

UNIVERSITE DE NANTES

FACULTE DE MEDECINE

**THÉRAPIE CELLULAIRE DES MALADIES RESPIRATOIRES :
UTILISATION DE LA VOIE AÉRIENNE POUR L'IMPLANTATION DE
CELLULES SOUCHES.**

Thèse de doctorat

Ecole doctorale CHIMIE BIOLOGIE

Discipline : Sciences de la Vie et de la Santé

Spécialité : Recherche Biomédicale

Présentée et soutenue publiquement par

LEBLOND Anne-Laure

Le Jeudi 18 Décembre 2008, devant le jury ci dessous

Rapporteurs :

Dr. Christelle Coraux, Chargée de Recherche, INSERM UMRS 903

Pr. Pierre Lehn, Professeur, Université de Bretagne Occidentale

Examineurs :

Dr. Luc Sensebé, Directeur Médical Scientifique, EFS Centre Atlantique

Pr. Patricia Lemarchand, Professeur, Université de Nantes

Pr. Antoine Magnan, Professeur, Université de Nantes

TABLES DES MATIERES

INTRODUCTION.....	8
1.1 LA THERAPIE CELLULAIRE POUR LES MALADIES RESPIRATOIRES	8
1.1.1 Les enjeux de la thérapie cellulaire respiratoire	8
1.1.1.1 Les enjeux de la thérapie cellulaire pour la mucoviscidose	10
1.1.1.2 Les enjeux de la thérapie cellulaire pour le déficit en α 1-antitrypsine	10
1.1.2 Les cellules souches endogènes ou progéniteurs résidents dans les poumons.....	12
1.1.3 Les cellules souches de source exogène aux poumons	13
1.1.3.1 Les cellules souches embryonnaires	14
1.1.3.2 Les cellules souches adultes de la moelle osseuse	16
1.1.3.3 Les cellules souches adultes et la thérapie cellulaire respiratoire.....	18
1.1.4 Les autres types de cellules pour une stratégie de thérapie cellulaire des maladies respiratoires.....	25
1.1.5 Transfert de gène et cellules souches.....	28
1.1.5.1 Les vecteurs viraux	29
1.1.5.2 Les vecteurs non-viraux	30
1.1.5.3 L'électroporation classique et la nucléofection	31
1.1.6 La niche des cellules souches au niveau de l'épithélium respiratoire	33
2 BUTS DE LA THESE	35
3 METHODOLOGIE.....	37
3.1 DEMARCHE EXPERIMENTALE	37
3.2 MODELE MURIN DE LESIONS EPITHELIALES	38
3.3 CULTURE CELLULAIRE.....	39
3.3.1 Lignées de cellules souches indifférenciées.....	39
3.3.2 Lignées de cellules différenciées.....	40
3.3.3 Culture primaire de cellules souches mésenchymateuses	40
3.3.3.1 Prélèvement de moelle osseuse.....	40
3.3.3.2 Caractérisation des cultures primaires	40
3.4 TRANSFERT DE GENES <i>IN VITRO</i> DES CELLULES SOUCHES	41
3.4.1 Gènes rapporteurs utilisés	41
3.4.2 Transfection des cellules souches.....	42
3.4.2.1 Transfection avec les vecteurs synthétiques	42
3.4.2.2 Nucléofection selon le système Amaxa®.....	43

3.4.2.3	Evaluation de la sensibilité du système de transfert de gène.....	43
3.4.3	Transduction des cellules souches	44
3.4.3.1	Transduction avec un vecteur rétroviral nls-LacZ	44
3.4.3.2	Transduction avec un vecteur lentiviral nls-lacZ.....	44
3.4.4	Utilisation des méthodes de transfert de gènes	44
3.5	ETUDE DE LA SURVIE	45
3.5.1	Dosage de la protéine CAT par ELISA et calcul du pourcentage de cellules vivantes .	45
3.5.2	Dosage de l'activité de la bêta galactosidase selon la méthode du 4 MUG (4-MethylUmbelliferyl- β -D-Galactoside).....	46
3.5.3	PCR.....	46
3.6	ETUDE DE LA LOCALISATION.....	47
3.6.1	Immunohistochimie de la protéine CAT.....	47
3.6.2	Immunohistochimie de la GFP	47
3.6.3	Révélation de l'activité de la bêta galactosidase par réaction biochimique avec le X Gal (ou 5-bromo-4-chloro-3-indolyl-bêta-D-galactopyranoside)	48
4	THERAPIE CELLULAIRE RESPIRATOIRE : IMPLANTATION DE CELLULES SOUCHES DANS LES VOIES AERIENNES DE SOURIS	50
4.1	MANUSCRIT	50
4.2	RESULTATS COMPLEMENTAIRES.....	80
4.2.1	Introduction	80
4.2.2	Evaluation du modèle murin avec injection intratrachéale de détergent	80
4.2.2.1	Lésions épithéliales dans les voies aériennes induites par le polidocanol	80
4.2.2.2	Survie des animaux	82
4.2.2.3	Limites du modèle PDOC 2%	83
4.2.3	Evaluation des méthodes de transfert de gène dans les cellules souches	86
4.2.3.1	Vecteurs non-viraux.....	87
4.2.3.1.1	Transfection des cellules souches issues de lignées cellulaires avec les vecteurs synthétiques.....	87
4.2.3.1.2	Transfection des cellules différenciées avec les vecteurs synthétiques	90
4.2.3.1.3	Transfection des cellules souches issues de cultures primaires	91
4.2.3.2	Bilan des résultats de transfection des cellules souches à l'aide de vecteurs non-viraux	92
4.2.3.3	Vecteurs viraux.....	93
4.2.3.3.1	Transduction avec le vecteur rétroviral nls-LacZ	93

4.2.3.3.2	Transduction avec le vecteur lentiviral nls-LacZ.....	94
4.2.3.4	Bilan des résultats de transduction des cellules souches à l'aide de vecteurs rétroviraux et lentiviraux	95
4.2.4	Evaluation du protocole de thérapie cellulaire avec injection intratrachéale de cellules souches.....	96
4.2.4.1	Survie des animaux après injections intratrachéales de PDOC 2% et de cellules souches	96
4.2.4.2	Survie des cellules souches après injection intratrachéale	97
4.2.4.2.1	Etude de la survie par PCR.....	97
4.2.5	Localisation des cellules souches	98
4.2.5.1	Immunohistochimie de la protéine CAT à 24h.....	99
4.2.5.2	Immunohistochimie de la GFP à 7 jours.....	99
4.2.6	Conclusions	100
5	DISCUSSION	102
6	BIBLIOGRAPHIE	108
7	ANNEXES	122

TABLES DES FIGURES

<i>Figure 1 : Structures anatomiques des poumons adultes humains.</i>	9
<i>Figure 2 : Coupe transversale d'une bronche (A) d'un patient non atteint et (B) atteint de la mucoviscidose.</i>	10
<i>Figure 3 : Emphysème chez un patient atteint de déficit en α1AT.</i>	11
<i>Figure 4 : Blastocyste humain avec la masse cellulaire interne composée des cellules souches embryonnaires.</i>	15
<i>Figure 5 : Différenciation des CSE murines en cellules épithéliales des voies aériennes.</i>	16
<i>Figure 6 : Cellules souches adultes de la moelle osseuse.</i>	16
<i>Figure 7 : Effets du PDOC 1%, 1,5% et 2% sur l'épithélium des voies aériennes de souris.</i>	81
<i>Figure 8 : Bronche intacte d'une souris SWISS traitée avec le PDOC 2%.</i>	84
<i>Figure 9 : Bronchiole de souris traitée au PDOC 2% 7 jours après l'administration.</i>	84
<i>Figure 10 : Formation de structures polypoides à 7 jours dans une bronchiole de souris « PDOC 2% + PBS ».</i>	85
<i>Figure 11 : Expression de la protéine CAT in vitro 24h après la transfection des CSE avec le BGTC et les lipides aminés.</i>	88
<i>Figure 12 : Expression de la protéine CAT in vitro 24h après la transfection des BMC9 avec le lipide aminé 3.</i>	89
<i>Figure 13 : Expression de la bêta galactosidase dans les BMC9 au cours des passages.</i>	94
<i>Figure 14 : Résultats des PCR 24h et 7 jours après l'injection des BMC9 nls-LacZ.</i>	97
<i>Figure 15 : Résultats des PCR 24h après l'injection des CSM issues de cultures primaires.</i>	98
<i>Figure 16 : Immunohistochimie de la protéine CAT 24h après l'injection de PDOC 2% (A), de PDOC 2% et de BMC9 (B-C).</i>	99
<i>Figure 17 : Immunohistochimie de la GFP sur une coupe de bronche de souris 7 jours après l'injection de PDOC 2% (A), de PDOC 2% et de CSM GFP (B).</i>	100

LISTE DES TABLEAUX

Tableau I : Modèles animaux de lésions épithéliales dans les poumons. _____	12
Tableau II : Etudes de thérapie cellulaire respiratoire chez la souris, avec administration systémique de cellules souches adultes issues de la moelle osseuse ou de sang de cordon. _____	20
Tableau III : Principales méthodes de détection des cellules souches adultes issues de moelle osseuse dans les poumons de souris. _____	22
Tableau IV : Effets négatifs observés chez la souris et associés aux cellules souches adultes de la moelle osseuse. ____	24
Tableau V : Etudes de thérapie cellulaire chez la souris avec administration par voie aérienne de cellules souches adultes issues de la moelle osseuse. _____	25
Tableau VI : Etudes de thérapie cellulaire chez le rongeur avec administration des cellules autre que les cellules souches. _____	26
Tableau VII : Comparaison des principaux vecteurs viraux pour le transfert de gène. _____	30
Tableau VIII : Transduction des cellules souches avec les vecteurs viraux. _____	30
Tableau IX : Principaux vecteurs non-viraux utilisés pour le transfert de gène dans les cellules souches. _____	31
Tableau X : Electroporation et nucléofection pour le transfert de gène dans les cellules souches. _____	31
Tableau XI : Utilisation des différents gènes rapporteurs. _____	42
Tableau XII : Utilisation des cellules souches transfectées ou transduites. _____	44
Tableau XIII : Primers utilisés pour amplifier le gène LacZ ou nls-LacZ par PCR. _____	47
Tableau XIV : Pourcentage de survie des animaux contrôles et traités au PDOC 2%. _____	83
Tableau XV : Nombre de souris présentant dans les voies aériennes des structures polypoides. _____	86
Tableau XVI : Transfection des cellules différenciées avec les vecteurs synthétiques. _____	90
Tableau XVII : Résultats des essais de transfection des CSM issues de cultures primaires. _____	91
Tableau XVIII : Résultats des essais de nucléofection des CSM issues de cultures primaires. _____	92
Tableau XIX : Résultats de la transfection des cellules souches. _____	92
Tableau XX : Pourcentage de CSM exprimant la bêta galactosidase après transduction. _____	94
Tableau XXI : Bilan des résultats de la transduction des cellules souches. _____	95
Tableau XXII : Pourcentage de survie des animaux traités avec le PDOC 2% et les cellules souches. _____	96
Tableau XXIII : Pourcentage de survie des animaux traités uniquement avec les cellules souches. _____	97

LISTE DES PRINCIPALES ABREVIATIONS

A

α 1AT : alpha 1-antitrypsine

B

BGTC : bis-guanidinium-tren-cholestérol.

C

CFTR : cystic fibrosis transmembrane

conductance regulator

CSE : cellules souches embryonnaires

CSM : cellules souches mésenchymateuses

D

DOPE : dioléoylphosphatidyléthanolamine

DOSPA : 2,3-dioleyloxy-N-[2(spermine-carboxamido)ethyl]-N,N-dimethyl-1-propanaminiumtrifluoroacetate

E

ELISA : enzyme linked immunosorbent assay

H

HES : hématoxyline éosine safran

L

LIF : leukemia inhibitory factor

M

MO : moelle osseuse

MOI : multiplicity of infection

4MUG : 4 méthylumbelliférone

N

Nls : localisation de séquence nucléaire

P

PBS : phosphate buffer saline

PEI : polyéthylèneimine

Pi : particules infectieuses

PDOC : polidocanol

X

X Gal : 5-bromo-4-chloro-3-indolyl-beta-D-galactopyranoside

INTRODUCTION

Le développement rapide des connaissances sur les cellules souches ouvre de nouvelles perspectives de traitement pour les maladies génétiques et dégénératives (pour revue, [1]). La thérapie cellulaire est aujourd'hui largement utilisée chez l'Homme dans le domaine de l'hématologie (greffe de cellules souches hématopoïétiques), des brûlures (greffe de peau) et se développe rapidement dans le cadre des maladies cardiaques et des affections neuro-dégénératives. Ces applications reposent sur la capacité des cellules souches à coloniser les zones endommagées et à acquérir des caractéristiques phénotypiques et fonctionnelles des cellules matures voisines. Parallèlement, les cellules souches peuvent être également modifiées génétiquement *ex-vivo* avant d'être administrées et permettre alors le transfert d'un gène thérapeutique. Cette capacité à véhiculer un gène thérapeutique a été évaluée dans des études expérimentales et cliniques pour l'ostéogenèse imparfaite [2, 3] et des maladies lysosomales [4]. Cette approche apparaît donc potentiellement utilisable pour le traitement de maladies génétiques respiratoires associées à une destruction des cellules épithéliales, telles que la mucoviscidose ou le déficit en α 1-antitrypsine. Cette stratégie est confortée par des travaux récents sur la différenciation *in vitro* des cellules souches embryonnaires ou des cellules souches adultes en cellules épithéliales pulmonaires.

1.1 La thérapie cellulaire pour les maladies respiratoires

1.1.1 Les enjeux de la thérapie cellulaire respiratoire

L'objectif de la thérapie cellulaire est de transplanter des cellules dans les poumons capables de coloniser les zones malades et de restaurer la fonction respiratoire endommagée. Selon les pathologies respiratoires étudiées, les zones endommagées et la fonction à restaurer peuvent être différentes. Ceci est lié à la complexité du système respiratoire constitué de plus de 40 types cellulaires différents, de structures et de fonctions uniques à chaque niveau du poumon (Figure 1). Ainsi, dans les voies aériennes, au niveau de la trachée, des bronches et des bronchioles, les cellules basales, les cellules de Clara, les cellules sécrétrices de mucus, les cellules ciliées, les cellules

neuro-endocrines sont prédominantes. Dans la zone des échanges gazeux, l'épithélium des alvéoles est composé de pneumocytes de type I ou II. Cette composition peut varier d'une espèce à l'autre, ainsi, les glandes sous muqueuses décrites dans les voies aériennes humaines ne sont pas retrouvées dans les voies aériennes de souris.

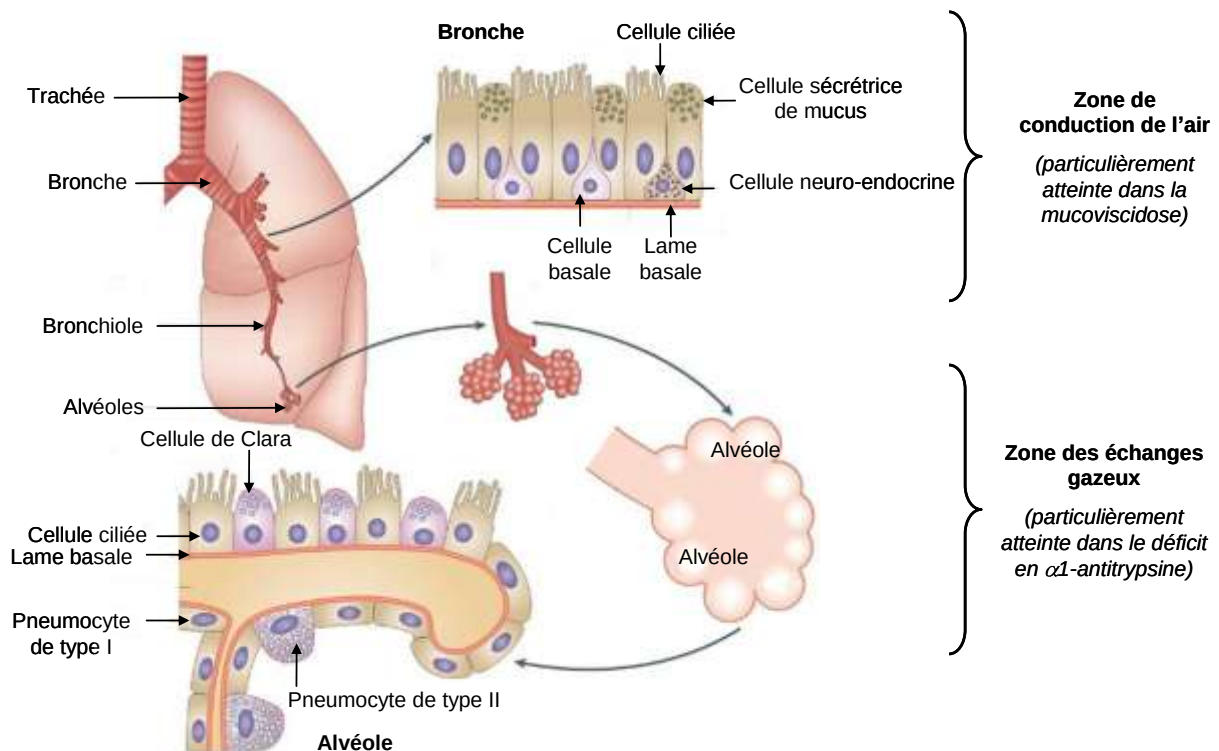


Figure 1 : Structures anatomiques des poumons adultes humains.
D'après [5].

Les cellules épithéliales du poumon, contrairement à d'autres cellules épithéliales (les cellules de l'épiderme, du tractus gastro-intestinal par exemple) possèdent un faible taux de renouvellement et donc une capacité de régénération minimale, ce qui explique le caractère rapidement irréversible des lésions observées.

1.1.1.1 Les enjeux de la thérapie cellulaire pour la mucoviscidose

La mucoviscidose est la plus fréquente des maladies autosomiques récessives graves chez les individus d'origine caucasienne. Elle est liée à des mutations génétiques au niveau du gène codant pour un canal chlorure, CFTR (Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator) [6-8]. Les conséquences de cette mutation sont multiples. Elles s'accompagnent d'une destruction progressive de l'épithélium des voies aériennes [9, 10] (Figure 2). Les enjeux de la thérapie cellulaire de la mucoviscidose seraient de transplanter *in vivo* des cellules souches exprimant le gène CFTR, capables de coloniser les voies aériennes (trachée-bronches-bronchioles), de proliférer, et de générer un épithélium bronchique fonctionnel et bien différencié.

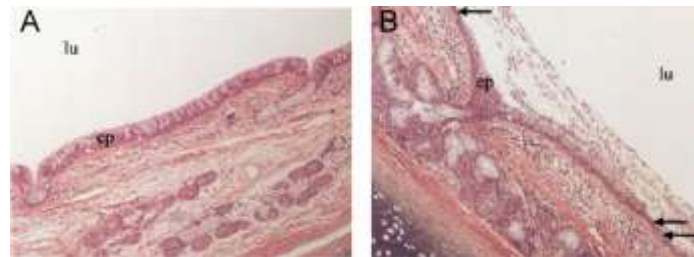


Figure 2 : Coupe transversale d'une bronche (A) d'un patient non atteint et (B) atteint de la mucoviscidose.

Lu : lumière, ep : épithélium de surface, flèches : lame basale dénudée. D'après [10].

Deux stratégies principales pourraient être envisagées :

- un contexte autologue : utiliser les cellules souches du patient, les corriger *ex-vivo* pour le gène CFTR et les ré-administrer au patient ;
- un contexte allogénique : utiliser des cellules souches CFTR positives, issues d'un donneur familial, et les administrer au patient.

1.1.1.2 Les enjeux de la thérapie cellulaire pour le déficit en α 1-antitrypsine

Le déficit en α 1-antitrypsine (α 1AT) est également une pathologie respiratoire liée au déficit d'un seul gène codant pour l' α 1AT. L' α 1AT est une protéine sanguine synthétisée par le foie. Sa principale action est d'inhiber l'élastase libérée par les polynucléaires neutrophiles, particulièrement lors d'épisodes inflammatoires ou infectieux. Chez le sujet sain, le poumon est protégé de l'action de l'élastase des polynucléaires neutrophiles par la présence en quantités importantes d' α 1AT. Chez

les sujets présentant un déficit en α 1AT, le déséquilibre entre les concentrations locales d'élastase et d' α 1AT aboutit à la dégradation des structures alvéolaires et au développement d'un emphysème (Figure 3). Le principe de la thérapie cellulaire pour le déficit en α 1AT serait d'utiliser des cellules qui expriment le gène de l' α 1AT et capables de se différencier en cellules épithéliales alvéolaires.



Figure 3 : Emphysème chez un patient atteint de déficit en α 1AT.
D'après [11].

En résumé :

Le principe de la thérapie cellulaire respiratoire est d'utiliser des cellules capables de coloniser les zones malades et de restaurer à la fois la structure et la fonction perdues. De part la complexité du tissu pulmonaire (plus de 40 types cellulaires, plusieurs fonctions), les enjeux de cette stratégie varient d'une pathologie à une autre :

- dans le cas de la mucoviscidose, les cellules doivent atteindre les voies aériennes, restaurer l'épithélium trachéo-bronchique et exprimer le gène CFTR ;
- dans le cas du déficit en α 1-antitrypsine, les cellules doivent coloniser le poumon profond, restaurer l'épithélium alvéolaire et exprimer le gène codant pour l' α 1-antitrypsine.

1.1.2 Les cellules souches endogènes ou progéniteurs résidents dans les poumons

Pour réparer les poumons par une stratégie de thérapie cellulaire, deux grandes sources de cellules candidates sont disponibles :

- les cellules souches exogènes aux poumons qui colonisent par voie systémique ou aérienne les s ;
- les cellules souches endogènes ou progéniteurs qui résident dans les poumons.

La présence d'un pool de « cellules souches endogènes réparatrices » ou de progéniteurs présents dans les poumons a été mise en évidence dans des études chez les rongeurs. Comme les cellules épithéliales respiratoires ont un faible taux de renouvellement, l'induction de lésions au niveau des poumons a été nécessaire pour stimuler la prolifération de ces cellules et ainsi étudier leur phénotype et leur localisation dans les voies aériennes. Selon le niveau des poumons étudié (les voies aériennes et/ou les alvéoles), les méthodes d'induction des lésions étaient différentes (Tableau I).

Tableau I : Modèles animaux de lésions épithéliales dans les poumons.
D'après [12]

Agents chimiques	Mode d'administration	Cibles	Références
O ₂ , O ₃ , NO ₂	Inhalation	Epithélium des voies aériennes et alvéoles	[13 , 14]
SO ₂	Inhalation	Epithélium proximal des voies aériennes	[15 , 16]
Polidocanol	Instillation intranasale et intratrachéale	Epithélium des voies aériennes	[17, 18]
Naphtaline	Injection intrapéritonéale	Cellules de Clara	[19 , 20]
Bléomycine	Injection intratrachéale	Cellules alvéolaires de type I et II	[21]
Elastase	Injection intratrachéale	Epithélium alvéolaire	[22]
Irradiation	Exposition	Zones exposées	[23 , 24]

Différents types de progéniteurs endogènes ont été identifiés selon la zone anatomique du poumon régénérée. Chez la souris, il est ainsi communément accepté que les cellules basales, les cellules de Clara ont la capacité de proliférer en cas de lésions dans les voies aériennes supérieures et de donner naissance à tous les types cellulaires présents dans cette zone [25]. Pour les voies aériennes plus distales (bronches et bronchioles), ce rôle est pris en charge par les cellules de Clara [19] et les cellules neuro-endocrines selon la zone d'intérêt [26]. Dans la zone des échanges gazeux, les pneumocytes de type II sont capables de donner naissance à des pneumocytes de type I [27]. Cette

compartimentalisation des progéniteurs a également été mis en évidence chez l'Homme. Pour étudier les progéniteurs dans les voies aériennes humaines, des modèles chimériques de reconstruction de l'épithélium respiratoire chez des souris xénotolérantes ont été développés [28-33]. Cette méthode a notamment été reprise dans les travaux d'Edith Puchelle à Reims (Unité INSERM U 903). Ils consistent à dissocier puis inoculer des pièces respiratoires humaines dans des segments de trachée de rat, dénudée de son propre épithélium. Cet ensemble est ensuite greffé sous la peau de souris nude tout en maintenant un pôle aérien. Après une étape de dédifférenciation, les cellules épithéliales adhèrent à la lame basale et donnent naissance à un épithélium de surface pseudostratifié mature. Ce système a permis d'identifier différents types de progéniteurs chez l'Homme incluant notamment les cellules basales et parabasales [34, 35].

L'ensemble de ces résultats montre la complexité d'élaborer une stratégie de thérapie cellulaire des maladies respiratoires à partir de ces progéniteurs. L'enjeu est de taille puisque, à ce jour, la cellule souche résidente dans les poumons capable de donner naissance à tous les types cellulaires tout au long de l'arbre trachée-bronches-bronchioles-alvéoles n'a pas été identifiée. Cette stratégie impliquerait donc d'isoler, de purifier et d'amplifier le progéniteur adéquat en fonction de la pathologie respiratoire à traiter. De plus, le problème de sa ré-administration dans l'appareil respiratoire demeure.

1.1.3 Les cellules souches de source exogène aux poumons

Les cellules souches de source exogène aux poumons pour une stratégie de thérapie cellulaire respiratoire incluent :

- les cellules souches directement administrées par voie systémique ou par voie aérienne, telles que les cellules souches embryonnaires et les cellules souches adultes ;
- les cellules souches présentes dans la circulation générale et capables de coloniser les zones lésées du poumon, telles que les cellules souches adultes issues de la moelle osseuse.

Les études de thérapie cellulaire respiratoire développées depuis presque 10 ans se sont principalement intéressées au rôle des cellules souches adultes issues de la moelle osseuse ou issues

du sang de cordon, lorsqu'elles étaient injectées en intraveineux dans des modèles de souris irradiées. Après la phase de reconstitution de moelle osseuse, les auteurs ont évalué la capacité des cellules souches de ce compartiment à coloniser les poumons malades. L'administration systémique ou par la voie aérienne de cellules souches adultes issues de la moelle osseuse a également été testée chez des souris non irradiées.

1.1.3.1 Les cellules souches embryonnaires

Les cellules souches embryonnaires (CSE) constituent la masse cellulaire interne du blastocyste pré-implantatoire, qui correspond à un stade précoce du développement embryonnaire (stade 5 jours après la fécondation chez l'Homme). Il s'agit de cellules pluripotentes, c'est-à-dire qu'elles sont capables de donner naissance aux trois feuillets embryonnaires : ectoderme, endoderme et mésoderme [36] (Figure 4). Ces trois feuillets donneront naissance à leur tour à l'ensemble des tissus d'un organisme. En 1981, des CSE murines ont été isolées pour la première fois [36]. Ces cellules sont capables de proliférer indéfiniment *in vitro* dans un état indifférencié sur un tapis de cellules nourricières ou en présence de fortes concentrations de Leukemia Inhibitory Factor (LIF) dans le milieu de culture [37].

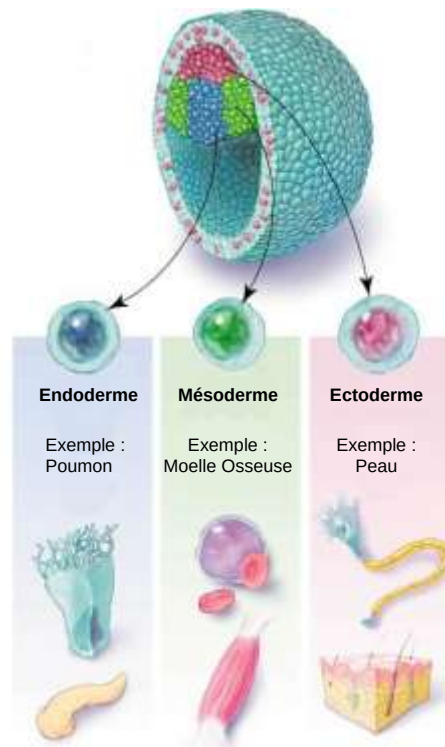


Figure 4 : Blastocyste humain avec la masse cellulaire interne composée des cellules souches embryonnaires.

Ces cellules donnent naissance aux 3 feuillets embryonnaires endoderme-mésoderme-ectoderme dont dérivent tous les tissus d'un organisme adulte. D'après [38].

Les CSE peuvent donner naissance *in vitro* à des cellules épithéliales alvéolaires de type II [39]. Les travaux du Dr. Coraux ont montré que les CSE pouvaient se différencier *in vitro* en un épithélium bronchique fonctionnel, complet, composé de cellules basales, de cellules ciliées, de cellules de Clara et similaire à l'épithélium qui tapisse les voies aériennes humaines [40] (Figure 5). Ces données confortent l'hypothèse selon laquelle les CSE sont des outils expérimentaux prometteurs dans le domaine de la thérapie cellulaire des pathologies pulmonaires dégénératives associées à une perte de cellules et de fonction, telles que la mucoviscidose. Ces cellules pluripotentes représentent une source illimitée de cellules capables de restaurer un épithélium endommagé. Cependant, des considérations éthiques questionnent aujourd'hui l'utilisation de ces cellules chez l'Homme et freinent leur étude *in vivo*. De plus des investigations expérimentales plus approfondies sont encore nécessaires pour tester leur potentiel rôle thérapeutique dans les pathologies respiratoires, notamment en ce qui concerne leur administration *in vivo* et leur prise de greffe dans les voies aériennes [41].

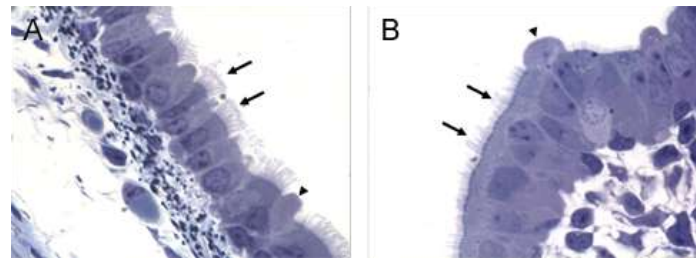


Figure 5 : Différenciation des CSE murines en cellules épithéliales des voies aériennes.

(A) Epithelium de trachée de souris. (B) Epithélium issu de la différenciation des CSE de souris. Flèches : cellules ciliées, têtes de flèche : cellules de Clara. D'après [40].

