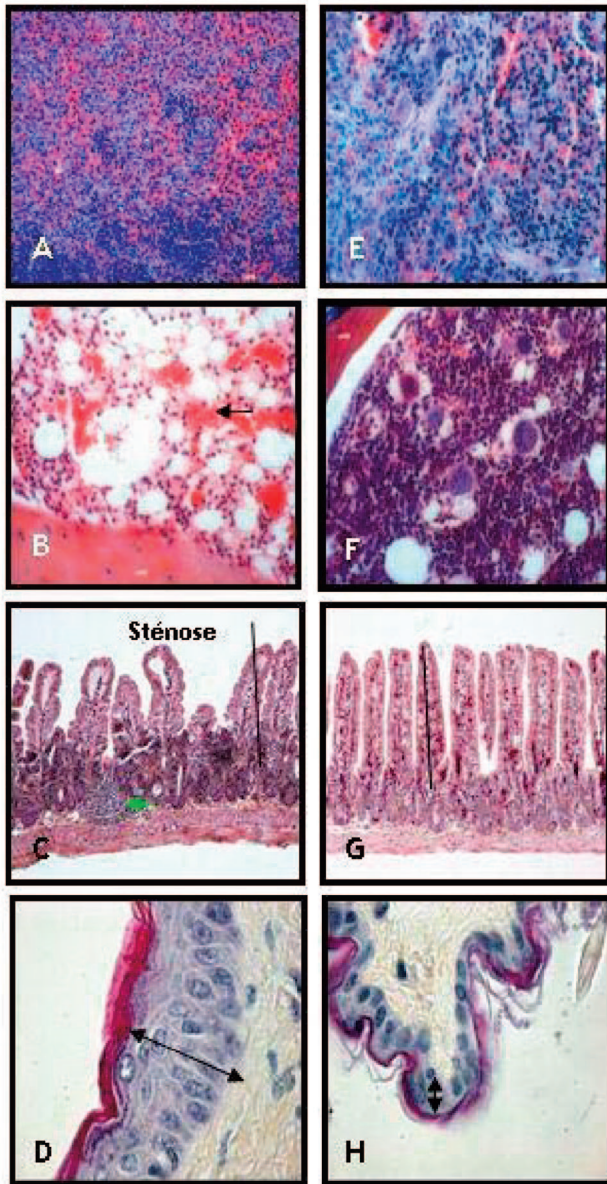
arrow) of the submucosal layer were observed. Local irradiation of the leg induced ulcerated zones and a modification of the thickness of dermis (Fig. 2D, black arrow) of the skin. No injury was observed in nonirradiated tissues (Fig. 2E–2H).

### Infused hMSCs Are Moderately Present in Unconditioned (Nonirradiated) NOD/SCID Mice Tissues

Quantitative PCR analysis indicated that after their infusion into nonirradiated animals ( $n = 10$ ), hMSCs homed to various tissues, albeit at a very low level. Human DNA accounted for engraftment of 0.06% hMSCs in lungs (Fig. 3B) and 0.14% in BM (Fig. 4D). No significant hMSC engraftment was found in the brain (Fig. 3A), kidneys (Fig. 5B), liver (Fig. 5A), gut (Fig.



**Figure 1.** FACS analysis. Determination of frequency of positive cells for specific markers of human mesenchymal stem cells at second passage, SH2 (CD105) and SH3 (CD73) and positive cells for CD45 (hematopoietic cell marker). Representative FACS plot analysis of the graft sample. Abbreviations: FACS, fluorescence-activated cell sorter; FITC, fluorescein isothiocyanate; IgG1, immunoglobulin G 1; PE, phycoerythrin.

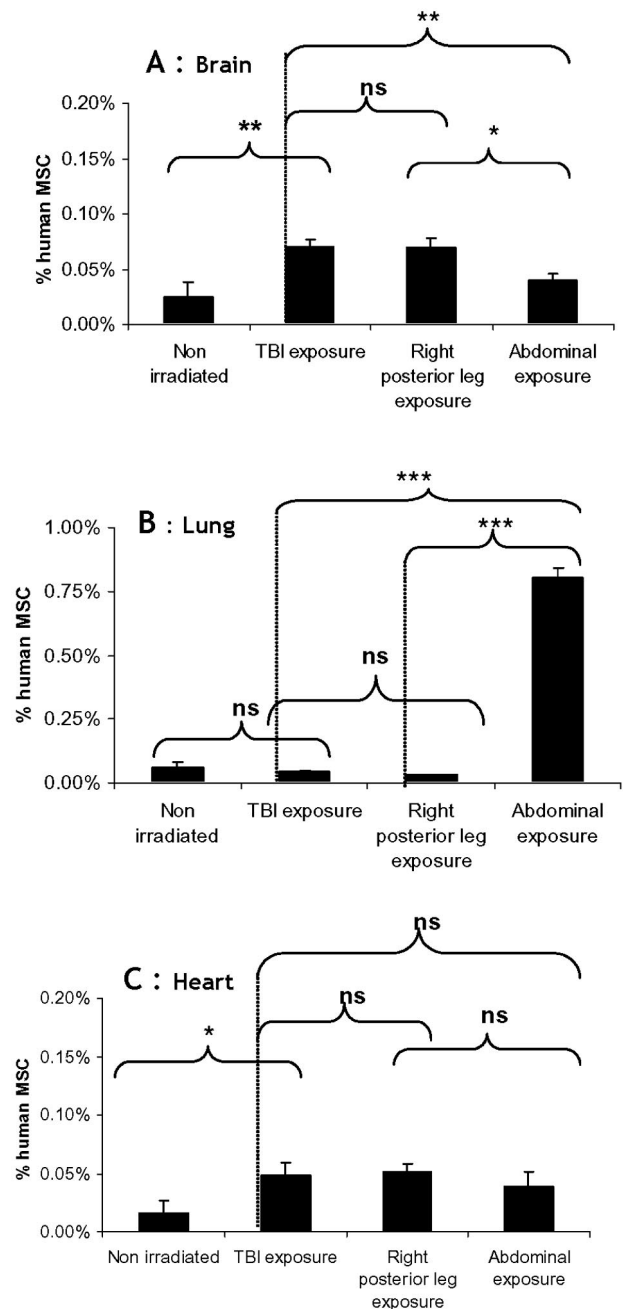


**Figure 2.** Histological examination of radiation exposed tissues by HES staining. (A): Spleen with cellular depletion. (B): Bone marrow with hemorrhage (black arrow). (C): Gut with villus atrophy and inflammatory infiltrates of the submucosal layer (green arrow). (D): modification of the thickness of dermis of irradiated right hind leg (black arrow). (E–H): Nonirradiated controls include spleen (E), bone marrow (F), gut (G), and skin (H).

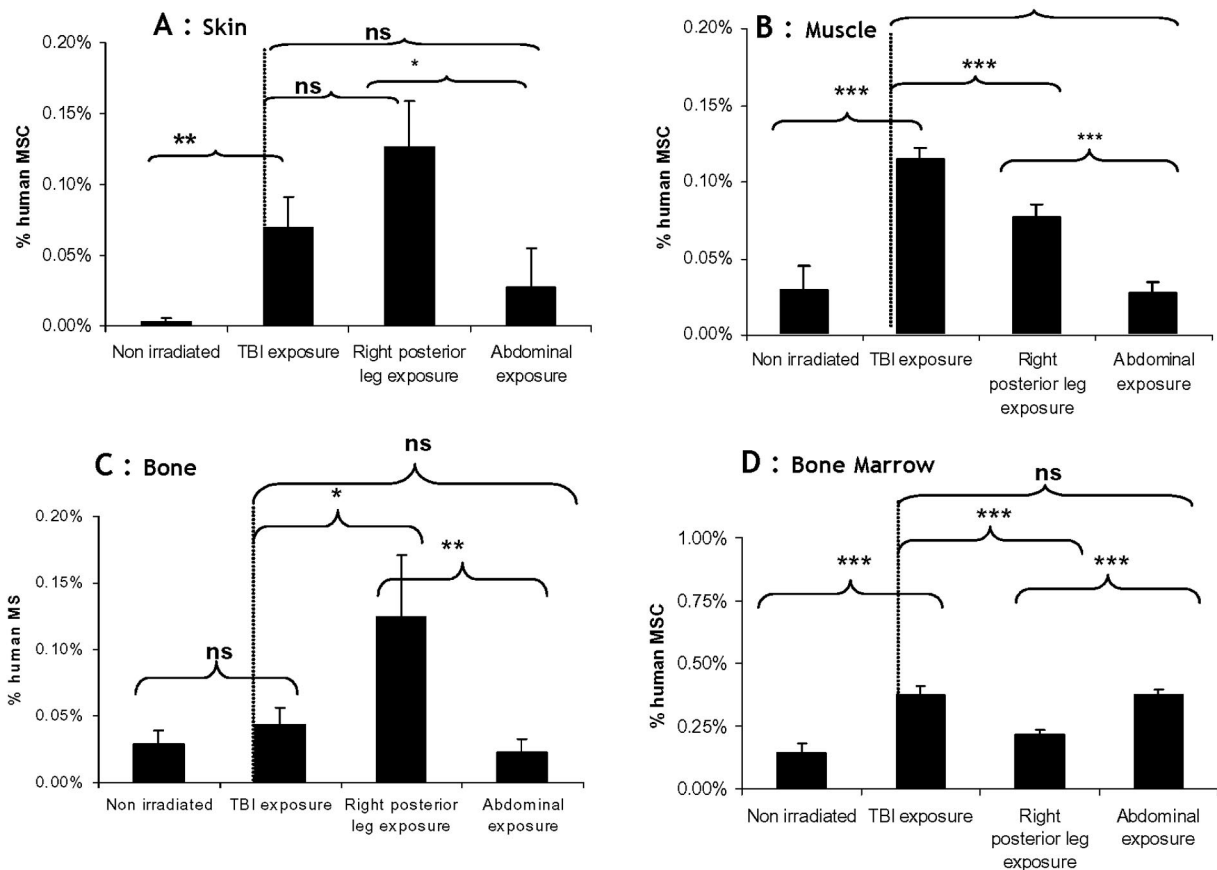
5E), stomach (Fig. 5C), heart (Fig. 3C), skin (Fig. 4A), muscle (Fig. 4B), bone (Fig. 4C), or peripheral blood.

### hMSCs Are Present to a Higher Level and in More Organs after TBI

Higher percentages of hMSCs were found in the brain (0.07%, Fig. 3A), heart (0.05%, Fig. 3C), liver (0.11%, Fig. 5A), BM (0.37%, Fig. 4D), and muscles (0.12%, Fig. 4B). TBI induced a 2.8-fold increase on engraftment levels of hMSCs in the brain ( $p < .05$ ), threefold in the heart ( $p < .05$ ), 2.5-fold in the liver ( $p < .05$ ), 2.6-fold in BM ( $p < .001$ ), and 1.7-fold in muscles



**Figure 3.** Comparison of implantations of hMSC in brain, lung, and heart tissues for mice irradiated according to three configurations of irradiation (TBI, IA, right posterior leg exposure or nonirradiated control mice). (A): hMSC engraftment rate was significantly increased in brain after irradiation, when compared with controls. (B): Abdominal irradiation significantly increased hMSC engraftment in lung when compared with other settings. (C): hMSC engraftment in heart tissues was significantly higher after irradiation of all type than in nonirradiated controls. All values were expressed as the mean and SEM. Significance for all analyses was set at  $p < .05$  (\*),  $p < .01$  (\*\*), and  $p < .001$  (\*\*\*)



**Figure 4.** Comparison of implantation of hMSC in right posterior leg tissues for mice irradiated according to three configurations of irradiation (TBI, IA, right posterior leg exposure) or nonirradiated control mice. **(A):** hMSC engraftment rate was significantly increased in skin after TBI or right leg exposure when compared with IA or nonirradiated controls. **(B):** hMSC engraftment rate was significantly increased in muscle after TBI or right leg exposure when compared with IA or nonirradiated controls. **(C):** hMSC engraftment rate in bone was significantly increased after posterior leg exposure when compared with other irradiation protocols or nonirradiated controls. **(D):** hMSC engraftment rate was significantly increased in the bone marrow after TBI or abdominal irradiation when compared with right hind leg exposure or nonirradiated controls. All values were expressed as the mean and SEM. Significance for all analysis was set at  $p < .05$  (\*),  $p < .01$  (\*\*), and  $p < .001$  (\*\*\*). Each group was constituted of 10 animals ( $n = 10$ ). Abbreviations: hMSC, human mesenchymal stem cell; MSC, mesenchymal stem cell; ns, nonsignificance; TBI, total body irradiation.

( $p < .05$ ) when compared with nonirradiated transplanted mice. TBI did not significantly increase hMSC frequency in the lungs (0.04%, Fig. 3B). We detected human  $\beta$ -GLOBIN gene in lung and heart, suggesting a blood vessel circulation of infused hMSCs after TBI and 14 days after infusion.

#### hMSCs Are Found Preferentially in Areas of the Body that Have Received the Highest Irradiation Dose

Figure 4 indicates the quantitative engraftment hMSCs in leg tissues, and Figure 5 indicates the levels of hMSC engraftment in abdominal tissues. Mice have received localized irradiation to the abdomen or the right leg in addition to TBI. Abdominal irradiation, as compared with right leg irradiation, increased hMSC engraftment in the exposed area by twofold in the gut ( $p < .001$ ) (Fig. 5E), 2.3-fold in the liver, and 9.3-fold in the spleen (Fig. 5A and 5D, respectively). In organs outside the abdomen, hMSC engraftment was increased by 1.8-fold in BM (Fig. 4D) and 11.6-fold in the lungs (Fig. 3B) ( $p < .05$ ).

Conversely, right leg irradiation, as compared with abdominal irradiation, increased hMSC engraftment in the exposed area by fivefold in the skin ( $p < .05$ ) and threefold in quadriceps muscles ( $p < .001$ ) (Fig. 4A and 4B, respectively).

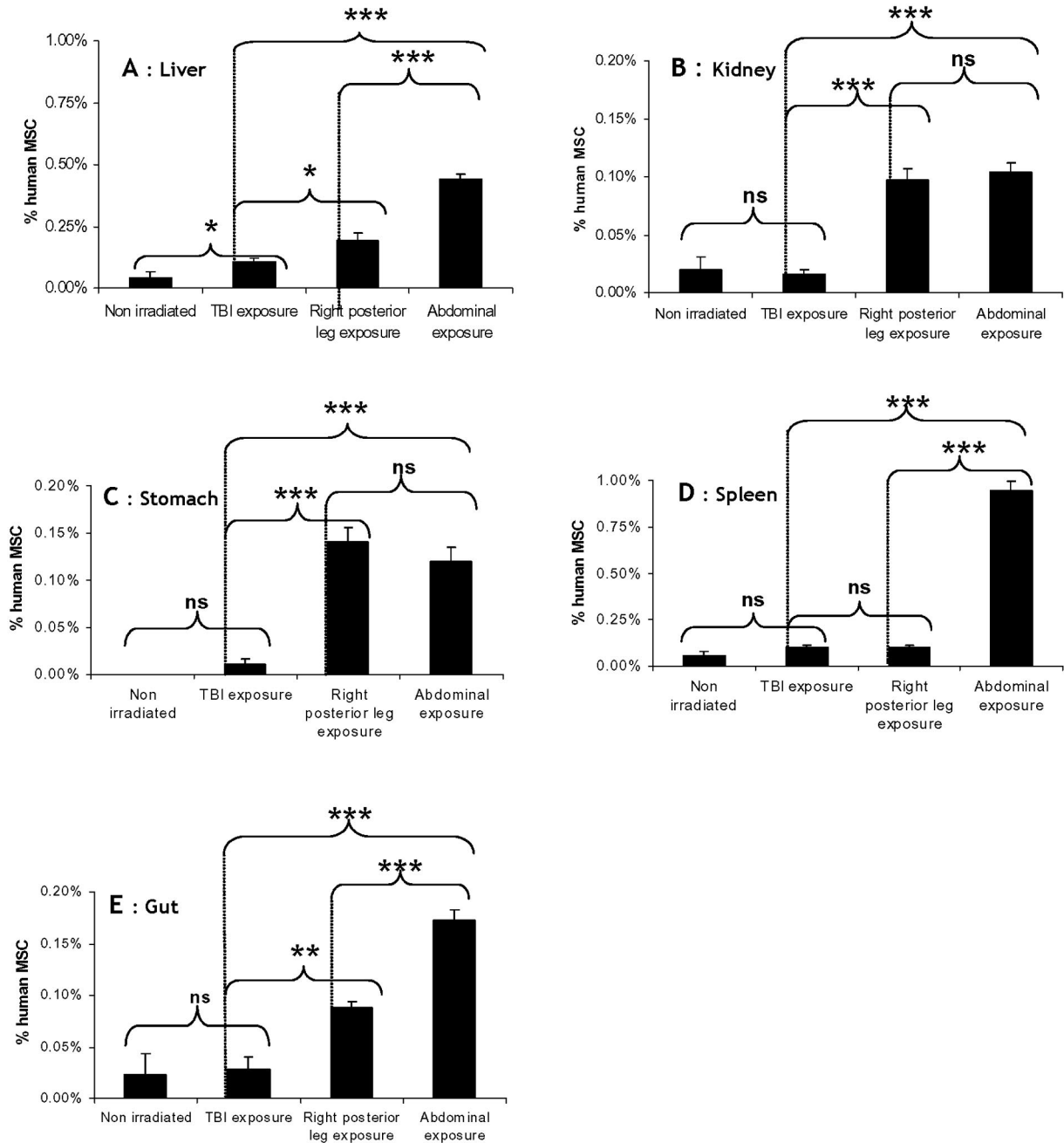
Neither of the localized irradiations significantly modified hMSC engraftment in stomach (Fig. 5C), kidney (Fig. 5B) or heart tissues (Fig. 3C).

The increased hMSC engraftments, in particular in the brain (Fig. 3A), after a 30-Gy irradiation of leg and an 8-Gy irradiation of the abdomen (2.2-fold,  $p < .05$ ) suggest a distant (absopal) effect of radiation damage.

#### Localization of hMSCs in Engrafted Tissues by Immunohistology and Comparison with PCR Analysis

To localize human cells in engrafted tissues, we performed immunohistologic experiments using a human  $\beta$ -2-microglobulin-specific antibody. Staining was carried out on the spleen of conditioned mice recipients and on lungs of animals irradiated locally. Cells expressing the human  $\beta$ -2-microglobulin were

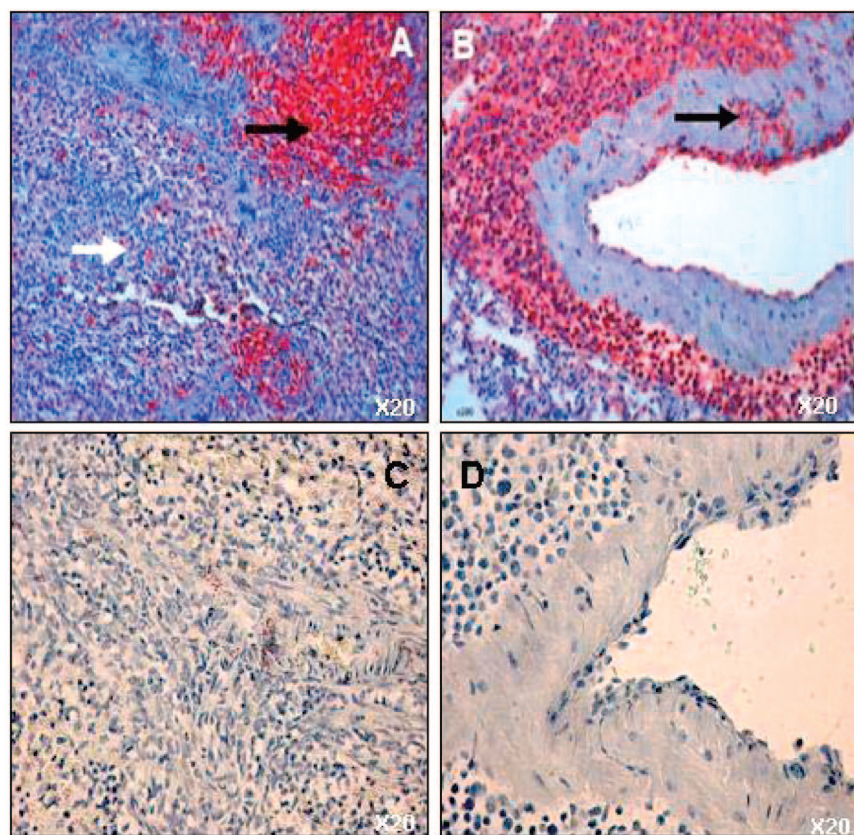




**Figure 5.** Comparison of implantations of hMSC in abdominal tissues for mice irradiated according to three configurations of irradiation (TBI, IA, and right posterior leg exposure) or nonirradiated control mice. **(A):** hMSC engraftment rate was significantly increased in liver when compared with controls. **(B):** Significantly increased hMSC engraftment was observed in kidney after both local irradiations, when compared with TBI or nonirradiated controls. **(C):** Significantly increased hMSC engraftment was observed in stomach after both local irradiations, when compared with TBI or nonirradiated controls. **(D):** Significantly increased hMSC engraftment was observed in spleen after abdominal irradiation when compared with TBI alone, right hind leg exposure or nonirradiated controls. **(E):** Significantly increased hMSC engraftment was observed in gut after right leg exposure or abdominal irradiation when compared with TBI or nonirradiated control. All values were expressed as the mean and SEM. Significance for all analyses was set at  $p < .05$  (\*),  $p < .01$  (\*\*), and  $p < .001$  (\*\*\*). Each group was constituted of 10 animals ( $n = 10$ ). Abbreviations: hMSC, human mesenchymal stem cell; IA, irradiation to the abdomen; MSC, mesenchymal stem cell; ns, nonsignificance; TBI, total body irradiation.

either insulated or gathered in clusters in the spleen. This positive result was related to 10% of the cells which recolonized the spleen on the total section 14 days after hMCS graft (Fig. 6A). We observed clusters of human  $\beta$ -2-microglobulin-positive cells in the lungs after abdominal exposure to radiation. These

aggregations were localized in perivascular position (Fig. 6B). Moreover, we observed the migration of human cells through the vascular wall and an intravascular colonization under intima. Figure 6C and 6D show a negative control corresponding to the spleen and lung. In limited perivascular areas of the lung, up to



**Figure 6.** Human  $\beta$ -2-microglobuline immunostaining in lung and spleen. The human cells expressing the human  $\beta$ -2-microglobulin are stained in red. **(A):** Spleen 15 days after total body irradiation (TBI). Human cells were insulated (white arrow) or gathered in cluster (black arrow) in contact with conjunctive structure of spleen. **(B):** Lung after localized radiation exposure, clusters of positive cells in perivascular position (black arrow) and passage of human cells through the vascular wall and an intravascular colonization. **(C):** Negative control (spleen) 15 days after TBI. **(D):** Negative control (lung) 15 days after TBI.

45%  $\pm$  2% of the cells stained positive for the human  $\beta$ -2-microglobulin. Nevertheless, in other lung areas, no human cell was detected. In contrast to immunohistochemistry analysis, quantitative PCR analysis indicated lower levels of engraftment. PCR is representative of larger sections of tissues both with high levels of implantation of hMSCs and areas with only mouse cells. We have not observed a large interanimal variability for hMSC engraftment in the brain and heart. In tissues such as the liver, the variability was slightly more important (Fig. 7).

## DISCUSSION

In the past decade, there has been considerable interest in the capacities of MSCs to increase hematopoietic recovery and contribute to tissue repair in humans. There have been reports on infusion of MSCs in patients with osteogenesis imperfecta and in animal models with myocardial infarction [31–33]. Other studies have addressed the contribution of the infusion of total BM which combines hematopoietic stem cells and MSCs.

We addressed the question of the potential therapeutic impact of the infusion of MSCs in the context of irradiation damage. We questioned the distribution of MSCs infused intravenously to various tissues in relation to the dose and the distribution of irradiation.

In an effort to answer this question, we built a preclinical model in which hMSCs were infused to NOD/SCID mice, without previous irradiation and after irradiation. Irradiation consisted of sublethal TBI at 3.5 Gy in all animals. To test the impact of localized additional lesions that potentially occur in humans after accidental irradiation (heterogeneous fields), we

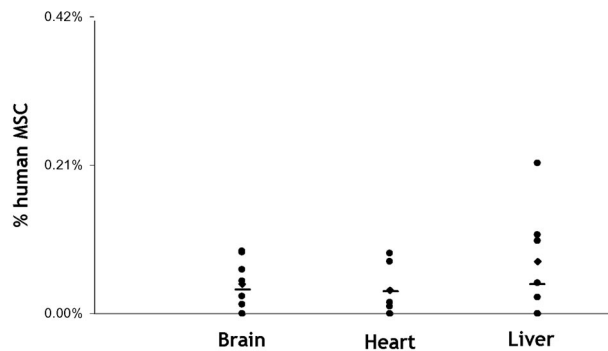
subjected one group to irradiation of the right hind leg (30 Gy) and another group to irradiation of the abdomen (8 Gy).