1.1.3.2 Les cellules souches adultes de la moelle osseuse

La moelle osseuse est constituée de nombreux types cellulaires, dont certains présentent les propriétés principales des cellule souches : auto-renouvellement et différenciation. Ces cellules souches adultes de la moelle osseuse peuvent être réparties selon au moins deux populations distinctes : les cellules souches hématopoïétiques et les cellules souches mésenchymateuses (CSM) (Figure 6, encadrés rouges).

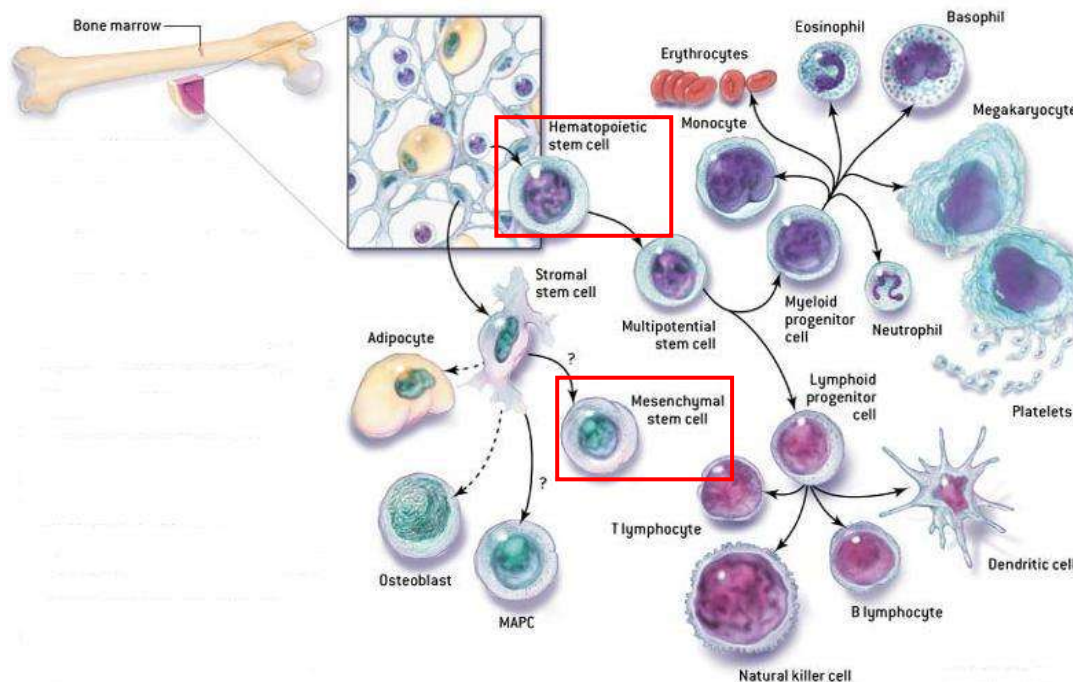


Figure 6 : Cellules souches adultes de la moelle osseuse.

D'après [38]

Les CSM ont été décrites pour la première fois comme la population de cellules présentes dans le stroma de la moelle osseuse, capables d'adhérer *in vitro* sur un support plastique [42]. Ces cellules sont capables de se différencier en cellules non hématopoïétiques d'origine mésodermique :

ostéoblastes, chondroblastes, adipocytes, myoblastes et fibroblastes [43, 44]. La limite principale de leur utilisation est qu'il n'existe pas de marqueur spécifique de ces cellules, induisant une grande variabilité dans les méthodes de préparation. De plus, ces cellules sont largement utilisées pour des études pré-cliniques et cliniques ce qui a encouragé à définir 3 critères principaux de caractérisation [45]:

- Capacité à adhérer sur support plastique dans des conditions classiques de culture ;
- Expression spécifique de marqueurs de surface attestée par cytométrie en flux :
 - o positives (>95%) pour le CD105, CD73, CD90 ;
 - o négatives (<2%) pour le CD45, CD34, CD14, CD11b, CD79 α , CD19 et HLA II
- Capacité à se différencier *in vitro* en ostéoblastes, chondroblastes, adipocytes.

Néanmoins, il a été montré des variations dans l'expression de marqueurs entre les espèces (Homme versus souris par exemple) mais également entre souches d'une même espèce (BALB/c versus C57Bl/6J par exemple) [46, 47]. Alors que les CSM humaines sont considérées comme négatives pour le CD34, les CSM murines sont, elles, positives pour l'expression de ce marqueur mais cette expression est variable d'une souche de souris à une autre. Les CSM murines sont CD90 négatives alors que les CSM humaines sont positives pour l'expression de ce marqueur.

Les CSM issues de la moelle osseuse sont particulièrement adaptées à une application clinique : elles peuvent être facilement isolées par aspiration de moelle osseuse sous anesthésie locale, leur expansion *ex-vivo* dans des conditions de grade clinique est possible [48] et permet d'obtenir jusqu'à 10^{12} cellules en 8 semaines [49], leur administration allogénique (allo-CSM) peut être envisagée. Le premier essai clinique d'administration systémique d'allo-CSM chez des enfants souffrant d'ostéogenèse imparfaite a conduit à une amélioration de la vitesse de marche, une augmentation du capital osseux et à une diminution du nombre de fractures [2]. D'autres résultats encourageants associés à l'injection d'allo-CSM ont été obtenus chez des patients atteints de cancers et traités par chimiothérapie [50]. Ces essais s'appuyaient sur les propriétés des allo-CSM à reconstituer la moelle osseuse du patient receveur. Les propriétés immunosuppressives des allo-

CSM ont été mises en évidence dans de nombreuses études *in vitro*. Le premier essai clinique portant sur la réaction du greffon contre l'hôte a montré les effets immunosuppresseurs des allo-CSM sur les lymphocytes T [51]. Cependant, l'utilisation de ces cellules a également été associée à une augmentation de l'incidence des rechutes chez des patients atteints de leucémies [52]. Les relations des allo-CSM avec le système immunitaire (inné ou acquis) sont complexes [53] et leur utilisation clinique requiert encore des précautions [54].

Des CSM ont également été obtenues à partir d'autres tissus tels que le sang de cordon [55-57]. Les cellules souches hématopoïétiques également présentes dans le sang de cordon ont été utilisées chez l'Homme pour différentes indications hématologiques depuis plusieurs années [58, 59].

1.1.3.3 Les cellules souches adultes et la thérapie cellulaire respiratoire

La capacité des cellules souches adultes, notamment des cellules souches mésenchymateuses (CSM) issues de la moelle osseuse, à donner naissance *in vitro* à des cellules issues des autres feuilletts embryonnaires telles que les cellules épithéliales pulmonaires [60-63] a permis leur utilisation dans le cadre de la thérapie cellulaire respiratoire. Plus récemment, une étude a montré la différenciation *in vitro* de CSM issues du sang de cordon humain en cellules épithéliales des voies aériennes [64]. Une étude antérieure avait déjà montré la capacité d'une sous population de cellules dans le sang de cordon à exprimer *in vitro* la protéine C du surfactant, marqueur phénotypique spécifique des pneumocytes de type II [65].

La stratégie de thérapie cellulaire respiratoire par administration de cellules souches adultes issues de la moelle osseuse a fait l'objet de nombreuses études expérimentales chez la souris. Les premières études ont concerné l'administration systémique de cellules souches mâles (Y positives) chez des souris femelles préalablement irradiées. Cette irradiation permettait de promouvoir la prise de greffe médullaire des cellules souches administrées. Selon la dose d'irradiation utilisée, un traitement supplémentaire était nécessaire pour induire des lésions pulmonaires (pour rappel, Tableau I). Certaines études ont mis en évidence la prise de greffe et la différenciation des cellules souches en de nombreux types cellulaires dans les poumons (Tableau II) [24, 66-75]. La voie

intraveineuse a aussi été utilisée pour administrer des CSM chez des souris non irradiées mais présentant des lésions respiratoires induites par la bléomycine [61, 76] ou le lypopolysaccharide (LPS) d'*Escherichia Coli* [77]. Avec des résultats similaires, une étude s'est également intéressée à l'administration de CSM issues de sang de cordon humain chez des souris irradiées [64]

Tableau II : Etudes de thérapie cellulaire respiratoire chez la souris, avec administration systémique de cellules souches adultes issues de la moelle osseuse ou de sang de cordon.

Protocole et CS	Méthodes	Localisation cellulaire	Phénotypes	Bénéfice	Références
Irradiation					
MO (n = 8)	FISH	Alvéoles	Pneumocytes (3% à 2 mois)	NE	[67]
MO (n = 17)	FISH, IF	Alvéoles	Pneumocytes (0.7% à 14% entre 5 jours et 6 mois, 1% et 2,5% à 8 mois)	NE	[24]
MO	FISH	Alvéoles	Pneumocytes II (0.2% à 28 jours)	NE	[75]
MO (n = 5)	FISH, RT-PCR		Expression du CFTR dans la trachée	CFTR fonctionnel	[72]
MO fraction adhérente	PCR <i>in situ</i>	Bronches et alvéoles	NE		[78]
MOpop (n = 5)	FACS, FISH	Bronchioles et alvéoles	Cellules épithéliales des voies aériennes (~3%) Pneumocytes II (>18,7%)	NE	[66]
MOpop	IF		Aucune cellule retrouvée		[79]
MAPC	IF, PCRq	Alvéoles	Différenciation (~ 4%)	NE	[62]
CSM (n = 2)	IHC	Bronchioles et alvéoles	Pas de différenciation	NE	[80]
CSM de sang de cordon	IF	Alvéoles	Différenciation (0.25%)	NE	[64]
Irradiation + bléomycine					
CSM (n = 3)	IF, RT-PCR	Alvéoles	Pneumocytes I et II, fibroblastes, myofibroblastes	Réduction des lésions et effet protecteur des CSM	[70]
Irradiation + polidocanol					
MOpop (n = 4 ou 9)	FISH	Epithélium des voies aériennes	Différenciation (0.6 à 1.5%)	NE	[68, 74]
Irradiation + NO₂					
MO (n = 4)	FISH	Alvéoles	Pneumocytes II (0.5%)	NE	[69]
Irradiation + cardiotoxine					
MO, CSH	IF, FACS	Alvéoles et endothélium	Pneumocytes I et II	NE	[73]
Irradiation + naphtaline					
MO fraction adhérente	FISH, RT-PCR	Epithélium des voies aériennes et alvéoles	Différenciation (0.025%)	CFTR fonctionnel	[71]
CSM (n = 18)	IHC, IF, FISH	Bronchioles	Différenciation (à 2 et 6 jours)		[81]
Bléomycine					
CSM	IHC, RT-PCR	Alvéoles	Pneumocytes I et II	Réduction des lésions	[61 , 76]
Lypopolysaccharide d'<i>Escherichia coli</i>					
CSM	IHC, IF	Alvéoles	Pas de différenciation	Réduction des lésions, effet protecteur	[77, 82, 83]

CS : Cellules Souches. MO : toutes les cellules de la Moelle Osseuse, MOPop, MAPC : sous population sélectionnée de la moelle osseuse, CSH-CSM : Cellules Souches Hématopoïétiques-Mésenchymateuses, IF : ImmunoFluorescence, IHC : ImmunoHistoChimie, FISH : hybridation in situ en fluorescence, FACS : cytométrie en flux, NE : non évalué.

Néanmoins, l'ensemble de ces études a conduit à des résultats variables puisque la contribution des cellules administrées à la réparation pulmonaire variait depuis 0 [79] jusqu'à 20% [66].

Les différences observées peuvent s'expliquer par la complexité anatomique et fonctionnelle des poumons, ainsi que par les différences de protocoles expérimentaux :

- le type de cellules souches adultes administrées : toutes les cellules souches de la moelle osseuse (MO dans le Tableau II), une sous population de cellules souches issues de la moelle osseuse sélectionnée pour l'expression de certains marqueurs de surface (MOPop dans le Tableau II), les CSM, les CSH, les MAPC (Multipotent Adult Progenitor Cell, sous population non hématopoïétique) ;
- le moyen utilisé pour induire les lésions respiratoires ;
- les méthodes de détection utilisées (Tableau III).

Les méthodes de détection utilisées sont basées sur la colocalisation des marqueurs des cellules administrées (marqueurs phénotypiques comme la GFP ou la β galactosidase, marqueurs génotypiques comme le chromosome Y) et des marqueurs de cellules épithéliales (différentes cytokératines pour les cellules épithéliales, CCSP pour les cellules de Clara, protéine du surfactant pour les pneumocytes par exemple). Ces méthodes ont été contestées lorsqu'un des auteurs des toutes premières études [61] a obtenu par la suite des résultats négatifs [84] : l'expression de la GFP dans les cellules administrées était sous le contrôle d'un promoteur spécifique des pneumocytes de type II et aucune cellule GFP positive n'a été retrouvée en histologie, en RT-PCR et cytométrie en flux dans les voies aériennes. Des résultats négatifs similaires ont été également obtenus par une autre équipe mettant en doute l'utilisation de la microscopie conventionnelle, de la cytométrie en flux et de l'immunofluorescence dans les poumons [85]. De par la proximité des structures alvéolaires et endothéliales, leur autofluorescence initiale, l'hypothèse que le signal obtenu était lié à une superposition de cellules, n'a pas pu être écartée [84-86]. La morphologie, l'orientation et la localisation de la cellule étaient utilisées pour conclure quand à la différenciation obtenue.

De même, l'utilisation de la GFP, comme marqueur des cellules souches obtenues à partir de moelle osseuse de souris GFP transgéniques, peut conduire à des erreurs en présence de structures autofluorescentes [87]. En utilisant des méthodes plus sophistiquées de fluorescence telles que la microscopie confocale à déconvolution, la participation des cellules souches adultes issues de la moelle osseuse serait comprise entre 0.01 et 0.1% [72, 88].

Tableau III : Principales méthodes de détection des cellules souches adultes issues de moelle osseuse dans les poumons de souris.
D'après [89].

Techniques	Avantages	Limites	Références
Immunofluorescence	Double marquage	Spécificité variable des anticorps Autofluorescence liée aux structures alvéolaires, aux débris cellulaires	[71, 75]
Cytométrie en flux	Marquage spécifique	Pas d'informations sur la localisation, la morphologie et la survie des cellules	[84, 85, 90]
PCR et RT-PCR	Haute sensibilité	Inclusion possible des cellules circulantes	[71, 76, 80, 84]
Expression des gènes rapporteurs sous le contrôle de promoteur spécifique	Suivi spécifique des cellules et de sa descendance	Régulation négative du promoteur	[84, 85]
Microdissection laser et PCR / RT-PCR (chez l'Homme)	Exclusion des marquages aspécifiques des cellules circulantes	Pas d'information sur la morphologie	[91]

Même si le pourcentage de cellules souches implantées dans les poumons est faible, il est admis que ces cellules sont capables de moduler les processus lésionnels grâce à leurs propriétés immunomodulatrices :

- l'administration de cellules souches adultes protège les animaux irradiés des infections pulmonaires [70, 73] ;
- l'administration intraveineuse des cellules souches adultes immédiatement après le traitement à la bléomycine protège le tissu alvéolaire des effets délétères de cette molécule : réduction du phénomène de fibrose [76, 82] ;
- dans des modèles murins d'emphysème induit par l'administration intranasale d'élastase ou de lipopolysaccharide d'*Escherichia coli*, les cellules souches adultes issues de la moelle

osseuse contribuent à réduire les lésions induites [92, 93] et cet effet positif est amélioré lorsque les CSM surexpriment l'angiopoïétine I [77, 83].

Alors que l'implantation structurale et la différenciation directe des cellules souches restent faibles, ces effets positifs seraient expliqués par un effet indirect de l'injection de cellules souches adultes lié à leurs propriétés paracrines (libération de cytokines, de facteurs de croissance). Ces propriétés conduisent alors à créer un environnement propice à stimuler la réparation pulmonaire, propriétés déjà décrites dans des études de thérapie cellulaire cardiaque par exemple [53].

Une stratégie de thérapie cellulaire de la mucoviscidose avec restauration de l'expression du gène CFTR dans les voies aériennes requiert une implantation structurale des cellules souches au niveau de l'épithélium des voies aériennes. Des études chez la souris ont été menées pour évaluer la capacité des cellules souches adultes à restaurer l'expression de ce gène [71, 94]. Des cellules souches adultes cfr positives ont été capables de s'implanter dans les poumons de souris knock-out pour le gène cfr, d'acquérir un phénotype épithélial, de produire l'ARN et la protéine d'intérêt. Cependant seules 0.025% des cellules épithéliales dérivées des cellules souches administrées étaient présentes dans l'appareil respiratoire et une modeste restauration du courant chlorure dans l'épithélium nasal et intestinal a été obtenue ([71], tableau II). Les auteurs concluent sur la nécessité d'améliorer le recrutement des cellules souches sur les sites lésionnels et d'étudier les mécanismes moléculaires de la différenciation épithéliale.

Des effets négatifs liés à l'injection de cellules souches adultes issues de la moelle osseuse ont également été décrits. Des études ont montré la participation de ces cellules à des processus pathologiques tels que la fibrose pulmonaire [95, 96], la formation de tumeurs induite par l'administration systémique de CSM [86] (Tableau IV). Dans différents modèles de fibrose, les auteurs ont montré que les fibroblastes et les myofibroblastes, acteurs majeurs dans le développement des lésions, étaient issus de la différenciation de cellules souches issues de la moelle osseuse [90, 96, 97] appuyant ainsi l'hypothèse selon laquelle le développement de ces lésions

serait lié à des fibroblastes circulants (ou fibrocytes) issus de la moelle osseuse [98]. La voie de différenciation empruntée par les cellules souches pourrait être conditionnée par le stade de développement des lésions (aigu, chronique ou établi) au moment où elles sont injectées. Ainsi les cellules souches administrées à des stades avancés des lésions participeraient directement au processus de fibrose [99]. A l'inverse ces cellules ont un effet bénéfique lorsqu'elles sont administrées en phase précoce et aiguë des lésions [76]. Cette propriété des cellules à intervenir dans le développement de fibrose pourrait être utilisée pour vectoriser des agents ou des gènes thérapeutiques [77, 100]. Dans le cas de la formation de tumeur, les auteurs pointent les anomalies du caryotype observées au cours de cultures prolongées des CSM murines qui précèdent leur injection [86].

Tableau IV : Effets négatifs observés chez la souris et associés aux cellules souches adultes de la moelle osseuse.

Protocole et CS	Méthodes	Localisation cellulaire	Phénotypes	Effets	Références
Irradiation					
CSM (n = 4 à 35)	IF, IHC	Alvéoles	Majorité de cellules non différenciées	Formation de tumeurs	[86]
MO et CSM	IF, FISH	Alvéoles	Fibroblastes, macrophages	Fibrose	[96]
Bléomycine					
MOpop	IHC, RT-PCR	Alvéoles	Fibroblastes	Fibrose	[97]
Irradiation + paracétamol					
MO (n = 5)	IHC, FISH	Alvéoles et endothélium	Myofibroblastes	Fibrose	[95]
Irradiation + bléomycine					
MO	IF	Alvéoles	Fibroblastes (>80%)	Fibrose	[90]

CS : Cellules Souches, MO : toutes les cellules de la Moelle Osseuse, MOpop : sous population sélectionnée de la moelle osseuse, CSM : Cellules Souches Mésenchymateuses, IF : ImmunoFluorescence, IHC : ImmunoHistoChimie, FISH : hybridation in situ en fluorescence.

La voie aérienne est une alternative à la voie systémique et a été plus récemment utilisée pour tester la stratégie de thérapie cellulaire (Tableau V). Cette voie présente de nombreux avantages : administrer directement les cellules souches sur le versant épithélial des voies aériennes, s'affranchir de la phase d'irradiation préalable et limiter la dissémination des cellules souches dans d'autres organes. Ces études ont utilisé des méthodes de détection similaires à celles décrites précédemment (Tableau III). Les premières conclusions montrent que cette voie d'administration

est plus efficace pour apporter les cellules que la voie intraveineuse (4 fois plus quand il s'agit de détecter la GFP) et que les cellules sont principalement localisées dans les voies aériennes. La différenciation des cellules reste modeste même si l'utilisation d'un promoteur spécifique permet de maintenir un phénotype épithélial jusqu'à 120 jours après l'administration [101]. De plus, des auteurs ont également montré que l'administration par voie aérienne des cellules souches adultes améliore la survie des animaux et diminue les risques d'oedèmes pulmonaires induits par l'endotoxine de *Escherichia coli* [102].

Tableau V : Etudes de thérapie cellulaire chez la souris avec administration par voie aérienne de cellules souches adultes issues de la moelle osseuse.

Protocole	CS	Méthodes	Localisation cellulaire	Phénotypes	Bénéfice	Références
Naphtaline						
Injection transtrachéale	MO	IF, FISH, RT-PCR	Epithélium distal des voies aériennes et alvéoles	Cellules de Clara et pneumocytes de type II	NE	[101]
Endotoxine						
Injection intrapulmonaire (n = 11 à 30)	CSM	RT-PCR, dosages protéiques, histologie	NE	NE	Réduction des lésions	[102]
Irradiation + naphtaline						
Injection intratrachéale (n = 3)	CSM	IF	Poumons	NE	NE	[81]

CS : Cellules Souches, MO : toutes les cellules de la Moelle Osseuse, CSM : Cellules Souches Mésenchymateuses, IF : ImmunoFluorescence, FISH : hybridation in situ en fluorescence, NE : non évalué.

1.1.4 Les autres types de cellules pour une stratégie de thérapie cellulaire des maladies respiratoires

D'autres travaux ont également montré que cette capacité à coloniser les poumons n'était pas uniquement la propriété des cellules souches (Tableau VI) :

- l'administration intratrachéale de fibroblastes pulmonaires néonataux de souris a été testée et montre que les cellules se localisent plus particulièrement dans les alvéoles lorsque les animaux sont traités à l'élastase [103] ;

- l'administration intratrachéale de cellules épithéliales alvéolaires de type II chez le rat protège les poumons des effets délétères de la bléomycine alors que la prise de greffe des cellules est très faible [104] ;
- l'injection systémique de fibroblastes issus de la peau et surexprimant le gène de l'angiopoïétine I protège les poumons de rats des effets délétères du lipopolysaccharide d'*Escherichia coli* [105].

Tableau VI : Etudes de thérapie cellulaire chez le rongeur avec administration des cellules autre que les cellules souches.

Protocole	Cellules	Méthodes	Localisation cellulaire	Phénotype	Bénéfice	Références
Elastase						
Injection endotrachéale	Fibroblastes néonataux	IF, IHC	Alvéoles	Macrophages et myofibroblastes	Aucun	[103]
Bléomycine						
Injection intratrachéale	Cellules alvéolaires de type II	FISH, RT-PCR	Alvéoles	NE	Réduction de la fibrose	[104]
Lypopolysaccharide d'<i>Escherichia coli</i>						
Injection intraveineuse	Fibroblastes de la peau		NE	NE	Effet protecteur	[105]

IF : ImmunoFluorescence, IHC : ImmunoHistoChimie, FISH : hybridation in situ en fluorescence, NE : non évalué.

En résumé :

De par leurs propriétés de prolifération et de différenciation, les cellules souches sont les cellules candidates pour une stratégie de thérapie cellulaire respiratoire.

Différents types de cellules souches endogènes, présentes dans les poumons, ont été identifiés tout au long de l'axe trachée-bronches-bronchioles-alvéoles dans des modèles murins de lésions pulmonaires. La diversité de ces cellules rend difficile l'élaboration d'une stratégie de thérapie cellulaire par administration de tels progéniteurs.

Les cellules souches exogènes incluent les cellules souches embryonnaires et les cellules souches adultes. Les cellules souches embryonnaires ont fait l'objet principalement d'études *in vitro* démontrant leur pouvoir de différenciation en cellules épithéliales des voies aériennes et alvéolaires.

La contribution des cellules souches adultes de la moelle osseuse au niveau du tissu pulmonaire a été largement étudiée dans des modèles de souris irradiées et/ou traitées avec des agents chimiques destinés à induire des lésions respiratoires. Après une réévaluation des méthodes de détection utilisées (microscopie conventionnelle, immunofluorescence), l'incorporation structurale des cellules souches adultes dans le tissu pulmonaire, leurs différenciations phénotypiques et fonctionnelles se sont avérées modestes. Néanmoins, la capacité de ces cellules à moduler des processus lésionnels (fibrose, œdème) a bien été étudiée et semble dépendante du stade de développement des lésions au moment de l'injection. La voie aérienne, plus modestement et récemment testée pour administrer les cellules, ne semble pas améliorer ces résultats mais délivre plus efficacement les cellules dans les voies aériennes que la voie systémique. D'autres types de cellules souches et de cellules différenciées ont également fait l'objet d'études de thérapie cellulaire respiratoire avec des résultats similaires.

1.1.5 Transfert de gène et cellules souches

L'utilisation d'ADN nu permet un transfert de gène peu efficace. Les barrières au transfert d'ADN nu sont importantes : le transgène doit atteindre la cellule à corriger à l'intérieur de l'organe ciblé, franchir les membranes et le cytoplasme pour être pris en charge dans le noyau par la machinerie transcriptionnelle tout en échappant aux dégradations enzymatiques. Pour optimiser le transfert, l'ADN doit être associé à un vecteur. Deux types de vecteurs existent : les vecteurs viraux et non viraux.

Les vecteurs viraux sont dérivés des virus à ADN (adénovirus et virus adéno-associés) et des virus à ARN (rétrovirus et lentivirus). Ces vecteurs utilisent les propriétés naturelles des virus à infecter les cellules et à intégrer leur génome à celui de la cellule hôte garantissant alors une expression stable du gène transféré (sauf dans le cas de l'adénovirus).

Les vecteurs non-viraux utilisent des molécules synthétiques pour véhiculer le gène incluant notamment des polymères et des lipides. Des méthodes physiques peuvent aussi être utilisées telles que l'électroporation et la nucléofection. Ces systèmes de transfert ne permettent pas d'intégration directe du transgène dans le génome de la cellule hôte ce qui entraîne une expression transitoire du transgène. Différentes stratégies sont possibles pour améliorer la persistance d'expression du transgène : modifier la construction du transgène en incluant un promoteur susceptible de promouvoir son expression [101, 106] ou une cassette de sélection à un antibiotique [107] ou un gène codant une intégrase [108] ou une transposase [109, 110].

Quelle que soit la méthode, virale ou non-virale, l'objectif principal est d'obtenir une bonne efficacité de transfert de gène dans les cellules et de tenir compte des paramètres suivants :

- la stabilité du transfert : liée à la capacité du vecteur à s'intégrer ou non dans le génome de la cellule hôte et à maintenir l'expression du transgène ;
- l'immunogénicité : particulièrement associée aux vecteurs viraux [111] ;
- la cytotoxicité : particulièrement associée aux méthodes physiques et également aux vecteurs non-viraux selon le type cellulaire et la formulation utilisée ;

- le niveau d'expertise nécessaire, le temps et le coût de production du vecteur : ces considérations sont importantes dans le cas de la production de certains vecteurs viraux.

Pour le transfert de gène dans les cellules souches, des travaux ont été menés pour s'assurer que les vecteurs utilisés n'altèrent pas leurs propriétés principales : auto-renouvellement et différenciation (lentivirus [77, 80], vecteur non viral FuGene [112], nucléofection [113]).

Dans le cas de la mucoviscidose, la combinaison thérapie génique et thérapie cellulaire apparaît comme une solution prometteuse. La thérapie génique donne de bons résultats lorsqu'elle cible des voies aériennes saines. Néanmoins, elle se heurte à des difficultés majeures lorsque l'épithélium est irréversiblement endommagé et les bronches obstruées par le mucus, comme il est décrit chez les patients atteints de la mucoviscidose au stade avancé de la maladie. Les atouts d'une stratégie « hybride » thérapie génique - thérapie cellulaire, en utilisant des cellules souches CFTR positives, pourraient permettre de surmonter ces difficultés :

- contrairement aux vecteurs de thérapie génique, les cellules souches seraient capables de coloniser les zones endommagées ;
- de par leurs propriétés intrinsèques, les cellules souches sont douées d'auto-renouvellement et de différenciation en cellules épithéliales des voies aériennes.

1.1.5.1 Les vecteurs viraux

Ce sont les vecteurs qui ont été le plus utilisés pour modifier génétiquement les cellules souches. Les cellules souches embryonnaires et les cellules souches adultes mésenchymateuses ont fait l'objet de transferts de gène à partir de vecteurs dérivés des virus à ADN (adénovirus et virus associés) et des virus à ARN (rétrovirus et lentivirus) (Tableaux VII et VIII).

Tableau VII : Comparaison des principaux vecteurs viraux pour le transfert de gène.

	Avantages	Limites
Adénovirus et virus associés aux adénovirus	- bonne efficacité <i>in vivo</i> et <i>ex-vivo</i> - production aisée - coût acceptable pour les adénovirus (500\$)	Adénovirus : - durée d'expression courte (forme épisomale dans le noyau) - forte immunogénicité [114, 115] Virus associés aux adénovirus : - transfert de gène de petite taille [116] - production comprise entre 500 et 1000\$
Rétrovirus	- bonne efficacité dans les cellules en division - expression stable	- durée d'expression limitée [117] - production coûteuse (1000\$)
Lentivirus	- bonne efficacité - expression stable	- production difficile et coûteuse (1000\$)

Tableau VIII : Transduction des cellules souches avec les vecteurs viraux.

	CSE	CSM
Adénovirus et virus associés	- efficacité faible (11%) - stabilité d'expression non étudiée [118]	- efficacité variable selon la construction utilisée [119-123]
Rétrovirus	- bonne efficacité (50-65%) [124]	- système très utilisé - perte d'expression du transgène par inactivation du promoteur [125, 126]
Lentivirus	- système le plus utilisé - efficacité variable en fonction de la construction utilisée et de la lignée : 20 à 80% pour les CSE humaines [127, 128] et jusqu'à 42% pour les CSE murines [129] - expression stable : jusqu'à 38 semaines pour les CSE humaines [128] et 3 mois pour les CSE murines [129]	- efficacité variable avec les CSM murines selon les protocoles (50% [130] à 95% [77, 80]) - bonne efficacité avec les CSM humaines (93% [131]) - expression stable [80, 132]

1.1.5.2 Les vecteurs non-viraux

Les vecteurs non-viraux sont des molécules synthétiques capables d'interagir avec les molécules d'ADN. Ces vecteurs sont également caractérisés par une production aisée et économique, une absence de pathogénicité et d'immunogénicité comparativement aux vecteurs viraux. Des lipides et les polymères cationiques complexés à l'ADN ont été testés sur les cellules souches. Les lipides cationiques sont associés à des lipides neutres pour améliorer le passage des membranes (la DOPE par exemple) ou consolider les complexes (le cholestérol par exemple). Les polymères cationiques, comme la polyéthylèneimine (PEI) et ses dérivés, sont des molécules à haute densité de charges cationiques capables de condenser et de transférer efficacement l'ADN [133]. Cependant la PEI non complexée induit une cytotoxicité cellulaire [134]. Les travaux ont conduit à des résultats variables en fonction des méthodes utilisées (Tableau IX).

Tableau IX : Principaux vecteurs non-viraux utilisés pour le transfert de gène dans les cellules souches.

	CSE	CSM
Lipides cationiques : - Lipofectamine constituée d'un lipide cationique (DOSPA) et de DOPE, - BGTC-DOPE - FuGENE	Lipofectamine : - efficacité faible : 5,75%, [135-137] pour les CSE murines, 5 à 28% pour les CSE humaines [107, 138], - durée d'expression améliorée quand sélection par un antibiotique [106]	Lipofectamine 2000 : - bonne efficacité : 50% de cellules transfectées et une survie>85% [140]
	FuGENE : - efficacité variable : 30 à 80% [124], <7% [139], - durée d'expression améliorée quand sélection par un antibiotique [112]	
Polymères cationiques : - polyéthylèneimine (PEI, JetPEI) - ExGen 500	ExGen 500 : - efficacité faible (<10%), - durée d'expression améliorée quand sélection par un antibiotique [107, 141]	PEI : - bonne efficacité sur les CSM de rat [142]

DOPE : dioléoylphosphatidyléthanolamine. DOSPA : 2,3-dioleoyloxy-N-[2(spermine-carboxamido)ethyl]-N,N-dimethyl-1-propanaminiumtrifluoroacetate. BGTC : Bis-guanidinium-tren-cholestérol.

1.1.5.3 L'électroporation classique et la nucléofection

L'électroporation classique et la nucléofection sont les deux principales méthodes physiques de transfert de gène utilisées pour les cellules souches. L'électroporation consiste à imposer un courant aux cellules pour générer de façon transitoire des pores dans les membranes, favorisant ainsi le passage des molécules d'ADN jusqu'au noyau [143, 144]. L'efficacité de ce système dépend de plusieurs paramètres : la taille de la cellule et son temps de division, le niveau et la durée de l'impulsion électrique [145]. La nucléofection est un protocole optimisé de l'électroporation classique (système Amaxa®) et permet d'obtenir des meilleurs résultats en terme d'efficacité et de viabilité que l'électroporation et les vecteurs synthétiques [113, 146, 147]. L'inconvénient de ce système est son coût (achat de la machine de nucléofection, des cuves et des solutions de nucléofection spécifiques de ce système) (Tableau X).

Tableau X : Electroporation et nucléofection pour le transfert de gène dans les cellules souches.

	CSE	CSM
Electroporation	- CSE murines : 20 à 25% d'efficacité [148]	- bonne efficacité (98%)
	- CSE humaines : efficacité variable, de 5% [146] à 40%[138]	- expression améliorée quand sélection par un antibiotique [149]
Nucléofection	- bonne efficacité : 65% pour CSE humaines [138] et 60% à 96% pour les CSE murines [146, 147]	- 45% d'efficacité et expression stable jusqu'à 7 jours après le transfert [113]

En résumé :

La capacité des cellules souches à migrer sur les sites lésionnels, à proliférer et à se différencier sont des arguments en faveur d'une stratégie « hybride » thérapie génique – thérapie cellulaire. Les cellules souches embryonnaires et adultes de la moelle osseuse ont fait l'objet d'études de transfert de gène avec principalement des vecteurs viraux mais aussi des vecteurs synthétiques et des méthodes physiques.

Parmi les vecteurs viraux, les expériences avec les vecteurs lentiviraux ont été les plus concluantes en termes d'efficacité de transfert et de persistance d'expression. Les résultats avec les vecteurs synthétiques sont très variables d'une méthode à une autre. L'électroporation et la nucléofection sont les principales méthodes physiques utilisées. La nucléofection permet d'obtenir de meilleurs résultats que l'électroporation et les vecteurs synthétiques.

1.1.6 La niche des cellules souches au niveau de l'épithélium respiratoire

Les études portant sur l'identification des cellules souches ou progéniteurs résidents dans les poumons ont montré une compartimentalisation des cellules souches ou progéniteurs dans les voies aériennes. Ces compartiments désignent des niches de cellules souches ou progéniteurs. Ces niches de cellules souches ou progéniteurs ont été aussi décrites dans de nombreux autres tissus adultes (tels que la moelle osseuse, le cœur, le cerveau, le tissu adipeux, les muscles, la peau, le foie, le tractus gastro intestinal [1]). Ces niches reposent sur des contacts étroits entre les cellules souches et les cellules différenciées voisines qui sécrètent et organisent un milieu riche en éléments de la matrice extracellulaire, en facteurs (cytokines, facteurs de croissance, molécules d'adhésion) capables de stimuler les propriétés intrinsèques des cellules souches : la capacité à s'auto-renouveler tout en maintenant en attente leur répertoire de programmes de différenciation [150]. La présence de sites de lésions dans les poumons, perturbant alors les propriétés de ces niches, favorise le recrutement, la migration des cellules souches endogènes (celles qui résident dans les poumons) ou exogènes (celles apportées par voie systémique ou aérienne) sur les sites de lésions. Les études décrites précédemment ont utilisé des approches expérimentales différentes et ont conduit à des résultats variables mais s'accordent pourtant sur le fait que lorsque les lésions sont absentes, le recrutement des cellules dans les poumons est très faible [77, 101] voire nul [61].

Dans des pathologies des voies aériennes telle que la mucoviscidose, il est observé une destruction progressive et irréversible de l'épithélium de surface (Figure 2). La clairance muco-ciliaire est perturbée et la lame basale sous-jacente dénudée. Cette lame basale dénudée fournirait alors un site potentiel d'adhérence des cellules souches. Cette hypothèse a déjà été vérifiée dans les modèles de xénogreffes humanisées chez la souris nude [34] puisque les cellules administrées sont capables d'adhérer sur la lame basale dénudée de trachée de rat. Ce phénomène de niche induit par une lame basale dénudée est bien connu dans le système vasculaire dont la lame basale constitue un élément central de l'effet de niche [151]. L'effet de niche des cellules souches au niveau de la lame basale dénudée dans les voies aériennes pourrait être plus important lors d'une administration directement

dans la trachée par rapport à une administration systémique. Des travaux récents ont testé cette voie pour administrer des cellules souches mésenchymateuses dans des voies aériennes préalablement traitées à la naphthaline. Cette molécule a pour cible les cellules de Clara [152] mais ne permet pas de mettre à nu la lame basale sous jacente. Néanmoins, la détection des CSM GFP positives par fluorescence a montré l'efficacité de cette voie pour apporter un plus grand nombre de cellules par rapport à la voie systémique, avec une rétention des cellules qui peut être maintenue jusqu'à 120 jours. Cependant l'implantation structurale et la différenciation restent limitées [81, 101, 102].

A retenir :

La niche des cellules souches dans les voies aériennes de patients atteints de la mucoviscidose pourrait être favorisée par la lame basale dépourvue de son épithélium. Cette lame basale deviendrait ainsi un site potentiel d'adhérence pour les cellules souches. Une administration directement dans la trachée des cellules souches potentialiserait cet effet de niche induit par la lame basale dénudée. Les premières études qui ont testé cette voie encouragent son utilisation.

2 BUTS DE LA THESE

Une destruction progressive et irréversible de l'épithélium des voies aériennes peut être observée chez les patients atteints de maladies respiratoires. Une stratégie de thérapie cellulaire consisterait donc à utiliser des cellules capables de coloniser les zones épithéliales lésées et de réparer cet épithélium. De par leurs propriétés particulières, les cellules souches semblent capables de remplir ce cahier des charges. Dans le cas de la mucoviscidose, maladie monogénique, ces cellules devront exprimer le gène CFTR ou le cas échéant, seront manipulées *ex vivo* pour exprimer ce gène. Les premiers travaux de thérapie cellulaire dans les poumons ont principalement porté sur l'administration de cellules souches adultes issues de la moelle osseuse chez des souris préalablement irradiées. L'irradiation permettait de promouvoir la prise de greffe médullaire des cellules souches administrées, une stratégie difficilement applicable à l'Homme. Ces travaux ont conduit à des résultats modestes et controversés à cause des méthodes de détection des cellules utilisées : l'utilisation de la GFP dans les poumons, la microscopie et l'immunofluorescence.

L'objectif de ce travail était de développer une stratégie de thérapie cellulaire visant l'épithélium des voies aériennes en évitant l'irradiation des souris et l'utilisation des méthodes de détection controversées dans la littérature.

Nous avons développé une stratégie de thérapie cellulaire par administration intratrachéale de cellules souches sans irradiation préalable. Nous avons eu recours à un modèle de souris présentant des lésions épithéliales aiguës dans les voies aériennes. Ce modèle a déjà été utilisé pour étudier des progéniteurs ou des cellules souches exogènes dans les voies aériennes [18, 68] mais également dans des études de thérapie génique de la mucoviscidose [17]. Ce modèle consiste à administrer en intratrachéal un détergent : le polidocanol. Cette administration est suivie de lésions épithéliales aiguës transitoires car une régénération spontanée de l'épithélium s'amorce rapidement de sorte que 7 jours après l'administration, l'épithélium est totalement réparé [18, 68]. Dans ce modèle, nous avons utilisé des cellules souches exogènes, embryonnaires et adultes, issues de lignées et de cultures primaires.

Pour cela, nous avons développé :

- le modèle murin de lésions épithéliales induites par le détergent de sorte à obtenir une lame basale dénudée dans les voies aériennes ;
- les conditions de transfert de gènes rapporteurs dans les cellules souches en utilisant à la fois des vecteurs viraux et non-viraux.

Ces systèmes nous ont permis d'étudier :

- la survie des cellules souches lorsqu'elles sont administrées dans des voies aériennes présentant des lésions épithéliales aiguës, à l'aide de méthodes quantitatives et sensibles ;
- la localisation des cellules souches à l'aide de méthodes biochimiques.

3 METHODOLOGIE

3.1 Démarche expérimentale

Notre protocole de thérapie cellulaire respiratoire a débuté par l'induction des lésions épithéliales dans les voies aériennes de souris SWISS mâles adultes avec administration intratrachéale de détergent : le polidocanol (PDOC). La solution de PDOC est préparée dans du PBS. 25µL de la solution de PDOC, ou de PBS dans le cas des animaux contrôles, sont injectés. 24h ou 7 jours après l'injection de PDOC ou de PBS, les animaux sont sacrifiés, les blocs trachée-poumons prélevés pour des analyses histologiques. Des coupes perpendiculaires à l'axe trachéo-bronchique sont effectuées au niveau de la trachée et des lobes pulmonaires. Grâce aux analyses histologiques, nous avons observé, 24 heures après l'injection de détergent, des lésions épithéliales importantes et donc sélectionné ce moment pour administrer les cellules souches. En revanche, 7 jours après l'administration de détergent, l'épithélium est spontanément régénéré.

Les études sur la survie et l'implantation des cellules dans des conditions aiguës de lésions épithéliales ont donc été menées, 24 heures après l'injection des cellules souches.

Pour suivre le devenir des cellules souches *in vivo*, celles-ci étaient préalablement transfectées avec différents gènes rapporteurs : le gène CAT codant la Chloramphénicol AcétylTransférase, le gène de la GFP et le gène LacZ codant la bêta galactosidase. L'expression de ces gènes rapporteurs était suivie à la fois *in vitro* et *in vivo* par ELISA, dosages biochimiques et PCR. La localisation des cellules souches était attestée par immunohistochimie et révélation biochimique de l'activité de la bêta galactosidase.

Les premières injections ont été réalisées avec des cellules souches issues de lignées établies et bien caractérisées. Les résultats obtenus ont encouragé les expériences avec des cellules souches issues de cultures primaires.

3.2 Modèle murin de lésions épithéliales

Dans cette étude, les lésions épithéliales ont été induites par l'administration d'un détergent non ionique : le polidocanol (PDOC). Le PDOC a déjà été utilisé dans des études de thérapie génique de la mucoviscidose [17] et dans des études de thérapie cellulaire [18, 68].

Dans notre modèle, l'intérêt majeur du PDOC était qu'il générât, 24h après son administration, une abrasion totale de l'épithélium dans les voies aériennes de sorte à obtenir une lame basale sous jacente dénudée. Notre hypothèse était que cette lame basale fraîchement dénudée pouvait alors stimuler la prise de greffe des cellules souches. De plus, c'est un modèle facile à mettre en place puisqu'il ne nécessite pas d'irradiation préalable des animaux. En revanche, à distance de l'injection du PDOC (7 jours), ces lésions sont absentes, l'épithélium des souris SWISS se régénère spontanément.

Pour mettre au point ce modèle animal, nous avons utilisé des souris SWISS mâles adultes (8 semaines). Pour procéder à l'injection intratrachéale du détergent, les animaux étaient anesthésiés par injection intrapéritonéale de kétamine (70 mg/kg) et xylazine (15 mg/kg). La sédation obtenue était satisfaisante pour faciliter l'intubation de l'animal et le temps de réveil était largement suffisant pour pratiquer l'injection.

Cette méthode autorisait également des anesthésies répétées sans difficulté particulière puisque l'administration des cellules souches était programmée 24 heures après l'injection du détergent, lorsque les lésions épithéliales étaient les plus importantes.

Une incision dans la région du cou était pratiquée afin de visualiser la trachée. Une canule d'intubation (Harvard Apparatus) était utilisée pour positionner en intratrachéal un fin cathéter (0,7 mm de diamètre externe, Tygon Tubing). Nous avons vérifié qu'il était possible de répéter ce mode opératoire pour permettre d'abord l'injection du détergent puis 24h après l'injection de PBS ou de cellules souches.

La solution de PDOC était préparée dans du PBS et injectée dans la trachée à l'aide d'une seringue de précision (Hamilton) associée à une aiguille 30G, via ce cathéter. Nous avons testé l'injection de 25µl de solution de PDOC 1%, 1.5% et 2%.

Pour comparer le pourcentage de survie des animaux entre les différents groupes contrôles (injection de PDOC ou de PBS ou les deux), un test non paramétrique (effectif < 30 souris) pour plusieurs groupes indépendants, test de Kruskal et Wallis, a été réalisé au risque 5%.

Pour comparer le pourcentage de survie des animaux entre le groupe contrôle (injection de PDOC puis 24h après, de PBS) et les différents groupes traités (injection de PDOC puis 24h après, injection de cellules souches issues de lignées cellulaires ou de cultures primaires), un test non paramétrique (effectif < 30 souris) pour plusieurs groupes indépendants, test de Kruskal et Wallis, a été réalisé au risque 5%.

Les souris étaient sacrifiées par une injection létale de nesdonal en intrapéritonéal, 24h ou 7 jours après l'administration des cellules souches et les blocs trachée-poumons étaient prélevés pour les analyses ultérieures.

3.3 Culture cellulaire

3.3.1 Lignées de cellules souches indifférenciées

Pour débiter ce projet, nous avons utilisé des cellules souches murines, issues de lignées cellulaires. Les cellules souches embryonnaires (lignée R1, [153]) étaient cultivées en routine dans le laboratoire à des fins de projet de thérapie cellulaire cardiaque. Les cellules souches mésenchymateuses (lignée BMC9, [154]) ont été fournies par nos collaborateurs de Tours (INSERM, EA 3855 - ERI 5, Microenvironnement de l'Hématopoïèse et Cellules Souches). Dans les deux cas, les cellules étaient cultivées à l'état indifférencié. La pluripotence des cellules souches embryonnaires était maintenue en supplémentant le milieu avec du LIF (Leukemia Inhibitory Factor, 2000U/mL, Sigma) [37, 155].

3.3.2 Lignées de cellules différenciées

Trois lignées de cellules différenciées ont été utilisées comme contrôles : la lignée humaine Hep3B (hépatocyte de carcinome humain), la lignée mOS-J (cellules d'ostéosarcome de souris) et la lignée COS-7 (fibroblastes de rein de singes verts d'Afrique). Ces trois types de lignées ont été cultivés en milieu classique composé de DMEM, supplémenté avec 10% de SVF (Invitrogen), 2mM de L-Glutamine (Invitrogen), pénicilline/streptomycine (100U/mL et 100µg/mL respectivement, Invitrogen).

3.3.3 Culture primaire de cellules souches mésenchymateuses

Les avantages dans l'utilisation des cellules souches mésenchymateuses obtenues à partir de cultures primaires de cellules de moelle osseuse étaient multiples : 1) garantir que l'effet obtenu sur la survie des cellules souches *in vivo* n'était pas un artéfact lié à l'utilisation de cellules immortalisées, issues de lignées cellulaires, 2) se rapprocher d'une utilisation clinique de cette stratégie parce que ces cellules souches isolées à partir de la moelle osseuse sont déjà utilisées chez l'Homme dans des conditions de grade clinique, 3) avoir la possibilité d'utiliser la moelle osseuse de souris transgéniques (souris Rosa26 et souris GFP dont les cellules expriment de façon constitutive la bêta galactosidase et la GFP respectivement) et s'affranchir ainsi de l'étape de transfert de gène rapporteur préalable à l'injection *in vivo*.

3.3.3.1 Prélèvement de moelle osseuse

Le prélèvement de moelle osseuse a été réalisé chez des souris SWISS mâles adultes, chez des souris Rosa26 (fournie par M.F. Gardahaut, Nantes, France) et des souris GFP (fournies par B. Pitard, Nantes, France). Les cellules de moelle osseuse sont cultivées dans un milieu de culture supplémenté avec du FGF 2 humain (2ng/mL, AbCys).

3.3.3.2 Caractérisation des cultures primaires

Seule la fraction adhérente des cellules de moelle osseuse de souris a été gardée en culture. Chaque passage a donné lieu à une caractérisation phénotypique des cellules par cytométrie en flux. Les

cellules destinées à l'injection étaient CD45 négatives (<0.5%) et CD29, CD106, Sca-1, CD44 positives (>95%). Ce profil d'expression était obtenu à partir du passage 8.

Pour les cultures issues de souris transgéniques GFP, la proportion de cellules exprimant la GFP était évaluée par cytométrie en flux.

Pour les cultures issues de souris transgéniques Rosa26, la proportion de cellules exprimant la bêta galactosidase était évaluée après révélation de l'activité de la bêta galactosidase en présence de X Gal.

3.4 Transfert de gènes *in vitro* des cellules souches

Le transfert des gènes rapporteurs précédait l'injection des cellules souches *in vivo*. Les gènes rapporteurs choisis devaient permettre d'évaluer quantitativement la survie des cellules souches et de les localiser dans des voies aériennes présentant des lésions épithéliales importantes. Selon les objectifs et les expériences, les vecteurs utilisés ont été adaptés : vecteurs viraux, vecteurs synthétiques et nucléofection. A chaque passage des cellules souches transfectées, la qualité des cultures était évaluée par le calcul du temps de division et le comptage au bleu trypan pour la mortalité. Les tests statistiques utilisés pour comparer les temps de division ou le pourcentage de mortalité en fonction des conditions de transfert de gènes est un test non paramétrique pour plusieurs échantillons indépendants : test de Kruskal et Wallis au risque 5%.

3.4.1 Gènes rapporteurs utilisés

Les gènes rapporteurs choisis sont le gène CAT codant la Chloramphenicol AcetylTransferase, le gène codant la GFP et le gène nls-LacZ (gène lacZ couplé à une séquence de localisation nucléaire) codant pour la bêta galactosidase. L'expression des gènes était suivie *in vitro* (cellules souches gardées en culture) et *in vivo* (dans la trachée et les poumons) (Tableau XI).

Tableau XI : Utilisation des différents gènes rapporteurs.

	Objectifs et moyens	Avantages
Gène CAT	- Quantifier le pourcentage de cellules souches vivantes <i>in vivo</i> par ELISA de la protéine CAT. - Localiser les cellules souches <i>in vivo</i> par immunohistochimie de la protéine CAT.	Méthode sensible de détection, de l'ordre du pg (CAT-ELISA, Roche Diagnostics).
Gène GFP	Estimer le pourcentage de cellules transfectées par cytométrie en flux.	Evaluation rapide sous microscope à fluorescence de la réussite du transfert de gène utilisé et quantification par cytométrie en flux.
Gène nls-LacZ	- Evaluer la survie des cellules souches <i>in vivo</i> par dosage de l'activité de la bêta galactosidase. - Localiser les cellules souches <i>in vivo</i> par révélation biochimique de l'activité de la bêta galactosidase.	- Détection facilitée par la présence de la séquence nls [156]. - Détection des cellules par réaction biochimique.

3.4.2 Transfection des cellules souches

3.4.2.1 Transfection avec les vecteurs synthétiques

Pour cette étude, nous avons utilisé les plasmides pCIK-CAT (4.7 Kb) et pEGFP-C1 (4.7 Kb) ainsi que les vecteurs synthétiques développés dans l'équipe de Bruno Pitard et le vecteur commercial Lipofectamine 2000 (Invitrogen). Pour les expériences de transfection, les cellules souches étaientensemencées à 30 000 cellules/puit en plaque 24 puits. Les lipides cationiques ont été utilisés pour les cellules souches issues de lignées cellulaires. La Lipofectamine a été utilisée pour les cellules souches adultes issues de cultures primaires.

Nous avons plus particulièrement travaillé avec des lipides cationiques développés dans le laboratoire. Pour ces vecteurs, quels que soient les cellules souches, les plasmides et les formulations utilisées, le protocole de transfection était inchangé : les mélanges ADN et vecteurs étaient préparés immédiatement avant la transfection, le milieu des cellules était changé avant le dépôt des mélanges, les cellules incubaient 2h avec les complexes à 37°C. A l'issue de l'incubation, le milieu était à nouveau changé et les cellules gardées à 37°C pour les expériences ultérieures.

L'efficacité de la transfection avec le plasmide pCIK-CAT était évaluée à 24h et 7 jours par ELISA. La transfection avec le plasmide GFP était destinée à estimer la proportion de cellules transfectées par cytométrie en flux.

Pour la transfection avec la Lipofectamine 2000 (Invitrogen), les cellules souches issues de cultures primaires étaient placées dans un milieu sans sérum puis incubées pendant 4h à 37°C avec les

complexes ADN et Lipofectamine, avant de repasser en milieu de culture classique. Les ELISA de la protéine CAT ont été réalisées à 24h.

3.4.2.2 Nucléofection selon le système Amaxa®

Pour la nucléofection, nous avons utilisé les plasmides pCIK-CAT (4.7 Kb) et pEGFP-C1 (4.7 Kb). Ce système a été utilisé pour les cellules souches mésenchymateuses issues de cultures primaires selon les recommandations du fournisseur. Le milieu était également changé 2h après le début de la nucléofection et les cellules étaient gardées en culture pendant 24h.

3.4.2.3 Evaluation de la sensibilité du système de transfert de gène

L'enjeu du système de transfert de gène était qu'il devait nous permettre de détecter facilement un faible nombre de cellules souches dans les voies aériennes de souris. Ceci impliquait, lors des mises au point *in vitro*, que la quantité de protéine CAT dosée dans l'échantillon ne soit pas à la limite du seuil de détection de l'ELISA. Le seuil de détection de l'ELISA était fixé à la densité optique (DO) obtenue pour 50pg de protéine CAT, DO en-dessous de laquelle la quantité dosée n'est plus proportionnelle à la DO mesurée. Lorsque la DO mesurée de l'échantillon était inférieure à la DO_{50pg} de la gamme, alors l'échantillon était considéré comme négatif.

Dans le cas des échantillons positifs (DO mesurée > DO_{50pg}), nous avons déterminé la quantité de protéine CAT par cellule exprimant la protéine CAT *in vitro*. Pour cela, la quantité de protéine CAT obtenue par ELISA *in vitro* a été divisée par le nombre de cellules et le pourcentage de cellules transfectées obtenues par cytométrie en flux. Connaissant la quantité de protéine CAT par cellules, nous avons ensuite calculé le nombre de cellules souches nécessaires pour avoir 50pg de protéine CAT, cette valeur correspondant au seuil de détection. La méthode de transfert était considérée sensible si le nombre de cellules détectées était inférieur à 10 000 cellules.

3.4.3 Transduction des cellules souches

3.4.3.1 Transduction avec un vecteur rétroviral nls-LacZ

La solution stock de rétrovirus nous a été fournie par l'équipe de Nicolas Ferry (EA 4274 Biothérapies Hépatiques, Nantes) [157]. Le rétrovirus nls-LacZ a été utilisé pour infecter les CSM issues de la lignée et de cultures primaires. Deux infections successives ont été nécessaires pour obtenir l'expression de la bêta galactosidase dans les CSM issues de la lignée cellulaire. Chaque infection était composée de 3 cycles. Chaque cycle d'infection a consisté à laisser en contact les particules virales avec les cellules pendant 1h. La proportion des cellules transduites était estimée après révélation de l'activité de la bêta galactosidase en présence de X-Gal.

3.4.3.2 Transduction avec un vecteur lentiviral nls-lacZ

L'équipe Jean-Christophe Pagès (INSERM ERI 19, Tours) a produit deux solutions stock de lentivirus nls-LacZ ($1,5 \cdot 10^7$ et $5 \cdot 10^6$ pi/mL respectivement). Le lentivirus a été utilisé sur les CSM issues de cultures primaires. L'infection a consisté à tester différentes concentrations de particules virales (exprimées en MOI, Multiplicity of Infection), c'est-à-dire le nombre de particules virales par cellules : 12.5, 25, 50 MOI. Le temps d'incubation n'a pas excédé 72h et a été fixé en fonction de l'état des cultures (temps de division et mortalité). La proportion de cellules transduites était estimée après révélation de l'activité de la bêta galactosidase en présence de X-Gal.

3.4.4 Utilisation des méthodes de transfert de gènes

Tableau XII : Utilisation des cellules souches transfectées ou transduites.

Système de transfert de gènes	Cellules souches	Expériences	
		24h	7j
Vecteurs synthétiques (plasmides pCIK-CAT et pEGFP-C1)	CSE, CSM issues de la lignée et de cultures primaires	- ELISA CAT - Cytométrie en flux - Immunohistochimie	
Nucléofection Amaxa® (plasmides pCIK-CAT et pEGFP-C1)	CSM issues de cultures primaires		.
Rétrovirus nls-LacZ	CSM issues de la lignée et de cultures primaires	- Dosage de l'activité de la bêta galactosidase - Révélation biochimique de l'activité de la bêta galactosidase	
Lentivirus nls-LacZ	CSM issues de cultures primaires	- Détection du gène nls-LacZ par PCR	

3.5 Etude de la survie

3.5.1 Dosage de la protéine CAT par ELISA et calcul du pourcentage de cellules vivantes

L'étude de la survie des cellules souches par ELISA de la protéine CAT a été menée 24h après leur administration, lorsque les lésions induites par le détergent étaient aiguës. Pour quantifier le nombre de cellules vivantes et présentes dans les voies aériennes, les cellules ont été transfectées avec le plasmide pCIK-CAT à l'aide de vecteurs synthétiques, immédiatement avant leur injection.

2h après le début de la transfection avec le plasmide pCIK-CAT et les vecteurs synthétiques, les cellules étaient soit gardées en culture, soit lysées pour un ELISA, soit injectées *in vivo*. L'ELISA à 2h a permis de s'assurer que les cellules souches gardées en culture ou destinées à l'injection *in vivo* n'exprimaient pas encore la protéine CAT. Notre postulat était le suivant : si les cellules souches survivent à l'injection, alors elles seront capables d'exprimer la protéine CAT. La survie des cellules *in vivo* était donc attestée par le dosage de la protéine CAT par ELISA, 24h après l'injection des cellules. La quantité de protéine CAT dosée était rapportée à la quantité de protéines totales.

Dans le cas des échantillons positifs (DO mesurée > DO_{50pg}), nous avons obtenu une quantité de protéine CAT par poumons.

Parallèlement, nous avons déterminé la quantité de protéine CAT par cellule exprimant cette protéine *in vitro* selon la méthode décrite précédemment : la quantité de protéine CAT dosée *in vitro*, à partir des cellules transfectées et gardées en culture pendant 24h, a été divisée par le nombre de cellules et le pourcentage de cellules transfectées obtenues par cytométrie en flux.

A partir de ces deux ratios : la quantité de protéine CAT par cellule *in vitro*, la quantité de protéine CAT par poumons *in vivo*, il nous était alors possible d'en déduire le nombre de cellules exprimant la protéine CAT dans les poumons.

3.5.2 Dosage de l'activité de la bêta galactosidase selon la méthode du 4 MUG (4-MethylUmbelliferyl- β -D-Galactoside)

Le dosage de l'activité de la bêta galactosidase a été utilisé pour estimer la survie des cellules souches transduites avec le gène nls-LacZ, 24h et 7 jours après leur administration.

Ce dosage consiste à fournir à la bêta galactosidase un substrat (le 4MUG) dont l'hydrolyse aboutit à un produit fluorescent. Grâce à une gamme étalon, il était possible d'en déduire la quantité de protéine bêta galactosidase présente. Cette quantité était ensuite rapportée à la quantité de protéines totales.

Des animaux contrôles ont été utilisés pour distinguer l'activité bêta galactosidase issue du transgène de celle présente de façon endogène dans les poumons de souris.

Comme les cellules exprimaient la bêta galactosidase au moment de leur injection *in vivo*, il n'a pas été possible d'estimer le pourcentage de cellules vivantes. Toutefois comme contrôle supplémentaire, des lysats de cellules souches transduites (obtenus après 3 cycles de congélation et décongélation, la mortalité étant attestée par un comptage au bleu trypan) ont été injectés dans les voies aériennes.

3.5.3 PCR

Les expériences de PCR étaient destinées à détecter le gène LacZ ou nls-LacZ dans les cellules souches gardées en culture et dans les échantillons de trachée-poumons. Cette technique était réalisée en parallèle des révélations et des dosages de l'activité de la bêta galactosidase. Les expériences de PCR permettaient également de palier à la diminution d'expression de la bêta galactosidase observée *in vitro*. Dans le cas des échantillons traités avec les BMC9 nls-LacZ, l'ADN nécessaire aux PCR a été obtenu à partir des broyats utilisés pour les dosages biochimiques. Pour amplifier le transgène nls-LacZ, un des primers était complémentaire de la séquence nls (Tableau XIII).