We used histology to check the presence of the expected radio-induced lesions in the irradiation fields. We quantified engraftment by PCR for human  $\beta$ -*GLOBIN* gene and identified human cells in engrafted tissues by immunohistology using a human  $\beta$ -2-microglobulin-specific antibody.

Our first observation was that in the absence of irradiation, hMSCs engrafted in the lungs and BM, albeit at a very low level. Previous studies have shown detection of MSCs in multiple tissues (e.g., bone, lungs, heart, liver, kidneys, and spleen) from the first hours to 7 days after systemic injection of murine MSCs (in the absence of previous irradiation) in nude mice and rats [4, 34]. In this study, however, 2 weeks after infusion, MSCs were detectable only in BM and spleen. Using hMSCs in NOD/SCID mice, we were able to detect hMSCs 14 days after infusion in various organs: The highest levels of MSC engraftment were detected in the lungs, muscles, and BM. Such results in BM are expected because it is the primary residence site for MSCs. A detectable engraftment of MSCs in the lungs might pertain to the incapacity of the larger MSCs to pass through the lung capillaries and/or to attach to endothelial cells in a receptor-mediated process [33].

Our second observation was the expected finding that TBI before hMSC infusion increased the levels of engraftment in several, although not all, tissues.

When dealing with additional irradiation at the two local sites (right hind leg and abdomen), the primary observation was that the hMSCs infused intravenously engrafted in all tissues



**Figure 7.** Interanimal variability for human mesenchymal stem cell (hMSC) engraftment. Polymerase chain reaction analysis of percentage of hMSC engraftment in the brain, heart, and liver of 10 animals. Percentage of hMSCs engrafted 15 days after total body irradiation.

involved in the local additional irradiation, at the highest levels observed. In this study, we detected a maximum rate of 0.94% of hMSCs in the spleen for animals receiving additional abdominal irradiation and 0.16% in the skin, 0.08% in the quadriceps muscle, and 0.12% into BM for animals receiving additional irradiation of the right hind leg. Previous studies have designed different models with local injuries generated in mice by means other than irradiation (e.g., chemical damage to alter lungs [35] or muscle [18, 36], coronary ligation to induce myocardial infarction [19, 20, 31, 37, 38], partial hepatectomy with 2-acetyl-aminofluorene to prevent hepatocyte division [14, 38], spinal cord surgical injury [11], or use of genetically deficient animals [9, 10, 12, 13, 39]). In all these models, with the exception of the work by Bolno et al., MSCs have been administered locally and not intravenously and in addition have been of murine and not human origin [3]. These studies have shown local engraftment of MSCs in injured tissues and their contribution to tissue repair by differentiation [6, 39–41].

The most relevant observation is that after additional local irradiation, the levels of hMSC engraftment increased not only at the sites of local irradiation, as mentioned above, but in all distant organs or tissues tested outside the local irradiation fields as well. This suggests mobilization induced by cytokines and potentially specific homing induced by chemokines, all released by inflammation [42, 43].

In the described experiments after irradiation and hMSC transplant, most of the implanted human cells were found in weakly damaged areas. In a different set of experiments in a nonhuman primate model submitted to mixed  $\gamma$ -neutron irradiation and infused with green fluorescent protein-labeled non-human primate MSCs, we observed that MSCs engrafted preferentially in regenerating tissues [44]. These results suggest that MSCs may participate in the preservation of the targeted tissues. Whether MSC engraftment in irradiated tissues improves their functional recovery remains to be studied. For these future studies, the knowledge of the influence of the pluripotentiality, replicative capacity, and “stemness” of the stroma-derived cells or their engraftment potential is a prerequisite. The comparison of the engraftment of cell populations with various differentiation abilities will offer important insight concerning the future of the clinical use of MSCs.

In our view, this work supports the use of MSC infusion to repair damaged tissues in patients after accidental irradiation and may be used in patients who will undergo controlled radiotherapy for the treatment of solid tumors.

#### ACKNOWLEDGMENTS

We thank Patrice Richard and Magali Leroy for their helpful contributions. This study was supported by grants from Electricité de France and the Région Ile de France.

#### DISCLOSURES

The authors indicate no potential conflicts of interest.

#### REFERENCES

- Deans RJ, Moseley AB. Mesenchymal stem cells: Biology and potential clinical uses. *Exp Hematol* 2000;28:875–884.
- Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC et al. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science* 1999;284:143–147.
- Bolno PB, Wechsler A, Kresh JY. Chemokine induced migration of human mesenchymal stem cells: A strategy for directing cardiac repair. *J Am Coll Surg* 2004;199:33.
- Erices AA, Allers CI, Conget PA et al. Human cord blood-derived mesenchymal stem cells home and survive in the marrow of immunodeficient mice after systemic infusion. *Cell Transplant* 2003;12:555–561.
- Almeida-Porada G, Zanjani ED. A large animal noninjury model for study of human stem cell plasticity. *Blood Cells Mol Dis* 2004;32:77–81.
- Allers C, Sierralta WD, Neubauer S et al. Dynamic of distribution of human bone marrow-derived mesenchymal stem cells after transplantation into adult unconditioned mice. *Transplantation* 2004;78:503–508.
- Bensidhoum M, Chapel A, Francois S et al. Homing of in vitro expanded Stro-1<sup>-</sup> or Stro-1<sup>+</sup> human mesenchymal stem cells into the NOD/SCID mouse and their role in supporting human CD34 cell engraftment. *Blood* 2004;103:3313–3319.
- Devine SM, Cobbs C, Jennings M et al. Mesenchymal stem cells distribute to a wide range of tissues after systemic infusion into nonhuman primates. *Blood* 2003;101:2999–3001.
- Horwitz EM, Prockop DJ, Fitzpatrick LA et al. Transplantability and therapeutic effects of bone marrow-derived mesenchymal cells in children with osteogenesis imperfecta. *Nat Med* 1999;5:309–313.
- Schwarz EJ, Alexander GM, Prockop DJ et al. Multipotential marrow stromal cells transduced to produce L-DOPA: Engraftment in a rat model of Parkinson disease. *Hum Gene Ther* 1999;10:2539–2549.
- Chopp M, Zhang XH, Li Y et al. Spinal cord injury in rat: Treatment with bone marrow stromal cell transplantation. *Neuroreport* 2000;11:3001–3005.
- Li Y, Chen J, Chen XG et al. Human marrow stromal cell therapy for stroke in rat: Neurotrophins and functional recovery. *Neurology* 2002;59:514–523.
- Jin HK, Carter JE, Huntley GW et al. Intracerebral transplantation of mesenchymal stem cells into acid sphingomyelinase-deficient mice delays the onset of neurological abnormalities and extends their life span. *J Clin Invest* 2002;109:1183–1191.
- Wang X, Montini E, Al-Dhalimy M et al. Kinetics of liver repopulation after bone marrow transplantation. *Am J Pathol* 2002;161:565–574.
- Sato Y, Araki H, Kato J et al. Human mesenchymal stem cells xenografted directly to rat liver are differentiated into human hepatocytes without fusion. *Blood* 2005;106:756–763.
- Jiang Y, Jahagirdar BN, Reinhardt RL et al. Pluripotency of mesenchymal stem cells derived from adult marrow. *Nature* 2002;418:41–49.

- 17 Barry FP, Murphy JM. Mesenchymal stem cells: Clinical applications and biological characterization. *Int J Biochem Cell Biol* 2004;36:568–584.
- 18 [Ferrari G, Cusella-De Angelis G, Coletta M et al. Muscle regeneration by bone marrow-derived myogenic progenitors. \*Science\* 1998;279:1528–1530.](#)
- 19 Toma C, Pittenger MF, Cahill KS et al. Human mesenchymal stem cells differentiate to a cardiomyocyte phenotype in the adult murine heart. *Circulation* 2002;105:93–98.
- 20 Pittenger MF, Martin BJ. Mesenchymal stem cells and their potential as cardiac therapeutics. *Circ Res* 2004;95:9–20.
- 21 Kurozumi K, Nakamura K, Tamiya T et al. Mesenchymal stem cells that produce neurotrophic factors reduce ischemic damage in the rat middle cerebral artery occlusion model. *Mol Ther* 2005;11:96–104.
- 22 Silva GV, Litovsky S, Assad JA et al. Mesenchymal stem cells differentiate into an endothelial phenotype, enhance vascular density, and improve heart function in a canine chronic ischemia model. *Circulation* 2005;111:150–156.
- 23 Mahmud N, Pang W, Cobbs C et al. Studies of the route of administration and role of conditioning with radiation on unrelated allogeneic mismatched mesenchymal stem cell engraftment in a nonhuman primate model. *Exp Hematol* 2004;32:494–501.
- 24 Abbott JD, Huang Y, Liu D et al. Stromal cell-derived factor-1alpha plays a critical role in stem cell recruitment to the heart after myocardial infarction but is not sufficient to induce homing in the absence of injury. *Circulation* 2004;110:3300–3305.
- 25 Neuss S, Becher E, Woltje M et al. Functional expression of HGF and HGF receptor/c-met in adult human mesenchymal stem cells suggests a role in cell mobilization, tissue repair, and wound healing. *STEM CELLS* 2004;22:405–414.
- 26 Lapidot T, Petit I. Current understanding of stem cell mobilization: The roles of chemokines, proteolytic enzymes, adhesion molecules, cytokines, and stromal cells. *Exp Hematol* 2002;30:973–981.
- 27 Krampera M, Glennie S, Dyson J et al. Bone marrow mesenchymal stem cells inhibit the response of naive antigen specific T-cells to their cognate peptide. *Blood* 2003;101:3722–3729.
- 28 Grinnemo KH, Mansson A, Dellgren G et al. Xenoreactivity and engraftment of human mesenchymal stem cells transplanted into infarcted rat myocardium. *J Thorac Cardiovasc Surg* 2004;127:1293–1300.
- 29 Heid CA, Stevens J, Livak KJ et al. Real time quantitative PCR. *Genome Res* 1996;6:986–994.
- 30 Lee RH, Kim B, Choi I et al. Characterization and expression analysis of mesenchymal stem cells from human bone marrow and adipose tissue. *Cell Physiol Biochem* 2004;14:311–324.
- 31 [Kinnaird T, Stabile E, Burnett MS et al. Local delivery of marrow-derived stromal cells augments collateral perfusion through paracrine mechanisms. \*Circulation\* 2004;109:1543–1549.](#)
- 32 Shake JG, Gruber PJ, Baumgartner WA et al. Mesenchymal stem cell implantation in a swine myocardial infarct model: Engraftment and functional effects. *Ann Thorac Surg* 2002;73:1919–1925; discussion 1926.
- 33 Tang YL, Zhao Q, Zhang YC et al. Autologous mesenchymal stem cell transplantation induce VEGF and neovascularization in ischemic myocardium. *Regul Pept* 2004;117:3–10.
- 34 Gao J, Dennis JE, Muzic RF et al. The dynamic in vivo distribution of bone marrow-derived mesenchymal stem cells after infusion. *Cells Tissues Organs* 2001;169:12–20.
- 35 [Ortiz LA, Gambelli F, McBride C et al. Mesenchymal stem cell engraftment in lung is enhanced in response to bleomycin exposure and ameliorates its fibrotic effects. \*Proc Natl Acad Sci U S A\* 2003;100:8407–8411.](#)
- 36 [Santa Maria L, Rojas CV, Minguell JJ. Signals from damaged but not undamaged skeletal muscle induce myogenic differentiation of rat bone-marrow-derived mesenchymal stem cells. \*Exp Cell Res\* 2004;300:418–426.](#)
- 37 Min JY, Sullivan MF, Yang Y et al. Significant improvement of heart function by cotransplantation of human mesenchymal stem cells and fetal cardiomyocytes in postinfarcted pigs. *Ann Thorac Surg* 2002;74:1568–1575.
- 38 [Bittira B, Shum-Tim D, Al-Khalidi A et al. Mobilization and homing of bone marrow stromal cells in myocardial infarction. \*Eur J Cardiothorac Surg\* 2003;24:393–398.](#)
- 39 [Jiang Y, Vaessen B, Lenvik T et al. Multipotent progenitor cells can be isolated from postnatal murine bone marrow, muscle, and brain. \*Exp Hematol\* 2002;30:896–904.](#)
- 40 Satoh H, Kishi K, Tanaka T et al. Transplanted mesenchymal stem cells are effective for skin regeneration in acute cutaneous wounds. *Cell Transplant* 2004;13:405–412.
- 41 Herrera MB, Bussolati B, Bruno S et al. Mesenchymal stem cells contribute to the renal repair of acute tubular epithelial injury. *Int J Mol Med* 2004;14:1035–1041.
- 42 [Van der Meeren A, Mouthon MA, Vandamme M et al. Combinations of cytokines promote survival of mice and limit acute radiation damage in concert with amelioration of vascular damage. \*Radiat Res\* 2004;161:549–559.](#)
- 43 Grimm PC, Nickerson P, Jeffery J et al. Neointimal and tubulointerstitial infiltration by recipient mesenchymal cells in chronic renal-allograft rejection. *N Engl J Med* 2001;345:93–97.
- 44 Chapel A, Bertho JM, Bensidhoum M et al. Mesenchymal stem cells home to injured tissues when co-infused with haematopoietic cells to treat a radiation-induced multi-organ failure syndrome. *J Gene Med* 2003;5:1028–1038.

**Local Irradiation Not Only Induces Homing of Human Mesenchymal Stem Cells at Exposed Sites but Promotes Their Widespread Engraftment to Multiple Organs: A Study of Their Quantitative Distribution After Irradiation Damage**

Sabine François, Morad Bensidhoum, Moubarak Mouiseddine, Christelle Mazurier, Bénédicte Allenet, Alexandra Semont, Johanna Frick, Amandine Saché, Sandrine Bouchet, Dominique Thierry, Patrick Gourmelon, Norbert-Claude Gorin and Alain Chapel

*Stem Cells* 2006;24:1020-1029; originally published online Dec 8, 2005;  
DOI: 10.1634/stemcells.2005-0260

**This information is current as of June 28, 2006**

**Updated Information  
& Services**

including high-resolution figures, can be found at:  
<http://www.StemCells.com/cgi/content/full/24/4/1020>

 **AlphaMed Press**

See discussions, stats, and author profiles for this publication at: <https://www.researchgate.net/publication/6171153>

# Immunosuppressive Effects of Mesenchymal Stem Cells: Involvement of HLA-G

Article in *Transplantation* · August 2007

DOI: 10.1097/01.tp.0000267918.07906.08 · Source: PubMed

CITATIONS

237

READS

504

11 authors, including:



[Aisha Nasef](#)

UPMC

11 PUBLICATIONS 601 CITATIONS

[SEE PROFILE](#)



[Alain Chapel](#)

Institut de Radioprotection et de Sûreté Nu...

111 PUBLICATIONS 2,746 CITATIONS

[SEE PROFILE](#)



[Mazurier Christelle](#)

Pierre and Marie Curie University - Paris 6

35 PUBLICATIONS 1,633 CITATIONS

[SEE PROFILE](#)



[Loïc Fouillard](#)

Groupe Hospitalier Est Francilien

112 PUBLICATIONS 3,674 CITATIONS

[SEE PROFILE](#)

Some of the authors of this publication are also working on these related projects:



Clinical Trial Cell therapy of Chronic Radiotherapy-induced Abdomino-pelvic Complications (Pelvic Radiation Disease, PRD) Refractory to Standard Therapy ClinicalTrials.gov Identifier: NCT02814864

[View project](#)



molecular diagnostic en d cell therapy [View project](#)

All content following this page was uploaded by [Alain Chapel](#) on 21 April 2017.

The user has requested enhancement of the downloaded file. All in-text references [underlined in blue](#) are added to the original document and are linked to publications on ResearchGate, letting you access and read them immediately.

# Immunosuppressive Effects of Mesenchymal Stem Cells: Involvement of HLA-G

Aisha Nasef,<sup>1</sup> Noelle Mathieu,<sup>2</sup> Alain Chapel,<sup>2</sup> Johanna Frick,<sup>2</sup> Sabine François,<sup>2</sup> Christelle Mazurier,<sup>1</sup> Asma Boutarfa,<sup>2</sup> Sandrine Bouchet,<sup>1</sup> N-Claude Gorin,<sup>1</sup> Dominique Thierry,<sup>2</sup> and Loïc Fouillard<sup>1,3</sup>

**Introduction.** Mesenchymal stem cells (MSCs) possess unique immunomodulatory properties. They are able to suppress allogenic T-cell response and modify maturation of antigen-presenting cells. Their role in the treatment of severe graft versus host disease has been reported. The underlying molecular mechanisms of immunosuppression are currently being investigated. Histocompatibility locus antigen (HLA)-G is a nonclassical major histocompatibility complex class I antigen with strong immune-inhibitory properties.

**Methods.** We studied the role of HLA-G on MSC-induced immunosuppression. The expression of HLA-G on human MSCs cultured alone and in mixed lymphocytes reaction (MSC/MLR) was analyzed.

**Results.** We found that HLA-G can be detected on MSCs by real-time reverse-phase polymerase chain reaction, immunofluorescence, flow cytometry ( $52.4 \pm 3.6\%$ ), and enzyme-linked immunosorbent assay in the supernatant ( $38.7 \pm 5.2$  ng/mL). HLA-G protein expression is constitutive and the level is not modified upon stimulation by allogenic lymphocytes in MSC/MLR. The functional role of HLA-G protein expressed by MSCs was analyzed using the 87G anti-HLA-G blocking antibody in a MSC/MLR. We found that blocking HLA-G molecule significantly raised lymphocyte proliferation in MSC/MLR ( $35.5\%$ ,  $P=0.01$ ).

**Conclusion.** Our findings provide evidences supporting involvement of HLA-G in the immunosuppressive properties of MSCs. These results emphasize the potential application of MSCs as a relevant therapeutic candidate in transplantation.

**Keywords:** Mesenchymal stem cell, Immunosuppression, Mixed lymphocytes reaction, Histocompatibility locus antigen-G, Graft versus host disease.

(*Transplantation* 2007;84: 231–237)

Experimental evidence and preliminary clinical studies have demonstrated that human bone marrow stromal cells, referred as mesenchymal stem cells (MSCs), have an important immunomodulatory function in the management of allogeneic hematopoietic stem cell (HSC) transplantation (1). Injection of MSCs could cure severe graft versus host disease (GVHD) (2, 3) and promote hematopoietic recovery (4, 5). Furthermore, MSC injection in immunocompetent baboons prolonged skin allograft survival (6).

MSC-mediated inhibition of immune response is a complex mechanism that involves changes in the maturation of antigen-presenting cells (7) as well as suppression of differentiation and function of monocyte derived dendritic cells (DCs) (8). Furthermore, MSCs altered the cytokine secretion profile of naïve DC, effector T cells, and natural killer cells (NKs) and modified the proinflammatory TH1 profile towards TH2 anti-inflammatory profile. These properties could be useful for the prevention and treatment of GVHD and the inhibition of graft rejection (9).

MSCs exert profound immunosuppression by inhibiting T-cell proliferation in response to various stimuli in vitro (10). They induce regulatory immunosuppressive lymphocytes (9) and CD8 apoptosis (11). MSCs inhibit cell cycle progression (12) and CD4 allo-proliferation (10). This immunosuppressive effect of MSCs is mediated through several inducible soluble factors, such as transforming growth factor- $\beta$  (10), hepatocyte growth factor (10), interleukin-10 (IL-10) (7), prostaglandin E2 (PGE2) (9), and indoleamine 2,3-dioxygenase (IDO) (13). In these studies, a partial reversion of the MSC inhibitory effect on T-cell proliferation was demonstrated.

Natural processes allow fetal allografts to evade from rejection by the mother. This phenomenon is partially dependant on histocompatibility locus antigen (HLA)-G molecules (14). HLA-G is a nonclassical major histocompatibility complex (MHC) class I, which is expressed in both membrane-bound and soluble isoforms. Both of them can display tolerogenic properties via interaction with inhibitory receptors on DC, NK, and T cells. Soluble HLA-G exerts an immunosuppressive effect by inducing apoptosis of CD8+ T cells and down modulating CD4+ T cells proliferation. Membrane-bound HLA-G protein has been shown to inhibit NK cells and T cell-mediated cytotoxicity, to suppress proliferation of allo-specific CD4+ T lymphocytes and to induce TH2 cytokine profile. For review, see (15). Furthermore, a good correlation between HLA-G expression and graft acceptance has been evidenced (16).

Production of HLA-G protein by adult MSCs had never been demonstrated. We investigated whether HLA-G was expressed by MSCs and contributed to MSC-mediated inhibition of immune response in vitro. We report here that MSCs express HLA-G protein and demonstrate that HLA-G is involved in MSC-mediated lymphocytes proliferation inhibition.

Supported by grants from the "Comité de Radioprotection, EDF" and EEC IP FIRST No.: LSHC-CT-2004-503436.

A.N. and N.M. contributed equally to this work.

<sup>1</sup> Inserm, U832, Université Pierre et Marie Curie-Paris6, Paris, France.

<sup>2</sup> Laboratory of Cell Therapy and Radioprotection of Accidents DRPH/SRBE/LTCRA, Cedex, France.

<sup>3</sup> Address correspondence to: Loïc Fouillard, M.D., Ph.D., EA1638 Hematology and Cellular Therapy Department, Faculty of Medicine Saint Antoine, Université Paris VI, 27 rue de Chaligny, 75012 Paris, France.

E-mail: loic.fouillard@sat.aphp.fr

Received 12 February 2007. Revision requested 21 March 2007.

Accepted 11 April 2007.

Copyright © 2007 by Lippincott Williams & Wilkins

ISSN 0041-1337/07/8402-231

DOI: 10.1097/01.tp.0000267918.07906.08

## MATERIALS AND METHODS

### Isolation and Culture of Human Bone Marrow (BM) MSCs

BM cells were obtained after informed consent of patients undergoing total hip replacement surgery and were used in accordance with the procedures approved by the human experimentation and ethic committees of Hospital St Antoine (France). Ten to twenty milliliters of BM were harvested in  $\alpha$ -minimum essential medium (MEM; Invitrogen, Cergy, France) supplemented with heparin. Total cells were isolated from bone fragments after two rounds of mechanical extraction/sedimentation. The recovered cells were centrifuged and resuspended in culture medium. Nucleated cells were counted after red cells lysis by acetic acid. Then, the nucleated cells were plated at 50,000 cells/cm<sup>2</sup> in  $\alpha$ -MEM supplemented with 10% fetal calf serum (research-grade FCS, Hyclone, Perbio, France), 1% L-glutamine, 1% penicillin streptomycin, and 1 ng/mL betaFGF (Sigma, France) referred as FCS- $\alpha$ MEM. FCS- $\alpha$ MEM corresponds to the culture techniques used in clinics (17). To study the importance of culture conditions for HLA-G protein expression,  $\alpha$ -MEM medium supplemented with platelet lysate from platelet-rich plasma (PRP- $\alpha$ MEM) was used in comparison with FCS- $\alpha$ MEM. For the culture in PRP- $\alpha$ MEM, the cells were plated at 2.10<sup>5</sup> cells/cm<sup>2</sup> in  $\alpha$ -MEM, 1% L-glutamine, 1% penicillin streptomycin, heparin 2U/mL, and 5% of platelet lysate from PRP as previously published (18). Culture flasks were incubated at 37°C with 5% CO<sub>2</sub> in humidified atmosphere. After 72 hr, nonadherent cells were removed, and the medium was replaced twice a week until the 90% of confluence was reached. Then, cells were detached using 0.25% trypsin (Stem Cell Technologies), and passaged up to passage 4 (P4). The cells were characterized by phenotypic analysis, and ability to differentiate into adipocytic, chondrocytic and osteocytic lineages as previously described (19).

### Antibodies, Flow Cytometry, and Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA)

At each passage, the cells were characterized using monoclonal antibodies specific for CD105 (SEROTEC, France), CD73 (BD Pharmingen, France), and CD45 (Beckman Coulter, France) conjugated with FITC, PE, and PC5, respectively. Acquisitions and data analysis were performed using the flow cytometer FACScalibur (BD Biosciences) and CELLquest software (Becton Dickinson). For HLA-G analysis we used the mouse anti HLA-G1/G5 MEMG/9 FITC antibody (Exbio, Praha, Czech Republic) at 1/500 final concentration. For all analysis isotypic controls were systematically included. Intracellular staining was performed using the Cytofix/cytoperm kit (BD Biosciences) according to the recommended conditions. To detect soluble HLA-G molecule in culture supernatant we performed an ELISA coated with the same MEMG/9 antibody, according to the manufacturer's instructions (Exbio, Praha, Czech Republic). Functional assessment of HLA-G activity was performed using (87 G) anti HLA-G blocking antibody (Exbio, Praha, Czech Republic, 10-437-C100).

### Semiquantitative Real-Time Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction (RT-PCR)

Total RNA was prepared from MSCs using the Trizol method according to the manufacturer's instructions (Invitrogen, Paisley, Scotland). A total of 1  $\mu$ g of DNase treated RNA was transcribed into cDNA using 200 units of SuperScript II reverse transcriptase (Invitrogen, Groningen, Netherlands) and 150 ng of random primers (Invitrogen). PCRs were performed in duplicate using the SYBR green Master Mix according to the manufacturer's instructions (Applied Biosystems, Foster City CA USA). *GAPDH* (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, access number NM002046) was used as a reference gene. *GAPDH* gene forward GAAGGTGAAGGTCG-GAGTC and reverse primer GAAGATGGTGATGGGATTTC and *HLA-G* genes (access number X17273) forward primer ACCATCCCCATCAGGTATC and reverse primer ACCG-CAGCTCCAGTGACTACA were designed on Primer Express™ software (Applied Biosystems). Primers sequences were checked for theoretical target genes specificity on BLAST2. The specificity of PCR products was checked with melting temperature dissociation software (Applied Biosystems). We used universal RNA control (Clontech Universal Reference Total RNA, Clontech) to prepare standard curve. Then sample quantity is determined from the standard curve. We calculated the average of HLA-G value from six healthy donors in duplicate using equation of standard curve.

### Immunofluorescence

MSCs were cultured on Labtek chamber slide system (Nunc) up to 80% confluence. After three washes in phosphate-buffered saline 1 $\times$ , the cells were fixed for 20 min in 4% paraformaldehyde. Permeabilization and blocking were done with 0.3% Triton X-100, 1% BSA, and 10% SVF in phosphate-buffered saline 1 $\times$  during 45 min at room temperature. MSCs and positive control were incubated with the 87G (Exbio, Praha, Czech Republic) primary antibody (1/50) in 300  $\mu$ L of the same buffer without Triton X-100 for 4 hr at room temperature. After washing, cells were incubated with the secondary fluorescent antibody diluted at 1/100 for 1 hr. To visualize nuclei, slides were mounted with 10  $\mu$ L DAPI anti fading and visualized on microscope.

### Peripheral Blood Mononuclear Cells (PBMCs) Proliferation Assay

Human PBMCs from two different donors were isolated from heparinized blood by gradient centrifugation on a Ficoll solution (density 1.077 g/mL, Biochrom, Germany) at 400g for 20 min at room temperature. Stimulator PBMCs were treated by mitomycin at 25  $\mu$ g/mL for 30 min at 37°C (Sigma, Isle d'Abeau, France). Cell count and viability were assessed by trypan blue dye exclusion, and then used directly in mixed lymphocyte reaction (MLR).

Human MSCs were plated in triplicate at passage 2 onto U-bottomed 96-well plates at 10<sup>5</sup> cells/mL in 100  $\mu$ L of FCS- $\alpha$ MEM and were allowed to adhere to the plate for 1 to 2 hr. Human responder (10<sup>5</sup> PBMCs) and an equal number of stimulator PBMCs were added to wells in 100  $\mu$ L of RPMI 1640 (Invitrogen, Cergy, France) 10% inactivated FCS (Sigma, France). Cultures were incubated at 37°C in 5% CO<sub>2</sub>.



for 5 days and then pulsed with thymidine for the final 18 hr (1  $\mu$ Ci per well, Amersham Pharmacia). Thymidine incorporated in DNA was recovered on filters, counted, and expressed in count per minute. Donors are different for MSCs, responder or stimulator PBMCs.

### HLA-G Functional Assay

To test the ability of anti HLA-G blocking antibody (87G) to restore lymphocyte proliferation, the same procedures were followed with addition of 3  $\mu$ g/well of 87G antibody (concentration of 1 mg/mL), as previously described (20), on the first day of the MSC/MLR cultures (9 MSC donors). We performed an antibody titration for optimal concentration at 3, 6, 9, and 12  $\mu$ L per well. We confirmed that the dose of 3  $\mu$ L was optimal and the upper doses (6, 9, 12  $\mu$ L) did not increase the restoration.

### Statistical Analysis

The statistical analysis was performed with the statistical package for the social sciences (SPSS Institute, Chicago, IL) version 10. Statistical significance was calculated using *t* test analyses. Significance was set at  $P < 0.05$  (\*). All values were expressed as the mean and SEM (standard error of the mean). Twenty different MSC samples were used to evaluate the difference in the percentage of intracellular and membrane bound HLA-G in MSC/MLR. As well, lymphocyte proliferation in the presence or absence of HLA-G blocking antibody was compared from nine individually acquired MSC samples. Finally, the percentage of HLA-G positive MSC was determined through up to four successive in vitro passages from six independent samples.

## RESULTS

### MSC Characteristics

Primary human MSCs were generated from adherent fraction of bone marrow of healthy donors. At each passage the percentage of CD105, CD73 and the absence of the hematopoietic marker CD45 were analyzed. At the end of the second passage MSCs were negative for hematopoietic antigens CD45 (0.96%) and they expressed antigens known to be present in MSCs: CD73 (80.45  $\pm$  6.27%) and CD105 (97.98  $\pm$  5.5%). The immune suppressive properties of the studied populations were assayed in MLR. An inhibition of 56  $\pm$  4.5% of the PBMC proliferation was observed. We have also verified that MSCs retain their capacity to differentiate into adipocytic, os-

teoblastic and chondroblastic lineages, using adequate media (data not shown) as previously described (19).

### MSCs Expression of the HLA-G Molecule

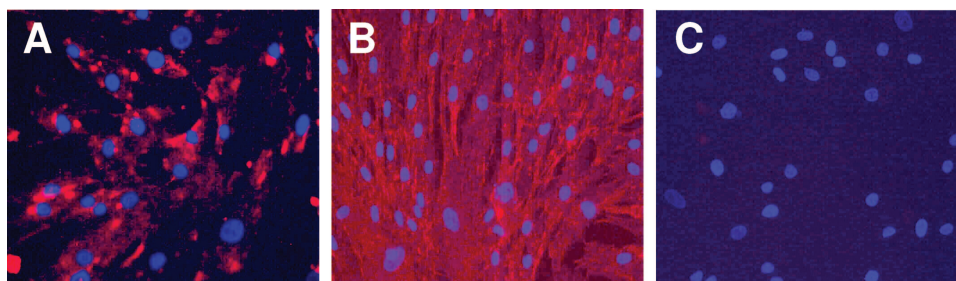
RT-PCR was used to analyze the expression of mRNA *hla-g* transcripts by MSCs. A total of 10 ng of total RNA of MSCs expressed 0.03  $\pm$  0.01 ng of HLA-G transcripts. To analyze the presence of HLA-G protein on MSCs, we used the specific 87G antibody, which recognizes the soluble and membrane-bound isoforms of the native molecule, and performed immunofluorescence. As shown in Figure 1A, HLA-G molecule was readily detectable on human MSCs. Figure 1B and 1C show positive (fetal tissue) (15) and negative control (isotype-matched mouse monoclonal antibodies), respectively.

Presence of HLA-G molecule on MSCs was quantified by flow cytometry using the specific MEMG/9 antibody on 16 different healthy donors. Extracellular and intracellular staining were used to study membrane-bound and intracytoplasmic HLA-G protein. A mean value of 52.4  $\pm$  3.6% of HLA-G-positive MSCs (Fig. 2A) was detected using intracellular staining. A low percentage of 13.7  $\pm$  1.3% HLA-G-positive MSCs (Fig. 2B) was detected using membrane-bound HLA-G staining. The immunostaining specificity was verified using lymphocytes from healthy donors as negative control; no extracellular or intracellular HLA-G molecule was detected (data not shown).

To quantify soluble HLA-G in culture supernatants, we performed an ELISA on 14 different MSC donors using the same MEMG/9 antibody. A mean value of 38.7  $\pm$  5.2 ng/mL HLA-G proteins was detected in MSC culture supernatants. The expression of HLA-G varied with the length of culture: successive passage showed a decrease of HLA-G positive cells (Fig. 3).

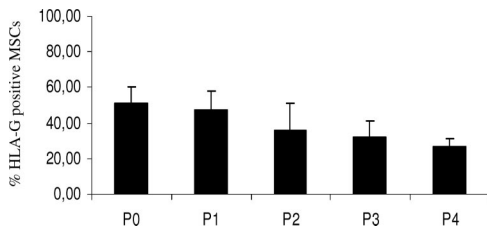
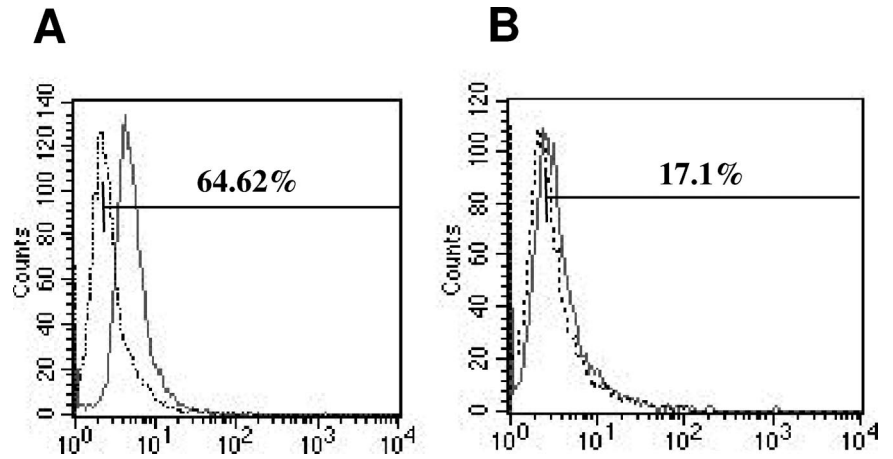
### Percentage of HLA-G-Positive MSCs and Culture Conditions

To test whether HLA-G production was dependant of the MSC culture conditions, a medium supplemented with platelet lysate obtained from PRP (PRP- $\alpha$ -MEM) was used (18) and compared with FCS-enriched medium (FCS- $\alpha$ -MEM). Using flow cytometry, we found no difference in the percentages of MSCs expressing CD105 or CD73 antigens. In both culture conditions, intracellular HLA-G is readily detectable in a large percentage of the MSC population (Table 1). HLA-G membrane-bound molecule was found on a low



**FIGURE 1.** Detection of HLA-G on MSCs with immunofluorescence. (A) MSCs and (B) fetal tissue (positive control) were incubated with 87G antibody then a secondary rhodamine-labeled antibody. (C) Negative control: MSCs incubated with the rhodamine-labeled secondary antibody. Red color shows intracytoplasmic HLA-G protein expressed by positive cells. Blue color evidenced DAPI staining.

**FIGURE 2.** Flow cytometry study of HLA-G-positive MSCs. HLA-G-positive MSCs were evidenced using the specific MEMG/9 antibody (dark line). An isotypic mAb was used as a control (dotted line). Cytometric traces show the level of fluorescence (x-axis) and the number of cells (y-axis). (A) HLA-G intracellular staining (64.62%), (B) HLA-G cell surface expression (17.1%). Experiments were performed using MSCs from 16 donors; shown are typical profiles from one donor. The percentage of HLA-G-positive cells was calculated after the subtraction of isotypic control by CELLquest software.



**FIGURE 3.** HLA-G production by MSCs decreases during passages. MSCs from six different donors were cultured in FCS- $\alpha$ -MEM. Mean percentages of intracellular HLA-G-positive MSC of six different donors at all passages were obtained by flow cytometry analysis using MEM/G9 specific antibody. Successive passages (P) showed a decrease in percentage of HLA-G-positive MSCs.

percentage of both MSC-cultures. The percentage of intracellular HLA-G-positive cells is significantly higher in PRP- $\alpha$ MEM than in FCS- $\alpha$ MEM cultures, with a p value of 0.023 (Table 1).

**HLA-G Molecule Is Implied in the Inhibition Induced by MSCs of Allogenic PBMC Proliferation**

To test the role of HLA-G expressed by MSCs on lymphocyte proliferation, we analyzed the modifications in HLA-G expression in MSC/MLR as compared with MSC cultures alone. Flow cytometry experiments performed on MSCs from four different donors showed no statistical change in the percentages of membrane-bound or intracytoplasmic HLA-G-positive MSCs in MSC/MLR when compared with MSC cultures alone (Fig. 4A). In the same experimental conditions, no HLA-G-positive PBMC was detected in MLR (Fig. 4B). Soluble HLA-G in the supernatant of the cultures was quantified with ELISA. Results showed that the level of soluble HLA-G in supernatants of MSC/MLR culture was (40.6 $\pm$ 7.1 ng/mL) and of MSC alone was (38.7 $\pm$ 5.2 ng/mL). The difference between both types of cultures was not statistically significant (P=0.89). The level of soluble HLA-G detected by ELISA could be linked to the high percentage of intra-cellular HLA-G positive cells detected by flow cytometry.

No change in HLA-G production could be detected upon allogenic stimulation (MSC/MLR). However, the role

**TABLE 1.** HLA-G production is dependant on culture conditions

	FCS- $\alpha$ -MEM	PRP- $\alpha$ -MEM	P value
Mean percentage intracellular staining (SEM)	45.03 $\pm$ 4.06	61.34 $\pm$ 4.61	P=0.023 (*)
Mean percentage extracellular staining (SEM)	15.32 $\pm$ 0.87	22.51 $\pm$ 2.39	P=0.4 (NS)

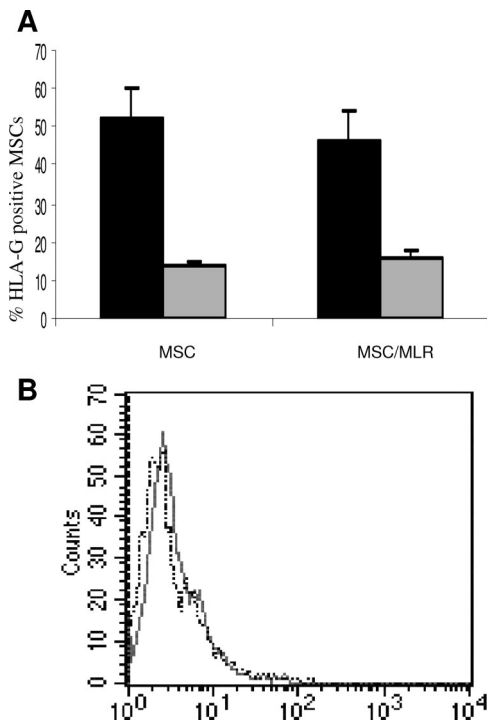
MSCs were cultured in FCS- $\alpha$ -MEM or PRP- $\alpha$ -MEM medium. Mean percentage of intracellular HLA-G-positive MSCs analysis by flow cytometry from different donors (n=6). \* P<0.023.

of HLA-G as a possible mediator of MSC immunosuppressive effect cannot be excluded. To test the functional role of the HLA-G protein expressed by MSCs, the specific neutralizing antibody 87G was used in MSC/MLR (MSC/MLR+87G). Allogenic PBMC proliferation was taken as a reference of 100% proliferation. The mean percentage of PBMC proliferation was significantly greater in MSC/MLR+87 G (65.9 $\pm$ 7%) when compared with MSC/MLR (44 $\pm$ 4.5%, P=0.01, Fig. 5). The MSC induced inhibition of allogenic lymphocyte proliferation was alleviated by 87G antibody blockade with a mean value of 35.5%. These results suggest that HLA-G could be a novel T-cell inhibitory effector produced by human MSCs.

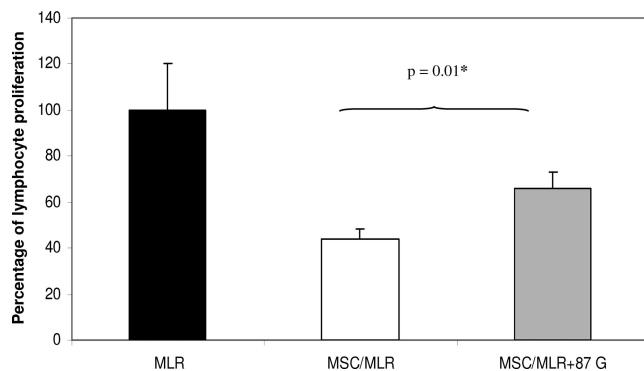
**DISCUSSION**

In this work, we studied the expression of the immunotolerogenic molecule HLA-G by MSCs and studied its implication toward the MSC immunosuppressive effects. We analyzed HLA-G expression at messenger RNA and protein level. This is the first report showing that human adult bone marrow MSCs express HLA-G as detected by RT-PCR, immunofluorescence, flow cytometry and ELISA.

Our results confirm the presence of *hla-g* transcripts in adult MSCs (21, 22). Gotherstrom et al. (22) have already reported detection of HLA-G protein by western blot in fetal MSCs, however not in adult MSCs. This later result differs from our report. This could be due to the differences in experimental design or culture conditions. Indeed in vitro we demonstrated (Table 1) that MSC culture in FCS- $\alpha$ MEM or



**FIGURE 4.** The percentage of HLA-G-positive MSCs is not modified in MSC/MLR. HLA-G-positive cells were detected by flow cytometry using MEMG/9 antibody. (A) Mean percentage of intracellular (black histogram) and membrane-bound HLA-G (gray histogram) in MSC/MLR as compared with MSCs alone (n=4). No statistical change of HLA-G expression in MSC/MLR was observed. (B) Negative control: Representative flow cytometry data of the percentage of intracellular HLA-G on allogeneic PBMCs alone (dotted line) and after 5-day coculture (dark line).



**FIGURE 5.** MSC tolerogenic effects are mediated in vitro via secretion of HLA-G. Tritiated thymidine ( $^3\text{HTdR}$ ) incorporation was measured as a marker of PBMC proliferation and data were presented as percent change in incorporated  $^3\text{HTdR}$  in presence or absence of 87G (PBMC+PBMC in absence of MSCs=100%). The  $^3\text{HTdR}$  incorporation test indicates that addition of MSCs significantly inhibited the proliferative response. The inhibition was partially restored in presence of 87G HLA-G blocking Antibody. Percent of restoration was calculated as follows:  $(\text{MSC/MLR} + 87\text{G} - \text{MSC/MLR}) / (\text{MLR} - \text{MSC/MLR}) \times 100$ . Results represent the Mean  $\pm$  SEM of 9 separate experiments performed in triplicate.

in PRP- $\alpha$ MEM could induce significant differences in the percentage of HLA-G-positive MSCs.

Human MSCs are multipotent unspecialized cells with a capacity for self-renewal and differentiation into multiple cell lineages. These stem cell characteristics could explain the expression of HLA-G molecules, which is found on numerous fetal tissues such as cytotrophoblast, hematopoietic progenitors (23) and fetal MSCs (22). This is in accordance with our results. Indeed, a decrease of the number of HLA-G-positive cells was observed over time using intracellular staining. Whether the observed decrease is linked with senescence of the cell remains to be studied (24).

It has been shown that co-culture of nonhuman primate or human MSCs with peripheral blood lymphocytes from allogeneic donors did not stimulate their proliferation in vitro (6, 25). This effect could be mediated through constitutive HLA-G expression by MSCs. Hereby, we demonstrated that, with two different antibodies (MEMG/9 and 87G), MSCs expressed constitutively the strong immune-inhibitory HLA-G molecule, which could explain the escape of immune recognition of MSCs by allogeneic peripheral blood lymphocytes.

MSCs can exert profound immunosuppression by inhibiting T-cell proliferation in response to various stimuli in vitro (10, 25). In vivo, injection of MSCs leads to prolonged allograft survival in non-human primate (6) and murine models (26). A possible mechanism to explain the MSC inhibitory effect was a veto cell-like activity (27). Indeed, in vitro veto cells inhibit CTL function against their own antigens, but not against third-party allogeneic cells. This contrasts with reported inhibition of allogeneic lymphocytes cytotoxicity and proliferation by MSCs (6, 10). A veto cell like activity is in agreement with the extensive data demonstrating engraftment and detection of MSCs (17, 28, 29) in various species. The constitutive expression of HLA-G by MSCs could support the veto cell-like activity, which plays an important role in their low immunogenicity.

It has been shown that human MSCs in cultures can mediate suppression of lymphocytes proliferation by several secreted factors such as hepatocyte growth factor, transforming growth factor- $\beta$  (10) and IL-10 (30). However blocking these factors with antibodies does not completely reverse the MSC-mediated immunosuppression. Recently, the role of tryptophan catabolizing enzyme IDO has been suggested to play a role in the MSC-mediated immunosuppression (13). IDO is not constitutively expressed in MSCs but depends on their activation by lymphocytes or exogenous IFN- $\gamma$ . This could explain the inhibition of allogeneic lymphocytes but could not explain the low immunogenicity and the engraftment of MSCs in allogeneic recipients. More recently, PGE2 which modulates a wide variety of immune cell functions in vitro (31), has been suggested to play a role in the MSC-mediated immunosuppression (30). However, using PGE2 synthesis inhibitors negated 70% of MSC's inhibitory effect (9). The overall data suggest the possibility of other anticipated molecules.

MSCs inhibit CD4 $^+$  T cells proliferation and DC maturation. They induce regulatory immunosuppressive cells, cell cycle arrest, and TH2 cytokines profile. It has been demonstrated that HLA-G exerts the same immunosuppressive effects (15), which could indicate that HLA-G expressed by MSCs may be responsible for much of human MSC-mediated

immunomodulatory effects. We studied the implication of HLA-G in the inhibitory effect mediated by MSCs. We evaluated the percentage of HLA-G-positive cell expression (flow cytometry) and the level of HLA-G in culture supernatant (ELISA) in MSC/MLR compared with cultured MSCs alone. We could not detect a statistically significant difference in HLA-G expression in both assays. However, this does not exclude the effective role of HLA-G in MSC-mediated suppressive effect and could indicate an optimal operational concentration of HLA-G expressed by MSCs. This is supported by our results: we have shown that with a neutralizing HLA-G antibody it was possible to partly counterbalance MSC-immunosuppressive effects. Hereby we demonstrated that HLA-G is a tolerogenic molecule constitutively expressed in cultured MSCs alone or in MSC/MLR.

Restoration of lymphocytes proliferation was consistently demonstrated in MSC/MLR using allogenic PBMCs from different donors. The significant restoration of lymphocytes proliferation in presence of HLA-G neutralizing antibody suggests that HLA-G may be partly responsible for human MSC-mediated immunomodulatory effects in vitro.

The constitutive expression of HLA-G protein, along with other reported inhibitory factors expressed by human MSCs, corroborates the effectiveness of MSCs in the management of GVHD (2). Our results showing that MSCs can limit lymphocytes response via HLA-G secretion could offer one explanation for this beneficial effect. It has been demonstrated that HLA-G secretion was associated with a better heart and liver graft acceptance (16, 32). A careful evaluation of the harmful immunomodulatory effects of MSCs is needed with regard to minimal residual disease and tumor escape in vivo. MSCs open new insights in the prevention and treatment of graft rejection in tissue and organ transplantation.

### ACKNOWLEDGMENTS

We thank Dr. Olla Ringden Center for Allogeneic Stem Cell Transplantation, Karolinska Institutet, Karolinska University Hospital Huddinge, Stockholm, Sweden, for his kind revision of the paper. We thank Prof. L. Douay (EA1638 Hematology and Cellular Therapy Dpt, Faculty of Medicine Saint Antoine, Université Paris VI) for help in furnishing tissue samples. We wish to thank Dr EL Taguri Adel for his helpful contribution.