Tableau XIII : Primers utilisés pour amplifier le gène LacZ ou nls-LacZ par PCR.

	Primers Forward	Primers Reverse	Produit de PCR	Programme (nombre de cycles)
Gène lacZ	AGT TCA GAT GTG CGG CGA GTT	TTC ATT CCC CAG CGA CCA GAT	650 bp	94°C 30" / 58°C 30" / 72°C 1' (32)
Rétrovirus nls LacZ	ATA CAC GCC GCC CAC GTG AAG	CGT AAC CGT GCA TCT GCC AGT	500 pb	94°C 30" / 61°C 45" / 72°C 45" (30)
Lentivirus nls LacZ	GTA ACA ACT CCG CCC CAT T	GAC AGT ATC GGC CTC AGG AA	569 pb	94°C 30" / 57°C 30" / 72°C 45" (30)

3.6 Etude de la localisation

Pour les études de localisation, les blocs trachée-poumons des animaux sont fixés dans du paraformaldéhyde puis aussitôt inclus en paraffine. Des coupes de 4µm sont réalisées au microtome. Après déparaffinage, les lames sont utilisées pour les marquages suivants. Une contre-coloration HES ou Nuclear Fast Red est pratiquée avant le montage des lamelles.

3.6.1 Immunohistochimie de la protéine CAT

L'immunohistochimie de la protéine CAT a été réalisée sur des échantillons de trachée-poumons 24h après l'administration de cellules souches embryonnaires transfectées avec le plasmide pCIK-CAT. Le protocole comprend un anticorps primaire, un anticorps secondaire biotinylé et un système streptavidine peroxydase. L'activité de la peroxydase en présence de son substrat (DAB) aboutit à la formation d'un précipité marron. Les expériences de marquage ont été réalisées en parallèle sur des cellules transfectées et gardées en culture pendant 24h, sur des échantillons de trachée-poumons de souris contrôles et de souris traitées uniquement avec le PDOC. Les lames sont contre-colorées avec de l'hématoxyline.

3.6.2 Immunohistochimie de la GFP

L'immunohistochimie de la GFP a été préférée à la détection directe de la GFP par fluorescence à cause de l'autofluorescence des structures pulmonaires. Ce marquage a été réalisé sur des échantillons de trachée-poumons 7 jours après l'administration de cellules souches mésenchymateuses issues de souris transgéniques GFP. Le protocole comprend un anticorps

primaire, un anticorps secondaire biotinylé et un système streptavidine peroxydase. L'activité de la peroxydase en présence de son substrat (DAB) aboutit à la formation d'un précipité marron. Les expériences de marquage ont été réalisées en parallèle sur des cellules gardées en culture, sur des échantillons de trachée-poumons de souris contrôles et de souris traitées uniquement avec le PDOC. Les lames sont contre-colorées avec de l'hématoxyline.

3.6.3 Révélation de l'activité de la bêta galactosidase par réaction biochimique avec le X Gal (ou 5-bromo-4-chloro-3-indolyl-bêta-D-galactopyranoside)

Cette révélation a été effectuée à la fois *in vitro* à partir de cellules souches gardées en culture et *in vivo* à partir des blocs trachée-poumons. La révélation *in vivo* a concerné les échantillons issus des souris traitées avec les cellules souches transduites avec le gène nls-LacZ ou les cellules souches issues de souris transgéniques Rosa26. La révélation a été effectuée 24h et 7 jours après l'administration des cellules.

La révélation consiste à fournir à la bêta galactosidase un substrat inerte (le X Gal) ce qui entraîne la production d'un précipité bleu indigo. Lorsque le gène LacZ, codant pour la bêta galactosidase, est couplé à une séquence de localisation nucléaire (nls), le précipité est concentré dans le noyau. Lorsque la protéine est cytoplasmique, le précipité bleu est réparti dans le cytoplasme ce qui donne un marquage plus pâle que le marquage nucléaire.

Pour les expériences *in vitro*, les cellules sont fixées dans du paraformaldéhyde puis mises en contact avec une solution de révélation contenant le X Gal pendant 2h à 37°C. Suivent un marquage des noyaux au DAPI puis un comptage pour permettre d'évaluer la proportion de cellules exprimant la bêta galactosidase.

Dans le cas des tissus traités avec des cellules souches transduites avec le gène nls-LacZ, les blocs trachée-poumons sont prélevés et fixés dans du paraformaldéhyde. Après 3 lavages dans du PBS, 5 mL de la solution de révélation contenant le X Gal sont injectés dans la trachée. Les blocs entiers sont ensuite immergés dans la solution de révélation à 30°C pendant 6h. La présence de cellules

exprimant la bêta galactosidase nucléaire est attestée par l'apparition de points bleus. Les blocs trachée-poumons sont ensuite inclus en paraffine pour des coupes histologiques.

Dans le cas des tissus traités avec des cellules souches issues de souris Rosa26, la révélation de l'activité bêta galactosidase est effectuée directement sur des coupes histologiques après inclusion en paraffine. Les lames sont déparaffinées puis immergées dans une solution de révélation contenant le X Gal 6h à 30°C. Les lames sont ensuite contre-colorées avec de l'hématoxyline pour faciliter l'analyse histologique ou du nuclear fast red pour faciliter la détection du marquage bleu.

4 THERAPIE CELLULAIRE RESPIRATOIRE : IMPLANTATION DE CELLULES SOUCHES

DANS LES VOIES AERIENNES DE SOURIS

4.1 Manuscrit

Ce travail fait l'objet de la publication suivante, actuellement en cours de révision pour le journal Molecular Therapy : "Cell therapy for respiratory disease: intratracheal delivery of genetically engineered stem cells in a murine model of airway injury."

Anne-Laure Leblond, Patrice Naud, Virginie Forest, Clothilde Gourden, Christine Sagan, Bénédicte Romefort, Eva Mathieu, Bruno Delorme, Christine Collin, Jean-Christophe Pagès, Luc Sensebé, Bruno Pitard, Patricia Lemarchand.

En résumé :

Nous avons montré la survie des cellules souches embryonnaires, des cellules souches mésenchymateuses (CSM) issues de lignée cellulaire ou de cultures primaires, dans des voies aériennes de souris non irradiées, et présentant des lésions épithéliales aiguës avec mise à nu de la lame basale. Nous avons estimé à l'aide d'ELISA que 0.4 à 5.5% des cellules souches sont capables de survivre dans les voies aériennes lésées à 24h. Ces résultats ont été confirmés en utilisant un second gène rapporteur et d'autres méthodes de détection : dosages biochimiques et PCR. A l'aide de méthodes biochimiques, des CSM ont été localisées sur le versant épithélial de la trachée et des bronches à 24h et également à 7 jours alors qu'à cette date, l'épithélium est spontanément réparé. Ces résultats encouragent l'utilisation de la voie aérienne pour viser l'épithélium des voies aériennes et développer une stratégie de thérapie cellulaire respiratoire.

[Hum Gene Ther.](#) 2009 Jul 16. [Epub ahead of print]

Developing cell therapy techniques for respiratory disease: Intratracheal delivery of genetically engineered stem cells in a murine model of airway injury.

[Leblond AL](#), [Naud P](#), [Forest V](#), [Gourden C](#), [Sagan C](#), [Romefort B](#), [Mathieu E](#), [Delorme B](#), [Collin C](#), [Pages JC](#), [Sensebe L](#), [Pitard B](#), [Lemarchand P](#).

l'institut du thorax-INSERM U915, Nantes, France, 0033240412950;
al.leblond@ucc.ie.

Over the past decade, interest has increased in the use of exogenous stem cells to optimize lung repair and serve as carriers of a therapeutic gene for genetic airway disease such as cystic fibrosis. We investigated the survival and the engraftment of exogenous stem cells after intratracheal injection, in a murine model of acute epithelial airway injury already used in gene therapy experiments on cystic fibrosis. Embryonic stem cells and mesenchymal stem cells were intratracheally injected 24hr after 2% polidocanol administration, when epithelial airway injury was maximal. Stem cells were transfected with reporter genes immediately prior to administration. Reporter gene expression was analyzed in trachea-lungs and bronchoalveolar lavages using non-fluorescent, quantitative and sensitive methods. ELISA quantitative results showed that 0.4 to 5.5% stem cells survived in the injured airway. Importantly, no stem cells survived in healthy airway or in the epithelial lining fluid. Using X-Gal staining, transduced mesenchymal stem cells were detected in injured trachea and bronchi lumen. When the epithelium was spontaneously regenerated, the in vivo amount of engrafted mesenchymal stem cells from cell line decreased dramatically. No stem cells from primary culture were located within lungs at 7 days. This study demonstrated the feasibility of the intratracheal cell delivery for airway diseases with acute epithelial injury

Cell therapy for respiratory disease: Intratracheal delivery of genetically engineered stem cells
in a murine model of airway injury

Anne-Laure Leblond ^{1,2}, Patrice Naud ^{1,2,3}, Virginie Forest ^{1,2}, Clothilde Gourden ⁴, Christine Sagan ⁵, Bénédicte Romefort ^{1,2,6}, Eva Mathieu ^{1,2}, Bruno Delorme ^{7,8}, Christine Collin ^{10,11}, Jean-Christophe Pagès ^{10,11}, Luc Sensebé ^{7,8,9}, Bruno Pitard ^{1,2}, Patricia Lemarchand ^{1,2,6}.

¹ INSERM, UMR915, l'institut du thorax, Nantes, F-44000 France ;

² Université de Nantes, Faculté de Médecine, Institut Fédératif de Recherche thérapeutique 26 (IFR26), Nantes, F-44000 France ;

³ CNRS, ERL3147, Nantes, F-44000 France ;

⁴ In-Cell-Art, 1 place Alexis Ricordeau, Nantes, F-44000 France ;

⁵ CHU Nantes, Service d'Anatomo-Pathologie, Nantes, F-44000 France ;

⁶ CHU Nantes, l'institut du thorax, Nantes, F-44000 France ;

⁷ INSERM, EA 3855 - ERI 5, Microenvironnement de l'Hématopoïèse et Cellules Souches, Tours, F-37000 France ;

⁸ Université de Tours, Faculté de Médecine, Institut Fédératif de Recherche thérapeutique 135 (IFR135), Tours, F-37000 France ;

⁹ Etablissement Français du Sang Centre-Atlantique, Service Recherche, Tours, F-37000 France ;

¹⁰ CHRU de Tours Laboratoire de Biochimie et Biologie Moléculaire, Tours, F-37000 France ;

¹¹ INSERM ERI 19, Université François Rabelais de Tours, Tours, F-37000 France.

Corresponding author :

INSERM, UMR915, l'institut du thorax, Faculté de Médecine, 1 rue Gaston Veil, F-44000 Nantes cedex 1, France,
Tel.: +33 2 40 41 29 91, fax: 00 33 2 40 41 29 50, E-mail address: patricia.lemarchand@univ-nantes.fr

Short title: Stem cell therapy for airway disease

Abstract:

Over the past decade, interest has increased in the use of exogenous stem cells to optimize lung repair and serve as carriers of a therapeutic gene for inherited airway diseases such as cystic fibrosis. We investigated the survival and the engraftment of exogenous stem cells after intratracheal injection, in a murine model of acute epithelial airway injury already used in cystic fibrosis gene therapy experiments. Embryonic stem cells and mesenchymal stem cells were intratracheally injected 24hr after 2% polidocanol administration, when epithelial airway injury was maximal. Stem cells were transfected with reporter genes immediately prior to administration. Reporter gene expression was analyzed in trachea-lungs and bronchoalveolar lavages using non-fluorescent, quantitative and sensitive methods. ELISA quantitative results showed that 0.4 to 5.5% stem cells survived in the injured airway. Importantly, no stem cells survived in healthy airway nor in the epithelial lining fluid. Using X-Gal staining, transduced mesenchymal stem cells were detected in injured trachea and bronchi lumen. When the epithelium was regenerated, the number of engrafted mesenchymal stem cells from cell line decreased dramatically and was null with stem cells from primary culture. This study demonstrated the feasibility of intratracheal cell delivery for airway diseases with acute epithelial airway injury.

Introduction

Respiratory diseases remain one of the main causes of morbidity and mortality in the world. Interest has increased as to the possibility of optimizing the repair of the lung with the use of stem cells. In particular, combining stem cell ability to engraft into damaged lungs and their ability to serve as carriers of a therapeutic gene has a great potential for pulmonary fibrosis [1] and for genetic disease such as cystic fibrosis. This developing therapeutic approach has been stimulated by early reports demonstrating that both embryonic stem cells and stem cells derived from adult bone marrow, including mesenchymal stem cells, can *in vitro* differentiate into respiratory cells, thus acquiring phenotypic and functional markers of airway and alveolar epithelial cells [2-4].

Several recent papers reported systemic administration of adult stem cells from bone marrow in mice after total-body irradiation [5-7] and/or pollutant-reagent treatment [5, 8-12]. In these studies, the administered stem cells were mainly engrafted in alveolar spaces [5-7, 9-12] and sometimes in conducting airway [6, 8, 10, 13-15]. Stem cell differentiation as pneumocytes (I or II) or airway epithelial cells were mostly assessed using different fluorescent techniques. These studies led to variable results regarding cell engraftment rate, with a wide frequency range of adult bone marrow stem cell-derived cells from none [16] up to 20% [13] in the lungs, and from 0.025% [15] to 4% [13] in conducting airway. These discrepancies have been attributed in part to detection methods of donor-derived epithelial cells by fluorescence techniques leading to significant artifacts [5]. Importantly, lung stem cell engraftment is currently estimated at 0.01-0.1% [17, 18]. Despite this low engraftment level there is evidence that transplanted cells post-lung injury have some therapeutic effects [5].

In most of these studies systemic infusion of stem cells required total-body irradiation of the recipient to promote their medullar engraftment, a condition difficult to apply in the clinical setting, especially in patients subjected to airway disease associated to chronic infections. Alternatively, considering the advantages of the intratracheal route to target the airway and the respiratory epithelium, more recent studies reported the intratracheal administration of adult stem cells in reagent-injured lungs [19, 20]. Using fluorescent techniques stem cell engraftment was enhanced with the intratracheal route as compared to intravenous route [20] but remained <5% [19, 20]. In parallel, the intratracheal route was also used to inject differentiated cells [12, 19, 21]. Their engraftment and differentiation levels were also assessed using fluorescent techniques and led to conflicting results.

The aims of our study were to evaluate the survival and the engraftment of different types of exogenous stem cells and differentiated cells after intratracheal injection, in a murine model of acute epithelial airway injury without total-body irradiation. The murine model of epithelial airway injury was already used for cystic fibrosis gene therapy experiments and consisted in injecting intratracheally polidocanol detergent [22]. Quantification of cell survival rates and cell location within lungs were performed using different sensitive and independent methods, avoiding controversial fluorescence techniques.

Results

Transient epithelial airway injury induced by polidocanol intratracheal administration

Intratracheal administration of 2% PDOC induced macroscopic lung injury at 24hr with hemorrhage (Figs. 1b,k,n). The major histologic findings were injury of the murine airway epithelium with focal shedding areas observed in the epithelial surface, with only a remaining layer of basal cells or a total denudation of the basement membrane (Figs. 1e,h). However, in some regions, the luminal layer of epithelial cells was just disrupted or sloughed whereas the basal cell layer and the basement membrane remained intact (not shown). Inflammation was present in pulmonary parenchyma (Figs. 1k,n, arrow heads). Trachea-lung sections at 7 days after PDOC administration demonstrated significant improvement of hemorrhage (Figs. 1c,l) and an airway regeneration with epithelial surface covered by cilia (Figs. 1f,i). PDOC effect did not alter significantly animal survival (Table S1 in supplementary data).

ESC and BMC9 survival in murine airway with acute epithelial injury

In a first set of experiments, embryonic stem cells (ESCs) and adult mesenchymal stem cells (BMC9s) from well-characterized cell lines were intratracheally injected. ESCs and BMC9s were injected 24hr after PDOC administration, when epithelial airway injury induced by PDOC is maximum [14]. Stem cell survival was evaluated 24hr after stem cell administration. To calculate the survival rate, we used a quantitative method based on *in vivo* expression of reporter genes by transplanted cells. Stem cells were transfected *in vitro* with plasmids encoding for CAT or GFP reporter genes 2hr prior to intratracheal injection. CAT-transfected stem cells were then intratracheally injected, at a time where they did not express the foreign genes yet (see below). We hypothesized that only surviving stem cells would express *in vivo* CAT protein in trachea-lungs 24hr after intratracheal cell injection.

Two hours after the beginning of cell incubation with both plasmids and synthetic vectors, transfection complexes were removed and reporter gene expression was evaluated. No CAT protein was detected in stem cells using ELISA (Fig. 2b) nor cell fluorescence using microscopy (not shown), demonstrating that stem cells did not express CAT nor GFP protein at the time of *in vivo* injection. *In vitro* reporter gene expression was also evaluated 24hr and 7 days after incubation with plasmids and synthetic vectors. As evaluated by FACS analysis, $19.4 \pm 0.2\%$ ESCs ($n = 6$) and $37.0 \pm 4.4\%$ BMC9s ($n = 6$) expressed GFP *in vitro* at 24hr (Fig. 2a). However, CAT and GFP were not detected at 7 days after transfection (Fig. 2b), suggesting that transgene expression was transient. Using CAT ELISA quantitative results and GFP-expressing cell rates, we calculated that CAT-expressing ESCs and CAT-expressing BMC9s contained at 24hr $0.03 \pm 0.01\text{pgCAT/cell}$ ($n = 10$) and $0.08 \pm 0.02\text{pgCAT/cell}$ ($n = 6$), respectively. Cell values were further used to evaluate the number of *in vivo* surviving cells after intratracheal injection.

For intratracheal administration, CAT-transfected ESCs and CAT-transfected BMC9s were harvested 2hr after the beginning of transfection and injected intratracheally. Mice were sacrificed 24hr after intratracheal administration, trachea-lungs were used *in toto* to quantify CAT protein by ELISA (Fig. 2c). No CAT protein was detected in control

animals or animals injected with PDOC only. Importantly, CAT protein was detected in 19/31 (61%) animals intratracheally injected with PDOC and ESCs and in 17/21 (81%) animals intratracheally injected with PDOC and BMC9s, suggesting that ESCs and BMC9s survived within lungs and expressed reporter genes 24hr after intratracheal injection. To estimate the number of surviving cells within the lungs at 24hr, total CAT protein quantity per animal was divided by CAT quantity per cell *in vitro*. The survival rate of 10^6 injected stem cells was $3.69 \pm 0.86\%$ ESCs ($n = 19$), whereas this survival rate was significantly less with BMC9s ($0.43 \pm 0.12\%$, $n = 17$, $p = 0.02$). CAT cell quantities were also used to calculate the *in vivo* cell detection threshold. A minimum of $10 \pm 1.2 \times 10^3$ ESCs and $4.3 \pm 1.1 \times 10^3$ BMC9s could be detected in one animal *in vivo*, corresponding to 0.4-1% injected cells. These results suggest that even if the percentage of cells expressing reporter gene *in vitro* was low, this was still a sensitive method for *in vivo* detection of a small cell number.

Influence of differentiation state and airway environment on ESC and BMC9 survival

To determine whether cell survival ability in murine injured airway was specific to stem cells, differentiated cells from various origins (Hep3B, mOS-J and COS-7 cells) were transfected *in vitro* with CAT plasmids in conditions and results similar to that of ESCs and BMC9s (not shown). CAT-transfected differentiated cells were then intratracheally injected 2hr after the beginning of incubation with CAT plasmid. No CAT protein was detected in any animal injected with PDOC and differentiated cells at 24hr (Fig. 2c), suggesting that only stem cells survived after intratracheal injection in injured airway. To evaluate if stem cells would survive after intratracheal administration in healthy airway, CAT-transfected ESCs and BMC9s were injected in control healthy animals. No CAT protein was detected in any animal with healthy airway 24hr after stem cell injection (Fig. 2c), suggesting that stem cell survival was favored by airway injury.

Cell survival in the epithelial lining fluid

To evaluate whether stem cells expressing CAT reporter protein were present within the epithelial lining fluid or after phagocytosis by alveolar macrophages, bronchoalveolar lavages (BALs) were performed at 24hr in *in vivo* conditions when phagocytosis was expected the highest, e.g. when CAT ELISA results were negative: mesenchymal stem cells (BMC9s) in healthy airway and murine differentiated cells (mOS-J) in injured airway. As further controls, BALs were also performed in control and PDOC animals and in animals intratracheally injected with PDOC and BMC9s. BAL cell number was $134 \pm 99 \times 10^3$ cells per animal. No CAT protein was detected in any BAL fluid nor BAL cell sample from any animal (Fig. 2d), suggesting that if stem cells or differentiated cells were phagocytosed by alveolar macrophages, such phagocytosis did not alter CAT protein measurement and cell survival detection. Importantly, in animals intratracheally injected with PDOC and BMC9s, high levels of CAT protein were measured in trachea and lung homogenates whereas no CAT protein was detected in BAL fluid nor BAL cells, suggesting that CAT expressing cells were mostly engrafted within the lungs and did not survive in the epithelial lining fluid (Fig. 2d).

BMC9 location at 24hr and 7 days

Next, we investigated BMC9 location at 7 days when the airway epithelium is spontaneously regenerated [14]. As CAT expression using synthetic vectors was transient, we used integrative virus vectors allowing long-term foreign gene expression. BMC9s were transduced with a retrovirus vector encoding nls-lacZ gene. As evaluated by X-Gal staining, $57.2 \pm 0.1\%$ BMC9s expressed nuclear β galactosidase (β gal) when they were injected (Fig. 3a, $n = 6$). β gal activity in transduced BMC9s was significantly increased just prior to injection as compared to endogenous β gal activity in BMC9s (Fig. 3b, $p = 0.02$) and remained stable at 7 days (not shown). Animals were assessed for β gal activity 24hr and 7 days after intratracheal administration, using the 4 MUG method (Fig. 3c). In contrast to previous experiments, β gal-transduced BMC9s expressed nls-lacZ gene at the time of intratracheal injections. Therefore, as a further control, we injected lysates of β gal-transduced BMC9s, and no significant increase in β gal activity was observed as compared to endogenous β gal activity ($p = 0.98$). In animals intratracheally injected with PDOC and β gal-transduced BMC9s, 24hr after injection β gal activity significantly increased as compared to that of control animals ($p = 0.003$) and to animals injected with PDOC and lysate of β gal-transduced BMC9s ($p = 0.004$), confirming results with CAT gene transfer. However, 7 days after stem cell injection β gal activity was similar to that of control animals ($p = 0.98$) and animals injected with PDOC and lysate of β gal-transduced BMC9s ($p = 0.94$), suggesting that the number of surviving BMC9s in the airway epithelium decreased significantly between 24hr and 7 days.

To locate BMC9s after intratracheal injection into injured airway, we performed X-Gal staining of *in toto* trachea-lungs at 24hr and 7 days (Fig. 4). No blue staining was observed in trachea-lungs (Fig. 4a) and histological sections (Figs. 4b-d) from any control animal (Figs. 4a, $n = 3$), animal injected with PDOC (Fig. 4b, $n = 3$), nor animal intratracheally injected with β gal-transduced BMC9s only (Figs. 4c, $n = 5$). No cell with nuclear blue staining was observed in any animal injected with PDOC and lysate of β gal-transduced BMC9s (Fig. 4d = 5), suggesting that cells with nuclear blue staining expressed the nls-lacZ gene *de novo*. In contrast, macroscopic and microscopic strong nuclear blue staining was observed in trachea and pulmonary lobes at 24hr (Figs. 4e-m, $n = 16$) and 7 days (Figs. 4n-p, $n = 7$) in each animal intratracheally injected with PDOC and β gal-transduced BMC9s. At 24hr, macroscopic analyses showed localized blue spots (≤ 5 spots) in trachea from 8/16 animals (Figs. 4e,f) and blue spots in one (15/16, Figs. 4g,h) or two pulmonary lobes (1/16, Figs. 4i,j). Blue spots were also observed in large bronchi from 5/16 animals (Figs. 4i,j). Histological analyses confirmed the macroscopic result for each sample, showing β -gal positive cells on histological sections where blue spots had been observed. Clusters of cells with blue nucleus were observed in the lumen of injured trachea (Fig. 4k) and injured bronchi or bronchioles (Figs. 4l,m), but not in lung parenchyma (Fig. 4l). At 7 days, blue spots were observed in 7/7 animals, in the lumen of bronchioles (Figs. 4n-p). No blue cell was observed in trachea nor in pulmonary parenchyma (not shown). Clusters of blue cells were sometimes located in polyp-like structures, located in

bronchioles and large bronchi. Polyp-like structures were not observed in any animal receiving PDOC only. Further quantitative and statistical analyses demonstrated that the development of polyp-like structures at 7 days was not due to stem cell administration but rather favored by a second intratracheal administration (PBS or BMC9) 24hr after PDOC injection (Table S2 in supplementary data). Histologic analyses at high magnification showed that β gal-expressing cells did not have a respiratory phenotype, with no cilia at 24hr or 7 days (not shown).

MSC survival in murine airway with acute epithelial airway injury

In a second set of experiments, to avoid *in vivo* cell survival linked to cell line transformation, we repeated previous experiments with the same experimental design, using murine MSCs from primary cultures. MSC cultures were characterised according to [23, 24]. FACS analysis demonstrated that MSCs were CD45- (Fig. 5a, $0.4 \pm 0.1\%$, $n = 4$), CD90 - ($0.43 \pm 0.2\%$, $n = 6$) and CD29 +, Sca-1+ (Fig. 5a, $96.9 \pm 1.3\%$ and $98.1 \pm 0.7\%$ respectively, $n = 4$) and CD106+ ($96 \pm 0.8\%$, $n = 4$).

MSCs were transiently transfected *in vitro* with plasmids encoding CAT or GFP reporter genes. In contrast to ESCs and BMC9s, MSC transfection with synthetic vectors was ineffective (not shown), therefore nucleofection was used to obtain significant gene transfer rate. As evaluated by FACS analysis, $56.8 \pm 2.9\%$ MSCs expressed GFP *in vitro* at 24hr (Fig. 5c, $n = 3$), but CAT and GFP were not detected 7 days after nucleofection (Fig. 5b), suggesting that foreign gene expression was again transient and that nucleofection could not be used for 7 days *in vivo* experiments. CAT-transfected MSCs contained 0.35 ± 0.02 pg CAT/cell at 24hr ($n = 6$). In control mice and mice injected with PDOC only, no CAT protein was detected at 24hr (Fig. 5d). Importantly, CAT protein was detected in each animal injected with PDOC and MSCs (Fig. 5d, $n = 8$, $p < 0.001$), suggesting that MSCs from primary cultures survived in injured airway and expressed CAT protein after intratracheal administration. MSC survival rate was $5.52 \pm 1.9\%$ ($n = 8$), a minimum of 710 ± 45 CAT-expressing MSCs could be detected in one animal *in vivo*, corresponding to 0.07% injected cells, confirming CAT ELISA sensitivity for *in vivo* experiments.

MSC location at 24hr and 7 days

To investigate whether MSCs could be located into the airway epithelium 7 days after cell injection, we first used MSCs in primary cultures from β gal+ transgenic (Rosa26) mice, thus expressing continuously cytoplasmic β gal (Fig. 6a). Using the 4 MUG method (Fig. 6c), *in vitro* β gal activity was significantly increased in Rosa26 MSCs as compared to MSCs from Swiss mice (Figure 6c, $p = 0.03$). Mice were assessed for β gal activity 24hr and 7 days after intratracheal administration of Rosa26 MSCs or of a lysate of Rosa26 MSCs (Fig. 6d). As observed in previous experiments with β gal-transduced BMC9s, β gal activity was similar in murine airway from control animals and animals intratracheally injected with lysates of Rosa26 MSCs ($p = 0.68$). In animals intratracheally injected with PDOC and Rosa26 MSCs, β gal activity was significantly increased as compared to that of both control groups ($p = 0.01$). However, in contrast to

previous experiments with β gal-transduced BMC9s, no blue staining was observed in trachea-lungs from animals injected intratracheally with PDOC and Rosa26 MSCs at 24hr, and Rosa26 MSCs could not be located on histologic slides (not shown). Finally, β gal activity in murine injured airway returned to baseline at 7 days after Rosa26 MSC intratracheal injection ($p = 0.85$).

In a last set of experiments, as previously performed with BMC9s we overexpressed nls-lacZ gene in MSCs from wild-type Swiss mice, to locate them *in vivo* at 24hr and 7 days. MSC transduction with the β gal retrovirus vector remained ineffective. Therefore, MSCs from Swiss mice were transduced prior to intratracheal injection with a lentivirus vector encoding the nls-lacZ gene [25]. After lentiviral transduction, $20.1 \pm 3.0\%$ MSCs expressed β gal (Fig. 6b, $n = 4$). Nevertheless, no blue staining was observed in trachea-lungs from animals injected intratracheally with PDOC and β gal-transduced MSCs at 7 days (not shown). Since rapid extinction with time of foreign gene expression under cytomegalovirus promoter has been described in lungs [26], we concurrently used PCR to detect the presence of nls-lacZ gene even without gene expression. PCR experiments using primers specific to nls-lacZ gene were performed 24hr and 7 days after β gal-transduced MSC injection (Fig. 6e). At 24hr, PCR was positive in trachea-lungs from each animal injected with PDOC and β gal-transduced MSCs (Fig. 6e, $n = 7$), confirming that β gal-transduced MSCs were present 24hr after injection in injured airway. However, no nls-lacZ gene was detected in animals at 7 days after β gal-transduced MSC injection, suggesting that no β gal-transduced MSCs from primary culture survived at this time once the epithelium is regenerated (Fig. 6e, $n = 6$).

Discussion

Using different and independent methods based on reporter gene transfer we demonstrated the survival of different types of exogenous stem cells, including embryonic and adult mesenchymal stem cells, after intratracheal injection in murine airway presenting acute epithelial airway injury and without total-body irradiation. In contrast to differentiated cells, 0.43 to 5.5 % stem cells were capable of surviving within the injured lungs at 24hr and this engraftment was favored by airway injury. Using biochemical staining, MSCs were located in the lumen of injured trachea and bronchi at 24hr. At 7 days, when the airway epithelium is regenerated [14], the number of MSCs *in vivo* decreased and the presence into epithelial airway of MSCs from a well-characterized cell line was limited, and null with MSCs from primary culture.