### REFERENCES

- Lazarus HM, Koc ON, Devine SM, et al. Cotransplantation of HLA-identical sibling culture-expanded mesenchymal stem cells and hematopoietic stem cells in hematologic malignancy patients. *Biol Blood Marrow Transplant* 2005; 11: 389.
- Le Blanc K, Rasmusson I, Sundberg B, et al. Treatment of severe acute graft-versus-host disease with third party haploidentical mesenchymal stem cells. *Lancet* 2004; 363: 1439.
- Ringden O, Uzunel M, Rasmusson I, et al. Mesenchymal stem cells for treatment of therapy-resistant graft-versus-host disease. *Transplantation* 2006; 81: 1390.
- Koc ON, Gerson SL, Cooper BW, et al. Rapid hematopoietic recovery after coinfusion of autologous-blood stem cells and culture-expanded marrow mesenchymal stem cells in advanced breast cancer patients receiving high-dose chemotherapy. *J Clin Oncol* 2000; 18: 307.
- Almeida-Porada G, Flake AW, Glimp HA, Zanjani ED. Cotransplantation of stroma results in enhancement of engraftment and early expression of donor hematopoietic stem cells in utero. *Exp Hematol* 1999; 27: 1569.
- Bartholomew A, Sturgeon C, Siatskas M, et al. Mesenchymal stem cells suppress lymphocyte proliferation in vitro and prolong skin graft survival in vivo. *Exp Hematol* 2002; 30: 42.
- Beyth S, Borovsky Z, Mevorach D, et al. Human mesenchymal stem cells alter antigen-presenting cell maturation and induce T-cell unresponsiveness. *Blood* 2005; 105: 2214.
- Jiang XX, Zhang Y, Liu B, et al. Human mesenchymal stem cells inhibit differentiation and function of monocyte-derived dendritic cells. *Blood* 2005; 105: 4120.
- Aggarwal S, Pittenger MF. Human mesenchymal stem cells modulate allogeneic immune cell responses. *Blood* 2005; 105: 1815.
- Di Nicola M, Carlo-Stella C, Magni M, et al. Human bone marrow stromal cells suppress T-lymphocyte proliferation induced by cellular or nonspecific mitogenic stimuli. *Blood* 2002; 99: 3838.
- Plumas J, Chaperot L, Richard MJ, Molens JP, Bensa JC, Favrot MC. Mesenchymal stem cells induce apoptosis of activated T cells. *Leukemia* 2005; 19: 1597.
- Glennie S, Soeiro I, Dyson PJ, Lam EW, Dazzi F. Bone marrow mesenchymal stem cells induce division arrest anergy of activated T cells. *Blood* 2005; 105: 2821.
- Meisel R, Zibert A, Laryea M, Gobel U, Daubener W, Dilloo D. Human bone marrow stromal cells inhibit allogeneic T-cell responses by indoleamine 2,3-dioxygenase-mediated tryptophan degradation. *Blood* 2004; 103: 4619.
- Rouas-Freiss N, LeMaout J, Moreau P, Dausset J, Carosella ED. HLA-G in transplantation: a relevant molecule for inhibition of graft rejection? *Am J Transplant* 2003; 3: 11.
- Carosella ED, Moreau P, LeMaout J, LeDiscorde M, Dausset J, Rouas-Freiss N. HLA-G molecules: From maternal-fetal tolerance to tissue acceptance. *Adv Immunol* 2003; 81: 199.
- Lila N, Carpentier A, Amrein C, Khalil-Daher I, Dausset J, Carosella ED. Implication of HLA-G molecule in heart-graft acceptance. *Lancet* 2000; 355: 2138.
- Fouillard L, Bensidhoum M, Bories D, et al. Engraftment of allogeneic mesenchymal stem cells in the bone marrow of a patient with severe idiopathic aplastic anemia improves stroma. *Leukemia* 2003; 17: 474.
- Doucet C, Ernou I, Zhang Y, et al. Platelet lysates promote mesenchymal stem cell expansion: A safety substitute for animal serum in cell-based therapy applications. *J Cell Physiol* 2005; 205: 228.
- Francois S, Bensidhoum M, Mouiseddine M, et al. Local irradiation not only induces homing of human mesenchymal stem cells at exposed sites but promotes their widespread engraftment to multiple organs: A study of their quantitative distribution after irradiation damage. *Stem Cells* 2006; 24: 1020.
- Lila N, Rouas-Freiss N, Dausset J, Carpentier A, Carosella ED. Soluble HLA-G protein secreted by allo-specific CD4+ T cells suppresses the allo-proliferative response: A CD4+ T cell regulatory mechanism. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001; 98: 12150.
- Nasef A, Chapel C, Mazurier C, et al. Identification of IL-10 and TGF-beta transcripts involved in inhibiting T Lymphocyte proliferation during cell contact with human mesenchymal stem cells. *Gene Expression*, in press.
- Gotherstrom C, West A, Liden J, Uzunel M, Lahesmaa R, Le Blanc K. Difference in gene expression between human fetal liver and adult bone marrow mesenchymal stem cells. *Haematologica* 2005; 90: 1017.
- Menier C, Rabreau M, Challier JC, LeDiscorde M, Carosella ED, Rouas-Freiss N. Erythroblasts secrete the nonclassical HLA-G molecule from primitive to definitive hematopoiesis. *Blood* 2004; 104: 3153.
- Bonab MM, Alimoghaddam K, Talebian F, Ghaffari SH, Ghavamzadeh A, Nikbin B. Aging of mesenchymal stem cell in vitro. *BMC Cell Biol* 2006; 7: 14.
- Le Blanc K, Tammik L, Sundberg B, Haynesworth SE, Ringden O. Mesenchymal stem cells inhibit and stimulate mixed lymphocyte cultures and mitogenic responses independently of the major histocompatibility complex. *Scand J Immunol* 2003; 57: 11.
- Chung NG, Jeong DC, Park SJ, et al. Cotransplantation of marrow stromal cells may prevent lethal graft-versus-host disease in major histocompatibility complex mismatched murine hematopoietic stem cell transplantation. *Int J Hematol* 2004; 80: 370.
- Potian JA, Aviv H, Ponzio NM, Harrison JS, Rameshwar P. Veto-like activity of mesenchymal stem cells: Functional discrimination between cellular responses to alloantigens and recall antigens. *J Immunol* 2003; 171: 3426.

28. Chapel A, Bertho JM, Bensidhoum M, et al. Mesenchymal stem cells home to injured tissues when co-infused with hematopoietic cells to treat a radiation-induced multi-organ failure syndrome. *J Gene Med* 2003; 5: 1028.
29. Bensidhoum M, Chapel A, Francois S, et al. Homing of in vitro expanded Stro-1- or Stro-1+ human mesenchymal stem cells into the NOD/SCID mouse and their role in supporting human CD34 cell engraftment. *Blood* 2004; 103: 3313.
30. Rasmusson I, Ringdén O, Sundberg B, Le Blanc K. Mesenchymal stem cells inhibit lymphocyte proliferation by mitogens and alloantigens by different mechanisms. *Exp Cell Res* 2005; 15: 33.
31. Harris SG, Padilla J, Koumas L, Ray D, Phipps RP. Prostaglandins as modulators of immunity. *Trends Immunol* 2002; 23: 144.
32. Creput C, Durrbach A, Charpentier B, Carosella ED, Rouas-Freiss N. [HLA-G: immunoregulatory molecule involved in allograft acceptance]. *Nephrologie* 2003; 24: 451.

See discussions, stats, and author profiles for this publication at: <https://www.researchgate.net/publication/5936968>

# New approach to radiation burn treatment by dosimetry-guided surgery combined with autologous mesenchymal stem cell...

Article in *Regenerative Medicine* · October 2007

DOI: 10.2217/17460751.2.5.785 · Source: PubMed

CITATIONS

151

READS

454

17 authors, including:



**Christelle Doucet**

Celogos, France

15 PUBLICATIONS 672 CITATIONS

SEE PROFILE



**Jean-François Bottollier-Depois**

Institut de Radioprotection et de Sûreté Nuc...

70 PUBLICATIONS 687 CITATIONS

SEE PROFILE



**Alain Chapel**

Institut de Radioprotection et de Sûreté Nuc...

111 PUBLICATIONS 2,746 CITATIONS

SEE PROFILE



**Cesar Carcamo**

Mutual de Seguridad

35 PUBLICATIONS 272 CITATIONS

SEE PROFILE

Some of the authors of this publication are also working on these related projects:



Clinical Trial Cell therapy of Chronic Radiotherapy-induced Abdomino-pelvic Complications (Pelvic Radiation Disease, PRD) Refractory to Standard Therapy ClinicalTrials.gov Identifier: NCT02814864

[View project](#)



Pulsed Radiofrequency for Chronic Pain [View project](#)

All content following this page was uploaded by [Alain Chapel](#) on 21 April 2017.

The user has requested enhancement of the downloaded file. All in-text references [underlined in blue](#) are added to the original document and are linked to publications on ResearchGate, letting you access and read them immediately.



# New approach to radiation burn treatment by dosimetry-guided surgery combined with autologous mesenchymal stem cell therapy

JJ Lataillade<sup>1†</sup>,  
C Doucet<sup>1</sup>, E Bey<sup>2</sup>,  
H Carsin<sup>2</sup>, C Huet<sup>3</sup>,  
I Clairand<sup>3</sup>,  
JF Bottollier-Depois<sup>3</sup>,  
A Chape<sup>3</sup>, I Ernou<sup>1</sup>,  
M Gourven<sup>1</sup>, L Boutin<sup>1</sup>,  
A Hayden<sup>4</sup>, C Carcamo<sup>4</sup>,  
E Buglova<sup>5</sup>,  
M Joussemet<sup>1</sup>, T de  
Reve<sup>2</sup> & P Gourmelon<sup>3</sup>

<sup>†</sup>Author for correspondence  
<sup>1</sup>Centre de Transfusion  
Sanguine des Armées,  
Jean Julliard, Unité de  
Thérapie Cellulaire,  
BP 410, 92141 Clamart  
Cedex, France  
E-mail: jllataillade@ctsa-  
armees.fr

Tel.: +33 141 467 260;  
Fax: +33 146 388 287

<sup>2</sup>Hôpital d'Instruction des  
Armées, Percy, BP 410,  
92141 Clamart Cedex,  
France

<sup>3</sup>Institut de Radioprotection et  
de Sécurité Nucléaire (IRSN),  
BP 17, 92262 Fontenay aux  
Roses Cedex, France

<sup>4</sup>Hospital Mutual de  
Seguridad, Av. Lib. Bernardo  
O'Higgins 4848 Santiago,  
Chile

<sup>5</sup>International Atomic Energy  
Agency, Wagramer Strasse 5,  
P.O.Box 100, A-1400  
Vienna, Austria

The therapeutic management of severe radiation burns remains a challenging issue. Conventional surgical treatment (excision and skin autograft or rotation flap) often fails to prevent unpredictable and uncontrolled extension of the radiation necrotic process. We report here an innovative therapeutic strategy applied to the victim of a radiation accident (December 15, 2005) with an iridium gammagraphy radioactive source (<sup>192</sup>Ir, 3.3 TBq). The approach combined numerical dosimetry-guided surgery with cellular therapy using mesenchymal stem cells. A very severe buttock radiation burn (2000 Gy at the center of the skin surface lesion) of a 27-year-old Chilean victim was widely excised (10 cm in diameter) using a physical and anatomical dose reconstruction in order to better define the limit of the surgical excision in apparently healthy tissues. A secondary extension of the radiation necrosis led to a new excision of fibronectic tissues associated with a local cellular therapy using autologous expanded mesenchymal stem cells as source of trophic factors to promote tissue regeneration. Bone marrow-derived mesenchymal stem cells were expanded according to a clinical-grade technique using closed culture devices and serum-free medium enriched in human platelet lysate. The clinical evolution (radiation pain and healing progression) was favourable and no recurrence of radiation inflammatory waves was observed during the 11 month patient's follow-up. This novel multidisciplinary therapeutic approach combining physical techniques, surgical procedures and cellular therapy with adult stem cells may be of clinical relevance for improving the medical management of severe localized irradiations. It may open new prospects in the field of radiotherapy complications.

The medical management of severe radiation burns after accidental overexposure to ionising radiation is still a major therapeutic challenge unresolved with the classical therapeutic approach derived from the management of thermal or electrical burns [1,2].

There are marked differences between radiation and thermal burns in terms of physio-pathological mechanisms, clinical aspects and evolution. The main feature of severe radiation burns is the occurrence of unpredictable successive inflammatory waves leading to the extension, in surface and in depth, of the necrotic process. After an initial period marked by a clinical picture limited to a rash and itching, subsequent ulceration and necrosis develop, which may extend to the deep dermal and underlying muscle structures [3]. Moreover, these inflammatory waves are associated with uncontrollable pain highly resistant to morphinics. The pathophysiological process, which implies a cascade of inflammatory mediators and a continuous activation of target cells (endothelial cells and fibroblasts) is not yet established. At very high

radiation dose, this uncontrolled and extensive morbid process involves several target tissues including muscles, vessels and bones.

Presently, the classical treatment of radiation burns has remained conservative in case of superficial lesions of distal extremities, with the use of necrectomy followed by rotation flaps and, in case of profound and large necrosis, excision and coverage of the wound bed with a good quality, full-thickness skin graft. When new inflammatory waves impair this therapeutic approach, there has been no other approach than new extensive surgical excisions ending with successive amputations [4]. In all cases, the healing has been delayed, fragile and unpredictable [5,6]. As a result, severe radiation burns remain a highly puzzling and challenging therapeutic issue.

In the framework of a recent radiation accident concerning a 27-year-old Chilean man who had been overexposed to a gammagraphy radioactive source, we used an innovative therapeutic strategy combining both early dosimetry-guided lesion excision and cellular therapy

**Keywords:** accidental irradiation, mesenchymal stem cell, radiation burn, tissue regeneration

future medicine part of fsg

with mesenchymal stem cells (MSCs). The aim of the early dosimetry-guided surgery was to perform the most accurate and largest excision in order to prevent the vicious circle induced by the successive inflammatory waves reaching apparently healthy surrounding tissues. The aim of the MSC therapy was to deliver to the lesion site trophic factors able to favor the healing of the impaired tissue.

We report here on the favourable outcome of the radiation lesions following this therapeutic approach.

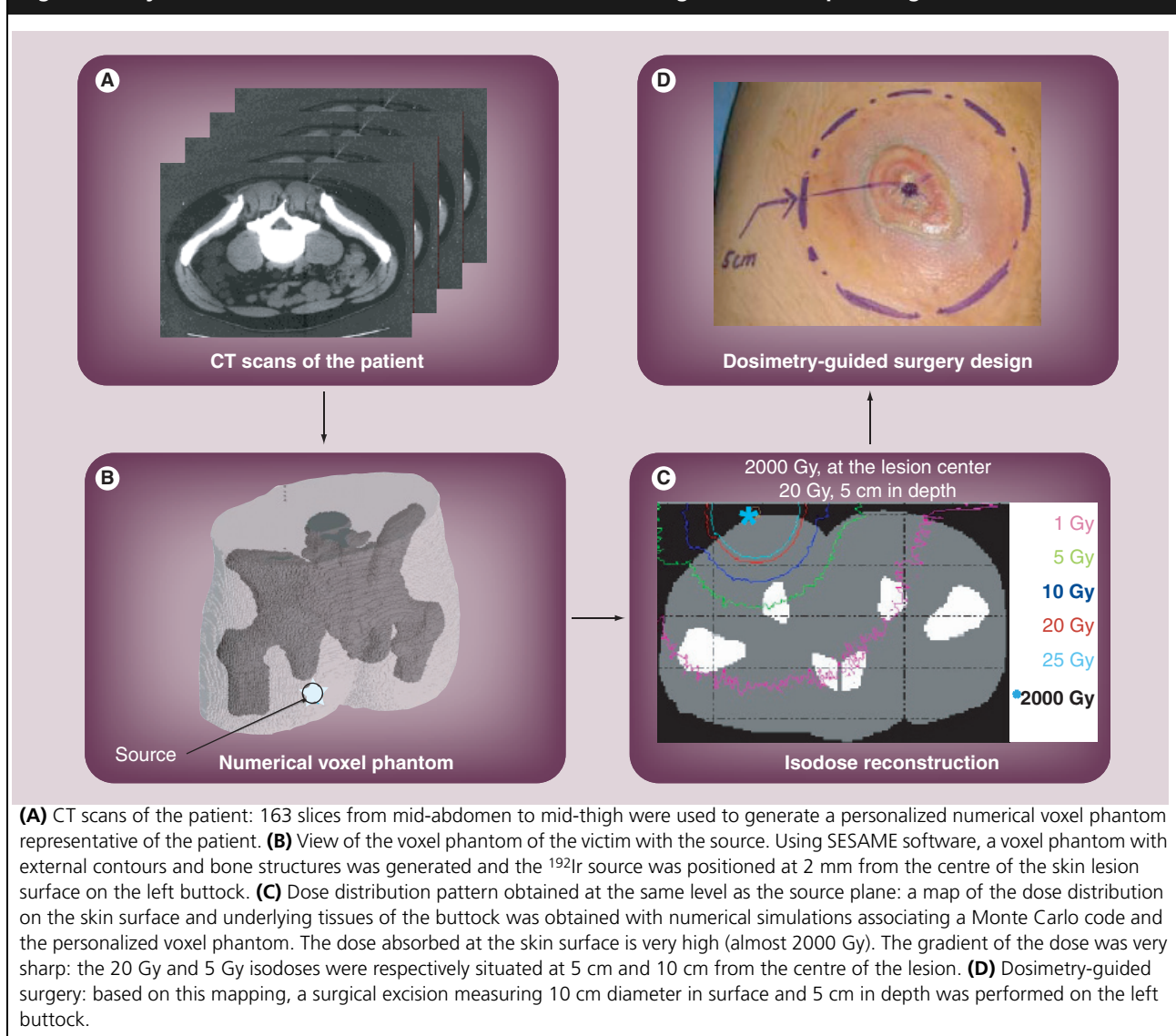
### Case report & methods

#### Patient & irradiation accident

A 27-year-old Chilean man was overexposed, on 15 December 2005, to a gammagraphy radioac-

tive source ( $^{192}\text{Ir}$ , 3.3 TBq). He picked up the source with his left hand and put it in the back left pocket of his trousers, where he kept it for approximately ten minutes before the alert was given. Following a multifocal localized irradiation, he rapidly exhibited severe radiation burns located to the hand and the buttock. The early occurrence of skin lesions (ringed permanent erythema with a central atonic area) at the buttock level within the first days after irradiation, strongly suggested a very high-dose exposure. Following the request of the Chilean authorities through International Atomic Energy Agency (IAEA) the patient was hospitalised at the Burn Treatment Centre (BTC) of Percy Military Hospital (Paris, France) on 29 December 2005. The buttock skin lesion evolved into moist epidermi-

Figure 1. Physical and anatomical dose reconstruction for surgical excision planning.





tis (4–5 cm in diameter), then quickly worsened and progressed to ulceration. In the weeks following exposure, the left hand exhibited erythematous lesions with swollen fingers. These radiation skin lesions were accompanied by classical intense pain, which was only partially alleviated by morphine. The early development of the buttock lesion without any latency phase, its fast evolution toward ulceration and the uncontrolled pain were characteristic of a very severe radiation burn with poor prognosis.

#### *Physical dosimetric reconstruction*

The strategy adopted to reconstruct the accidental dose distribution delivered to the patient was based on numerical simulations. A numerical dosimetric reconstruction of a radiation accident needs to simulate the source, its environment and the patient body using a numerical anthropomorphic phantom. The doses absorbed by the tissues are then calculated using a computer code. Such numerical methodology was recently applied to other severe radiation accidents [7,8]

In this accident a voxel anthropomorphic phantom was used and generated with the SES-AME software [9] from 163 computed tomography slices (mid-abdomen to mid-thigh) (Figure 1A, 1B). The simulations were carried out assuming an exposure time of 10 min and an activity of  $^{192}\text{Ir}$  of 3.3 TBq. Calculations were performed to generate a map of the dose distribution on the skin surface and underlying tissues of the buttock using the MCNPX version 2.4.0 Monte Carlo code [10]. This code is widely used in dosimetry assessment to model the transport and interaction of charged or neutral particles in matter.

#### *Autologous mesenchymal stem cells production*

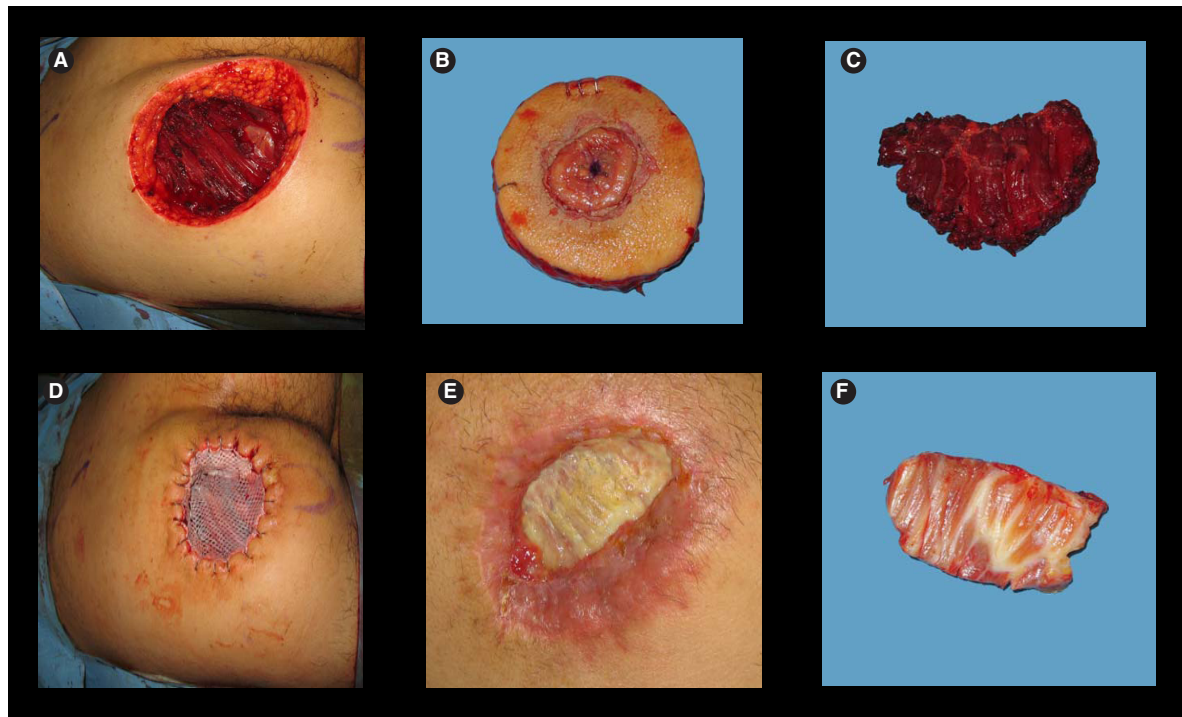
The patient gave written consent for a new therapeutic strategy combining a surgical approach and MSC local therapy. Ethical and technical approvals were obtained from the French health authority (AFSSaPS). Autologous bone marrow total cells (BMCs) were obtained from unexposed iliac crest aspirations. A novel clinical-grade MSC production process using closed culture devices (Cellstack<sup>®</sup>, Corning, Macopharma, Tourcoing, France) was used. Cells were expanded in a clinical grade medium containing  $\alpha$ -MEM (Macopharma), 10  $\mu\text{g}/\text{ml}$  ciprofloxacin (Ciflox<sup>®</sup> 400 mg/200 ml, Bayer Pharma, Puteaux, France) and 8% human platelet lysate (PL) as a source of growth factors [11,12]. PL were

obtained from platelet apheresis products that were biologically qualified according to French legislation. The platelet number of each product was automatically measured (ADVIA 120, Bayer) and only samples containing approximately  $1.10^9$  platelets/ml were selected and frozen at  $-80^\circ\text{C}$  to obtain a PL containing platelet-released growth factors. PL products were then thawed and harvested to be used in culture as fetal calf serum (FCS) substitutes.  $254.5 \times 10^6$  BMCs were plated at a density of  $200 \times 10^3$  cells/ $\text{cm}^2$  on day 75 postirradiation (PI) in 1272  $\text{cm}^2$  Cellstack<sup>®</sup> devices containing PL medium and cultured at  $37^\circ\text{C}$  in 95% air and 5%  $\text{CO}_2$ . After 3–4 days, the nonadherent cells were removed and the cultures were re-fed with fresh medium. On day 14 after the start of the culture, cells reached confluence. One part of MSCs was harvested after a  $1 \times$  trypsin-ethylenediamine tetraacetic acid (EDTA) (both from Sigma) application for 5 min at  $37^\circ\text{C}$ , conditioned in human albumin and freshly administered.  $10 \times 10^6$  of remaining MSCs were reseeded at a density of  $8 \times 10^3$  cells/ $\text{cm}^2$  in two 1272  $\text{cm}^2$  Cellstack<sup>®</sup> and 7 days later, P2 MSCs were harvested for the second local administration.

Quality controls were achieved on each cell product:

- MSC phenotype characterization (CD45-/CD105+/CD73+/CD90+) as previously described [11].
- Colony-forming unit-fibroblast (CFU-F) frequency numeration: briefly,  $0.33 \times 10^6$  BMCs were cultured in 25  $\text{cm}^2$  flasks with PL medium. The medium was replaced every 3 days and cultures were stopped on day 10. Then, the cell layer was fixed and stained with a Giemsa solution at  $\text{pH} = 7$  (Biolyon, Dardilly, France). Clonogenic efficiency was calculated as number of colonies per  $10^6$  cells seeded.
- MSC telomerase activity was performed using a modified telomeric repeat amplification method (TRAP assay) described by Kim NW *et al* [13]. A TeloTAGGG Telomerase PCR ELISAPLUS detection kit (Roche Applied Science) was used to quantify telomerase activity according the manufacturer recommendations.
- Before administration contamination control for bacteria, fungi and mycoplasma.

Figure 2. Surgical therapy.



The wide surgical excision of the buttock radiation burn was performed on day 21 PI according to the anatomical and physical dose reconstruction. **(A)** View of the excision (10 cm diameter). **(B)** Excised cutaneous and sub-cutaneous tissues including the central radiation burn. **(C)** Excised Gluteal muscle in apparent healthy status. The excision was followed by a temporary wound closure with a cryopreserved skin allograft **(D)** and in a second step, by a skin autograft (day 49 PI). The clinical evolution was marked by a lysis of the skin graft and a recurrence of a fibro-necrotic process in the bottom of the wound - day 90 PI **(E)**. An additional surgical excision of the muscular fibrotic tissue was applied **(F)** and followed by a second skin autograft at day 90 PI. PI: Postirradiation.

#### *Histological analysis*

Histological examination of 5µm tissue section of skin and muscle excisions was performed after fixation in 5% formaldehyde and staining with hematoxylin-eosin.

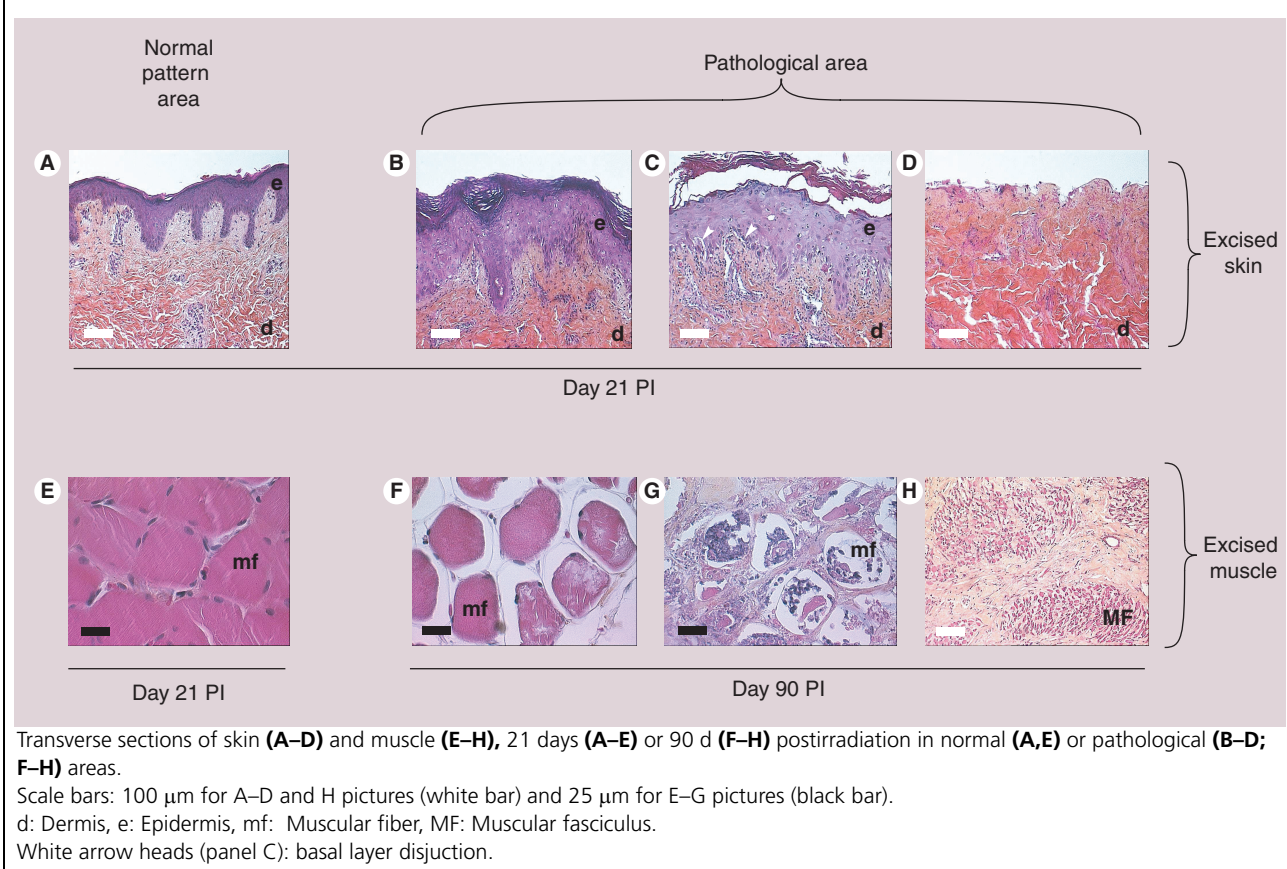
#### **Results**

##### *Dose reconstruction of the buttock lesion*

A dose reconstruction of the radiation lesion using numerical method and taking into account the anatomical characteristics of the patient was performed in order to improve the accuracy of the surgical excision. The dose distribution obtained with numerical simulations associating a Monte Carlo code and a Voxel phantom representative of the patient anatomy is illustrated in Figure 1C. The dose absorbed at the skin lesion center was very high (almost 2000 Gy) but dropped rapidly due to the combined effect of distance and of tissue attenuation. Thus, the 20 Gy and 5 Gy isodoses were respectively situated at 5 cm and 10 cm from the center of the lesion.

#### *Dosimetry-guided Surgery*

Based on the dose reconstruction mapping, a wide resection in apparently healthy tissues was performed on day 21 PI (Figure 1D & 2A, B, C). All tissues exposed to a dose over 20 Gy that were situated between the center of the lesion and the 20 Gy isodose, were excised according to hemisphere of 10 cm in diameter and then covered with a cryopreserved allograft (Figure 2D). Histological examination of excised cutaneous tissues revealed characteristic histological features of skin burns (Figures 3B, C, D). The center of the lesion was characterized by both dermal ulceration and marked epidermolysis (Figure 3D). Complete disjunction of the epidermis with germinal and keratinocyte interphase cell death associated to a loss of epidermis adhesiveness to the basal layer were observed (Figure 3C). Concerning the underlying muscular structure, morphology of the striated muscle was quite normal without any sign of rhabdomyolysis, with discrete fibroadipocytic intensification punctuated with small vessels and normal morphological nervous structure.

**Figure 3. Histological characteristics of radio-induced tissue damages.**

Following surgery, no infection or subsequent radiation inflammatory wave was observed for 1 month. Due to this apparent normal evolution, a skin autograft was done on day 49 PI. Rapid lysis of the skin graft occurred with the development of a painful infected radiation ulceration (Figure 2E).

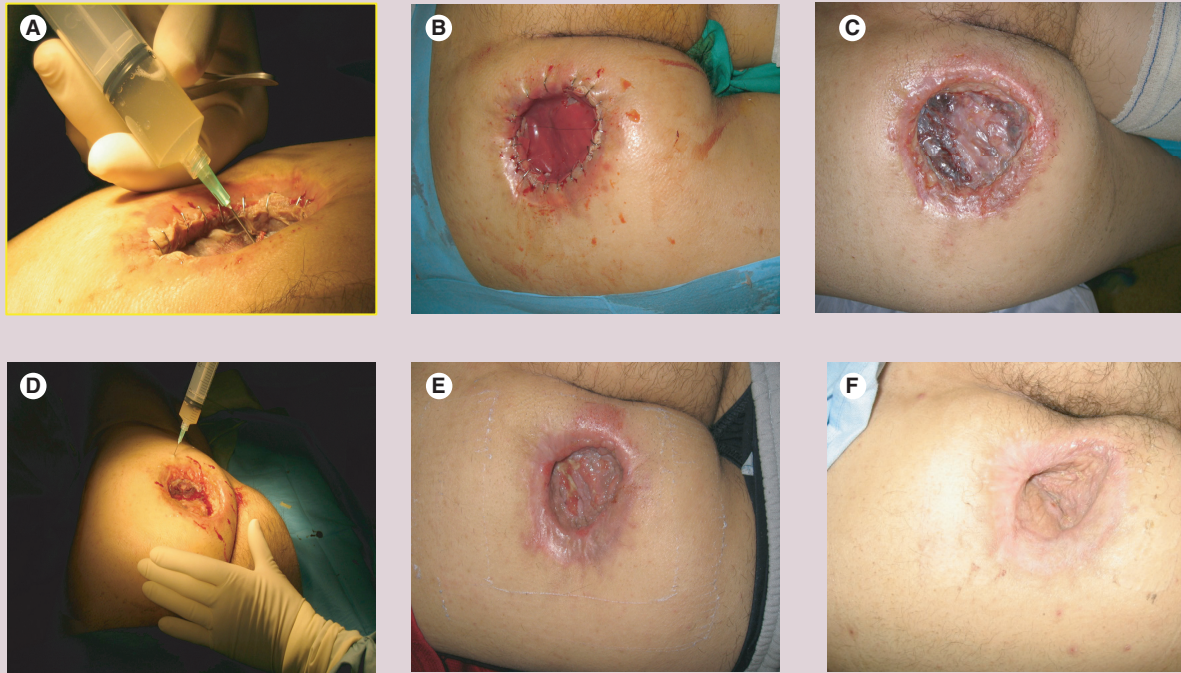
#### *New therapeutic approach with cell therapy*

A new therapeutic strategy combining a classical surgical therapy (excision plus skin autograft) and a local MSC therapy was designed (Figure 4). For MSC production, an autologous bone marrow collection was performed, allowing a two-step MSC expansion producing  $182 \times 10^6$  cells at the first passage (P1) and  $227 \times 10^6$  cells at the second passage (P2). Results of cell production are summarized in Table 1. Expanded cells exhibited antigenic characteristics of MSCs: they did not express CD45, but expressed CD90, CD105 and CD73 antigens (Figure 5). MSC purity was up to 97% and their clonogenic efficiency obtained at P1 was 225. No telomerase activity was found in the expanded MSCs (Table 1). The pluripotentiality of expanded

MSC was controlled by *in vitro* osteogenic, adipogenic and chondrogenic assays performed on five preclinical culture runs (data not shown).

The first step of this therapeutic approach was the surgical excision of the muscular fibrotic tissue, followed by a second skin autograft (Figure 2F). Histological examination of muscle resection revealed characteristic features of radiation burn recurrence (Figures 3F, G, H). Muscular injury was very heterogeneous and started with degeneration and retraction of muscular fibers (Figure 3F). Some areas were characterized by fibro-atrophic lesions with compression of number of muscular fasciculus (Figure 3H) evolving sometime into rhabdomyolysis with numerous plurinucleated cells (Figure 3G). Fibrosis is punctuated by some inflammatory mononucleated cells. Vascular damages were remarkable by their polymorphism, their focal characteristic and the absence of systematisation. Fibrinoid necrosis of the vascular wall was associated with perivascular inflammatory cell infiltration. Swollen endothelial cells were associated with polynuclear wall infiltration, and fibrinous thrombi obstructing the vessel lumen were observed.

Figure 4. Mesenchymal stem cell therapy.



The surgical excision step and skin allograft was followed by two weekly local administrations of *in vitro* expanded MSC. **(A)**  $168 \times 10^6$  MSC were injected on day 90 PI in a circle around the lesion and into the wound bed. **(B)** The lesion was further dressed with an artificial derma (Integra®). **(C)** View of the lesion 9 days after the first MSC administration. **(D)**  $226 \times 10^6$  MSC were injected on day 99 PI in a circle around the lesion at the cutaneous and muscular levels. **(E)** Healing evolution on day 109 PI. **(F)** Final aspect of the lesion (5.5 months PI)

MSC: Mesenchymal stem cells; PI: Postirradiation.

The second therapeutic step was the local administrations of  $168 \times 10^6$  MSC on day 90 PI (Figure 4A) and  $226 \times 10^6$  on day 99 PI (Figure 4D), which were injected in circle around the lesion at the cutaneous and muscular levels, and in the wound bed of the lesion under the skin graft. The lesion was further dressed with an artificial derma (Integra®) (Figure 4B). Figure 6 shows a schematic temporal pattern of successive surgical and cellular therapies.

#### Evolution

Following this therapy combining surgical excision and cell administration, no adverse reaction to the autologous MSC administration was observed. The day following the MSC injections, pain disappeared and the active clinical evolution of the radiation burn was stopped. The healing of the lesion was ascertained by the quality of the engraftment. Unlike the classical evolution of a very severe radiation skin lesion, the size of the wound progressively decreased following a centripetal process (Figures 4E, F). Almost com-

plete healing was achieved by 1 month post-treatment.

No recurrence of radiation burn was observed during the follow-up of the patient. The healing was complete without any functional impairment at 5.5 months post irradiation (day 75 post-cell therapy). The only persistent sequelae were aesthetic (Figure 4F).

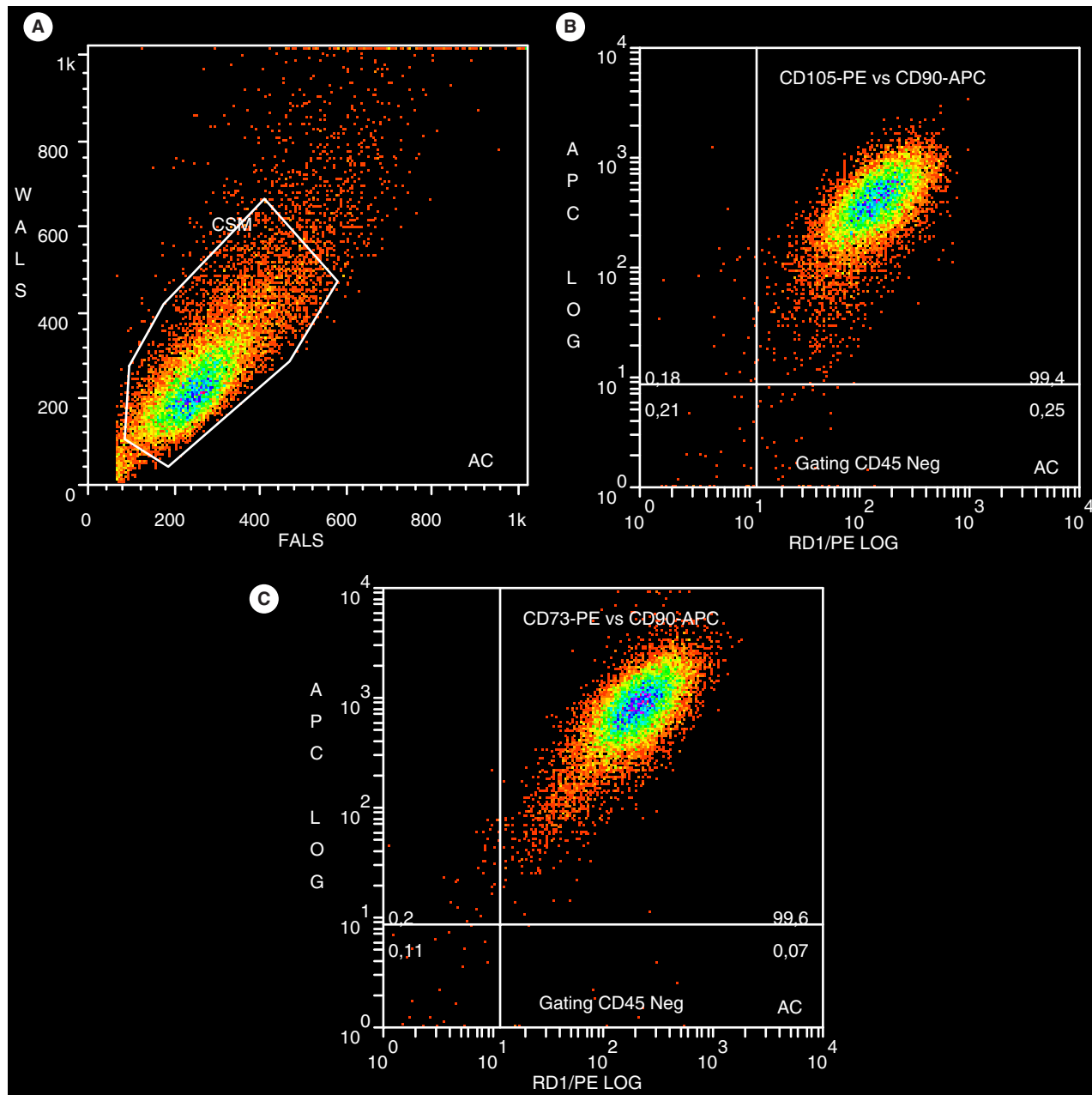
#### Discussion

In contrast to thermal burns, radiation burns exhibit several clinical patterns including dry desquamation, moist desquamation and necrosis according to the radiation dose level [3,4].

Dry and moist desquamations are skin clinical manifestations of the keratinocyte mitotic death and necrosis is the consequence of the tissue radiation injuries that have reached not only the skin but also the deep subcutaneous structures such as muscles, vessels and sometimes even bone [5].

The surgical management of severe necrotic radiation burns is theoretically easy to perform. The conventional main strategy is the excision of

**Figure 5. Mesenchymal stem cell phenotype characterization.**



Bone marrow total cells were plated at a density of  $200 \times 10^3$  cells/cm<sup>2</sup> in an expansion medium containing 8% PL. After each passage, the cells were assessed for antigenic expression by flow cytometry. Cells were labeled with antibodies against CD45, CD90, CD105, and CD73 or control IgGs, and analyzed by flow cytometry. Plots show specific antibody staining profiles for cells cultured in PL at passage 2 (**B & C**) CD45 negative cells were analyzed for CD90, CD73 and CD105 expression by three-color flow cytometry. PL: Platelet lysate

the necrotic tissues followed by a rotation flap or a good quality skin autograft. In practice, the planning of such a surgical approach often encounters insurmountable technical difficulties due to the occurrence of successive and unpredictable inflammatory waves associated with a progressive extension of the necrotic process [6].

Then, the evolution of the radiation lesion often becomes uncontrolled and the final option is a last surgical act leading to a very high morbidity and disability [6]. Thus, in two highly irradiated Peruvian and Georgian victims that we previously treated in 1999 and 2002 with the classical surgical approach combining excision and skin

**Table 1. MSC production rates and quality controls.**

	Passages	
	P1	P2
Bone marrow aspiration (ml)	25	-
Input of BMMNCs and MSCs*	254.5 × 10 <sup>6</sup>	10 × 10 <sup>6</sup> *
Total MSC production	182 × 10 <sup>6</sup>	227 × 10 <sup>6</sup>
Culture duration (days)	14	7
MSC purity (%)	97	100
CFU-F efficiency (per 10 <sup>6</sup> cells seeded)	225	-
Telomerase activity	None	None
Micro-organism contamination	Negative	Negative
Number of MSCs injected (day PI)	168 × 10 <sup>6</sup> (90)	226 × 10 <sup>6</sup> (99)

graft, we were unable to control, in the Peruvian case, even after amputation of the irradiated leg, the huge extension, at the perineal level, of the radionecrotic process. Concerning the Georgian case, the conventional treatment was a failure since four successive excisions followed by skin autografts were always inefficient 440 days post-exposure and only an autonomous, vascularized tissue (omentum flap) covered by skin allograft allowed healing at 500 days PI (Table 2).

Thus, to date, the best therapeutic approach for severe radiation burns remains unknown.

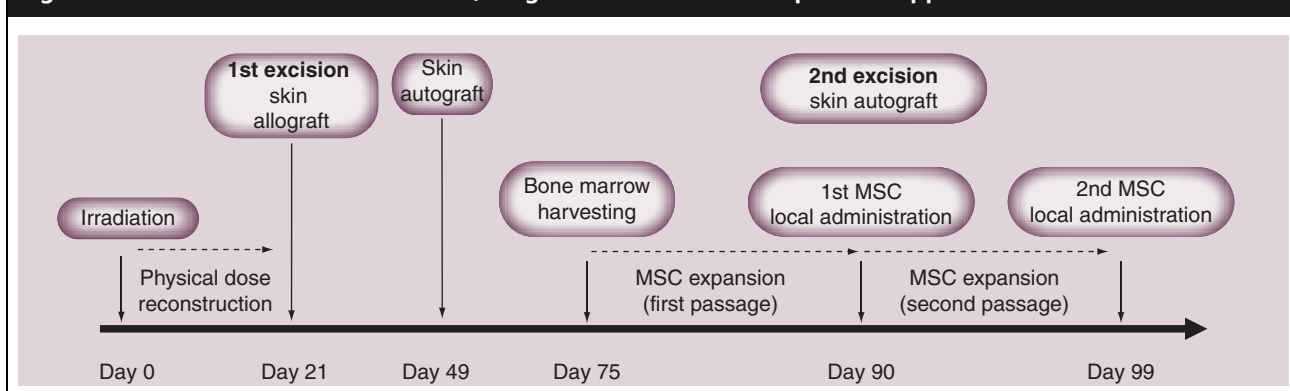
One of the unsolved issues is the size of the excision surgery. Indeed, in a classical surgical approach, the limits of any lesion to be removed are well defined. By contrast, regarding radiation burns, the actual limits of the lesion are unknown and a tissue that may appear at first healthy may in fact necrose more or less rapidly. The first challenge for the surgeon is to appreciate the boundaries between healthy and injured tissues. The unique way to get reliable information concerning this invisible limit is to know the gradient of dose delivered to the tissues. The necrotic process is known to occur in tissues that received a dose greater than 25 Gy.

We took advantage in this accident of the early recognition of the event with a clear description of the circumstances, so that we were able, for the first time in a radiation burn victim, to do a physical dosimetric reconstruction to guide the surgical excision.

In practice, physical dose reconstruction with numerical methods requires a perfect knowledge of key parameters such as the activity of the source, the position of the source, the distance between the source and the lesion, and the duration of the exposure.

In the present case, several parameters were crucial for assessing an accurate dose reconstruction. Indeed, the accidental scenario was very precise, the activity of the source was well known, the source was wedged in a rear pocket trouser and was not moved during the exposure, constantly almost in direct contact with the skin. Moreover, the most subjective parameter of a dose reconstruction which is the time of exposure was here pretty well quantified by the victim himself (10 min by watch checking). In addition, the physical dose reconstruction was carried out from a personalized voxelized phantom generated from the tomodensitometric images of the victim. The dose reconstruction mapping confirmed the very high severity of the local irradiation since 2000 Gy was delivered to the centre of the lesion. The main characteristic of a <sup>192</sup>Ir source irradiation is the very sharp gradient of dose delivered inside the target tissue. The 25 Gy necrotic boundary isodose was situated at 4.5 cm in depth from the centre of the skin surface lesion. The key issue of an accidental dose reconstruction is the assessment of uncertainties that are in practice very difficult to quantify. Consequently, a safety factor of 20% was applied for the dosimetry guided surgery and the 20 Gy isodose was defined as the limit of the excision in surface (10 cm in diameter) and in depth (5 cm). Postsurgical follow-up demonstrated that this anatomical dose assessment was effective in surface but could have been underestimated in depth as suggested by the recurrence of the radiation muscular lesion focalized in the wound bed. Another hypothesis could be the technical difficulty in controlling accurately the depth of the surgical excision. Last, a high radiosensitivity

**Figure 6. Schedule of dose assessment, surgical and cellular therapeutical approaches.**



of the patient could also be suspected in view of the occurrence of the muscular fibrotic process and the lysis of the autograft.

The present accident demonstrates one more time that in case of a very severe radiation burn, the classical therapeutic strategy (serial excisions followed by skin autografts) is inappropriate. Therefore, following this primary failure, we decided to design an innovative therapeutic approach with cellular therapy.

MSCs are defined as pluripotent cells capable of proliferating extensively and able to give rise to skeletal tissues: bone, cartilage, tendon and marrow stroma [14–16]. Moreover, MSCs are able to migrate towards injured tissular lesions where they deliver a high number of growth factors that are required for immunoregulation and repair processes [17–19]. It has been demonstrated that MSCs can be easily recovered from bone marrow and enriched through their property of adhering to tissue culture surfaces [20]. Several teams have recently expanded MSCs up to a millionfold *in vitro* for hematologically and orthopedically relevant applications [21–24]. We have previously shown their positive effect in promoting the healing of radiation burn lesions in a preclinical immunodeficient NOD/SCID

mouse model: in this model, the intravenous administration of human MSCs strongly improved the healing of burn lesions of the leg induced by a 30 Gy irradiation [25]. In this context we proposed to the patient a new therapeutic approach where the second surgical excision and skin graft was locally combined with the use of MSC therapy.