In our study, several gene transfer systems were used, according to our aims and to cell types. Using a careful timing, non-viral vectors were useful to allow expression of the foreign gene only after intratracheal cell injection. Depending on the gene transfer system and the cell type, gene transfer efficacy was variable *in vitro*. Gene delivery with viral vectors was used for *in vivo* studies at 7 days, but we had to use different virus vectors for transducing MSCs from cell lines and primary MSCs. This data confirmed that primary MSCs are difficult to transfect, a condition to keep in mind for future cell and gene therapy combining protocols such as those for cystic fibrosis.

Engraftment of exogenous stem cells into the lungs has been reported in several *in vivo* studies, but cell engraftment rate remains controversial [5]. Our results highlight the main advantage in using ELISA and biochemical methods to detect and quantify a small cell number in a whole organ. Even if lacZ gene is widely used to locate stem cells, some reports have shown that standard protocols for X-Gal staining can lead, especially in the lungs, both to false positive results as well as to failure to adequately detect β galactosidase (β gal) expressing cells [27]. In our study, while β gal activity significantly increased after intratracheal injection of MSCs from Rosa26 mice, surviving Rosa26 MSCs could not be located *in vivo* on histologic slides, as already described in another report [14]. The lacZ gene coupled with a nuclear localization signal has already been used in several studies from our group [28, 29] and others [30] and is shown to allow easy detection of endogenous from exogenous β gal activity. Using nls-LacZ gene, we were able to detect and locate nuclear β gal-expressing cells, even when β gal activity in the whole lungs was not significantly different from baseline.

We investigated whether stem cells would be capable of engrafting specifically on the epithelial side of airway after intratracheal administration. BAL experiments showed that stem cells expressing reporter protein did not survive in the epithelial lining fluid. X-Gal staining showed that stem cells were located *in vivo* into injured airway. By injecting stem cells in healthy airway, we also confirmed the major role of injured environment on the engraftment [14]. Stem cells may not engraft into healthy airway because of mucociliary clearance mechanism that could impede access to airway

epithelium, as described for *in vivo* gene transfer to the lungs [31]. We speculated that mucociliary clearance would be disrupted in PDOC-treated airway and that the freshly denuded basement membrane may also promote specifically stem cell adherence and engraftment in the airway epithelium [32, 33]. In the first set of experiments, murine ESCs were intratracheally injected and a significant survival cell rate was observed although, *in vitro* ESC transfection rate was low. This confirms the great potential of ESC pluripotency for regenerative medicine and in particular airway injury. Nevertheless, ESCs for cell-based therapy have met with ethical, moral and political challenges, and have also greater inherent risks associated with immune rejection than autologous adult stem cells [34]. In further experiments, we focused our attention on MSCs because they are already used in the clinical setting [35]. Our ELISA data indicated that MSC survival rate varied according to immortalized or fresh cultures, probably because of the different gene transfer systems we used. Survival rates (from 0.4% to 5.5%) 24hr after intratracheal administration were higher than those described after intravenous administration (from 0.01% to 0.1%) and in agreement with those usually described in stem cell therapy protocols, including cardiology [36] or diabetology [37] protocols, and lung injury models [19, 20].

We hypothesized that the MSC incorporation in the lungs at 7 days could be masked by a down regulation of transgene expression into the lungs because of the common cytomegalovirus enhancer/promoter element in our constructs [26, 43]. However, the negative results of PCR experiments on the nls-LacZ gene at 7 days demonstrated that this was not the case. The hypothesis of immune rejection seems unlikely at 24hr and because ESCs, known to be targeted for rejection by the immune system [34] survived. Therefore, allogeneic rejection seems also unlikely to explain allogeneic destruction of differentiated cells at 24hr. Nevertheless, we can not rule out allogeneic MSC rejection at 7 days.

Another hypothesis to explain our negative results at 7 days is the total regeneration of the airway epithelium that may have hampered MSC incorporation into epithelial airway. At 24hr, e.g. when there is a desquamation of the epithelial surface and a denuded basement membrane, PDOC murine model is a good model to evaluate stem cell survival and presence in injured airway but stem cell differentiation into airway epithelial cells is unlikely at this time. At 7 days after PDOC administration, the epithelium was spontaneously and totally regenerated, demonstrating that PDOC did not alter endogenous lung capability to regenerate. Therefore, PDOC model may not be an adequate model to evaluate stem cell capability in regenerating lung epithelium, since the endogeneous reparation mechanisms may impede MSC contribution to achieve structural lung regeneration. This limitation was described in Wong AP *et al* study in which the naphtalene-injured airway epithelium was still undergoing rapid cell turnover and regeneration and the number of administered stem cells also decreased with time. A more appropriate animal model to study stem cell contribution to structural lung regeneration would be a model with chronic epithelial airway injury and a recurrent loss of the epithelial surface, due to a lack or an exhaustion of endogenous progenitor cells. This hypothesis was evaluated in animal models with permanent retinal epithelial degeneration such as the RCS rat model [38] and the rhodopsin knock-out mouse [39]. MSC engraftment and epithelial regeneration involving MSCs were observed in these animal models [40, 41]. For lung

tissue, a recent murine model overexpressing the beta-subunit of epithelial Na⁺ channel (ENaC^{+/+}) and showing epithelial degeneration in newborn animals [42] may be more appropriate to evaluate MSC contribution to lung regeneration

Finally, another important limitation of our study was also the lack of phenotypic characterisation of surviving cells. This characterisation of stem cell-derived epithelial cells has been hampered by methodological problems, in the lungs as in many other organs such as the heart [44] or the brain [45], and remains difficult and controversial. In this regard, additional studies using complex transgenic models with reporter genes under the control of lung-specific promoters *in vivo* will be essential.

Materials and methods

Animal model and intratracheal administration

Male, 8- to 10-week old Swiss mice were obtained from Janvier Laboratories (Le Genest St Isle, France). Animal experiments were performed under the approval of the *Guide for The Care and Use of Laboratory Animals* published by the U.S. National Institutes of Health (NIH Publication No. 85-23, revised 1996). For intratracheal administration, mice were anesthetized with an intraperitoneal injection of xylazine (15mg/kg) and ketamine (70mg/kg).

Airway injury was induced after anesthesia by intratracheal administration of 25µl of 2% povidone iodine (PDI: polyoxyethylene 9-lauryl ether, Sigma) in phosphate-buffered saline (PBS) through a 22-gauge catheter within an intubation canula (Harvard Apparatus). Cells (10^6 cells/25µl) or PBS were intratracheally injected 24hr after PDI administration. Mice were sacrificed by an intraperitoneal lethal injection of nesdonal 24hr or 7 days after intratracheal administration.

Bronchoalveolar lavage

BAL was performed 24hr after CAT-transfected cell administration in healthy or injured airway. Mice were anesthetized and thoracic cavity was opened by careful dissection. The trachea was exposed, and a small transverse incision performed just below the level of the larynx. BAL was then performed using one dose of 1 ml of PBS, ensuring that both lungs inflated during the lavage process and that there was no leakage of lavage fluid from the trachea. Using hemacytometer, BAL cell number per animal was calculated. The lavage samples were kept on ice until processing. BAL fluid was centrifuged at 400 g for 5 min. The supernatant was removed and stored at -80°C until ELISA. The pellet was resuspended in lysis buffer and stored at -80°C until ELISA.

Cell cultures

Undifferentiated mouse embryonic stem cells (ESCs, R1 cell line, [46]) were cultured in dishes coated with 0.1% gelatin (Sigma). The culture medium was composed of Dulbecco minimum essential medium with 4.5g/l glucose (DMEM, Invitrogen) supplemented with 15% FCS (Invitrogen), 0.1% non essential amino acids (Invitrogen), 1mM sodium pyruvate (Invitrogen), 2mM L-Glutamin (Invitrogen), 10^{-7} M βmercaptoethanol (Sigma), penicillin/streptomycin (100U/ml and 100µg/ml respectively, Invitrogen) and 2000U/ml of LIF (Sigma).

Undifferentiated murine mesenchymal stem cells (BMC9, [47]) were cultured as previously described [24] in alpha MEM medium with nucleosides (Invitrogen) supplemented with 10% FCS (Invitrogen), 2mM L-Glutamin (Invitrogen), penicillin/streptomycin (100U/ml and 100µg/ml respectively, Invitrogen).

A human hepatocellular carcinoma cell line (Hep3B), murine osteosarcoma cell line (mOS-J) and transformed african green monkey kidney fibroblast cell line (COS-7) were used for control experiments. Cells were cultured in DMEM medium with 4.5 g/l glucose supplemented with 15% FCS, 2 mM L-Glutamin, penicillin/streptomycin (100U/ml and 100µg/ml respectively).

Primary culture of adult mesenchymal stem cells

Total bone marrow was obtained from adult male Rosa26 lacZ-mice (background C57Bl/6J x 129S2, kindly provided by Dr M.F. Gardahaut, Nantes, France) and wild type adult male Swiss mice by flushing femurs and tibias with culture medium. Cells were plated at a density of 500 000 cells/cm² in medium composed of alpha MEM with nucleosides supplemented with 10% FCS, 2 mM L-Glutamin, penicillin/streptomycin (100U/ml and 100µg/ml respectively) and 2ng/ml of human FGF2 (AbCys). The culture medium was changed at day 3 to remove non-adherent cells and was subsequently replaced weekly. The cells were grown for 2-3 weeks until confluence. Adherent cells were then detached by 0.5% trypsin-EDTA and replated at a density of 10 000 cells/cm². Subsequent passaging and seeding of the cells was performed at a density of 5 000 cells/cm². From passage 8, MSC cultures were characterized by FACS analysis (FACS Calibur Instrument, BD Biosciences, CellQuestPro Software) after incubation with anti-CD45-PE, anti-CD90-PE, anti-CD29-CyChrome, anti-Sca1-PE, anti CD106-CyChrome (BD Biosciences) [23].

In vitro cell transfection with CAT or GFP reporter genes and evaluation of gene transfer system efficacy

ESCs, BMC9s and differentiated cells were transfected with pCIK-CAT (4.7 Kb) and pEGFP-C1 (4.7 Kb) plasmids encoding for Chloramphenicol AcetylTransferase (CAT) protein and GFP, using synthetic vectors just prior to intratracheal administration [48]. DNA plasmids were complexed with ICAfectin® 441 according to the manufacturer's instruction (In-Cell-Art, Nantes, France). After 2hr, transfection complexes were removed by changing growth medium and cells were lysed for dosages or kept in culture for 24hr, 7 days, or injected intratracheally as indicated above.

MSCs from Swiss mice were transfected with pCIK-CAT and pEGFP-C1 plasmids using nucleofection (Nucleofector Solution, Amaxa Biosystem) just prior to intratracheal administration [49]. After 2hr, growth medium was changed and cells were lysed for dosages or kept in culture for 24hr, 7 days, or injected intratracheally as indicated above. The percentage of GFP-expressing cells was evaluated 24hr after GFP nucleofection using FACS analysis.

The efficacy of gene transfer systems was evaluated using cytometry for GFP-expressing cells and ELISA for CAT-expressing cells. The percentage of GFP-expressing cells was evaluated 24hr after GFP transfection using FACS analysis (FACS Calibur Instrument, BD Biosciences, CellQuestPro Software). CAT protein quantity per stem cell at 24hr was then calculated using *in vitro* data: CAT protein quantity in cell lysis buffer was divided by the cell number and by the percentage of GFP-expressing cells (obtained by FACS analysis). Finally, this value was used to determine the minimum number of CAT-expressing stem cells required to be detected by ELISA *in vitro* or *in vivo* considering that CAT ELISA detection threshold was 50pg CAT protein (see below).

In vitro stem cell transduction with nls-lacZ reporter gene

BMC9s were transduced with a retrovirus vector containing the nls-lacZ reporter gene (lacZ gene with nuclear localization signal, encoding β galactosidase (βgal)) [50]. After transduction, retrovirus vector was removed by

changing growth medium and cells were lysed for dosages or kept in culture or injected intratracheally as indicated above.

To evaluate the percentage of β gal-transduced BMC9s, cells were fixed in 4% paraformaldehyde, washed with PBS and incubated in 5mM K₄Fe(CN)₆, 5mM K₃Fe₃(CN)₆ and 2mM MgCl₂ in PBS containing 0.5mg/ml X-Gal ([5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-galactopyranoside] dissolved in N,N-dimethylformamide at 20mg/ml before dilution into the reaction mixture, Sigma) for 2hr, at 37°C. Cells were identified as positive for β gal activity by blue nuclear staining after X-Gal reaction. The percentage of β gal expressing cells *in vitro* was obtained by counting the number of nuclear-blue cells in a total of 200 cells.

MSCs from Swiss mice were transduced with a lentivirus vector containing the nls-lacZ reporter gene. Lentiviral particles were obtained in human embryonic kidney 293T cells after cotransfection with pCMV-8.2 encoding HIV1 Gag and Pol protein, pH-CMV-G encoding the VSV-g protein and the lentiviral plasmid pHR'CMV-NLS-LacZ derived from pHR' LacZ (gift of D. Trono). After transduction with 50 MOI (Multiplicity Of Infection), lentivirus vector was removed by changing growth medium and cells were kept in culture or injected intratracheally as indicated above. The percentage of β gal-transduced MSCs was evaluated by *in vitro* X-Gal staining and counting as described above.

Reporter gene assay and estimation of survival rate

CAT-transfected cells, BAL cells and BAL fluid, or whole frozen trachea-lungs were homogenized in reporter lysis buffer (Roche Diagnostics) supplemented with protease inhibitors (Roche Diagnostics). After centrifugation at 10 000 rpm for 5min, CAT quantity was measured in supernatant with a VICTOR² multilabel counter (PerkinElmer), using a CAT enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) kit according to the instructions of the supplier (Roche Diagnostics). Each sample was analyzed in duplicate. CAT detection threshold was 50pg. Protein content was measured with a bicinchoninic acid (BCA) protein assay kit.

To estimate cell survival rate 24hr after intratracheal administration, we first calculated CAT protein quantity per CAT-expressing cell, using *in vitro* data: CAT quantity in cell lysis buffer was divided by the cell number and by the percentage of GFP-expressing cells (obtained by FACS analysis). Finally, the total *in vivo* CAT protein quantity per animal was divided by this *in vitro* value, in order to estimate the number of CAT-expressing cells per animal and subsequently the cell survival rate.

β galactosidase (β gal)-transduced BMC9s and Rosa26 MSCs or whole frozen murine trachea-lungs were homogenized in 1ml reporter lysis buffer (Roche Diagnostics) supplemented with a protease inhibitor cocktail (Roche Diagnostics). After centrifugation at 10 000 rpm for 5min, β gal activity was determined by enzymatic fluorimetric assay using 4MUG (4-methylumbelliferyl- β -D-galactoside) as a fluorescent substrate. Each cell and trachea-lung samples were analyzed in

duplicate. β gal activity detection threshold was 230pg. Protein content was measured with a BCA protein assay kit. Additional experiments were done with lysates of β gal-transduced BMC9s or Rosa26 MSCs after three cycles of freezing and thawing. Non viability was ascertained by trypan blue staining.

Detection of β galactosidase activity

Tissues were fixed in 4% paraformaldehyde (at room temperature, 20min) and rinsed 3 times with PBS. Immediately after fixation, trachea-lungs were stained by intratracheal infusion (through a 19-gauge needle, total volume = 5ml) and immersion in 5mM K₄Fe(CN)₆, 5mM K₃Fe₃(CN)₆ and 2mM MgCl₂ in PBS containing 0.5mg/ml X-Gal (as indicated above) for 6hr, at 30°C. Tissues were again washed with PBS and immediately embedded in paraffin. Tissues were identified as positive for β galactosidase activity by nuclear blue staining after X-Gal reaction. Sections (4 μ m thick) were stained with nuclear fast red (Sigma).

Detection of nls-lacZ reporter gene

Total DNA from whole murine trachea-lungs was isolated for PCR analysis. Tissues were digested overnight with lysis buffer containing proteinase K (10mg/ml, Sigma). Total DNA was extracted with phenol/chloroform/isoamyl alcohol (Sigma) method and then precipitated in ethanol. Total DNA from 10⁶ transduced MSCs was also extracted for PCR experiments. PCR were performed using primers that specifically bind the nls sequence and the lacZ gene encoded in the nls-lacZ lentivirus vector: 5'- GTA ACA ACT CCG CCC CAT T -3' and 5'- GAC AGT ATC GGC CTC AGG AA -3'.

Statistical analysis

Data are expressed as means $\pm$ S.E.M. Statistical significance was evaluated using the analysis of variance (ANOVA) method to compare control and treatment groups of 3 or more. Tukey's test was subsequently used for pair-wise comparisons. A non parametric Mann and Whitney test was performed to compare two groups. Statistical significance was set at p<0.05.

Acknowledgments

We thank Nicolas Ferry for providing the nls-lacZ retrovirus vector (Nantes, France) and Marie-France Gardahaut for providing Rosa26 mice (Nantes, France). We are grateful to Beatrice Delasalle for statistical analyses. This work was supported in part by a grant from “Vaincre la Mucoviscidose” (Paris, France).

References

1. Loebinger, MR, Sage, EK, and Janes, SM, *Mesenchymal stem cells as vectors for lung disease*. Proc Am Thorac Soc, 2008. **5**(6): p. 711-6.
2. Wang, G, Bunnell, BA, Painter, RG, Quiniones, BC, Tom, S, Lanson, NA, Jr., Spees, JL, Bertucci, D, Peister, A, Weiss, DJ, Valentine, VG, Prockop, DJ, and Kolls, JK, *Adult stem cells from bone marrow stroma differentiate into airway epithelial cells: potential therapy for cystic fibrosis*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2005. **102**(1): p. 186-91.
3. Coraux, C, Nawrocki-Raby, B, Hinnrasky, J, Kilezity, C, Gaillard, D, Dani, C, and Puchelle, E, *Embryonic stem cells generate airway epithelial tissue*. Am J Respir Cell Mol Biol, 2005. **32**(2): p. 87-92.
4. Rippon, HJ, Polak, JM, Qin, M, and Bishop, AE, *Derivation of distal lung epithelial progenitors from murine embryonic stem cells using a novel three-step differentiation protocol*. Stem Cells, 2006. **24**(5): p. 1389-98.
5. Loebinger, MR, Aguilar, S, and Janes, SM, *Therapeutic potential of stem cells in lung disease: progress and pitfalls*. Clin Sci (Lond), 2008. **114**(2): p. 99-108.
6. Pereira, RF, Halford, KW, O'Hara, MD, Leeper, DB, Sokolov, BP, Pollard, MD, Bagasra, O, and Prockop, DJ, *Cultured adherent cells from marrow can serve as long-lasting precursor cells for bone, cartilage, and lung in irradiated mice*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1995. **92**(11): p. 4857-61.
7. Sueblinvong, V, Loi, R, Eisenhauer, PL, Bernstein, IM, Suratt, BT, Spees, JL, and Weiss, DJ, *Derivation of lung epithelium from human cord blood-derived mesenchymal stem cells*. Am J Respir Crit Care Med, 2008. **177**(7): p. 701-11.
8. MacPherson, H, Keir, PA, Edwards, CJ, Webb, S, and Dorin, JR, *Following damage, the majority of bone marrow-derived airway cells express an epithelial marker*. Respir Res, 2006. **7**: p. 145.
9. Beckett, T, Loi, R, Prenovitz, R, Poynter, M, Goncz, KK, Suratt, BT, and Weiss, DJ, *Acute lung injury with endotoxin or NO2 does not enhance development of airway epithelium from bone marrow*. Mol Ther, 2005. **12**(4): p. 680-6.
10. Serikov, VB, Popov, B, Mikhailov, VM, Gupta, N, and Matthay, MA, *Evidence of temporary airway epithelial repopulation and rare clonal formation by BM-derived cells following naphthalene injury in mice*. Anat Rec (Hoboken), 2007. **290**(9): p. 1033-45.
11. Mei, SH, McCarter, SD, Deng, Y, Parker, CH, Liles, WC, and Stewart, DJ, *Prevention of LPS-induced acute lung injury in mice by mesenchymal stem cells overexpressing angiopoietin 1*. PLoS Med, 2007. **4**(9): p. e269.
12. Xu, J, Woods, CR, Mora, AL, Joodi, R, Brigham, KL, Iyer, S, and Rojas, M, *Prevention of endotoxin-induced systemic response by bone marrow-derived mesenchymal stem cells in mice*. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2007. **293**(1): p. L131-41.
13. Krause, DS, Theise, ND, Collector, MI, Henegariu, O, Hwang, S, Gardner, R, Neutzel, S, and Sharkis, SJ, *Multi-organ, multi-lineage engraftment by a single bone marrow-derived stem cell*. Cell, 2001. **105**(3): p. 369-77.
14. MacPherson, H, Keir, P, Webb, S, Samuel, K, Boyle, S, Bickmore, W, Forrester, L, and Dorin, J, *Bone marrow-derived SP cells can contribute to the respiratory tract of mice in vivo*. J Cell Sci, 2005. **118**(Pt 11): p. 2441-50.
15. Loi, R, Beckett, T, Goncz, KK, Suratt, BT, and Weiss, DJ, *Limited restoration of cystic fibrosis lung epithelium in vivo with adult bone marrow-derived cells*. Am J Respir Crit Care Med, 2006. **173**(2): p. 171-9.
16. Wagers, AJ, Sherwood, RI, Christensen, JL, and Weissman, IL, *Little evidence for developmental plasticity of adult hematopoietic stem cells*. Science, 2002. **297**(5590): p. 2256-9.
17. Krause, DS, *Engraftment of bone marrow-derived epithelial cells*. Ann N Y Acad Sci, 2005. **1044**: p. 117-24.

18. Bruscia, EM, Ziegler, EC, Price, JE, Weiner, S, Egan, ME, and Krause, DS, *Engraftment of donor-derived epithelial cells in multiple organs following bone marrow transplantation into newborn mice*. Stem Cells, 2006. **24**(10): p. 2299-308.
19. Gupta, N, Su, X, Popov, B, Lee, JW, Serikov, V, and Matthay, MA, *Intrapulmonary delivery of bone marrow-derived mesenchymal stem cells improves survival and attenuates endotoxin-induced acute lung injury in mice*. J Immunol, 2007. **179**(3): p. 1855-63.
20. Wong, AP, Dutly, AE, Sacher, A, Lee, H, Hwang, DM, Liu, M, Keshavjee, S, Hu, J, and Waddell, TK, *Targeted cell replacement with bone marrow cells for airway epithelial regeneration*. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2007. **293**(3): p. L740-52.
21. Weiss, DJ, Kolls, JK, Ortiz, LA, Panoskaltsis-Mortari, A, and Prockop, DJ, *Stem cells and cell therapies in lung biology and lung diseases*. Proc Am Thorac Soc, 2008. **5**(5): p. 637-67.
22. Parsons, DW, Grubb, BR, Johnson, LG, and Boucher, RC, *Enhanced in vivo airway gene transfer via transient modification of host barrier properties with a surface-active agent*. Hum Gene Ther, 1998. **9**(18): p. 2661-72.
23. Dominici, M, Le Blanc, K, Mueller, I, Slaper-Cortenbach, I, Marini, F, Krause, D, Deans, R, Keating, A, Prockop, D, and Horwitz, E, *Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement*. Cytotherapy, 2006. **8**(4): p. 315-7.
24. Chateauvieux, S, Ichante, JL, Delorme, B, Frouin, V, Pietu, G, Langonne, A, Gallay, N, Sensebe, L, Martin, MT, Moore, KA, and Charbord, P, *Molecular profile of mouse stromal mesenchymal stem cells*. Physiol Genomics, 2007. **29**(2): p. 128-38.
25. Conrad, C, Gupta, R, Mohan, H, Niess, H, Bruns, CJ, Kopp, R, von Luetlichau, I, Guba, M, Heeschen, C, Jauch, KW, Huss, R, and Nelson, PJ, *Genetically engineered stem cells for therapeutic gene delivery*. Curr Gene Ther, 2007. **7**(4): p. 249-60.
26. Pringle, IA, Raman, S, Sharp, WW, Cheng, SH, Hyde, SC, and Gill, DR, *Detection of plasmid DNA vectors following gene transfer to the murine airways*. Gene Ther, 2005. **12**(15): p. 1206-14.
27. Weiss, DJ, Liggitt, D, and Clark, JG, *In situ histochemical detection of beta-galactosidase activity in lung: assessment of X-Gal reagent in distinguishing lacZ gene expression and endogenous beta-galactosidase activity*. Hum Gene Ther, 1997. **8**(13): p. 1545-54.
28. Lemarchand, P, Jones, M, Danel, C, Yamada, I, Mastrangeli, A, and Crystal, RG, *In vivo adenovirus-mediated gene transfer to lungs via pulmonary artery*. J Appl Physiol, 1994. **76**(6): p. 2840-5.
29. Chapelier, A, Danel, C, Mazmanian, M, Bacha, EA, Sellak, H, Gilbert, MA, Herve, P, and Lemarchand, P, *Gene therapy in lung transplantation: feasibility of ex vivo adenovirus-mediated gene transfer to the graft*. Hum Gene Ther, 1996. **7**(15): p. 1837-45.
30. Mastrangeli, A, Danel, C, Rosenfeld, MA, Stratford-Perricaudet, L, Perricaudet, M, Pavirani, A, Lecocq, JP, and Crystal, RG, *Diversity of airway epithelial cell targets for in vivo recombinant adenovirus-mediated gene transfer*. J Clin Invest, 1993. **91**(1): p. 225-34.
31. Weiss, DJ, *Delivery of gene transfer vectors to lung: obstacles and the role of adjunct techniques for airway administration*. Mol Ther, 2002. **6**(2): p. 148-52.
32. Engelhardt, JF, Yankaskas, JR, and Wilson, JM, *In vivo retroviral gene transfer into human bronchial epithelia of xenografts*. J Clin Invest, 1992. **90**(6): p. 2598-607.
33. Nikolova, G, Jabs, N, Konstantinova, I, Domogatskaya, A, Tryggvason, K, Sorokin, L, Fassler, R, Gu, G, Gerber, HP, Ferrara, N, Melton, DA, and Lammert, E, *The vascular basement membrane: a niche for insulin gene expression and Beta cell proliferation*. Dev Cell, 2006. **10**(3): p. 397-405.
34. Chidgey, AP, Layton, D, Trounson, A, and Boyd, RL, *Tolerance strategies for stem-cell-based therapies*. Nature, 2008. **453**(7193): p. 330-7.
35. Uccelli, A, Moretta, L, and Pistoia, V, *Mesenchymal stem cells in health and disease*. Nat Rev Immunol, 2008. **8**: p. 726-736.

36. Robey, TE, Saiget, MK, Reinecke, H, and Murry, CE, *Systems approaches to preventing transplanted cell death in cardiac repair*. J Mol Cell Cardiol, 2008. **45**(4): p. 567-81.
37. Bottino, R, Lemarchand, P, Trucco, M, and Giannoukakis, N, *Gene- and cell-based therapeutics for type I diabetes mellitus*. Gene Ther, 2003. **10**(10): p. 875-89.
38. D'Cruz, PM, Yasumura, D, Weir, J, Matthes, MT, Abderrahim, H, LaVail, MM, and Vollrath, D, *Mutation of the receptor tyrosine kinase gene Mertk in the retinal dystrophic RCS rat*. Hum Mol Genet, 2000. **9**(4): p. 645-51.
39. Humphries, MM, Rancourt, D, Farrar, GJ, Kenna, P, Hazel, M, Bush, RA, Sieving, PA, Sheils, DM, McNally, N, Creighton, P, Erven, A, Boros, A, Gulya, K, Capeocchi, MR, and Humphries, P, *Retinopathy induced in mice by targeted disruption of the rhodopsin gene*. Nat Genet, 1997. **15**(2): p. 216-9.
40. Inoue, Y, Iriyama, A, Ueno, S, Takahashi, H, Kondo, M, Tamaki, Y, Araie, M, and Yanagi, Y, *Subretinal transplantation of bone marrow mesenchymal stem cells delays retinal degeneration in the RCS rat model of retinal degeneration*. Exp Eye Res, 2007. **85**(2): p. 234-41.
41. Arnhold, S, Absenger, Y, Klein, H, Addicks, K, and Schraermeyer, U, *Transplantation of bone marrow-derived mesenchymal stem cells rescue photoreceptor cells in the dystrophic retina of the rhodopsin knockout mouse*. Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol, 2007. **245**(3): p. 414-22.
42. Mall, MA, Harkema, JR, Trojanek, JB, Treis, D, Livraghi, A, Schubert, S, Zhou, Z, Kreda, SM, Tilley, SL, Hudson, EJ, O'Neal, WK, and Boucher, RC, *Development of chronic bronchitis and emphysema in beta-epithelial Na⁺ channel-overexpressing mice*. Am J Respir Crit Care Med, 2008. **177**(7): p. 730-42.
43. Alton, EW, Stern, M, Farley, R, Jaffe, A, Chadwick, SL, Phillips, J, Davies, J, Smith, SN, Browning, J, Davies, MG, Hodson, ME, Durham, SR, Li, D, Jeffery, PK, Scallan, M, Balfour, R, Eastman, SJ, Cheng, SH, Smith, AE, Meeker, D, and Geddes, DM, *Cationic lipid-mediated CFTR gene transfer to the lungs and nose of patients with cystic fibrosis: a double-blind placebo-controlled trial*. Lancet, 1999. **353**(9157): p. 947-54.
44. Murry, CE, Soonpaa, MH, Reinecke, H, Nakajima, H, Nakajima, HO, Rubart, M, Pasumarthi, KB, Virag, JI, Bartelmez, SH, Poppa, V, Bradford, G, Dowell, JD, Williams, DA, and Field, LJ, *Haematopoietic stem cells do not transdifferentiate into cardiac myocytes in myocardial infarcts*. Nature, 2004. **428**(6983): p. 664-8.
45. Castro, RF, Jackson, KA, Goodell, MA, Robertson, CS, Liu, H, and Shine, HD, *Failure of bone marrow cells to transdifferentiate into neural cells in vivo*. Science, 2002. **297**(5585): p. 1299.
46. Nagy, A, Rossant, J, Nagy, R, Abramow-Newerly, W, and Roder, JC, *Derivation of completely cell culture-derived mice from early-passage embryonic stem cells*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1993. **90**(18): p. 8424-8.
47. Dennis, JE and Caplan, AI, *Differentiation potential of conditionally immortalized mesenchymal progenitor cells from adult marrow of a H-2Kb-tsA58 transgenic mouse*. J Cell Physiol, 1996. **167**(3): p. 523-38.
48. Pitard, B, Bello-Roufai, M, Lambert, O, Richard, P, Desigaux, L, Fernandes, S, Lanctin, C, Pollard, H, Zeghal, M, Rescan, PY, and Escande, D, *Negatively charged self-assembling DNA/poloxamine nanospheres for in vivo gene transfer*. Nucleic Acids Res, 2004. **32**(20): p. e159.
49. Aluigi, M, Fogli, M, Curti, A, Isidori, A, Gruppioni, E, Chiodoni, C, Colombo, MP, Versura, P, D'Errico-Grigioni, A, Ferri, E, Baccarani, M, and Lemoli, RM, *Nucleofection is an efficient nonviral transfection technique for human bone marrow-derived mesenchymal stem cells*. Stem Cells, 2006. **24**(2): p. 454-61.
50. Cany, J, Avril, A, Pichard, V, Aubert, D, Ferry, N, and Conchon, S, *A transgenic mouse with beta-Galactosidase as a fetal liver self-antigen for immunotherapy studies*. J Hepatol, 2007. **47**(3): p. 396-403.

Figure legends

Figure 7: Epithelial damage induced by intratracheal administration of polidocanol (PDOC). **(a-c)** Trachea-lungs from control animal **(a)**, animals injected with PDOC at 24hr **(b)** and 7 days **(c)** after PDOC administration. **(d-i)** Tracheal and **(j-o)** bronchial sections from **(d,g,j,m)** control animal, **(e,h,k,n)** animals injected with PDOC at 24hr and **(f,i,l,o)** at 7 days. **(k)** Magnification 4x. **(d-f)** Magnification 10x. **(j,l)** Magnification 20 x. **(g-i,m-o)** Magnification 100x. Hematoxylin counterstaining, airway epithelial damage (arrows), ciliated cells (white arrow), inflammation areas (arrow heads), hemorrhagic areas (white arrow heads). Areas marked by *asterisks* were magnified in the subjacent pictures.

Figure 8: *In vitro* cell transfection with reporter genes and *in vivo* CAT gene expression into injured airway 24hr after intratracheal stem cell administration. To follow stem cell survival *in vivo*, murine embryonic stem cells (ESCs) or adult mesenchymal stem cells (BMC9s) were transfected *in vitro* with plasmids encoding CAT or GFP reporter genes just prior to intratracheal administration. **(a)** Representative histograms of FACS analysis of GFP-expressing ESCs or BMC9s 24hr after *in vitro* transfection. **(b)** CAT protein quantification in ESC and BMC9 lysates using ELISA, 2hr, 24hr or 7 days after incubation with plasmids and synthetic vectors. **(c)** CAT protein quantification in whole trachea-lung homogenates using ELISA, 24hr after ESC or BMC9 intratracheal injection. Evaluated groups included animals that were intratracheally injected with the followings: no injection (control), PDOC only (PDOC), ESCs or BMC9s only (ESC, BMC9), PDOC and ESCs or BMC9s 24hr later (PDOC + ESC, BMC9), PDOC and differentiated cells 24hr later (PDOC + Hep3B, mOS-J, COS-7). **(d)** CAT protein quantification in bronchoalveolar lavages and whole trachea-lung homogenates using ELISA, 24hr after BMC9 or murine differentiated cells (mOS-J) intratracheal injection. Evaluated groups included animals that were intratracheally injected with the followings: no injection (control), PDOC only (PDOC), BMC9s only (BMC9), PDOC and mOS-Js 24hr later (PDOC + mOS-J), PDOC and BMC9s 24hr later (PDOC + BMC9). Dotted line depicts control threshold. * $p < 0.05$.

Figure 3: *In vitro* and *in vivo* detection of β gal activity 24hr or 7 days after β gal-transduced BMC9 intratracheal administration. BMC9s were transduced *in vitro* with a retrovirus vector encoding nls-lacZ gene prior to *in vivo* administration. **(a)** Representative example of β gal-transduced BMC9s just prior to injection, after X-Gal staining. Magnification 20x. **(b)** *In vitro* β gal activity in BMC9s and β gal-transduced BMC9s just prior to injection. **(c)** β gal activity in whole trachea-lung homogenates, 24hr or 7 days after BMC9 intratracheal injection. Evaluated groups included animals that were intratracheally injected with the followings: no injection (control), PDOC and lysate of β gal-transduced BMC9s (PDOC + BMC9 lysate), PDOC and β gal-transduced BMC9s (PDOC + BMC9). Dotted line depicts control threshold. * $p < 0.05$.

Figure 4: BMC9 location 24hr and 7 days after intratracheal injection, using X-Gal staining. **(a-d)** Trachea-lungs or histological sections at 24hr after X-Gal staining from control animal, animal intratracheally injected with PDOC or β gal-transduced BMC9s or with PDOC and 24hr later β gal-transduced BMC9 lysate respectively. No blue staining was observed in any control animals. **(e-j)** Trachea-lungs, **(k)** Tracheal and **(l,m)** bronchial sections from animals intratracheally injected with PDOC and 24hr later β gal-transduced BMC9s. Animals were sacrificed 24hr after BMC9 injection and stained using X-Gal. Blue spots were observed **(e,f)** in trachea and **(g-j)** in pulmonary lobes. **(f,h,i)** Higher power views of the area marked by *asterisks* in Figs. 1e,g,j, respectively. **(m)** Higher power view of the area marked by *asterisk* in Fig. 1l. **(n-p)** Trachea-lungs and histological sections from animal intratracheally injected with PDOC and β gal-transduced BMC9s, sacrificed 7 days after BMC9 injection and stained using X Gal. **(p)** Higher power view of the area marked by *asterisk* in Fig.1o. **(c,d,o)** Magnification 4x. **(b,l)** Magnification 10x. **(k)** Magnification 20x. **(m,p)** Magnification 40x. Nuclear fast red counterstaining.

Figure 5: *In vitro* cell transfection with reporter genes and *in vivo* CAT gene expression 24hr after intratracheal administration into injured airway of murine adult mesenchymal stem cells (MSCs) from primary cultures. **(a)** MSC morphology and representative histograms of CD45, CD29 and Sca-1 labeling, using FACS analysis just prior to intratracheal injection. **(b-d)** To follow MSC survival *in vivo*, MSCs were transfected *in vitro* with plasmids encoding CAT or GFP reporter genes using nucleofection, just prior to intratracheal injection. **(b)** CAT protein quantification in MSCs using ELISA, 2hr, 24hr or 7 days after incubation with plasmid and nucleofection solution. **(c)** FACS analysis of GFP-expressing MSCs 24hr after incubation with GFP plasmid and nucleofection solution. **(d)** CAT protein quantification in whole trachea-lung homogenates using ELISA, 24hr after CAT-transduced MSC intratracheal injection. Evaluated groups included animals that were intratracheally injected with the followings: no injection (control), PDOC only (PDOC), PDOC and 24hr later CAT-transduced MSCs (PDOC + MSC). Dotted line depicts control threshold.

Figure 6: *In vitro* and *in vivo* detection of Rosa26 MSCs and β gal-transduced MSCs 24hr or 7 days after administration. MSCs from wild type mice were transduced with a lentivirus vector encoding nls-lacZ gene. **(a,b)** Representative example of **(a)** Rosa26 MSCs or **(b)** β gal-transduced MSCs after *in vitro* X-Gal staining just prior to intratracheal injection. Magnification 20x. **(c)** *In vitro* β gal activity in MSCs and Rosa26 MSCs just prior to intratracheal injection. **(d)** β gal activity in whole trachea-lungs homogenates, 24hr or 7 days after Rosa26 MSC intratracheal administration. Evaluated groups included animals that were intratracheally injected with the followings: no injection (control), PDOC

and lysate of Rosa26 MSCs (PDOC + Rosa26 MSC lysate), PDOC and Rosa26 MSCs (PDOC + Rosa26 MSC). (e) *In vivo* detection of the nls-lacZ gene by PCR 24hr and 7 days after intratracheal injection of β gal-transduced MSCs. Dotted line depicts control threshold. * $p < 0.05$.

Supplementary data

Table S1: Animal survival survey.

Table S2: Quantification of polyp-like structures in murine airway at 7 days.

Figure 1

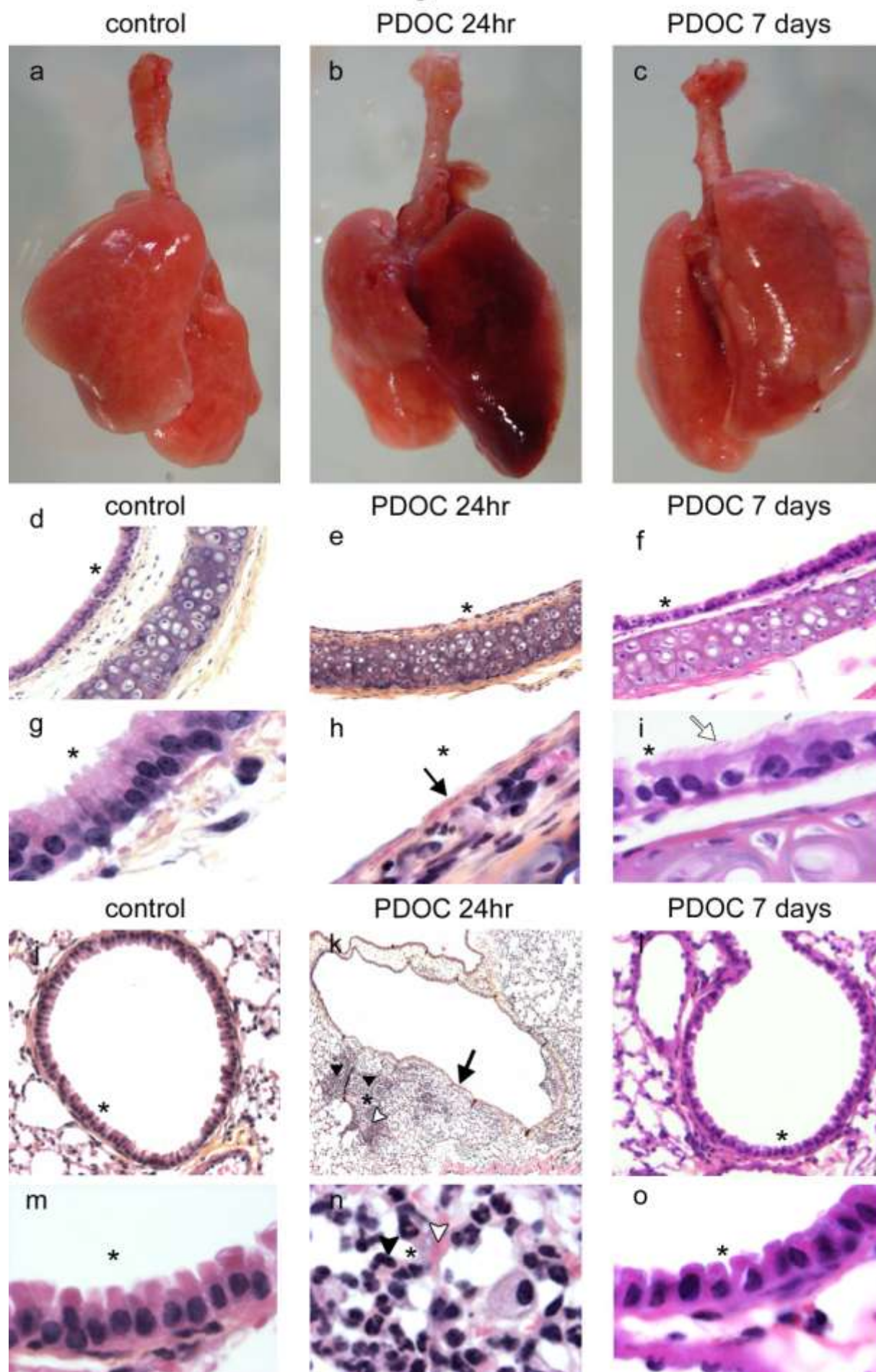


Figure 2

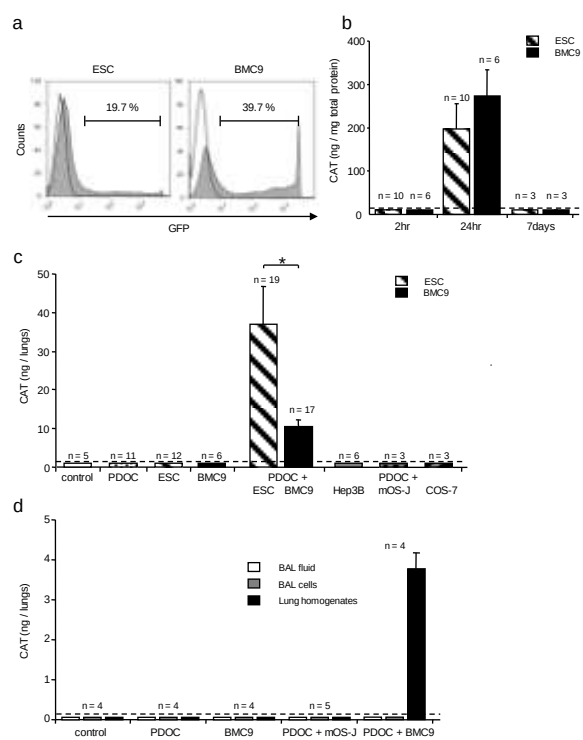
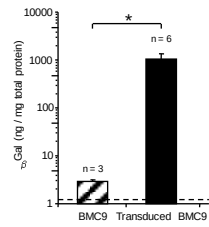


Figure 3

a



b



c

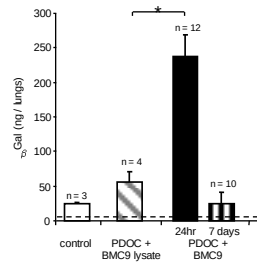


Figure 4

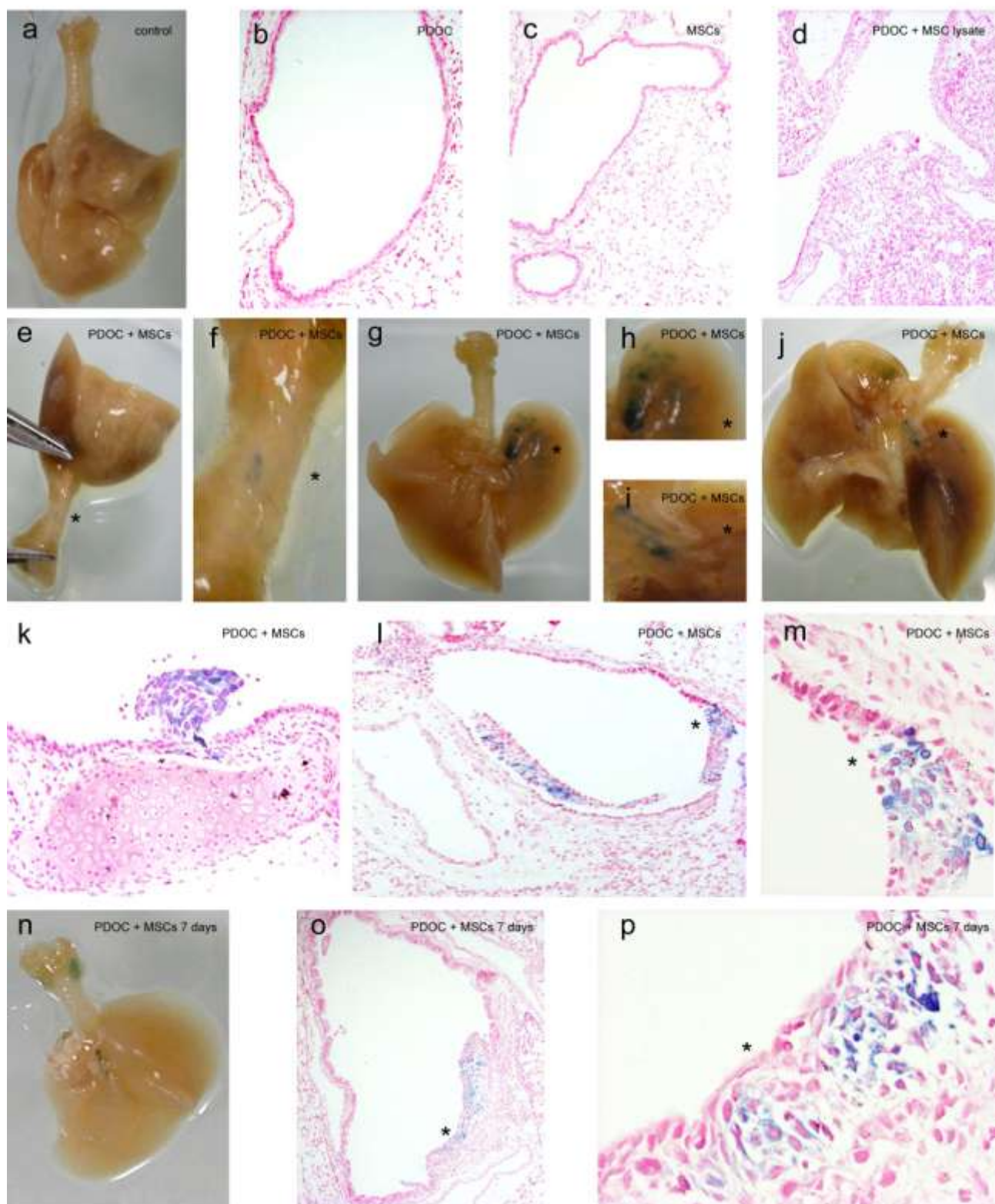


Figure 5

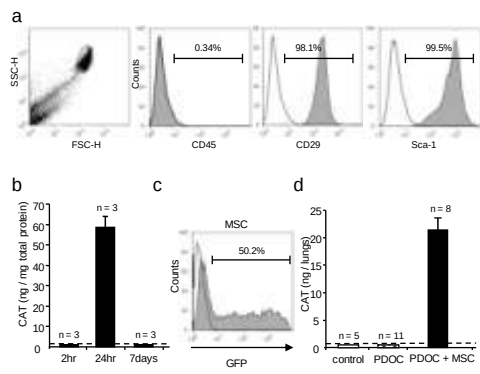
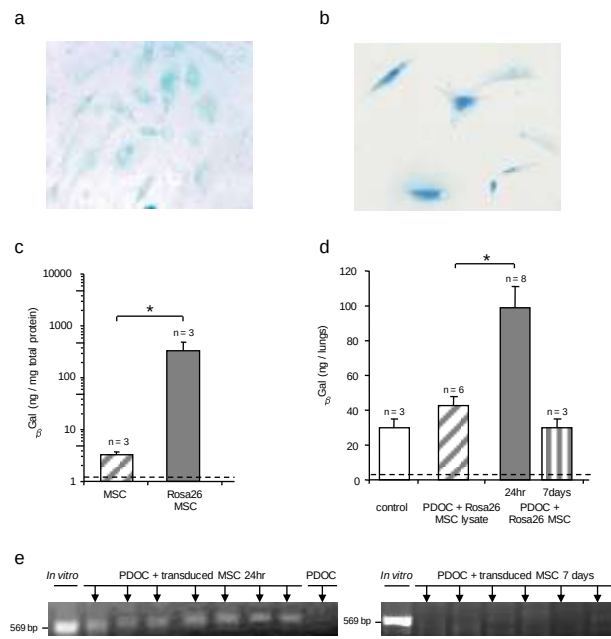


Figure 6



5 **RESULTATS COMPLEMENTAIRES**

5.1.1 *Introduction*

L'objectif de ce travail de thèse était de développer une stratégie de thérapie cellulaire visant l'épithélium des voies aériennes. Pour cela, d'importantes études complémentaires ont été nécessaires pour établir le modèle animal, évaluer les méthodes de transfert de gène et les méthodes de détection *in vivo* des cellules souches injectées. Les résultats sont présentés ici.

5.1.2 *Evaluation du modèle murin avec injection intratrachéale de détergent*

Le modèle murin nécessaire au développement de notre stratégie de thérapie cellulaire visant l'épithélium des voies aériennes devait remplir une condition principale : au moment de l'injection des cellules, ce modèle devait présenter des lésions épithéliales tout au long de l'appareil respiratoire, avec une lame basale sous-jacente dépourvue de son épithélium. Pour cela, différentes concentrations de ce détergent ont été testées pour évaluer son effet sur l'ensemble des voies aériennes trachée-bronches-bronchioles de souris. La survie des animaux traités au PDOC et les principales limites de ce modèle ont été évaluées.

5.1.2.1 *Lésions épithéliales dans les voies aériennes induites par le polidocanol*

L'administration intratrachéale du détergent polidocanol (PDOC) génère des lésions épithéliales dans les voies aériennes de souris. Cependant, l'étendue des lésions (dans la trachée et/ou dans les voies aériennes plus distales) et leur sévérité s'avéraient dépendantes de la concentration de la solution de PDOC administrée (Figure 7).

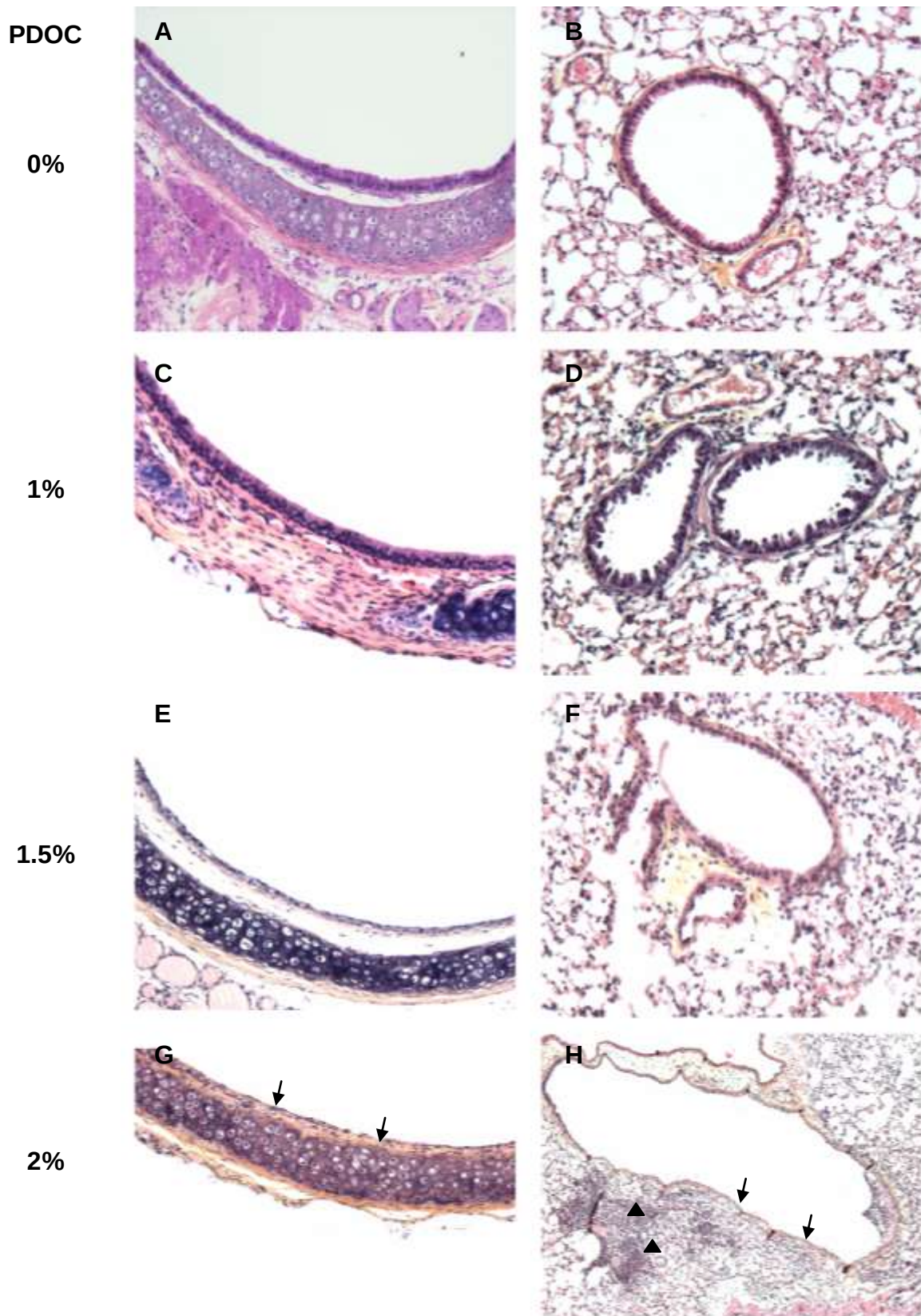


Figure 9 : Effets du PDOC 1%, 1,5% et 2% sur l'épithélium des voies aériennes de souris.
Trachée (A, C, E, G) et bronchioles (B, D, F, H) de souris. (A-B) Souris contrôle traitée en intratrachéal avec du PBS. Souris traitée en intratrachéal avec une solution de PDOC 1% (C-D), 1,5% (E-F), 2% (G-H). Flèches : abrasion de l'épithélium de surface avec mise à nu de la lame basale sous jacente. Têtes de flèche : infiltrat inflammatoire. (A-F) : grossissement 10X. (H) : grossissement 4X. Contre coloration HES.

L'administration de PBS n'induit pas de lésions épithéliales dans les voies aériennes de souris à 24h (Figures 7A-B). Les premiers effets du PDOC sont visibles au niveau de l'épithélium de la trachée pour la concentration de 1,5% (Figure 7E) : les cellules ciliées sont absentes par endroit et les noyaux des cellules basales sont refoulés contre la lame basale sous-jacente. Néanmoins, à cette concentration, aucune modification histologique du poumon profond est observée (Figure 7F), l'ensemble des voies aériennes n'est pas atteint à cette concentration. En revanche, avec la solution de PDOC 2%, l'ensemble des voies aériennes présente des lésions épithéliales : l'épithélium de surface est absent, la lame basale sous-jacente est soit complètement dénudée, soit partiellement tapissée de cellules basales restantes (Figures 7G-H). Dans le poumon profond, des infiltrats inflammatoires proches des bronchioles et d'axes vasculaires sont visibles (Figure 7H). Des résultats similaires ont été obtenus 48h après l'injection du PDOC 2%.

En résumé :

Ces expériences montrent que l'injection intratrachéale de PDOC 2% entraîne à 24h et 48h des lésions épithéliales dans les voies aériennes (trachée et poumon profond), avec une abrasion de l'épithélium de surface et une mise à nu de la lame basale sous-jacente. 24h après l'induction des lésions par le détergent, les conditions étaient donc réunies pour procéder à l'injection de cellules souches.

5.1.2.2 Survie des animaux

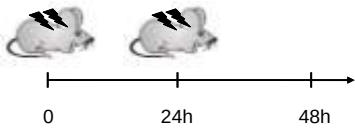
Pour déterminer si l'injection de cellules souches avait un effet sur la survie des animaux traités au PDOC 2%, nous avons évalué la survie des animaux contrôles. Au regard de notre protocole de thérapie cellulaire comportant deux injections intratrachéales successives, séparées de 24h, plusieurs types d'animaux contrôles de ce protocole ont été étudiés (Tableau XIV) :

- l'animal était intubé une seule fois pour administrer le PBS ou le PDOC 2%, puis sacrifié 48h après l'injection ;
- l'animal était intubé deux fois en 24h pour administrer le PBS ou le PDOC 2% puis à nouveau le PBS (seconde injection destinée à remplacer celle des cellules souches). Le sacrifice

était pratiqué au lendemain de la seconde injection comme dans le cas du protocole avec les cellules souches.

Quel que soit le type d'animal contrôle utilisé, aucune différence dans le pourcentage de survie n'a été mise en évidence ($p = 0.2$). La survie des animaux traités en intratrachéal avec le PDOC 2% seul ou le PDOC2% suivi de PBS est identique à celle des animaux contrôles traités avec le PBS (une ou deux injections intratrachéales successives). Les décès surviennent dans les 24h suivant la dernière injection intratrachéale. Aucune modification de la survie est observée entre 24h et 7 jours.

Tableau XIV : Pourcentage de survie des animaux contrôles et traités au PDOC 2%.

	Protocole	Pourcentage de survie (n = nombre d'animaux)
1 intubation et évaluation de la survie à 48h		
	PBS seul	94.4 ± 20.6 % (n = 10)
	PDOC 2% seul	90.1 ± 16.2 % (n = 812)
2 intubations successives et évaluation de la survie à 48h		
	PBS + PBS	80.2 ± 13.5 % (n = 10)
	PDOC 2% + PBS	91.7 ± 8.3 % (n = 19)

5.1.2.3 Limites du modèle PDOC 2%

Trois limites principales de ce modèle au développement de notre stratégie de thérapie cellulaire ont été identifiées :

- l'administration intratrachéale d'une solution de PDOC 2% n'affecte pas de façon symétrique l'ensemble des lobes pulmonaires. Dans les voies aériennes des animaux traités avec le PDOC 2%, il est possible d'observer des zones épithéliales intactes (Figure 8). Cette distribution asymétrique liée à l'administration intratrachéale a déjà été décrite dans des études de thérapie génique visant à injecter des solutions d'ADN en intratrachéal [158].

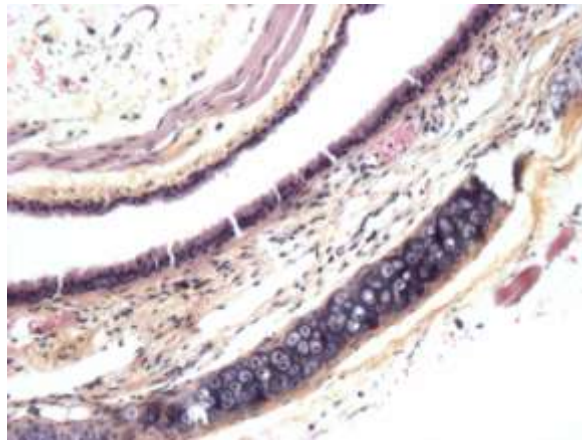


Figure 10 : Bronche intacte d'une souris SWISS traitée avec le PDOC 2%.

Grossissement 10X. Contre coloration HES.