Muscular fibrotic tissues were again excised, and a new skin autograft done. Expanded bone marrow-derived MSC were locally injected around and in the lesion and this was repeated a week later. Following this combined therapy, the healing of the lesion proceeded smoothly. There was no side effect. Perfect healing persists 1 year after the procedure.

We postulate that MSC favoured the radiation burn healing process through the secretion of soluble mediators (cytokines) and trophic factors that may have counteracted the local inflammatory wave processes [25,26]. However, we had no way to study the fate of the infused MSCs because of their autologous nature and the lack of specific markers. It has been shown recently in several studies with MSCs that when their presence can be detected at some tissue sites, this usually does not last over 6–9 months [23].

**Table 2. Comparative therapeutic strategies of very severe radiation burns in three historical cases.**

	<b>Radiation burn localization (size)</b>	<b>Surgical treatment strategy: excision, artificial skin graft, skin autograft, omentum flap</b>			<b>Mesenchymal stem cell therapy</b>	<b>Final outcome</b>
Peruvian case (1999)	Right thigh (30 × 13 cm)	2 excisions	Excision + sciatic nerve cutting	Lower limb amputation	No	No healing (Extension to Perineum area)
Georgian case (2002)	Back (26 × 19 cm)	Excision + artificial skin graft	4 excisions + 4 skin autografts	Excision + omentum flap + skin autograft	No	Healing (16.5 months post-treatment)
Chilean case (2005)	Left buttock (5cm in diameter)	2 excisions + 2 skin autografts	2 excisions + 2 skin autografts	2 excisions + 2 skin autografts	2 MSC local administrations	Healing (5.5 months post-treatment)

In conclusion, we present this report as possibly indicating the efficacy of human MSC therapy in the management of very severe radiation burns involving cutaneous and subcutaneous structures. If confirmed in further radiation accidents, which fortunately by nature are rare although dramatic events, it would bring a major therapeutic improvement. Furthermore, this novel multidisciplinary

therapeutic approach using physical techniques, surgical procedures and cellular therapy with adult stem cells may open new prospects in the field of radiotherapy complications.

#### Acknowledgements

The authors thank Valerie Buard and Valerie Holler for their histological technical assistance.

#### Bibliography

- Gottlöber P, Bezold G, Weber L *et al.*: The radiation accident in Georgia: Clinical appearance and diagnosis of cutaneous radiation syndrome. *J. Am. Acad. Dermatol.* 42, 453–458 (2000).
- Peter RU, Gottlöber P: Management of cutaneous radiation injuries: diagnostic and therapeutic principles of the cutaneous radiation syndrome. *Mil. Med.* 167, 110–112 (2002).
- Peter RU: Cutaneous radiation syndrome in multiorgan failure. *Br. J. Radiol.* 27(Suppl.), 180–184 (2005).
- Zaharia M, Goans RE, Berger ME *et al.*: Industrial radiography accident at the Yanango hydroelectric power plant. In *The Medical Basis for Radiation-Accident Preparedness*. The Parthenon Publishing Group, London, UK 267–281 (2001).
- Lefaix JL, Delanian S: Le syndrome cutané radio-induit. In *John Libbey Eurotext. The terrorist threat Nuclear, Radiological, Biological, Chemical-A medical approach*. De Revel T, Gourmelon P (Eds). 87–95 (2005).
- Stephanazzi J, Barges L, Curet PM, Lebevert H, Carsin H: Le traitement du syndrome cutané radiologique. In *John Libbey Eurotext. The terrorist threat Nuclear, Radiological, Biological, Chemical-A medical approach*. De Revel T, Gourmelon P (Eds). 112–122 (2005).
- Clairand I, Trompier F, Bottollier-Depois JF, Gourmelon P: Ex vivo ESR measurements associated with Monte Carlo calculations for accident dosimetry: application to the 2001 Georgian accident. *Radiat. Prot. Dosimetry* 119, 500–505 (2006).
- Bottollier-Depois JF, Gaillard-Lecanu E, Roux A, *et al.*: New approach for dose reconstruction: application to one case of localized irradiation with radiological burns. *Health Phys.* 79(3), 251–256 (2000).
- Lemosquet A, Clairand I, de Carlan L, Franck D, Aubineau-Lanière I, Bottollier-Depois JF: A computational tool based on voxel geometry for dose reconstruction of a radiological accident due to external exposure. *Radiat. Prot. Dosimetry* 110, 449–454 (2004).
- Walters LS: MCNPX User's Manual, Version 2.4.0, LA-CP-02–408, Los Alamos National Laboratory (2002).
- Doucet C, Ernou I, Zhang Y *et al.*: Platelet lysates promote mesenchymal stem cell expansion: a safety substitute for animal serum in cell-based therapy applications. *J. Cell. Physiol.* 205(2), 228–236 (2005).
- Lange C, Cakiroglu F, Spiess AN, Cappallo-Obermann H, Dierlamm J, Zander A: Accelerated and safe expansion of human mesenchymal stromal cells in animal serum-free medium for transplantation and regenerative medicine. *J. Cell. Physiol.* 213(1), 18–26 (2007).
- Kim NW, Piatyszek MA, Prowse KR *et al.*: Specific association of human telomerase activity with immortal cells and cancer. *Science* 266, 2011–2015 (1994).
- Bentley SA: Bone marrow connective tissue and the haemopoietic microenvironment. *Br. J. Haematol.* 50(1), 1–6 (1982).
- Caplan AI: Mesenchymal stem cells. *J. Orthop. Res.* 9(5), 641–650 (1991).
- Ringden O, Uzunel M, Rasmusson I *et al.*: Mesenchymal stem cells for treatment of therapy-resistant graft-versus-host disease. *Transplantation* 81(10), 1390–1397 (2006).
- Chapel A, Bertho JM, Bensedhoum M *et al.*: Mesenchymal stem cells home to injured tissues when co-infused with hematopoietic cells to treat a radiation-induced multiorgan failure syndrome. *J. Gene Med.* 5, 1028–1038 (2003).
- François S, Bensedhoum M, Mouisseddine M *et al.*: Local irradiation not only induces homing of human mesenchymal stem cells at exposed sites but promotes their widespread engraftment to multiple organs: A study of their quantitative distribution after irradiation damages. *Stem Cells* 24, 1020–1029 (2006).
- Le Blanc K, Ringden O: Mesenchymal stem cells: properties and role in clinical bone marrow transplantation. *Curr. Opin. Immunol.* 18(5), 586–591 (2006).
- Friedenstein AJ, Gorskaja JF, Kulagina NN: Fibroblast precursors in normal and irradiated mouse hematopoietic organs. *Exp. Hematol.* 4(5), 267–274 (1976).
- Koc ON, Gerson SL, Cooper BW *et al.*: Rapid hematopoietic recovery after coinfusion of autologous-blood stem cells and culture-expanded marrow mesenchymal stem cells in advanced breast cancer patients receiving high-dose chemotherapy. *J. Clin. Oncol.* 18(2), 307–316 (2000).
- Horwitz EM, Prockop DJ, Fitzpatrick LA, *et al.*: Transplantability and therapeutic effects of bone marrow-derived mesenchymal cells in children with osteogenesis imperfecta. *Nat. Med.* 5(3), 309–313 (1999).
- Le Blanc K, Rasmusson I, Sundberg B *et al.*: Treatment of severe acute graft-versus-host disease with third party haploidentical mesenchymal stem cells. *Lancet* 363(9419), 1439–1441 (2004).
- Fouillard L, Bensedhoum M, Bories D *et al.*: Engraftment of allogeneic mesenchymal stem cells in the bone marrow of a patient with severe idiopathic aplastic anemia improves stroma. *Leukemia* 17(2), 474–476 (2003).
- François S, Mouisseddine M, Mathieu N *et al.*: Human mesenchymal stem cells favour healing of the cutaneous radiation syndrome in a xenogenic transplant model. *Ann. Hematol.* 86, 1–8 (2007).
- Thierry D, Bertho JM, Chapel A, Gourmelon P: Cell therapy for the treatment of accidental radiation overexposure. *Br. J. Radiol.* 27(Suppl.), 175–179 (2005).



# Use of Mesenchymal Stem Cells (MSC) in Chronic Inflammatory Fistulizing and Fibrotic Diseases: a Comprehensive Review

Jan Voswinkel · Sabine Francois · Jean-Marc Simon ·  
Marc Benderitter · Norbert-Claude Gorin ·  
Mohamad Mohty · Loïc Fouillard · Alain Chapel

Published online: 8 January 2013  
© Springer Science+Business Media New York 2013

**Abstract** Mesenchymal stem cells (MSC), multipotent adult stem cells, feature the potential to regenerate tissue damage and, in parallel, inhibit inflammation and fibrosis. MSC can be safely transplanted in autologous and allogeneic ways as they are non-immunogenic, and consequently represent a therapeutic option for refractory connective tissue diseases, fibrosing diseases like scleroderma and fistulizing colitis like in Crohn's disease. Actually, there are more than 200 registered clinical trial sites for evaluating MSC therapy, and 22 are on autoimmune diseases. In irradiation-induced colitis, MSC accelerate functional recovery of the intestine and dampen the systemic inflammatory response. In order to provide rescue therapy for accidentally over-irradiated prostate cancer patients who underwent radiotherapy, allogeneic bone marrow-derived MSC from family donors were intravenously infused to three patients with refractory and fistulizing colitis resembling fistulizing Crohn's disease. Systemic MSC therapy of refractory irradiation-induced colitis was safe and effective on pain,

diarrhoea, hemorrhage, inflammation and fistulization accompanied by modulation of the lymphocyte subsets towards an increase of T regulatory cells and a decrease of activated effector T cells. The current data indicate that MSC represent a promising alternative strategy in the treatment of various immune-mediated diseases. Encouraging results have already been obtained from clinical trials in Crohn's disease and SLE as well as from case series in systemic sclerosis. MSC represent a safe therapeutic measure for patients who suffer from chronic and fistulizing colitis. These findings are instructional for the management of refractory inflammatory bowel diseases that are characterized by similar clinical and immunopathological features.

**Keywords** MSC · Stem cells · Immunology · Immunomodulation · Connective tissue disease · Fistulization · Fibrosis · Colitis · Radiotherapy

## Background

Mesenchymal stromal cells (MSC) are easy to isolate and amplify from bone marrow and adipose tissue. These characteristics led to more than 10 years of therapeutic use of MSC in a growing number of diseases, most importantly in tissue degeneration, irradiation damage, hematopoietic and posttransplant diseases as well as in refractory chronic inflammatory, fibrosing and fistulizing diseases. In inflammatory diseases, MSC are effective by their immune modulatory properties coupled with a tissue repair capacity.

MSC are characterized by their phenotype and their ability to differentiate into three lineages, chondrocytes, osteoblasts and adipocytes. These stroma cells have been identified in the bone marrow as well as in other tissues of the joint, including adipose tissue, synovial tissue, periosteum, perichondrium and cartilage [1–4]. MSC are primarily

---

J. Voswinkel (✉) · S. Francois · N.-C. Gorin · M. Mohty ·  
A. Chapel  
Department of Hematology, Saint Antoine Hospital APHP and  
UPMC University, UMRS 938, 184 rue Faubourg Saint Antoine,  
75012 Paris, France  
e-mail: jan.voswinkel@sat.aphp.fr

S. Francois · M. Benderitter · A. Chapel  
Radiological Protection and Human Health Division,  
Institute of Radiological Protection and Nuclear Safety,  
Fontenay-aux-Roses, France

J.-M. Simon  
Department of Radiation Oncology,  
Pitié-Salpêtrière University Hospital, Paris, France

L. Fouillard  
Department of Hematology and Cell therapy, Centre Hospitalier,  
Meaux, and UPMC University, Paris, France

not immune-stimulating *in vitro*. They do not induce lymphocyte proliferation when co-cultured with allogeneic lymphocytes, and they are not targeted by cytotoxic lymphocytes and natural killer (NK) cells [5–8].

### MSC–Lymphocytes and Dendritic Cell Interactions

MSC act as potent modulators of immune responses by their (*in vitro*) ability to suppress T cell proliferation [5]. Immune modulation requires their previous activation by immune cells through the proinflammatory cytokines interferon gamma (IFN- $\gamma$ ), tumour necrosis factor  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) or interleukin-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) [9]. Moreover, indoleamine-2,3-dioxygenase, heme oxidase as well as human leukocyte antigen G5 (HLA-G5) have been involved in MSC-mediated immune modulation. A distinct subpopulation of MSC, characterized by the expression of CXCL12 and vascular cell adhesion molecule-1, might provide a survival niche for memory plasma cells [10] (Fig. 1). Besides immune modulation, MSC exhibit healing capacities, improve angiogenesis and prevent fibrosis [11].

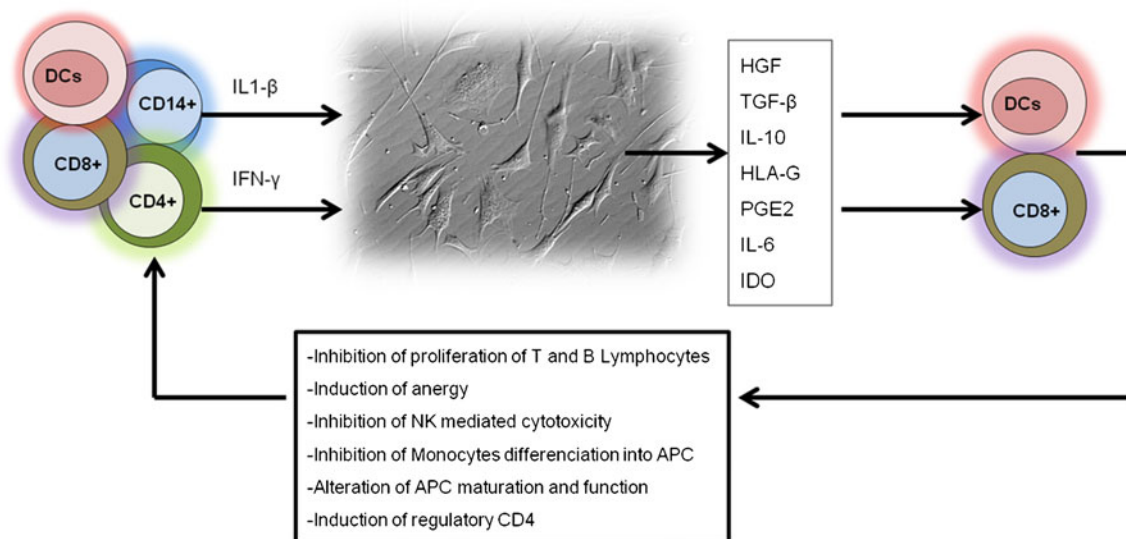
Prostaglandin E2 (PGE2) is involved in the immunosuppressive activity of MSCs. PGE2 acts as a powerful immune suppressant representing inhibiting T cell mitogenesis and interleukin-2 production, and is a cofactor for the induction of T helper (Th) type 2 lymphocyte activity. Production of PGE2 by MSC is enhanced following TNF- $\alpha$  or IFN- $\gamma$  stimulation. The use of specific inhibitors resulted in restoration of T lymphocyte proliferation [12]. MSC-derived PGE2 was shown to act on macrophages by stimulating the production of interleukin-10 (IL-10) and on monocytes

by blocking their differentiation toward dendritic cells (DCs) [13, 14] (Fig. 2).

The interleukin IL-6, a major MSC-secreted factor, has been reported to be involved in the inhibition of monocyte differentiation toward DCs (Fig. 2), decreasing their stimulation ability on T cells [15, 16]. In parallel, the secretion of IL-6 by MSC was reported to delay apoptosis of lymphocytes and neutrophils [17, 18]. HLA-G5 by MSC was recently shown to suppress T cell proliferation, as well as NK cell cytotoxicity and T cell cytotoxicity, and to promote the generation of regulatory T (TREG) cells. Cell contact between MSC and activated T cells induced IL-10 production, which was essential to stimulate the release of soluble HLA-G5 [19, 20].

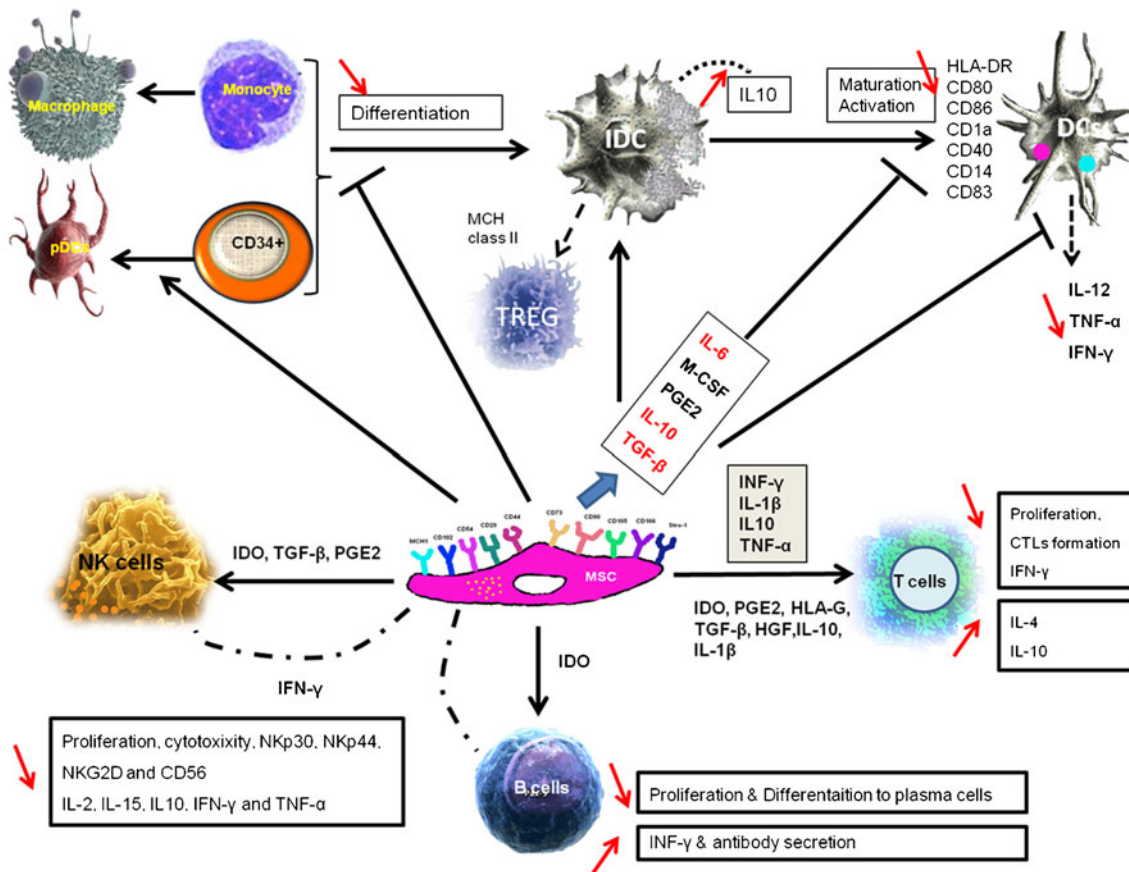
### Promotion of Regulatory T Cells, Suppression of Autoreactivity

Both *in vitro* and *in vivo*, MSC promote the generation of CD4+CD25+ or CD8+ TREG cells with functional properties [21]. *In vivo* data, however, are contradictory [22, 23]. Recent studies suggest that MSC may induce a cytokine profile shift in the Th1/Th2 balance toward the anti-inflammatory phenotype Th2 that is accompanied by an increase of T regulatory lymphocytes and in consequence an increase of IL10 [24, 25] (Fig. 3). MSC inhibit the proliferation of B lymphocytes that are activated with anti-immunoglobulin antibodies, soluble CD40 ligand or cytokines [26]. The use of human adipose tissue-derived MSC led to decreased antigen-specific Th1/Th17 cell expansion, enhanced secretion of IL-10 and generation of CD4+CD25+



**Fig. 1** Possible sequences of lymphocytes and MSCs interaction. Initially, CD14+ secrete IL-1- $\beta$ , allogeneic lymphocytes secrete IFN- $\gamma$ . Then, these cytokines will act on MSCs and stimulate the

production of several inhibitory factors. Thirdly, secreted factors will act on different immunological reactions on lymphocytes through the executive cells (dendritic cells, DCs)



**Fig. 2** Possible different acting mechanisms upon dendritic cells, T lymphocytes, B lymphocytes and natural killer cells. MSCs inhibit monocytes (MO) differentiation into immature DCs (IDC) and skewed them toward cells with macrophage features (Mac). They reduced percentage of CD34(+) derived IDC but increased plasmacytoid DC (pDC). They inhibit maturation IDC into mature DCs (MDC). MSCs inhibit the regulation of HLA-DR, CD80, CD86, CD1a, CD40, CD14 and CD83 antigen on DCs surface through IL-6, M-CSF, PGE2, IL-10 and TGF- $\beta$  secretion. MSCs increased production of IL-10 and

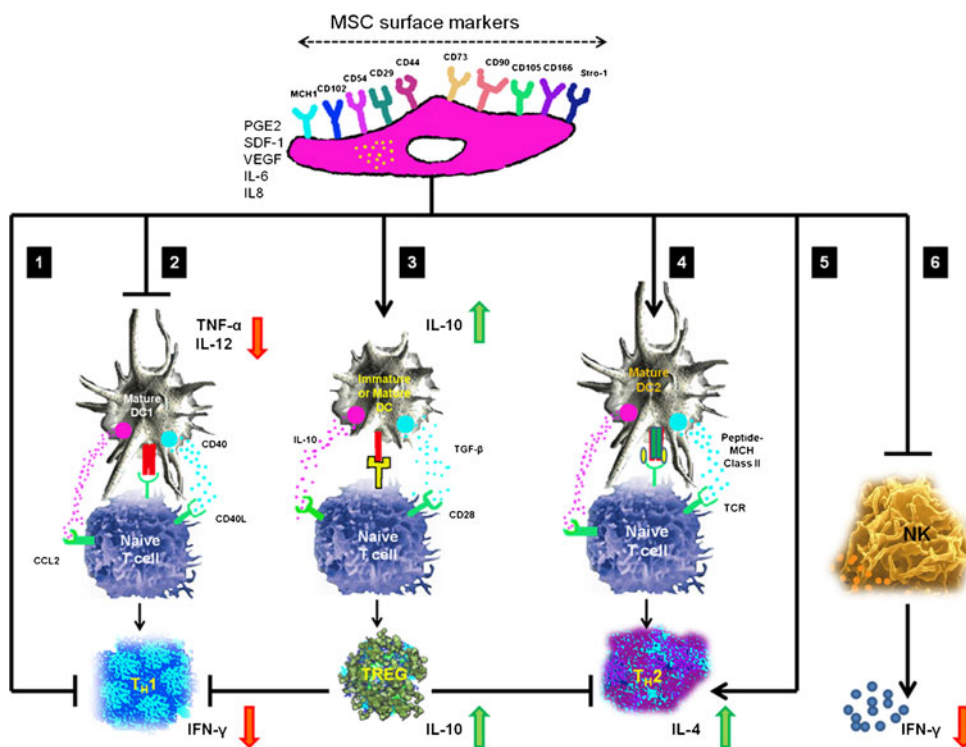
decreased production of IL-12, TNF- $\alpha$  and INF- $\gamma$  by DCs. MSCs induced DC that exhibit a suppressor phenotype (supp APC) and generated alloantigen-specific regulatory cells (Reg cells). MSCs inhibit NK proliferation and change cytokines secretion pattern through IDO, TGF- $\beta$ , PGE2. MSCs inhibit lymphocytes B proliferation and differentiation to plasma cells through IDO. MSCs inhibit lymphocytes T proliferation and cytotoxicity through IDO, PGE2, HLA-G, TGF- $\beta$ , HGF, IL-10 and IL-1 $\beta$

FoxP3+ TREG cells with the capacity to suppress self-reactive T effector responses in a xenogeneic collagen-induced arthritis model [27].

#### MSC in Clinical Practice

Transplantation of MSC from BM is considered safe and has been widely tested in clinical trials of cardiovascular, neurological and immunological disease with encouraging results. The continuously growing interest on MSC therapy is based besides their safety on MSC's pleiotropic functions that enhance endogenous repair and attenuate immunological dysfunction. Currently, there are more than 200 registered clinical trial sites for evaluating MSC therapy throughout the world (<http://clinicaltrials.gov/>, summarized in [28, 29]). For the absence of major histocompatibility complex class II and T lymphocyte coactivators, MSC are

immunoprivileged and in parallel display immunomodulatory, proangiogenic as well as antifibrotic properties. Consecutively, MSC represent an attractive clinical approach for chronic inflammatory, fibrosing and fistulizing diseases. MSC can be transplanted without conditioning and without immunosuppressive prophylaxis in allogeneic as well as in autologous way. Actually, within 140 clinical studies reported employing MSC, 22 are on autoimmune diseases. No major complications have been documented so far [29]. MSC can be obtained from bone marrow (BM), adipose tissue, cord blood and potentially from muscle, gingiva and fetal liver. Actually, most clinical MSC studies use BM, adipose tissue and cord blood. MSC undergo 2–3 weeks of culture before use either by immediate injection into the patient or alternatively by cryoconservation and banking. Either fresh or cryoconserved MSC culture products can be injected intravenously or locally (i.e. into fistula



**Fig. 3** Proposed mechanisms of MSC action upon dendritic cells (DCs). MSC mediate their immunomodulatory effects by interacting with cells from both the innate (dendritic cells (DC), pathways 2–4; natural killer cells (NK), pathway 6) and adaptive immunity systems (T cell, pathways 1 and 5). MSC inhibition of TNF- $\alpha$  secretion and promotion of IL-10 secretion may affect DC maturation state and their functional properties, resulting in skewing the immune response toward in an anti-inflammatory/tolerant phenotype. Alternatively, when

MSCs are present an inflammatory microenvironment, they inhibit IFN- $\gamma$  secretion from Th1 and NK cells and increase IL-4 secretion from Th2 cells, thereby promoting a Th1–Th2 shift. It is likely that MSC also mediate their immunomodulatory actions by direct cell–cell contact as well as by secreted factors. Several MSC cell-surface molecules and secreted molecules are depicted. *CCL* chemokine ligand, *TCR* T cell receptor

or into a joint). Injections can be repeated without toxicity or loss of activity [30].

### MSC Dispersion and Action in Model and Clinical Practice

In animal models intravenously administered, marked MSC are detected firstly enriched in the lungs and liver and secondary in inflamed as well as irradiated tissues. In five of six patients with osteogenesis imperfect, MSC were detected after 1 h in the bone, skin and BM [31]. One study on AD-MSK revealed a risk of malignant transformation [32] that could not be confirmed by others: several recent studies on BM-MSK documented that only transient chromosomal alterations appear. Neither in vitro nor in vivo transformation and induction of malignancy was seen [33]. To ensure biological safety, a karyotype control documenting the absence of genetic alteration is requested [34].

### Autoimmune Diseases

The immune modulatory effects of MSC on dendritic cells, B and T lymphocytes predispose MSC to a beneficial role in

salvage therapy of chronic inflammatory fistulizing bowel diseases, fibrosing diseases, vasoocclusive diseases and type I diabetes mellitus [28, 29].

### Systemic Lupus Erythematosus

In systemic lupus erythematosus (SLE), four clinical trials with MSC were reported. One Chinese study on 82 patients with refractory SLE treated by intravenous infusion of allogeneic BM-MSK displayed a good tolerance but no statistically significant benefit [35]. Another Chinese one-armed open-label study administered allogeneic cord blood-derived MSC (CB-MSK) intravenously to 16 patients with refractory SLE with lupus nephritis. A significant response of lupus nephritis in all patients was observed [36]. With respect to the few number of patients, the question remains whether CB-MSK do better than BM-MSK.

### Fistulizing Bowel Diseases

The largest body of experience with more than 100 patients treated within clinical trials by local as well as systemic

MSC therapy concerns refractory fistulizing bowel diseases like Crohn's disease (Table 1 provides an overview of actual studies on MSC in fistula). The treatment of chronic inflammatory bowel diseases by MSC provides a therapeutic option in patients who are refractory to all established therapies. By their immunoprivileged and immune modulatory linked with tissue repairing character, MSC represent the best rescue therapy for these chronic inflammatory and often fistulizing diseases [37]. Several clinical trials of phase II and phase III are ongoing or already concluding data from MSC therapy in Crohn's disease, in non-Crohn fistulizing bowel diseases as well as in gut and liver graft versus host diseases (GvHD) that we will discuss later on. In Crohn's disease, several groups use MSC for the treatment of fistula. First evidence of MSC efficacy in inflammatory bowel diseases was documented in case series and phase I–II trials (reviewed in [37, 38]). Mucosal lesions healed rapidly after MSC treatment [39]. One phase I trial treated Crohn's fistula

by autologous adipose tissue-derived MSC: eight fistulas in four patients were treated by amplified MSC, and a healing of fistula was achieved within 8 weeks. Six of eight fistulas were considered as healed as epithelization was observed. No abscess or other complication occurred within the follow-up of 24 months [40]. A more recent publication by the same group confirmed the therapeutic success of MSC therapy: A phase II trial with 49 patients with complex perianal fistula (35 cryptoglandular fistula and 14 Crohn's fistula) compared standard therapy (intrafistular injection of fibrin glue) to the addition of  $20 \times 10^6$  adipose tissue-derived MSC. Within the 24 patients treated by MSC, the authors observed a significant superiority on fistula occlusion of 71 versus 16 % in fibrin glue alone. Fistula occlusion remained stable in 1 year of follow-up. No side effects linked to cell therapy had been observed. Of note, by MSC therapy, an anal excision that risks anal sphincter lesions could be avoided [41].

**Table 1** Clinical experience of mesenchymal stem cells in fistula

Disease/phase	No patients	Source of MSC/treatment	Outcome	Study
Crohn's disease/phase 1	4	Local injection of autologous adipose tissue derived MSC	9 fistula treated in 4 patients; healing in 8 weeks	Garcia-Olmo et al. [40]
Crohn's disease/phase 2	49	Local injection of autologous adipose tissue derived MSC (20 millions) in fibrin glue (24 patients) or fibrin glue alone (25 patients)	71 % of fistula occlusion with MSC 16 % with fibrin alone	Garcia-Olmo et al. [41]
Crohn's disease phase	4	Cryptoglandular origin, (35) associated with Crohn's disease (14) Autologous adipose tissue derived MSC expanded or not (stromal vascular fraction, SVF)	3 fistula (4 treated) closed using expanded MSC 1 fistula (4 treated) closed using unexpanded MSC (SVF)	Garcia-Olmo et al. [42]
Crohn's disease recto Vaginal Fistula phase 1	1	Local injection of autologous adipose tissue derived MSC in fibrin glue	Not determined	Garcia-Olmo et al. [43]
Crohn's disease phase 1	10	Intravenous injection of autologous bone marrow tissue derived MSC	2 doses of 1–2 millions of MSC/kg 3 patients respond to MSC therapy. Clinical response (CDAI decrease $\geq 70$ from baseline) 6 weeks post-treatment; 3 patients required surgery due to disease worsening	Duijvestein et al. [44]
Ulcerative colitis Crohn's disease phase 1	39 10	Intravenous injection of allogenic bone marrow tissue derived MSC (150–200 millions/patient)	Clinico-morphological remission in 40 patients (Results quantified using Rachmilewicz clinical activity index, the Crohn's disease activity index and the Mayo and Gebs scales) Ineffective in 10 patients	Lazebnik et al. [45]
Crohn's disease phase 1	12	Local injection of autologous bone marrow tissue derived MSC without fibrin glue (50 million/patients)	Complete closure in 7 cases Incomplete closure of fistula tracks in 3 patients Significant Crohn's disease activity Decrease of perianal activity Rectal mucosal healing	Ciccocioppo et al. [46]

All clinical studies conducted between 2005 and 2011 on the treatment of fistulas by MSC therapy (bone marrow tissue derived MSC: BM-MSC; adipose tissue derived MSC: AD-MSC)

MSC from adipose tissue seemed to be more effective after expansion (three of four fistulas closed) than without expansion (one of four fistulas closed) [42]. In a recent study from 2010, the therapeutic efficacy of allogeneic MSC had been demonstrated in the treatment of rectovaginal fistula [43]. Intravenous injection of autologous BM-MSC has been shown to be feasible and effective in a study of ten patients who obtained two doses of one to two millions of MSC per kilogram body weight with 1 week of interval. The authors showed that three of these patients responded to the MSC therapy [44]. A recent study reported 39 patients with ulcerative colitis and 10 patients with Crohn's who were treated by allogeneic BM-MSC intravenously. Eight months of follow-up revealed a benefit in 40 patients [45]. Another study documented the feasibility, safety and efficacy of autologous BM-MSC therapy by local injection of the expanded MSC without addition of fibrin glue into fistula within 12 Crohn's patients. They observed sustained complete closure in seven cases and an incomplete closure of fistula tracks in three cases with statistically significant reduction of Crohn's disease activity and decrease of perianal disease activity in parallel ( $p < 0.01$  for both), and rectal mucosal healing [46].

#### Systemic Sclerosis

Severe systemic sclerosis (SSc) with lung fibrosis, skin sclerosis and vasoocclusion often remains refractory to steroids and immunosuppressive drugs. MSC salvage therapy in these patients is promising for their anti-inflammatory action coupled with anti-fibrotic and proangiogenic potential. Whereas Cipriani et al. raised the suspicion of MSC deficiency underlying the fibrosing pathology [47], Larghero et al. could demonstrate that there are no functional differences between MSC from SSc patients to healthy controls, and thus, autologous transplantation is feasible [48]. Recently, Keyszer et al. published a case series of five refractory SSc patients who underwent family allogeneic transplantation by BM-MSC intravenously injected. Cutaneous manifestations significantly improved in four patients, digital ulcers healed in three patients and pulmonary fibrosis stabilized with a trend to better oxygenation in all patients. No toxicities superior to grade I were seen [49].

#### Graft Versus Host Disease

Severe graft versus host disease is characterized by an immune aggression by the donor's T lymphocytes against the host's tissue (most involved are the skin, gut and liver). Severe GvHD is a life-threatening complication after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. For severe steroid refractory GvHD, no effective therapy exists (summarized in [50]). Several studies used allogeneic BM-MSC

for systemic application in refractory severe GVHD with contradictory results. The up to now largest study by Ringden, Le Blanc and coworkers in eight patients revealed an overall proven response rate of 6/8 with four patients showing a prompt and complete response, one a slow response. One patient responded twice in the liver and gut. Two patients died after MSC infusion, one had no gastrointestinal GVHD at autopsy. Survival was significantly better in patients given MSC, compared to 16 comparable controls [51]. These findings were confirmed by a phase II trial conducted by the same group: 30 of 55 patients had a complete response and 9 showed improvement. Complete responders had lower transplantation-related mortality 1 year after infusion [52].

#### MSC Therapies for the Restoration of Radio-Induced Pelvic Damage

Up to 500,000 patients per year undergo abdominal or pelvic radiotherapy worldwide. Eight out of ten will develop acute gastrointestinal symptoms, and 5 to 10 % will develop severe intestinal complications within 10 years after treatment, i.e. pelvic radiation disease (PRD) [53], due to the low tolerance of organs at risk (intestine, colon, rectum and bladder) in the radiation field. Acute radiation responses affect patient quality of life, causing abdominal pain, diarrhoea/constipation sequences and malabsorption that may interrupt or delay the radiotherapy protocol. Late radiation response refers to fibro-necrosis, fistulae, hemorrhage and occlusion, and the clinical impact is important in terms of persistence, morbidity and mortality. Nowadays, dose-volume histograms are routinely generated for each patient receiving radiotherapy. This allows defining dose-volume tolerance for each organ at risk. For example, radiation-induced rectal bleeding is significantly increased in patients who received more than 70 Gy to a quarter or more of their rectal volume. Hypotheses on radiolesions' etiology focused on epithelial ulceration, mucosal and submucosal inflammation for the acute radiation enteropathy, and the transmural effect of chronic radiation enteropathy is characterized by excessive extracellular matrix deposition, vascular sclerosis and muscular dystrophy. The cellular and molecular mechanisms of pelvic radiation disease include oxidative stress, stem cell death with compromised epithelial renewal [54], microvascular damage with endothelial cell death, pro-inflammatory and pro-thrombotic factor activation [55–58] and the release of numerous inflammatory and fibrogenic cytokines and growth factors. Current management strategy for PRD includes anti-inflammatory treatment with sulfasalazine, vascular therapy with hyperbaric oxygen or argon plasma coagulation and fibrosis pharmacological modulation with statins. Severe radio-necrosis management requires invasive surgical intervention.

As demonstrated in a preclinical model, mesenchymal stem cells (MSC) may offer a novel strategy to treat pelvic radiation disease. In mice, MSC transplanted via the tail vein after abdominal irradiation at 13 Gy possessed the capacity to engraft into the enteric mucosa [59]. Another study showed that intestinal structure had recovered with systemic MSC transplantation at 3 days after 3.5-Gy total body irradiation and 4.5-Gy local abdominal irradiation. In a mouse model of local irradiation, transplantation of MSC directly into the walls of irradiated intestine improves radiation-induced intestinal injury. MSC are able to repair radiation-induced intestinal damage by inhibiting ulceration [60, 61]. Lorenzi et al. reported that MSC injection improved muscle regeneration and increased contractile function of anal sphincters after injury [62]. In that study, rats underwent sphincterotomy and surgical repair followed by intrasphincteric injection of MSC using a microsyringe. MSC treatment brings about fast recovery of the intestine (structure and function) with reversible alterations and extends the life of mice with irreversible gastrointestinal disorders. The effects of MSC are a consequence of their ability to improve the renewal capability of small intestinal epithelium. MSC treatment favours the re-establishment of cellular homeostasis by both increasing endogenous proliferation processes and inhibiting apoptosis of radiation-induced small intestinal epithelial cells [63]. MSCs might regulate the epithelial stem/progenitor cells directly or indirectly, that is stem cell niches that provide and maintain an optimal microenvironment for stem cell function. MSC release cytokines and growth factors, such as interleukin-11, hepatocyte growth factor (HGF), fibroblast growth factor-2 and insulin-like growth factor-1. Each of these factors has been described earlier as facilitating intestinal mucosa repair, either through enhancement of cell proliferation or inhibition of epithelial cell apoptosis. MSC-derived bioactive components could be a novel therapeutic approach for the treatment of radiation-induced injury, protecting radiation-induced small intestine injury in mice. Repeated infusion of MSC-derived bioactive components for 7 days immediately after abdominal irradiation of 10 Gy ( $^{60}\text{Co}$   $\gamma$ -ray) increased the survival rate, decreased diarrhoea occurrence and improved the small intestinal structural integrity of irradiated mice [64].

Mitigation of lethal intestinal injury, following high-dose irradiation, can be achieved by intravenous administration of bone marrow-derived adherent stromal cell transplantation (BMASCT), including mesenchymal, endothelial and macrophage cell populations. BMASCT increases blood levels of intestinal growth factors and induces regeneration of the irradiated host progenitor and the villous enterocytes crypt intestinal stem cells niche, thereby accelerating functional recovery of the intestine in radiation-induced gastrointestinal syndrome. By reducing the levels of pro-

inflammatory cytokines, while inducing anti-inflammatory cytokines, BMASCT also dampens the systemic inflammatory response syndrome in radiation-induced gastrointestinal syndrome [65].

### Case Series of Compassionate MSC Therapy in Patients

#### *Background*

After irradiation, the transplantation of adult stem cells promises to foster healing of severe irradiation-induced lesions. As a healing effect, their potential gives rise to the reconstitution of advanced lesions. Furthermore, transplantation of adult stem cells can diminish inflammatory and ischemic irradiation action in periphery that in the untreated course of disease would lead to progressive and irreversible necrotizing damage. The beneficial effects of MSC in tissue consist of their anti-inflammatory properties, in the protection of micro-vascularization as well as in the limitation of irradiation-induced fibrosis. This might be due to a synergistic effect in the differentiation of MSC into the targeted tissues and the contribution to remodeling of the extracellular matrix that constitute the microenvironment by favouring the proliferation of endogenous tissue stem cells. A trophic effect on the endogenous cells is performed by the transplanted MSC production of paracrine factors implanted into the target organ.

From 2001 and 2006, 433 patients had been overexposed while obtaining a confirmational radiotherapy of prostate cancer at the Jean Monnet Hospital at Epinal (France). Thirty-two patients of this cohort had been injured by overdose. Nine patients died, including one who died in consequence of irradiation-induced lesions. With respect to the remaining patients, seven present post-irradiation injury grade III to IV, with decharging colostomy and complex fistula and/or recto-vesicular fistula. For these patients, two approaches had been considered and could eventually be combined: surgical revision and/or injection of MSC.

#### *Cases*

Here, we report three patients with refractory irradiation-induced hemorrhagic colitis treated by MSC. The four male elder patients accidentally had been overexposed to irradiation while undergoing radiotherapy for prostate cancer. The over-irradiation led to severe refractory hemorrhagic colitis and recto-vesicular as well as recto-prostatic fistula. MSC were obtained by culture from BM aspirates of their children. The three patients received  $5 \times 10^6$ ,  $2.6 \times 10^6$  and  $5 \times 10^6/\text{kg}$  MSC, respectively, by intravenous infusion. Before, 1 and 6 months after MSC therapy, the clinical parameters pain, hemorrhage and fistulization (MRI, colonoscopy) were evaluated. Except for one patient retreated with  $0.8 \times$

**Table 2** Patient characteristics

Case	Age (years)	Dose plan	Dose received	Pathology induced by over-irradiation	Treatment after radiotherapy	Source MSC and treatment	Observations
1	66	78 Gy prostate cavity	93.2 Gy	Urine loss in rectum Pollakisuria Emissional pain Bleeding Large necrotic zone Fistula in prostate cavity	Colostomy Suprapubic Catheterization	$5 \times 10^6$ MSC/kg Intravenous Donor niece	Pain disappeared 10 days after injection and reappeared 3 weeks later
2	80	73 Gy prostate cavity	91 Gy	-Chronic pain -Permanent rectal bleeding -Retracted urinary bladder, -Active cystitis and rectitis Decomposition of the bladder-prostate bond as well as a recto-prostatic fistula	Discharging colostomy Application of a Foley's urinary tube	$2.6 \times 10^6$ MSC/kg Intravenous Donor son $0.82 \times 10^6$ MSC/kg (6 months later) Intravenous Donor son	Pain and bleeding disappeared 4 weeks after injection and relapse 6 month latter Pain and bleeding partially disappeared and relapse 3 month latter
3	69	69 Gy Prostate cavity	86 Gy	Reduced capacity of bladder due to strongly enlarged walls Atrophy of the seminal glands and fatty conversion by irradiation of the sacral spine	Decharging colostomy followed by 20 sessions of hyperbar oxygen therapy	$2.6 \times 10^6$ MSC/kg Intravenous Donor daughter	6 months later clinical response with reduction of analgesic therapy

All the characteristics of the clinical study on three patients who received an overdose of radiation in the pelvic area. (case 1, case 2 case 3). The parameters are: patient age, radiation dose received, the radiation-induced lesions, treatment with MSC and observations of the lesions evolution after therapy using MSC



$10^6$ /kg of MSC after 6 months, no further MSC injections were performed. After MSC therapy, two patients revealed a substantiated clinical response for pain and hemorrhage. In one patient, pain reappeared after 6 months and again substantially responded on a second MSC infusion. In one patient, a beginning fistulization process could be stopped. In this case, a stable remission has been observed for more than 3 years of follow-up. Prostate cancer remained in stable complete remission in all patients. No toxicity occurred (Table 2). Additionally, lymphocyte subsets were monitored. After the MSC injections, a decline of CD4+CD127+CD25 T lymphocytes and an increase of CD4+CD25+ (potentially regulatory) T lymphocytes were observed as a means of immune modulation towards a lymphocyte pattern that is predominated by the regulatory cells. These clinical findings correspond to the experiences in animal models. Recently, Choi et al. published a lupus-mice model for human adipose tissue-derived MSC transplantation that demonstrated an increase of T regulatory cells in the spleen of MSC-treated mice in comparison to the control mice [66].

#### *Evaluation Criteria of Pain and Quality of Life*

Pain is the first symptom and principle criterion for patients' self-assessment. However, the instantaneous evaluation of pain intensity is not sufficient and reliable for follow-up of patients with chronic pain. Pain has to be evaluated in a multidimensional approach: functional aspects, emotional aspects as well as cognitive and behavioural aspects take integral part of pain evolution. For pain assessment, the following tools were used: numeric scale [Pain Numerical rating Scale (PNS)] of median pain intensity within the last 8 days [67]; The scale of reverberation of chronic pain on daily life [ANAES is the French translation for the Brief Pain Inventory (BPI)] [68]; evaluation of mental reverberation: Hospital Anxiety and Depression Scale (HADS) [69]; Evaluation of quality of life: the Short Form Health Survey (SF-36), the general questionnaire that is most frequently used and best evaluated represents an internationally recognized questionnaire for quality of life [70].

#### *Case 1: a 66-Year-Old Man*

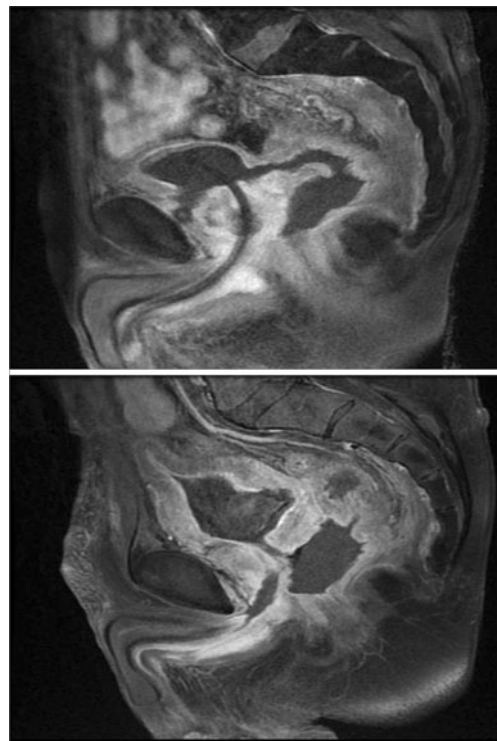
In this patient, 1 year before MSC therapy, prostate cancer had been diagnosed by Drills biopsies. The staging examinations revealed a prostate carcinoma T1c, Gleason score 5.

Radiotherapy by 78 Gy on the prostate cavity had been intended; however, 92.3 Gy had been applied leading to an over-irradiation of more than 70 Gy of 37 % of the rectum and of 40 % of the urinary bladder, respectively. Tissue injury affected the prostate cavity, the rectum, the urinary bladder and was accompanied by a recto-urethral fistula that resulted in the following clinical manifestations: the patient

suffered of urine loss in the rectum, pollakisuria and emicational pain and bleeding. Magnetic resonance imaging (MRI) showed a large necrotic zone and a fistula within the prostate cavity (Fig. 4). First line therapy of these accidental complications consisted of colostomy and suprapubic catheterization. The examination before MSC use by rectal endoscopy revealed a giant recto-urethral fistula (two fingers large). The cystoscope directly entered the rectum. The asthenic patient could neither support a digestive intervention (type Soave) nor a urinary bypass. The lasting symptoms consisted in severe and permanent rectal and cystitis pain.

#### *MSC Therapy and Follow-up*

MSC were obtained by two collections from the patient's two nieces, consecutively. The first bone marrow collection was insufficient and withdrawn. The second collection of 20 ml from the second niece resulted in a good expansion of MSC and was used for grafting. The Etablissement Français du Sang (EFS)/Henri Mondor hospital was in charge of the MSC culture based on fresh material. The number of MSC per injection obtained from the first passage was  $5 \times 10^6$ /kg (viability 95 %). MSC injection resulted in complete disappearance of pain 10 days after injection. Pain reappeared 3 weeks later. We conclude an excellent efficacy by one sole MSC injection by complete remission of pain over 3 weeks. MSC injection was not repeated.



**Fig. 4** Magnet resonance imaging before MSC therapy. A large necrotic zone and a fistula appear within the prostate cavity

Case 2: 80-Year-Old Man

In this elder patient, prostate cancer had been characterized as an adenocarcinoma Gleason 8 by three drills biopsies with advanced infiltration of both prostate lobes without locoregional lymph node infiltration. Radiotherapy by 50 Gy on the prostate cavity and the seminal vesicles and a complementary irradiation up to 73 Gy on the prostate cavity were planned. The dosage accidentally obtained was 88.9 Gy for the prostate, 91 Gy maximum for the rectum and 90 Gy on the urinary bladder. The resulting overdose was 53 % of the rectum, and 43 % of the urinary bladder received more than 70 Gy. Tissue injury by over-irradiation affected the prostate cavity, the urinary bladder and the rectum. Specific therapy of irradiation injury consisted in discharging colostomy and application of a Foley’s urinary tube 11 months after irradiation. Neither a urinary bypass nor a recession of the colon could be performed due to the reduced performance status of the 80-year-old patient. The late effects of the over-irradiation led to chronic pain and permanent rectal bleeding besides the discharging colostomy and the urinary tube. The MRI revealed a necrosis of the prostate cavity, a retracted urinary bladder, active cystitis and proctitis and a decomposition of the bladder–prostate bond as well as a recto-prostatic fistula (Fig. 4). The urethero-cystoscopy displayed a stenosis of the upper rectum. A 15-mm large ulceration appeared on the anterior side of the rectum communicating with the prostate cavity.