- ce modèle génère des lésions épithéliales aiguës dans les voies aériennes 24h ou 48h après l'administration de PDOC 2% :

- ces lésions sont transitoires, puisque 7 jours après l'injection de PDOC 2%, l'épithélium des voies aériennes est spontanément et complètement régénéré (Figure 9).
- ce modèle ne permet pas de rendre compte de l'obstruction des bronches par le mucus comme il est décrit dans les voies aériennes des patients atteints de la mucoviscidose.

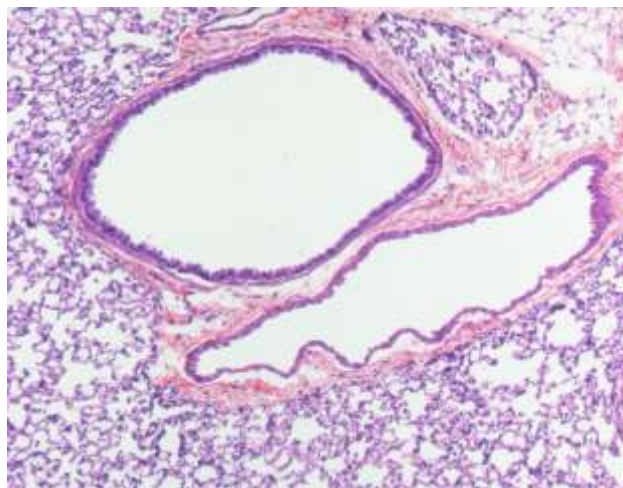


Figure 11 : Bronchiole de souris traitée au PDOC 2% 7 jours après l'administration.

Grossissement 4X. Contre coloration HES.

- lors de l'étude de la localisation des BMC9 transduites avec le gène nls-LacZ à 7 jours, nous avons noté la présence de BMC9 au niveau de structures polypoïdes dans les voies aériennes

(Manuscrit, Figure 4H-I). La formation de ces structures pouvait être liée à la prolifération incontrôlée des cellules souches issues d'une lignée cellulaire et donc immortalisées. Pour évaluer cette hypothèse, nous avons fait des expériences supplémentaires en traitant des animaux avec une injection intratrachéale de PDOC 2% puis 24h après, une seconde injection intratrachéale de PBS (Tableau XIV). A 24h, les animaux contrôles présentaient des lésions épithéliales identiques à celles décrites précédemment (Figure 7 G-H). A 7 jours, nous avons retrouvé la formation de structures polypôides dans les voies aériennes des animaux contrôles, au niveau de certaines bronchioles. Aucune de ces structures n'a été détectée dans la trachée et les bronches. Aucune de ces structures n'a été détectée dans les voies aériennes des animaux traités au PBS seul (avec une seule ou deux injections successives). Ces formations sembleraient donc liées à une réaction de l'épithélium traité au PDOC2% après deux injections intratrachéales successives (Figure 10, flèches). Les intubations ne semblent pas être en cause puisque ces structures polypôides ne sont retrouvées ni dans la trachée, ni chez les animaux traités deux fois au PBS. L'évaluation du nombre de souris présentant des structures polypôides dans la trachée et dans les bronchioles, dans le groupe contrôle (PDOC 2% + PBS) ou dans le groupe traité (PDOC 2% + BMC9 nls-LacZ), à 7 jours n'a pas montré de différence (Tableau XV). Ceci suggère que les BMC9 n'ont pas joué de rôle significatif dans la survenue de ces formations polypôides (test exact de Fisher, $p = 0.68$).

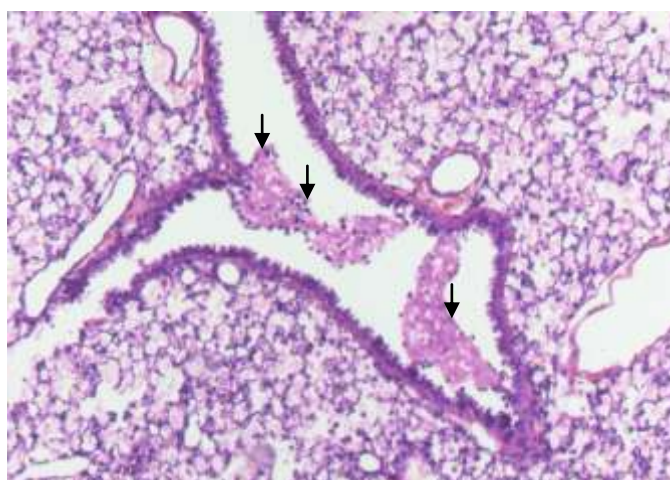


Figure 12 : Formation de structures polypôides à 7 jours dans une bronchiole de souris « PDOC 2% + PBS ».
Grossissement 4X. Contre coloration HES.

Tableau XV : Nombre de souris présentant dans les voies aériennes des structures polypôides.

	Trachée	Bronchioles
PDOC 2% + PBS à 7 jours	0	8/11 soit 72%
PDOC 2% + BMC9 nls-LacZ à 7 jours	0	5/7 soit 71%

En résumé :

Les effets du polidocanol (PDOC) sur l'épithélium des voies aériennes de souris sont dépendantes de sa concentration. L'injection intratrachéale de PDOC 2% a été retenue pour développer notre projet de thérapie cellulaire respiratoire car elle entraîne à 24h une abrasion de l'épithélium de surface dans les voies aériennes, si bien que la lame basale sous jacente devient un site potentiel d'adhérence pour les cellules souches. L'injection intratrachéale de PDOC 2% n'a pas d'effet sur la survie des animaux par rapport aux groupes contrôles. Ce modèle murin de lésions épithéliales présentent 3 limites principales au développement de notre projet :

- les lésions induites par le PDOC 2% sont hétérogènes tout au long de l'arbre trachéo-bronchique ;
- les lésions induites par le PDOC 2% sont transitoires, l'épithélium est spontanément régénéré 7 jours après l'injection de PDOC 2% ;
- ce modèle ne permet pas de rendre compte de l'encombrement des bronches par le mucus ;
- la formation de structures polypôides, réaction de l'épithélium traité au PDOC2% après deux injections intratrachéales successives est observée dans les bronchioles. L'apparition de ces structures n'est pas liée à la présence de cellules souches.

5.1.3 Evaluation des méthodes de transfert de gène dans les cellules souches

24h après l'induction des lésions épithéliales, avec mise à nu de la lame basale, des cellules souches embryonnaires (CSE) et des cellules souches mésenchymateuses (CSM) étaient injectées en intratrachéal. Pour étudier la survie et la localisation de ces cellules *in vivo*, celles-ci étaient préalablement transfectées avec différents gènes rapporteurs à l'aide de vecteurs non-viraux ou viraux. Le choix des méthodes de transfert était fonction du type cellulaire (CSE ou CSM, lignées

cellulaires ou cultures primaires) et des études ultérieures (étude de la survie ou de la localisation). Pour évaluer la sensibilité du système de transfert de gène, les cellules ont été transfectées avec le plasmide pCIK-CAT et le nombre minimum de cellules exprimant la protéine CAT nécessaire pour avoir un signal CAT au dessus du seuil a été calculé pour chaque système.

5.1.3.1 Vecteurs non-viraux

5.1.3.1.1 Transfection des cellules souches issues de lignées cellulaires avec les vecteurs synthétiques

Les premiers essais de transfection ont été réalisés sur les cellules souches embryonnaires (CSE, lignée R1), ensemencées dans des plaques 24 puits (30 000 cellules/puit, en duplicat), et ont consisté à tester :

- la nature du lipide cationique : le BGTC et 4 lipides aminés en cours de développement (lipides 1-4) ;
- la quantité d'ADN au sein des complexes avec le BGTC : 1 ou 1,5 µg ;
- le rapport de charge entre les molécules d'ADN et le BGTC : $R = 4$ ou 6 .

Pour les lipides aminés, la quantité d'ADN dans les complexes était 1 µg.

Les mélanges étaient préparés par l'équipe de Bruno Pitard immédiatement avant la transfection, dans du NaCl 1M. Les mises au point ont été effectuées avec le plasmide pCIK-CAT et les dosages de la protéine CAT étaient réalisés 24h et 7 jours après la transfection (Figure 11).

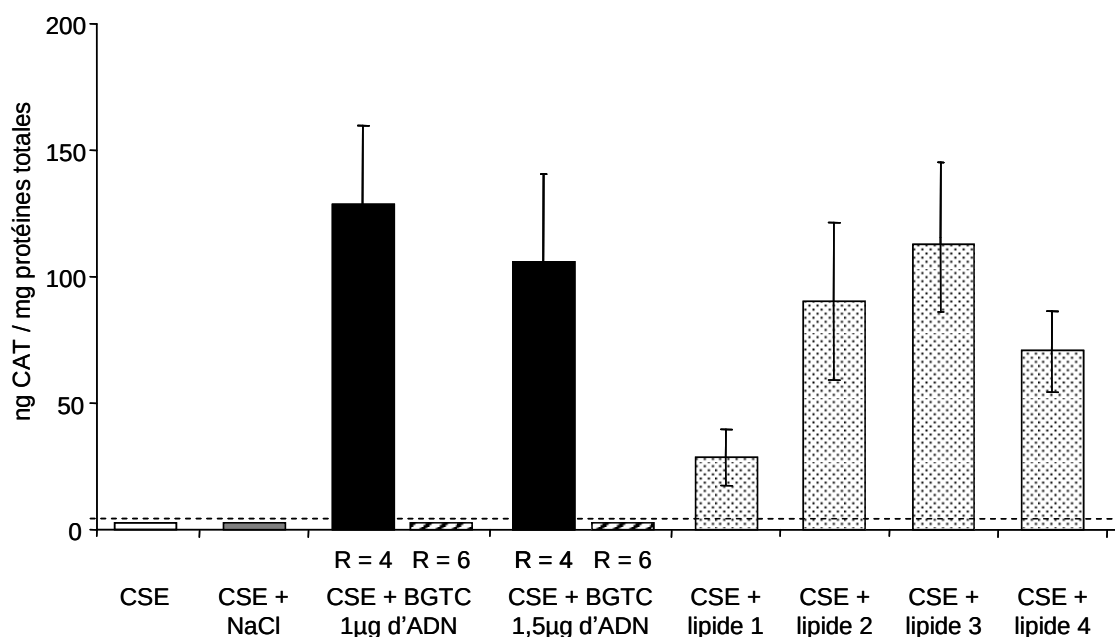


Figure 13 : Expression de la protéine CAT *in vitro* 24h après la transfection des CSE avec le BGTC et les lipides aminés.

Pour le BGTC, les formulations avec 1µg ou 1,5µg d'ADN et R = 4 ou 6 ont été testées. n = 3 séries pour chaque condition. Ligne pointillée : limite inférieure du seuil de détection de l'ELISA.

La formulation BGTC, 1µg d'ADN et R = 4 a permis d'obtenir une quantité importante de protéine CAT ($129 \pm 31,5$ ng de protéine CAT/mg de protéines totales) à 24h. Dans ces conditions, un minimum de 2132 ± 577 CSE exprimant la protéine CAT était nécessaire pour avoir un signal au dessus du seuil de détection. Ces résultats préliminaires confortaient l'utilisation de l'ELISA comme méthode de détection suffisamment sensible pour les expériences *in vivo*.

Les résultats des ELISA à 7 jours après la transfection n'ont pas mis en évidence l'expression de la protéine CAT dans les CSE *in vitro*.

Dans ces conditions de transfection, aucune modification de la qualité des cultures des CSE n'a été observée : le temps de division et la proportion de cellules mortes après comptage au bleu trypan lors des passages étaient inchangés.

Nous avons ensuite réalisé les essais de transfection pour les cellules souches adultes mésenchymateuses issues de la lignée BMC9 avec la formulation retenue pour les CSE : BGTC, 1µg d'ADN et R = 4. Cependant, nous n'avons pas mis en évidence l'expression de la protéine CAT à 24h dans ces conditions.

Le lipide 3, développé dans l'équipe de Bruno Pitard et aujourd'hui commercialisé sous le nom ICAfectin® 441 (In-Cell-Art, Nantes, France) a été ensuite évalué pour mettre au point les conditions de transfert de gène dans les BMC9. Pour mettre au point les mélanges, trois paramètres ont été testés :

- l'association ou non du lipide avec la DOPE (pour rappel, tableau IX) ;
- le rapport entre les molécules d'ADN et les molécules de lipides était ici exprimé par le rapport N/P qui tient compte du nombre d'atomes d'azote (N) apporté par le lipide et du nombre d'atomes de phosphore (P) apporté par l'ADN : N/P = 3 ou N/P = 5 ;
- la nature du milieu dans lequel était préparé le mélange : milieu de culture avec 10% de SVF (mélange II) et OptiMEM (mélange III, milieu commercial appauvri en sérum, Invitrogen).

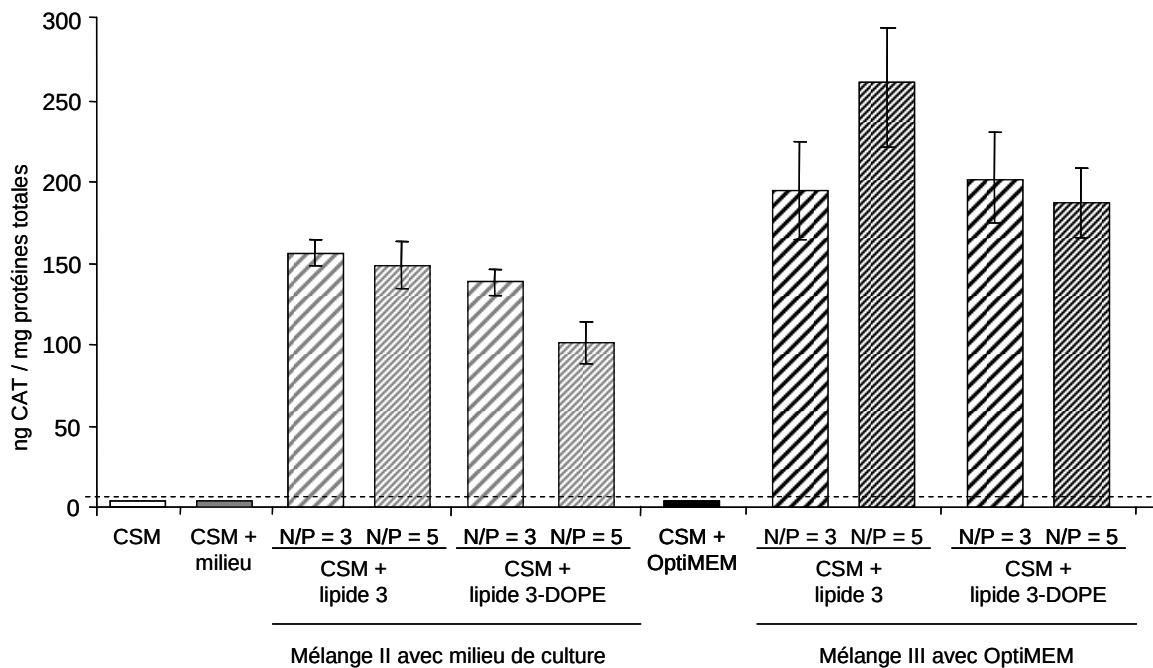


Figure 14 : Expression de la protéine CAT *in vitro* 24h après la transfection des BMC9 avec le lipide aminé 3.
n = 3 séries pour chaque condition. Ligne pointillée : limite inférieure du seuil de détection de l'ELISA.

Les résultats montrent une meilleure efficacité de transfection avec les mélanges préparés dans l'OptiMEM. Pour les injections *in vivo* des BMC9, la formulation lipide 3, N/P = 5 a été retenue, formulation pour laquelle une quantité importante de protéine CAT a été dosée dans les CSM (275 ± 60 ng protéine CAT/mg de protéines totales). De plus, grâce à ces conditions, un minimum de 861

± 222 BMC9 exprimant la protéine CAT était nécessaire pour avoir un signal CAT au dessus du seuil. Ce résultat rendait possible la détection des cellules *in vivo*.

Dans ces conditions, les résultats des ELISA à 7 jours après la transfection n'ont pas mis en évidence l'expression de la protéine CAT dans les CSM *in vitro*.

De même, nous n'avons pas observé de modification dans le temps de division et la mortalité des CSM transfectées lors des passages.

Cette formulation lipide 3, N/P = 5, préparée dans l'OptiMEM a été testée également sur les CSE. 197 ± 45 ng protéine CAT/mg de protéines totales ($n = 6$) ont été obtenues à 24h. Dans ces conditions, un nombre minimum de 2000 ± 378 CSE était nécessaire pour avoir un signal au dessus du seuil. Cette sensibilité encourageait l'utilisation de cette formulation par rapport à celle avec le BGTC pour les expériences *in vivo*. Tout comme avec les BMC9, les résultats des ELISA à 7 jours après la transfection n'ont pas mis en évidence l'expression de la protéine CAT dans les CSE *in vitro*. Aucune modification dans le temps de division et la mortalité des CSE transfectées lors des passages n'a été observée.

5.1.3.1.2 Transfection des cellules différenciées avec les vecteurs synthétiques

Comme expériences contrôles, nous avons également injecté *in vivo* des cellules différenciées : cellules Hep3B (lignée d'hépatocytes humaine), cellules COS (lignée de cellules de rein de singe), cellules mOS-J (lignée de cellules d'ostéosarcome de souris). Les résultats obtenus permettaient d'utiliser ces systèmes de transfert de gène pour les expériences contrôles *in vivo* (Tableau XV).

Tableau XVI : Transfection des cellules différenciées avec les vecteurs synthétiques.

Formulations		ng protéine CAT/mg protéines totales ($n = 3$)	Nombre minimum de cellules exprimant la protéine CAT ($n = 3$)
COS	BGTC, R= 4, 0.6 μ g d'ADN	129 ± 22.4	1693 ± 325
Hep3B	Lipide 3, mélange avec OptiMEM, N/P = 5	50 ± 2.3	611 ± 29
mOS-J	Lipide 3, mélange avec OptiMEM, N/P = 7	$11,3 \pm 7.6$	777 ± 53

5.1.3.1.3 Transfection des cellules souches issues de cultures primaires

Lorsque nous avons utilisé les cellules souches mésenchymateuses issues de cultures primaires, nous avons testé *in vitro*, selon des protocoles et des conditions similaires, l'ensemble des vecteurs synthétiques décrits précédemment. Ces expériences n'ont pas donné des résultats concluants :

- nous ne détectons pas la protéine CAT ou la quantité de protéine CAT détectée était à la limite du seuil de détection, ce qui signifiait qu'un nombre important de CSM exprimant la protéine CAT (>10 000) était nécessaire pour avoir un signal CAT au-dessus du seuil et compromettrait la détection ultérieure *in vivo* ;
- la proportion de cellules transfectées estimée par cytométrie en flux était inférieure à 10% ($8.5 \pm 0.6 \%$, $n = 35$).

Nous avons alors testé deux autres systèmes de transfert de gène avec les plasmides pCIK-CAT et pEGFP-C1 :

- un vecteur commercial : la Lipofectamine 2000 (Invitrogen). Deux séries d'expériences ont été menées pour mettre au point ce système. Dans la première série d'expériences, la quantité d'ADN dans les complexes a été fixée selon les recommandations du fournisseur à 1,6µg et plusieurs ratios ADN : Lipofectamine 2000 ont été testés (1 : 0.5 ; 1 : 1 ; 1 : 2.5 ; 1 : 5). Seul le ratio 1 : 2.5 a permis la détection de la protéine CAT à 24h. Dans la seconde série, le ratio a été fixé à 1 : 2.5 et 4 ou 6µg d'ADN ont été testés. Le ratio 1 : 2.5 avec 4µg d'ADN a permis d'améliorer la sensibilité de ce système de transfert de gène (Tableau XVII). Aucune modification de la qualité des cultures n'a été observée.

Tableau XVII : Résultats des essais de transfection des CSM issues de cultures primaires.

	1 ^{ère} série d'expériences : quantité d'ADN fixée à 6µg				2 ^{nde} série d'expériences : ratio fixé à 1 : 2.5	
	1 : 0.5	1 : 1	1 : 2.5	1 : 5	4µg d'ADN	6µg d'ADN
ng protéine CAT/mg protéines totales (n = 3)	0	0	19 ± 7.9	0	45.5 ± 1.8	0
Nombre minimum de cellules exprimant la protéine CAT (n = 3)	$10\,061 \pm 461$				6316 ± 543	

- la nucléofection : nous avons mis au point la quantité de plasmide pEGFP-C1 dans les solutions de nucléofection (2, 4 ou 6µg) et les programmes de nucléofection proposés par le fournisseur (U23 ou C17). Le programme U23 en présence d'ADN a induit une forte mortalité dans nos cultures. Le programme C17 a été retenu pour des expériences supplémentaires avec le plasmide pCIK-CAT. L'ensemble des résultats nous a encouragé à préférer la nucléofection par rapport à la transfection avec la Lipofectamine 2000 pour les expériences *in vivo* (Tableau XVIII).

Tableau XVIII : Résultats des essais de nucléofection des CSM issues de cultures primaires.

	U23		C17		
ADN	% cellules GFP positives	% cellules mortes	% cellules GFP positives	% cellules mortes	ng protéine CAT/mg protéines totales, nombre minimum de cellules exprimant la protéine CAT
0µg	0	1.5	0	1	58.45 ± 5.62 ng (n = 3), 142 ± 9 (n = 3)
2µg	40	18 ± 1.5	26.13	5 ± 1.3	
4µg	48.8		33.87		
6µg	50.26		56.8 ± 2.9 (n = 3)		

5.1.3.2 Bilan des résultats de transfection des cellules souches à l'aide de vecteurs non-viraux

Tableau XIX : Résultats de la transfection des cellules souches.

Système de marquage	Résultats		Avantages	Limites
	ELISA CAT, nombre minimum de cellules exprimant la protéine CAT	cytométrie en flux, % cellules GFP +		
Vecteurs synthétiques : - CSE : BGTC, R = 4, 1µg d'ADN ou Lipide 3, OptiMEM, N/P = 5 - BMC9 : Lipide 3, OptiMEM, N/P = 5	861 ± 222 à 2131 ± 577	19.4 à 37%	- Pas de modification dans la qualité des cultures ; - Transfert immédiatement avant l'injection	- Pas d'expression sur le long terme (7 jours)
Lipofectamine 2000 : CSM issues de cultures primaires, 1 : 2.5, 4µg d'ADN	6316 ± 543	non évalué		
Nucléofection Amaxa : CSM issues de cultures primaires, programme C17, 6µg d'ADN	142 ± 9	56.8 ± 2.9 %		

En résumé :

Pour étudier la survie des cellules souches et des cellules différenciées *in vivo*, celles-ci ont été préalablement transfectées avec différents gènes rapporteurs à l'aide de vecteurs non-viraux (Tableau bilan XIX). Nos résultats montrent la nécessité d'adapter le système de transfert de gène (le type de vecteur synthétique, la formulation, la quantité d'ADN, etc) au type cellulaire utilisé (cellules souches ou cellules différenciées, lignées cellulaires ou cultures primaires). Le transfert du plasmide pCIK-CAT a permis d'évaluer la sensibilité de chaque système de transfert de gène en calculant le nombre minimum de cellules exprimant la protéine CAT nécessaire pour avoir un signal CAT au dessus du seuil. Dans nos conditions, les systèmes de transfert de gène retenus permettaient la détection d'un nombre minimum compris entre 142 ± 9 (obtenu avec les CSM issues de cultures primaires) et 2131 ± 577 (obtenu avec les CSE issues de la lignée R1).

5.1.3.3 Vecteurs viraux

L'utilisation de vecteurs viraux avait pour but de prolonger l'étude de la survie et de la localisation *in vivo* des cellules souches à 7 jours. Ces systèmes ont également permis de vérifier les résultats obtenus avec le gène rapporteur CAT avec un second gène rapporteur : le gène LacZ, codant la bêta galactosidase dont l'activité enzymatique peut être dosée.

5.1.3.3.1 Transduction avec le vecteur rétroviral nls-LacZ

La transduction des BMC9 avec le rétrovirus nls-LacZ nous a permis d'étudier la survie et la localisation de ces cellules 24h et 7 jours après l'administration *in vivo* (Manuscrit).

Cependant, nous avons observé dans les BMC9 transduites et gardées en culture jusqu'au passage 12 après la transduction, une diminution progressive des cellules exprimant la bêta galactosidase après révélation au X Gal (Figure 13).

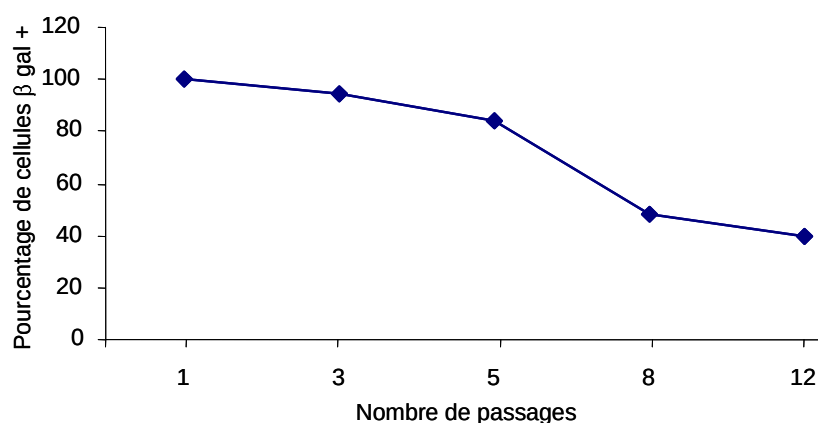


Figure 15 : Expression de la bêta galactosidase dans les BMC9 au cours des passages.

Cette observation *in vitro* a encouragé l'administration *in vivo* des cellules souches dès le premier passage après la transduction (à 4 jours) et à réaliser les expériences de PCR pour détecter le gène nls-LacZ *in vitro* et *in vivo*, en parallèle des révélations et des dosages biochimiques de l'activité de la bêta galactosidase.

La transduction avec le vecteur rétroviral est restée inefficace sur les CSM issues de cultures primaires malgré plusieurs cycles d'infection.

5.1.3.3.2 Transduction avec le vecteur lentiviral nls-LacZ

Pour la première production ($1,5 \cdot 10^7$ pi/mL, 200μL), il nous a été possible de tester plusieurs conditions de concentrations (12.5, 25 et 50 MOI). De par le titre de la seconde production ($5 \cdot 10^6$ pi/mL), nous avons reproduit l'expérience uniquement avec 50 MOI (Tableau XX). Aucune modification de la qualité des cultures n'a été observée. Le pourcentage de cellules bêta galactosidase positives était maintenu en culture au cours des passages (évalué sur 10 passages après la transduction).

Tableau XX : Pourcentage de CSM exprimant la bêta galactosidase après transduction.

MOI (temps d'incubation)	Production 1 ($1,5 \cdot 10^7$ pi/mL) (n = 3)	Production 2 ($5 \cdot 10^6$ pi/mL) (n = 3)
0	0	0
12.5 (72h)	30.8 ± 9.7	non évalué
25 (24h)	30.7 ± 4.2	non évalué
50 (24h)	36.7 ± 2.5	21.8 ± 7.2

5.1.3.4 Bilan des résultats de transduction des cellules souches à l'aide de vecteurs rétroviraux et lentiviraux

Tableau XXI : Bilan des résultats de la transduction des cellules souches.

Système de marquage	Avantages	Limites
Rétrovirus nls-LacZ, 2 infections successives	- Séquence nls, - Expression sur le long terme (>7 jours)	Diminution progressive du nombre de cellules bêta galactosidase positives au cours des passages
Lentivirus nls-LacZ, 50 MOI pendant 24h		Maximum 36% de cellules transduites

En résumé :

Pour évaluer la survie des cellules souches *in vivo* à 7 jours et les localiser dans les voies aériennes, celles-ci ont été transduites avec le gène rapporteur nls-LacZ (codant la bêta galactosidase) à l'aide de vecteurs viraux.

Pour les cellules souches mésenchymateuses issues de lignée cellulaire, nous avons utilisé un vecteur rétroviral nls-LacZ. Cette transduction était efficace (100% des cellules sont transduites dès le premier passage après la transduction) mais s'est accompagnée d'une diminution progressive du pourcentage de cellules exprimant la bêta galactosidase *in vitro*. Pour pallier à cet effet, nous avons procédé à des expériences de PCR en parallèle, pour détecter le transgène nls-LacZ.

Pour les cellules souches mésenchymateuses issues de cultures primaires, le vecteur rétroviral est resté inefficace et nous avons eu recours à un vecteur lentiviral nls-LacZ. L'expression de la bêta galactosidase était maintenue au cours des passages. Le pourcentage de cellules transduites n'excédait pas 36%.

Ces expériences de transductions n'ont pas modifié la qualité des cultures.

5.1.4 Evaluation du protocole de thérapie cellulaire avec injection intratrachéale de cellules souches

5.1.4.1 Survie des animaux après injections intratrachéales de PDOC 2% et de cellules souches

Pour évaluer l'effet de l'injection intratrachéale de cellules souches sur la survie des animaux traités préalablement ou non avec le PDOC 2% , nous avons effectué plusieurs comparaisons (Tableaux XXII et XXIII) :

- comparaison de la survie du groupe contrôle « PDOC 2% + PBS » avec celle des différents groupes traités « PDOC 2% + cellules souches » ;
- comparaison de la survie du groupe contrôle « PBS seul » avec celle des groupes « PDOC 2% seul », « CSE seule » et « BMC9 seule » incluant les animaux traités uniquement avec le PDOC 2% ou les CSE, les BMC9 préalablement transfectées avec pCIK-CAT puis injectées dans des voies aériennes saines.

Cette survie a été évaluée à 24h. Aucun décès n'est survenu entre 24h et 7 jours.

A l'issue de ces comparaisons sur la survie, nous n'avons pas mis en évidence de différences significatives entre les différents groupes d'animaux, cela signifie que l'injection intratrachéale de cellules souches n'a pas d'effet sur la survie des animaux traités ou non au PDOC 2% entre 24h et 7 jours.

Tableau XXII : Pourcentage de survie des animaux traités avec le PDOC 2% et les cellules souches.

Aucune différence significative au risque 5% ($p = 0.72$).