MSC Therapy and Follow-up

MSC therapy was performed 16 months after radiotherapy using MSC obtained by two collections from the patient’s son’s BM. MSC expansion took place simultaneously at the

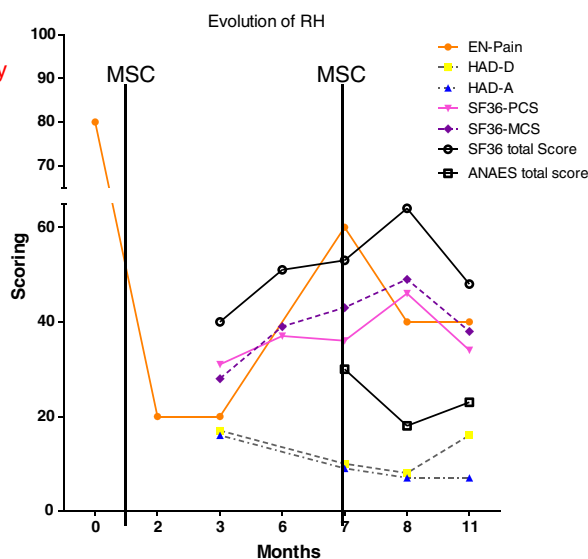
EFS–Henri Mondor Hospital and the Centre de Transfusion Sanguine des Armées (CTSA), Clamart, France. The richest collection was chosen, and MSC culture was performed according to the EFS techniques validated by the Société Française de greffes de moelle et thérapie cellulaire [71]. Absence of cytogenetic alterations had been verified, and fresh material was injected containing  $5.03 \times 10^6$ /kg MSC for first cure; after pain relapse 6 months later,  $0.82 \times 10^6$ /kg MSC were re-injected. The first evaluation of response to MSC therapy 4 weeks after the first MSC injection showed complete disappearance of bleeding and of pain by 2 weeks after MSC therapy (pain scale decreased from 8/10 before to 2/10) enabling stop of analgetics. Quality of life increased and was estimated at 80 % by the patient as well as by his proximity. The HADS questionnaire of anxiety and depression showed scores of 16/21 and 17/21, respectively. The Short Form (SF) SF 36 score was at 40 (physical state) and 42 (mental state), global score 82/100 (Fig. 5). At the next visit 3 months later, a stable complete remission of bleeding was concluded. Pain reappeared 18 weeks after MSC therapy (pain scale 5–6/10). After a second MSC injection (low dose of 1/5 of the first injection), again a partial remission (pain scale from 6 to 4, HADS anxiety from 9 to 7, depression 10 to 8) could be achieved, quality of life assessment increased from 53 to 64. At the last visit 3 months later (8 months from MSC therapy), all parameters slightly worsened: ANAES=23, HADS=7/16, and SF36=48 (Fig. 5).

We conclude a substantiated and lasting efficacy of MSC on bleeding (no transfusions were required by first MSC therapy). Furthermore, a substantiated but transitional analgetic potential for 5 months after first and 1 month after (low dose) second MSC injection was observed.

**Fig. 5** For pain assessment, the following tools were used: Numeric scale (PNS) of median pain intensity within the last 8 days. ANAES scale of reverberation of chronic pain on daily life (ANAES is the French translation for the BPI. Evaluation of mental reverberation. HADS (Hospital Anxiety and Depression Scale). Evaluation of quality of life: SF36, the general questionnaire the most frequently used and best evaluated and an internationally recognized questionnaire for quality of life

Clinical benefit :

- Pain disappear rapidly
- Stop of bleeding
- Pelvic necrosis was stabilized
- Quality of life was ameliorated



### Case 3: 74-Year-Old Man

In this patient, prostate cancer had been diagnosed and treated by prostatectomy 6 months before radiotherapy that had been planned with irradiation by 69.3 Gy on the prostate cavity. The real average dosage was 86.1 Gy on the prostate cavity, 87.7 Gy on the rectum (29 % of the rectum obtaining an overdose of more than 70 Gy) and 85 Gy on the urinary bladder (24 % obtaining an overdose of more than 70 Gy). One year after radiotherapy, the patient obtained a decharging colostomy followed by 20 sessions of hyperbar oxygen therapy. The tissue damage by over-irradiation affected the prostate cavity, the rectum and the urinary bladder resulting in urine incontinence with 15 to 20 very painful emictions per day. Prostate cancer manifestations were excluded by bone scintigraphy and a normal prostate-specific antigen. The MRI showed cystitis, a reduced capacity of the bladder due to strongly enlarged walls as well as atrophy of the seminal glands and fatty conversion by irradiation of the sacral spine was documented.

### MSC Therapy and Follow-up

MSC therapy was performed at the French army instruction hospital at Percy (France) 6 months after radiotherapy. MSC were collected from 40 ml of his daughter's bone marrow leading to an excellent expansion. MSC production was performed at the CTSA, Clamart (France) based on fresh material.  $2.6 \times 10^6$ /kg MSC (viability 93 %) from the first culture passage had been injected without any complication. Six months later, a good tolerance and clinical response with reduction of analgetic therapy besides a stable remission of cancer was noted. No further MSC injections were performed.

### Conclusion

The current data indicate that MSC represent a promising alternative strategy in the treatment of various immune-mediated diseases. Encouraging results have already been obtained from clinical trials in Crohn's disease and SLE as well as from case series in systemic sclerosis. Systemic MSC therapy of three patients with refractory irradiation-induced colitis, cystitis and fistula was safe and effective on pain, hemorrhage and inflammation. A long-term effect in inhibition of chronic inflammation as well as fistulization arrest was observed in one patient. MSC represent a safe therapeutic measure for patients accidentally over-irradiated who suffer from chronic and fistulizing colitis. These findings are instructional for the management of refractory severe inflammatory bowel diseases that are characterized by similar clinical and immunopathological features.

The clinical effects of MSC therapy were accompanied by modulation of the lymphocyte subsets towards a regulatory pattern. Taken together, MSC may represent a safe therapy for patients with refractory autoimmune diseases.

**Acknowledgments** Our special thanks to Professor Patrick Gourmelon, former head of the Radiological Protection and Human Health Division, Institute of Radiological Protection and Nuclear Safety, Fontenay-aux-Roses, for providing the facilities and recruitment of patients; to Professor Jean-Jacques Lataillades, Burn Treatment Center, Percy Military Hospital, Clamart, Professor Luc Douay and Helene Rouard, Etablissement Français du Sang (EFS) for MSC production; Dr. Christian Guy-Coichard (Saint Antoine Hospital pain unit) for health and pain assessment and Dr. Jean-Yves Perrot (Saint Antoine Hospital immunology department) for his help in the technique of flow cytometry.

### References

- Djouad F, Bony C, Haupl T et al (2005) Transcriptional profiles discriminate bone marrow-derived and synovium-derived mesenchymal stem cells. *Arthritis Res Ther* 7:R1304–R1315
- De Bari C, Dell'Accio F, Luyten FP (2001) Human periosteum-derived cells maintain phenotypic stability and chondrogenic potential throughout expansion regardless of donor age. *Arthritis Rheum* 44(1):85–95
- Noel D, Caton D, Roche S et al (2008) Cell specific differences between human adipose-derived and mesenchymal-stromal cells despite similar differentiation potentials. *Exp Cell Res* 314:1575–1584
- Fickert S, Fiedler J, Brenner RE (2003) Identification, quantification and isolation of mesenchymal progenitor cells from osteoarthritic synovium by fluorescence automated cell sorting. *Osteoarthr Cartil* 11:790–800
- Le Blanc K, Tammik L, Sundberg B, Haynesworth SE, Ringden O (2003) Mesenchymal stem cells inhibit and stimulate mixed lymphocyte cultures and mitogenic responses independently of the major histocompatibility complex. *Scand J Immunol* 57:11–20
- Tse WT, Pendleton JD, Beyer WM, Egalka MC, Guinan EC (2003) Suppression of allogeneic T-cell proliferation by human marrow stromal cells: implications in transplantation. *Transplantation* 75(3):389–397
- Klyushnenkova E, Mosca JD, Zernetkina V et al (2005) T cell responses to allogeneic human mesenchymal stem cells: immunogenicity, tolerance, and suppression. *J Biomed Sci* 12:47–57
- Rasmusson I, Ringden O, Sundberg B, Le Blanc K (2003) Mesenchymal stem cells inhibit the formation of cytotoxic T lymphocytes, but not activated cytotoxic T lymphocytes or natural killer cells. *Transplantation* 76:1208–1213
- Rasmusson I (2006) Immune modulation by mesenchymal stem cells. *Exp Cell Res* 312:2169–2179
- Tokoyoda K, Zehentmeier S, Hegazy AN et al (2009) Professional memory CD4<sup>+</sup> T lymphocytes preferentially reside and rest in the bone marrow. *Immunity* 30:721–730
- Chen L, Tredget EE, Wu PY, Wu Y (2008) Paracrine factors of mesenchymal stem cells recruit macrophages and endothelial lineage cells and enhance wound healing. *PLoS One* 3:e1886
- Aggarwal S, Pittenger MF (2005) Human mesenchymal stem cells modulate allogeneic immune cell responses. *Blood* 105:1815–1822
- Nemeth K, Leelahavanichkul A, Yuen PS et al (2009) Bone marrow stromal cells attenuate sepsis via prostaglandin E(2)-

- dependent reprogramming of host macrophages to increase their interleukin-10 production. *Nat Med* 15:42–49
14. Spaggiari GM, Abdelrazik H, Becchetti F, Moretta L (2009) MSCs inhibit monocyte-derived DC maturation and function by selectively interfering with the generation of immature DCs: central role of MSC-derived prostaglandin E2. *Blood* 113:6576–6583
  15. Djouad F, Charbonnier LM, Bouffi C et al (2007) Mesenchymal stem cells inhibit the differentiation of dendritic cells through an interleukin-6-dependent mechanism. *Stem Cells* 25:2025–2032
  16. Jiang XX, Zhang Y, Liu B et al (2005) Human mesenchymal stem cells inhibit differentiation and function of monocyte-derived dendritic cells. *Blood* 105:4120–4126
  17. Ren G, Su J, Zhang L et al (2009) Species variation in the mechanisms of mesenchymal stem cell-mediated immunosuppression. *Stem Cells* 27:1954–1962
  18. Sato K, Ozaki K, Oh I et al (2007) Nitric oxide plays a critical role in suppression of T-cell proliferation by mesenchymal stem cells. *Blood* 109:228–234
  19. Nasef A, Mathieu N, Chapel A et al (2007) Immunosuppressive effects of mesenchymal stem cells: involvement of HLA-G. *Transplantation* 84:231–237
  20. Nasef A, Zhang YZ, Mazurier C et al (2009) Selected Stro-1-enriched bone marrow stromal cells display a major suppressive effect on lymphocyte proliferation. *Int J Lab Hematol* 31:9–19
  21. Prevosto C, Zancolli M, Canevali P, Zocchi MR, Poggi A (2007) Generation of CD4+ or CD8+ regulatory T cells upon mesenchymal stem cell-lymphocyte interaction. *Haematologica* 92:881–888
  22. Parekkadan B, Tilles AW, Yarmush ML (2008) Bone marrow-derived mesenchymal stem cells ameliorate autoimmune enteropathy independently of regulatory T cells. *Stem Cells* 26:1913–1919
  23. Zappia E, Casazza S, Pedemonte E et al (2005) Mesenchymal stem cells ameliorate experimental autoimmune encephalomyelitis inducing T-cell anergy. *Blood* 106:1755–1761
  24. Zhou H, Jin Z, Liu J, Yu S, Cui Q, Yi D (2008) Mesenchymal stem cells might be used to induce tolerance in heart transplantation. *Med Hypotheses* 70:785–787
  25. Haniffa MA, Wang XN, Holtick U et al (2007) Adult human fibroblasts are potent immunoregulatory cells and functionally equivalent to mesenchymal stem cells. *J Immunol* 179:1595–1604
  26. Corcione A, Benvenuto F, Ferretti E et al (2006) Human mesenchymal stem cells modulate B-cell functions. *Blood* 107:367–372
  27. Gonzalez MA, Gonzalez-Rey E, Rico L, Buscher D, Delgado M (2009) Treatment of experimental arthritis by inducing immune tolerance with human adipose-derived mesenchymal stem cells. *Arthritis Rheum* 60:1006–1019
  28. Malgieri A, Kantzari E, Patrizi MP, Gambardella S (2010) Bone marrow and umbilical cord blood human mesenchymal stem cells: state of the art. *Int J Clin Exp Med* 3:248–26
  29. Voswinkel, J., and Chapel, A. (2012). Mesenchymal stem cells and rheumatism: state of the art. *Z Rheumatol*.
  30. Beggs KJ, Lyubimov A, Borneman JN et al (2006) Immunologic consequences of multiple, high-dose administration of allogeneic mesenchymal stem cells to baboons. *Cell Transplant* 15:711–721
  31. Le Blanc K, Ringden O (2007) Immunomodulation by mesenchymal stem cells and clinical experience. *J Intern Med* 262:509–525
  32. Rubio D, Garcia-Castro J, Martin MC et al (2005) Spontaneous human adult stem cell transformation. *Cancer Res* 65:3035–3039
  33. Tarte K, Gaillard J, Lataillade JJ et al (2010) Clinical-grade production of human mesenchymal stromal cells: occurrence of aneuploidy without transformation. *Blood* 115:1549–1553
  34. Bernardo ME, Zaffaroni N, Novara F et al (2007) Human bone marrow derived mesenchymal stem cells do not undergo transformation after long-term in vitro culture and do not exhibit telomere maintenance mechanisms. *Cancer Res* 67:9142–9149
  35. Liang J, Zhang H, Hua B et al (2010) Allogeneic mesenchymal stem cells transplantation in refractory systemic lupus erythematosus: a pilot clinical study. *Ann Rheum Dis* 69:1423–1429
  36. Sun L, Wang D, Liang J et al (2010) Umbilical cord mesenchymal stem cell transplantation in severe and refractory systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 62:2467–2475
  37. Dryden GW (2009) Overview of stem cell therapy for Crohn's disease. *Expert Opin Biol Ther* 9:841–847
  38. Dryden GW Jr (2009) Overview of biologic therapy for Crohn's disease. *Expert Opin Biol Ther* 9:967–974
  39. Ditschkowski M, Einsele H, Schwerdtfeger R et al (2003) Improvement of inflammatory bowel disease after allogeneic stem-cell transplantation. *Transplantation* 75:1745–1747
  40. Garcia-Olmo D, Garcia-Arranz M, Herreros D, Pascual I, Peiro C, Rodriguez-Montes JA (2005) A phase I clinical trial of the treatment of Crohn's fistula by adipose mesenchymal stem cell transplantation. *Dis Colon Rectum* 48:1416–1423
  41. Garcia-Olmo D, Herreros D, Pascual I et al (2009) Expanded adipose-derived stem cells for the treatment of complex perianal fistula: a phase II clinical trial. *Dis Colon Rectum* 52:79–86
  42. Garcia-Olmo D, Herreros D, Pascual M et al (2009) Treatment of enterocutaneous fistula in Crohn's disease with adipose-derived stem cells: a comparison of protocols with and without cell expansion. *Int J Colorectal Dis* 24:27–30
  43. Garcia-Olmo D, Herreros D, De-La-Quintana P et al (2010) Adipose-derived stem cells in Crohn's rectovaginal fistula. *Case Report Med* 2010:961758
  44. Duijvestein M, Vos AC, Roelofs H et al (2010) Autologous bone marrow-derived mesenchymal stromal cell treatment for refractory luminal Crohn's disease: results of a phase I study. *Gut* 59:1662–1669
  45. Lazebnik LB, Konopliannikov AG, Kniazev OV et al (2010) Use of allogeneic mesenchymal stem cells in the treatment of intestinal inflammatory diseases. *Ter Arkh* 82:38–43
  46. Ciccocioppo R, Bernardo ME, Sgarella A et al (2011) Autologous bone marrow-derived mesenchymal stromal cells in the treatment of fistulizing Crohn's disease. *Gut* 60:788–798
  47. Cipriani P, Guiducci S, Miniati I et al (2007) Impairment of endothelial cell differentiation from bone marrow-derived mesenchymal stem cells: new insight into the pathogenesis of systemic sclerosis. *Arthritis Rheum* 56:1994–2004
  48. Larghero J, Farge D, Braccini A et al (2008) Phenotypical and functional characteristics of in vitro expanded bone marrow mesenchymal stem cells from patients with systemic sclerosis. *Ann Rheum Dis* 67:443–449
  49. Keyszer G, Christopheit M, Fick S et al (2011) Treatment of severe progressive systemic sclerosis with transplantation of mesenchymal stromal cells from allogeneic related donors: report of five cases. *Arthritis Rheum* 63:2540–2542
  50. Deeg HJ (2007) How I treat refractory acute GVHD. *Blood* 109:4119–4126
  51. Ringden O, Uzunel M, Rasmusson I et al (2006) Mesenchymal stem cells for treatment of therapy-resistant graft-versus-host disease. *Transplantation* 81:1390–1397.52
  52. Le Blanc K, Frassoni F, Ball L et al (2008) Mesenchymal stem cells for treatment of steroid-resistant, severe, acute graft-versus-host disease: a phase II study. *Lancet* 371:1579–1586
  53. Potten CS, Owen G, Roberts SA (1990) The temporal and spatial changes in cell proliferation within the irradiated crypts of the murine small intestine. *Int J Radiat Biol* 57:185–199
  54. Gaugler MH, Vereycken-Holler V, Squiban C, Vandamme M, Vozenin-Brotans MC, Benderitter M (2005) Pravastatin limits endothelial activation after irradiation and decreases the resulting inflammatory and thrombotic responses. *Radiat Res* 163:479–487
  55. Milliat F, Francois A, Isoir M et al (2006) Influence of endothelial cells on vascular smooth muscle cells phenotype after irradiation:

- implication in radiation-induced vascular damages. *Am J Pathol* 169:1484–1495
56. Paris F, Fuks Z, Kang A et al (2001) Endothelial apoptosis as the primary lesion initiating intestinal radiation damage in mice. *Science* 293:293–297
  57. Zhang J, Gong JF, Zhang W, Zhu WM, Li JS (2008) Effects of transplanted bone marrow mesenchymal stem cells on the irradiated intestine of mice. *J Biomed Sci* 15:585–594
  58. Semont A, Francois S, Mouiseddine M et al (2006) Mesenchymal stem cells increase self-renewal of small intestinal epithelium and accelerate structural recovery after radiation injury. *Adv Exp Med Biol* 585:19–30
  59. Kudo K, Liu Y, Takahashi K et al (2010) Transplantation of mesenchymal stem cells to prevent radiation-induced intestinal injury in mice. *J Radiat Res* 51:73–79
  60. Gao Z, Zhang Q, Han Y, Cheng X, Lu Y, Fan L, Wu Z (2012) Mesenchymal stromal cell-conditioned medium prevents radiation-induced small intestine injury in mice. *Cytotherapy* 14:267–273
  61. Semont A, Mouiseddine M, Francois A et al (2010) Mesenchymal stem cells improve small intestinal integrity through regulation of endogenous epithelial cell homeostasis. *Cell Death Differ* 17:952–961
  62. Lorenzi B, Pessina F, Lorenzoni P et al (2008) Treatment of experimental injury of anal sphincters with primary surgical repair and injection of bone marrow-derived mesenchymal stem cells. *Dis Colon Rectum* 51:411–420
  63. Saha S, Bhanja P, Kabarriti R, Liu L, Alfieri AA, Guha C (2011) Bone marrow stromal cell transplantation mitigates radiation-induced gastrointestinal syndrome in mice. *PLoS One* 6:e24072
  64. Peiffert D, Simon JM, Eschwege F (2007) Epinal radiotherapy accident: passed, present, future. *Cancer Radiother* 11:309–312
  65. Marchesi V, Aigle D, Peiffert D, Noel A, Simon JM (2009) Securitization of the bi-site radiotherapy activity as part of the resumption of treatments in the Hospital of Epinal by the team of Alexis Vautrin Nancy Cancer Center. *Cancer Radiother* 13:740–743
  66. Choi EW, Shin IS, Park SY et al (2012) Reversal of serologic, immunologic, and histologic dysfunction in mice with systemic lupus erythematosus by long-term serial adipose tissue-derived mesenchymal stem cell transplantation. *Arthritis Rheum* 64:243–253
  67. Von Korff M, Jensen MP, Karoly P (2000) Assessing global pain severity by self-report in clinical and health services research. *Spine* 25:3140–3151, Phila Pa 1976
  68. Tan G, Jensen MP, Thornby JI, Shanti BF (2004) Validation of the Brief Pain Inventory for chronic nonmalignant pain. *J Pain* 5:133–137
  69. Zigmond AS, Snaith RP (1983) The hospital anxiety and depression scale. *Acta Psychiatr Scand* 67:361–370
  70. Ware JE Jr, Sherbourne CD (1992) The MOS 36-item short-form health survey (SF-36). I. Conceptual framework and item selection. *Med Care* 30:473–483
  71. Sensebe L, Bourin P (2008) Producing MSC according GMP: process and controls. *Biomed Mater Eng* 18:173–177

# ABSTRACT

Biotherapies offered new hope for the treatment of radiation-induced severe tissue damage, including acute radiation syndrome (ARS) and severe, chronic radiation-induced abdomino-pelvic complications—i.e. pelvic radiation disease (PRD)—refractory to standard therapy. This work was initially applied to ARS. One approach uses ex vivo expansion to amplify non-irradiated bone marrow hematopoietic stem cells (HSCs) from patients with bone marrow aplasia. The expanded HSCs are reinjected into the patients to treat hematopoietic syndrome. Another approach taken stimulates residual hematopoiesis by targeting in vivo nonirradiated HSCs with an antibody coupled to a growth factor gene. The transfected HSCs then produce growth factors necessary for their proliferation, restoring hematopoiesis. The last approach uses growth factors to enhance proliferation of residual HSCs. In the most severe cases, none of these strategies completely reverses aplasia. The solution is to generate autologous HSCs from differentiated cells. We have produced HSCs from autologous inductive pluripotent stem cells (iPSCs) to treat bone marrow aplasia. They will be following up with an exploration of ARS-associated acute gastrointestinal subsyndrome.

One avenue of cell therapy research investigates the role of mesenchymal stem cells (MSC) in the treatment of multiple organ dysfunction syndrome (MODS), also known as multiple organ failure (MOF). We have demonstrated that MSCs migrate to irradiated tissues; restore the bone marrow microenvironment, enhancing hematopoiesis; promote intestinal and hepatic regeneration; and limit muscle and skin tissue radionecrosis.

We have demonstrated that MSCs migrate to damaged tissues and restore gut functions after irradiation, making them a promising tool for the medical management of radiation-induced gastrointestinal disorders. MSCs can be incorporated into the enteric mucosa and are able to repair radiation-induced intestinal damage by inhibiting ulceration. They release cytokines and growth factors such as IL-11, human hepatocyte growth factor, fibroblast growth factor 2, and insulin-like growth factors. These factors have previously been reported to facilitate intestinal mucosa repair, either through enhancement of cell proliferation or inhibition of epithelial cell apoptosis. By lowering levels of pro-inflammatory cytokines, while inducing anti-inflammatory cytokines, MSCs may also dampen systemic inflammatory response syndrome associated with radiation-induced gastrointestinal syndrome. Furthermore, MSC treatment of a target organ may affect distant tissues. MSCs regenerate the small intestine epithelium, which in turn restores the enterohepatic recirculation pathway initially damaged by irradiation. Another mechanism that should be considered is the role of cytokines and growth factors produced by MSCs homing to other organs, as in distant hepatic protection without introduction of MSCs into the liver. To consider further applications in patients, we carefully studied the side effects of MSC injection. None were observed in healthy tissue or residual tumors after radiotherapy. MSCs limited the progression of colorectal fibrosis. MSC therapy could reduce acute or chronic side effects of ionizing radiation and may be of therapeutic interest. These studies helped to provide irradiated patients with compassionate treatment for hematopoietic damage and radionecrosis of muscle and skin tissue, and also permitted treatment of four victims of accidental radiation overdose at Jean Monnet Hospital in Épinail, France. Clinical transfer of stem cell therapy for treating late side effects of pelvic radiation is currently under way. Initial participants in Phase II clinical research will be recruited in 2017.

**Key words :** MSC, HSC, iPSC, SAI, MODS, MOF, PRD, tissue repair, cell therapy, irradiation