Contrôle	PDOC 2% + cellules souches issues de lignées cellulaires				PDOC 2% + CSM issues de la moelle osseuse de souris SWISS		PDOC 2% + CSM issues de la moelle osseuse de souris transgéniques		
PDOC 2% + PBS	CSE-CAT	BMC9-CAT	BMC9-nls-LacZ	lysate BMC9 nls-LacZ	CSM-CAT	CSM nls-LacZ	CSM GFP	CSM Rosa26	lysate CSM Rosa26
91.7 ± 8.3 % (n = 19)	91 ± 4.1 % (n = 31)	95 ± 5 % (n = 21)	100 % (n = 12)	100 % (n = 4)	100 % (n = 8)	100 % (n = 6)	67.6 ± 33 % (n = 8)	92.1 ± 8.3% (n = 18)	100 % (n = 6)

Tableau XXIII : Pourcentage de survie des animaux traités uniquement avec les cellules souches.

Aucune différence significative au risque 5% ($p = 0.50$).

PBS	PDOC 2%	CSE	BMC9
94.4 $\pm$ 20.6 % (n = 10)	90.2 $\pm$ 16.2 % (n = 812)	80.6 $\pm$ 13.6 (n = 12)	100 (n = 6)

5.1.4.2 Survie des cellules souches après injection intratrachéale

5.1.4.2.1 Etude de la survie par PCR

Dans les cultures de BMC9 nls-LacZ (transduites avec le vecteur rétroviral), nous avons observé une diminution progressive du nombre de BMC9 exprimant la bêta galactosidase après révélation au X Gal (Chapitre 4.2.2.2.1). De même, cette diminution a été relevée dans les cultures de cellules souches mésenchymateuses issues de la moelle osseuse de souris Rosa26, passant de 100% à 30% de cellules exprimant la protéine, en 10 passages.

Pour pallier à cette perte d'expression de la bêta galactosidase, nous avons réalisé des expériences de PCR destinées à détecter le gène LacZ avec ou sans séquence nls dans les CSM issues de la lignée (BMC9, Figure 14) ou dans les CSM issues de cultures primaires (Figure 15). Ces expériences de PCR, réalisées en parallèle des dosages et des révélations biochimiques, étaient également un moyen d'évaluer la présence du transgène dans les voies aériennes.

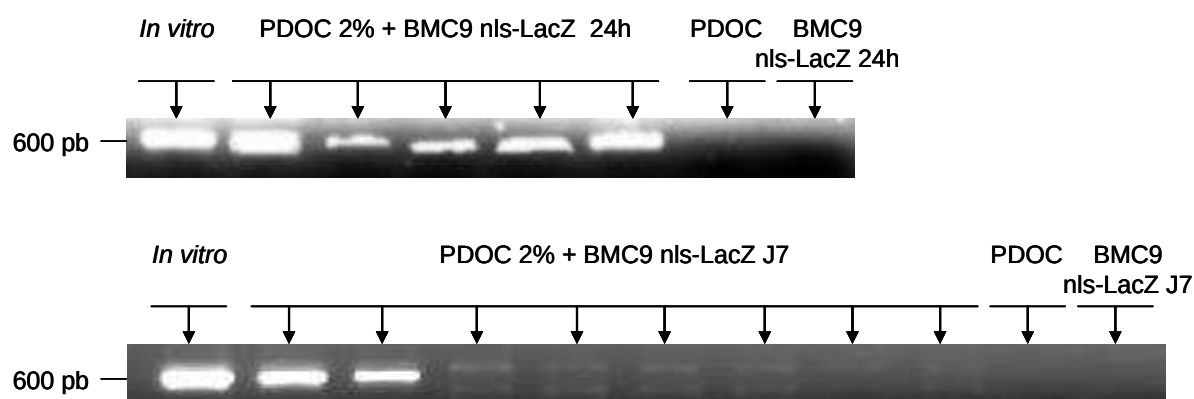


Figure 16 : Résultats des PCR 24h et 7 jours après l'injection des BMC9 nls-LacZ.

La présence du transgène est attestée par une bande de 600pb.

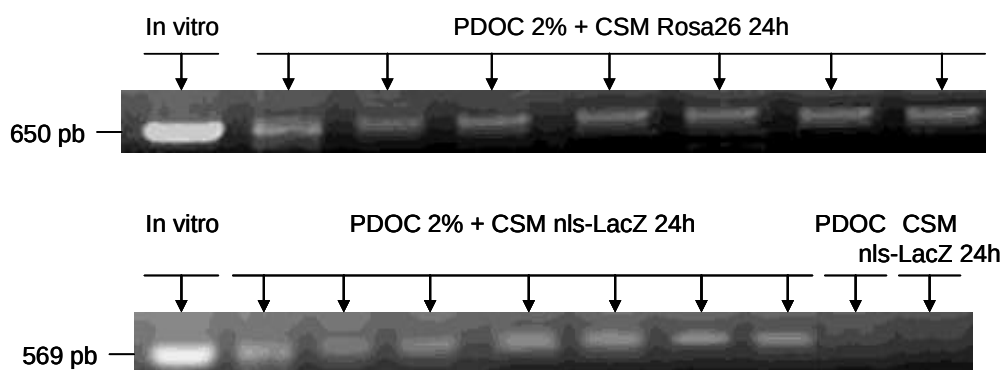


Figure 17 : Résultats des PCR 24h après l'injection des CSM issues de cultures primaires.

CSM Rosa26 : CSM issues de souris Rosa26. CSM nls-LacZ : CSM issues de souris SWISS et transduites avec le vecteur lentiviral nls-LacZ. La présence du transgène est attestée par une bande à 650pb et 569pb respectivement.

Les échantillons traités avec les BMC9 nls-LacZ ont à la fois été utilisés pour les dosages biochimiques et les expériences de PCR. La présence du transgène dans les voies aériennes, attestée par les dosages biochimiques a donc été confirmée par les expériences de PCR à 24h (5 souris sur 5) et à 7 jours (2 souris sur 8) (Figure 14).

Dans le cas des CSM issues de cultures primaires, les CSM Rosa26 et les CSM nls-LacZ, les expériences de PCR ont montré la présence du transgène dans les voies aériennes de tous les animaux à 24h (n = 7 pour les CSM Rosa26 et n = 8 pour les CSM nls-LacZ). Les PCR réalisées à 7 jours n'ont pas mis en évidence la présence du transgène.

5.1.5 Localisation des cellules souches

Pour l'étude de la localisation des cellules souches *in vivo*, plusieurs stratégies ont été utilisées. Une première méthode a consisté à réaliser des expériences d'immunohistochimie de la protéine CAT, 24h après l'injection des cellules transfectées avec le gène rapporteur CAT. Par la suite, en utilisant des CSM issues de souris transgéniques GFP, nous avons également effectué des expériences d'immunohistochimie de la GFP, 7 jours après l'injection des cellules.

5.1.5.1 Immunohistochimie de la protéine CAT à 24h

Nos expériences de localisation des CSE et des BMC9 ont débuté par l'immunohistochimie de la protéine CAT. Ces marquages se sont accompagnés d'un bruit de fond important dans les voies aériennes (les cils des cellules ciliées par exemple), notamment dans des zones lésionnelles (la lame basale dénudée par exemple) et riches en fibrine. Cette caractéristique rendait difficile l'exploitation des résultats, ce qui n'a pas permis de conclure quant à la localisation des cellules par cette méthode (Figure 16).

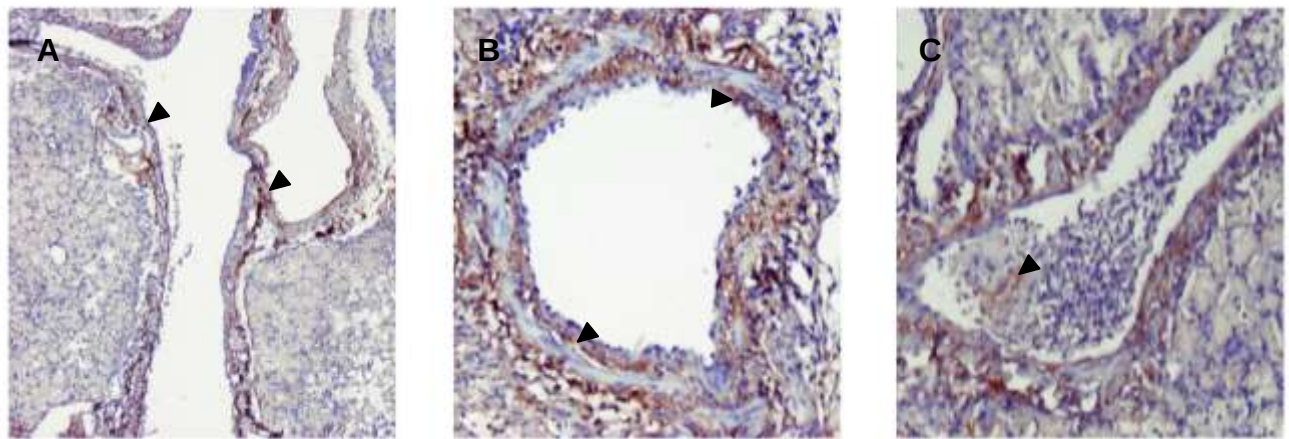


Figure 18 : Immunohistochimie de la protéine CAT 24h après l'injection de PDOC 2% (A), de PDOC 2% et de BMC9 (B-C).

(A) Marquage aspécifique de la lame basale dénudée. (B) Marquage péribronchiolaire aspécifique. (C) Marquage aspécifique avec la présence d'une structure polypoïde dans la lumière de la bronchiole. Têtes de flèche : marquage considéré comme aspécifique. (A) Grossissement 20x. (B-C) Grossissement 40x. Contre coloration hématoxyline.

5.1.5.2 Immunohistochimie de la GFP à 7 jours

Des CSM issues de la moelle osseuse de souris GFP ont également été injectées dans des voies aériennes traitées au PDOC 2% (n = 8 animaux). Les échantillons ont été utilisés pour des expériences d'immunohistochimie de la GFP à 7 jours. Ces expériences n'ont pas permis de conclure quant à la localisation des cellules à cause du bruit de fond (Figure 17).

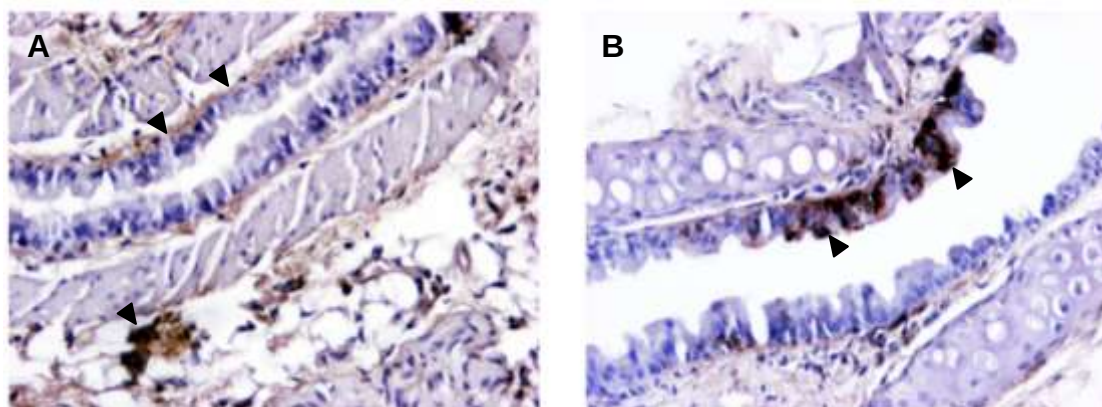


Figure 19 : Immunohistochimie de la GFP sur une coupe de bronche de souris 7 jours après l'injection de PDOC 2% (A), de PDOC 2% et de CSM GFP (B).

Têtes de flèche : marquage considéré comme aspécifique.

En résumé :

Les expériences de PCR ont confirmé les résultats des ELISA, des révélations et des dosages biochimiques : les cellules souches mésenchymateuses (CSM) issues de lignée cellulaire ou de cultures primaires sont présentes dans les voies aériennes lésées à 24h. Les résultats de PCR à 7 jours ont été positifs uniquement avec les échantillons traités avec le PDOC 2% et les CSM issues de la lignée cellulaire. Ces résultats sont concordants avec les résultats des révélations et des dosages biochimiques.

Pour localiser les cellules souches dans les voies aériennes, différentes méthodes d'immunohistochimie ont été testées en plus de la révélation biochimique de l'activité de la bêta galactosidase. Les expériences d'immunohistochimie anti-CAT et anti-GFP réalisées n'ont pas permis de conclure quant à la localisation des cellules 24h et 7 jours après l'injection.

5.1.6 Conclusions

Ces résultats ont permis d'évaluer les effets du polidocanol sur l'épithélium des voies aériennes de souris. Ce modèle s'avère un modèle acceptable pour évaluer la survie à court terme des cellules post-injection. Néanmoins, les limites associées à ce modèle (un système d'auto-réparation fonctionnel, aucune obstruction des bronches par le mucus, etc) encouragent dans le futur le transfert de cette stratégie à des modèles plus sophistiqués.

Le suivi des cellules souches *in vivo* a nécessité d'adapter le transfert de gène aux types cellulaires et aux expériences ultérieures. Des formulations avec les vecteurs synthétiques, des protocoles de nucléofection ont permis des transferts de gène efficaces dans les cellules souches issues de lignées cellulaires et de cultures primaires. La transduction à l'aide de vecteurs rétroviraux et lentiviraux a également été utilisée pour des études de survie et de localisation.

La survie des cellules souches issues de lignées cellulaires et de cultures primaires a été attestée à 24h et à 7 jours par différentes méthodes quantitatives (ELISA et dosages biochimiques) et par PCR.

Différentes méthodes ont été utilisées pour localiser les cellules souches dans les voies aériennes. Seules les expériences de révélation biochimique de l'activité de la bêta galactosidase ont permis de localiser des cellules, principalement dans la lumière de la trachée et des bronches, à 24h et à 7 jours.

6 DISCUSSION

L'objectif de notre travail était de développer une stratégie de thérapie cellulaire visant l'épithélium des voies aériennes, sans irradiation préalable des animaux. Pour cela, nous avons besoin d'un modèle de souris, présentant des lésions épithéliales aiguës dans les voies aériennes avec une desquamation de l'épithélium, de sorte à mettre à nu la lame basale sous-jacente. Notre hypothèse était que cette lame basale dénudée pouvait favoriser la niche des cellules souches sur le versant épithélial des voies aériennes. Pour potentialiser cet effet, les cellules souches étaient administrées directement dans la trachée, en intratrachéal. Pour s'affranchir des difficultés liées à l'utilisation de la fluorescence dans les poumons, nous avons mis en place des méthodes quantitatives sensibles pour quantifier la survie des cellules *in vivo* et utilisé des méthodes biochimiques pour les localiser. Ces études ont été rendues possibles par l'utilisation de différents gènes rapporteurs et stratégies de transfert de gène.

Nous avons montré la survie des cellules souches embryonnaires, des cellules souches mésenchymateuses (CSM) issues de lignée cellulaire ou de cultures primaires, dans des voies aériennes de souris non irradiées, et présentant des lésions épithéliales aiguës avec mise à nu de la lame basale. Nous avons estimé à l'aide d'ELISA que 0.4 à 5.5% des cellules souches sont capables de survivre dans les voies aériennes lésées à 24h. Ces résultats ont été confirmés en utilisant un second gène rapporteur et d'autres méthodes de détection : dosages biochimiques et PCR. A l'aide de méthodes biochimiques, des CSM ont été localisées sur le versant épithélial de la trachée et des bronches à 24h et également à 7 jours alors qu'à cette date, l'épithélium est spontanément réparé. Ces résultats encouragent l'utilisation de la voie aérienne pour viser l'épithélium des voies aériennes et développer une stratégie de thérapie cellulaire respiratoire.

Ces résultats ont été obtenus dans un modèle de lésions épithéliales aiguës. Tout comme le modèle avec administration de naphthaline [71, 101], les lésions sont transitoires car elles sont suivies d'une

régénération spontanée de l'épithélium, selon des délais similaires [101]. Cette régénération spontanée, liée à des mécanismes de réparation préservés lors du traitement au polidocanol ou à la naphthaline, empêche le développement d'un éventuel processus de réparation supplémentaire, grâce aux cellules souches administrées. Un modèle animal idéal pour évaluer la participation des cellules souches au processus de réparation épithéliale serait un modèle présentant des lésions épithéliales chroniques, dues à un défaut ou un épuisement des systèmes d'auto-réparation de l'épithélium des voies aériennes. Cette hypothèse est confortée par les résultats obtenus dans des études de thérapie cellulaire de la rétine. Dans ce domaine, il existe des modèles animaux présentant des lésions épithéliales sans régénération spontanée, tels que le rat RCS (Royal College of Surgeons) présentant une mutation perte de fonction pour une protéine kinase, ce qui entraîne une phagocytose des cellules épithéliales de la rétine [159], et la souris knock-out pour la rhodopsine, pigment présent dans les cellules épithéliales de la rétine et nécessaire à leur développement [160]. L'administration locale de CSM dans ces modèles a donné des résultats prometteurs avec une colonisation massive des CSM au niveau des zones lésées, ainsi qu'une différenciation en cellules épithéliales pigmentaires [161-163].

Pour les poumons, un modèle récent de souris surexprimant la sous-unité bêta du canal sodique épithélial (ENaC^{+/+}) pourrait être un bon modèle pour tester cette stratégie de thérapie cellulaire. Les premiers travaux menés sur ces souris et publiés après le lancement de notre projet, ont montré que les animaux présentaient des lésions épithéliales proches de celles décrites dans les voies aériennes des patients atteints de la mucoviscidose, mais aussi un encombrement de la trachée puis des bronches par le mucus, une colonisation bactérienne, des infiltrats inflammatoires chroniques [164]. Dans une étude longitudinale menée très récemment chez ces animaux, il a été montré que l'hyperabsorption de sodium, en modifiant les propriétés du liquide de surface dans les voies aériennes, est responsable dès les premiers jours de vie de l'obstruction de la trachée par le mucus et d'une dégénération des cellules de l'épithélium de surface dans les voies aériennes. Cette dégénération se poursuit jusqu'au 3^{ème} jour après la naissance avant de disparaître chez les animaux

plus âgés (juvéniles et adultes). Cette phase de dégénération épithéliale est associée à une nécrose des cellules épithéliales, plus particulièrement des cellules de Clara, attribuée à des conditions hypoxiques [165]. Ce modèle est donc un modèle de lésions épithéliales sans régénération et permettrait alors de tester une stratégie de thérapie cellulaire de la mucoviscidose, en évaluant à la fois la capacité des cellules souches à gagner la lame basale dénudée en dépit du mucus et leur contribution à la réparation de la barrière épithéliale.

Le développement d'un emphysème plus tardivement chez les animaux adultes ENaC^{+/+} fait de ce modèle un outil également intéressant pour tester une stratégie de thérapie cellulaire du déficit en $\alpha 1$ anti-trypsine ($\alpha 1$ AT) [165]. L'enjeu de cette stratégie serait de rétablir des taux en $\alpha 1$ AT suffisants et durables pour empêcher le développement des lésions. Cela implique donc une prise de greffe massive des cellules au niveau des alvéoles. Des résultats dans ce sens ont déjà été obtenus en administrant par voie aérienne chez la souris des macrophages surexprimant le gène codant l' $\alpha 1$ AT [166].

Alors qu'à 24h le modèle polidocanol est un modèle adapté pour notre stratégie puisqu'il génère des lésions épithéliales aiguës avec abrasion de l'épithélium de surface, il devient à 7 jours, un modèle s'accompagnant de lésions de type polypoïdes dans les voies aériennes. Nous avons observé le développement de structures polypoïdes dans les bronchioles à l'issue des premières expériences avec les cellules souches mésenchymateuses issues de la lignée cellulaire. Nous avons alors vérifié que l'apparition de ces structures n'était pas liée à l'utilisation de cellules souches. Nos résultats montrent que le développement de ces structures est lié à l'injection de PDOC 2% lorsqu'elle est suivie d'une seconde injection dans les 24h. Cette réaction de l'épithélium à ce traitement est cohérente avec ce qui a été décrit chez des animaux présentant une abrasion épithéliale dans l'oreille moyenne (chez le rat [167, 168]) ou dans le sinus maxillaire (chez le lapin [169]). Dans ces travaux, les auteurs montrent que l'abrasion mécanique de l'épithélium serait à l'origine du développement de polypes. La perte de continuité épithéliale occasionnée par une agression, en

l'occurrence les injections successives de PDOC puis de PBS ou de cellules souches dans notre modèle, serait suivie d'une dysrégulation de la réparation épithéliale [169], conduisant à la formation de ces structures polypoïdes.

La recherche du modèle animal idéal s'accompagne également de la recherche du vecteur idéal destiné à suivre les cellules *in vivo*. Nos résultats s'accordent à montrer que le vecteur idéal est en réalité dépendant du type de cellules utilisées et des expériences ultérieures. Plusieurs vecteurs non-viraux ont été utilisés pour transfecter efficacement les cellules souches issues de lignées cellulaires ou issues de cultures primaires. L'utilisation de ces vecteurs non viraux a permis d'estimer le pourcentage de cellules vivantes dans les voies aériennes. Les vecteurs viraux ont été préférés pour localiser les cellules souches *in vivo* à 24h et à 7 jours. Il serait encore possible d'améliorer l'efficacité du transfert de gène en modifiant les conditions techniques du transfert de gène lui-même : ainsi de meilleurs résultats ont été obtenus récemment en procédant au transfert de gène avec un vecteur lentiviral sur des CSM en suspension, obtenues après une décongélation ou un traitement avec la trypsine [130]. L'utilisation de promoteurs spécifiques en amont du gène rapporteur serait également un moyen d'obtenir une meilleure efficacité de transfert de gène. Dans notre étude, des promoteurs ubiquitaires tels que le promoteur CMV (common cytomegalovirus) étaient présents dans les constructions utilisées pour le transfert de gène. Cependant, des travaux de thérapie génique avec administration de solutions d'ADN dans les poumons ont montré une régulation négative de l'expression du transgène lorsqu'il est sous contrôle de ce promoteur [170]. Ceci peut être surmonté par l'utilisation de promoteurs dépourvus d'îlots CpG permettant une expression durable du transgène dans les poumons [171]. L'adaptation des constructions au tissu visé serait un moyen de favoriser l'expression du transgène dans les cellules souches lorsqu'elles sont implantées. Ainsi, l'utilisation de CSM issues de souris transgéniques exprimant la GFP sous le contrôle d'un promoteur épithélial (promoteur de la cytokératine 18) a permis de prolonger la

détection de la présence de cellules GFP positives dans les voies aériennes jusqu'à 120 jours après leur injection intratrachéale [101].

Dans cette étude, nous avons utilisé des cellules à l'état indifférencié. Des cellules différenciées ou engagées dans la voie de différenciation épithéliale pulmonaire pourraient également être utilisées. Des études *in vitro* de cocultures de cellules souches et de cellules épithéliales pulmonaires, en interface air-liquide, ont montré l'importance de l'environnement dans l'induction de cette différenciation [172]. Un environnement tridimensionnel (3D), sous la forme d'hydrogel par exemple, s'est avéré pertinent *ex-vivo* pour étudier la morphogenèse et le développement des poumons [173, 174]. Un nouveau domaine de recherche sur la différenciation pulmonaire consisterait à cultiver des cellules souches dans des matrices 3D pour stimuler cette voie de différenciation. Des CSM cultivées dans des matrices 3D particulières ont été capables de donner naissance à du cartilage utilisé dans différentes indications thérapeutiques [175, 176]. Dans le cas du tissu pulmonaire, des structures alvéolaires ont également été obtenues à partir de cultures 3D de cellules fœtales de souris et de rats [177, 178]. Cette approche d'ingénierie tissulaire est également à l'étude dans le laboratoire dans le cadre d'un projet de thérapie cellulaire cardiaque.

L'identification de progéniteurs résidents dans les poumons, les nombreuses démonstrations de la capacité de différenciation de cellules souches exogènes aux poumons en cellules épithéliales des voies aériennes encouragent le développement d'une stratégie de thérapie cellulaire pour traiter les maladies respiratoires. Néanmoins, les études *in vivo* ont abouti à des résultats controversés. L'utilisation récente de la voie aérienne s'est avérée plus efficace que la voie systémique pour apporter les cellules souches dans les voies aériennes. Cependant leur prise de greffe et leur différenciation demeurent limitées quels que soient le modèle animal et la voie d'administration. Pour surmonter ces difficultés, plusieurs stratégies sont possibles : utiliser des modèles animaux transgéniques, plus proches des pathologies humaines, qui permettront de conclure quand à l'effet

thérapeutique réel de ces cellules, intensifier les recherches sur la différenciation épithéliale pulmonaire des cellules souches en utilisant des modèles de cultures 3D et tenter ainsi d'élaborer un tissu fonctionnel. Contrairement à d'autres organes tels que l'os ou le cœur, la thérapie cellulaire des maladies respiratoires ne fait que commencer !

7 BIBLIOGRAPHIE

1. Mimeault, M, Hauke, R, and Batra, SK, *Stem cells: a revolution in therapeutics-recent advances in stem cell biology and their therapeutic applications in regenerative medicine and cancer therapies*. Clin Pharmacol Ther, 2007. **82**(3): p. 252-64.
2. Horwitz, EM, Prockop, DJ, Fitzpatrick, LA, Koo, WW, Gordon, PL, Neel, M, Sussman, M, Orchard, P, Marx, JC, Pyeritz, RE, and Brenner, MK, *Transplantability and therapeutic effects of bone marrow-derived mesenchymal cells in children with osteogenesis imperfecta*. Nat Med, 1999. **5**(3): p. 309-13.
3. Horwitz, EM, Prockop, DJ, Gordon, PL, Koo, WW, Fitzpatrick, LA, Neel, MD, McCarville, ME, Orchard, PJ, Pyeritz, RE, and Brenner, MK, *Clinical responses to bone marrow transplantation in children with severe osteogenesis imperfecta*. Blood, 2001. **97**(5): p. 1227-31.
4. Koc, ON, Day, J, Nieder, M, Gerson, SL, Lazarus, HM, and Krivit, W, *Allogeneic mesenchymal stem cell infusion for treatment of metachromatic leukodystrophy (MLD) and Hurler syndrome (MPS-IH)*. Bone Marrow Transplant, 2002. **30**(4): p. 215-22.
5. Sun, S, Schiller, JH, and Gazdar, AF, *Lung cancer in never smokers--a different disease*. Nat Rev Cancer, 2007. **7**(10): p. 778-90.
6. Kerem, B, Rommens, JM, Buchanan, JA, Markiewicz, D, Cox, TK, Chakravarti, A, Buchwald, M, and Tsui, LC, *Identification of the cystic fibrosis gene: genetic analysis*. Science, 1989. **245**(4922): p. 1073-80.
7. Riordan, JR, Rommens, JM, Kerem, B, Alon, N, Rozmahel, R, Grzelczak, Z, Zielenski, J, Lok, S, Plavsic, N, Chou, JL, and et al., *Identification of the cystic fibrosis gene: cloning and characterization of complementary DNA*. Science, 1989. **245**(4922): p. 1066-73.
8. Rommens, JM, Iannuzzi, MC, Kerem, B, Drumm, ML, Melmer, G, Dean, M, Rozmahel, R, Cole, JL, Kennedy, D, Hidaka, N, and et al., *Identification of the cystic fibrosis gene: chromosome walking and jumping*. Science, 1989. **245**(4922): p. 1059-65.
9. Durieu, I, Peyrol, S, Gindre, D, Bellon, G, Durand, DV, and Pacheco, Y, *Subepithelial fibrosis and degradation of the bronchial extracellular matrix in cystic fibrosis*. Am J Respir Crit Care Med, 1998. **158**(2): p. 580-8.
10. Hubeau, C, Lorenzato, M, Couetil, JP, Hubert, D, Dusser, D, Puchelle, E, and Gaillard, D, *Quantitative analysis of inflammatory cells infiltrating the cystic fibrosis airway mucosa*. Clin Exp Immunol, 2001. **124**(1): p. 69-76.
11. Theegarten, D, Anhehn, O, Hotzel, H, Wagner, M, Marra, A, Stamatis, G, Mogilevski, G, and Sachse, K, *A comparative ultrastructural and molecular biological study on Chlamydia psittaci infection in alpha-1 antitrypsin deficiency and non-alpha-1 antitrypsin deficiency emphysema versus lung tissue of patients with hamartochondroma*. BMC Infect Dis, 2004. **4**: p. 38.

12. Liu, X, Driskell, RR, and Engelhardt, JF, *Stem cells in the lung*. Methods Enzymol, 2006. **419**: p. 285-321.
13. Smith, LJ, *Hyperoxic lung injury: biochemical, cellular, and morphologic characterization in the mouse*. J Lab Clin Med, 1985. **106**(3): p. 269-78.
14. Meulenbelt, J, Dormans, JA, Marra, M, Rombout, PJ, and Sangster, B, *Rat model to investigate the treatment of acute nitrogen dioxide intoxication*. Hum Exp Toxicol, 1992. **11**(3): p. 179-87.
15. Asmundsson, T, Kilburn, KH, and McKenzie, WN, *Injury and metaplasia of airway cells due to SO₂*. Lab Invest, 1973. **29**(1): p. 41-53.
16. Langley-Evans, SC, Phillips, GJ, and Jackson, AA, *Sulphur dioxide: a potent glutathione depleting agent*. Comp Biochem Physiol C Pharmacol Toxicol Endocrinol, 1996. **114**(2): p. 89-98.
17. Parsons, DW, Grubb, BR, Johnson, LG, and Boucher, RC, *Enhanced in vivo airway gene transfer via transient modification of host barrier properties with a surface-active agent*. Hum Gene Ther, 1998. **9**(18): p. 2661-72.
18. Borthwick, DW, Shahbazian, M, Krantz, QT, Dorin, JR, and Randell, SH, *Evidence for stem-cell niches in the tracheal epithelium*. Am J Respir Cell Mol Biol, 2001. **24**(6): p. 662-70.
19. Reynolds, SD, Hong, KU, Giangreco, A, Mango, GW, Guron, C, Morimoto, Y, and Stripp, BR, *Conditional clara cell ablation reveals a self-renewing progenitor function of pulmonary neuroendocrine cells*. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2000. **278**(6): p. L1256-63.
20. West, JA, Pakehham, G, Morin, D, Fleschner, CA, Buckpitt, AR, and Plopper, CG, *Inhaled naphthalene causes dose dependent Clara cell cytotoxicity in mice but not in rats*. Toxicol Appl Pharmacol, 2001. **173**(2): p. 114-9.
21. Bigby, TD, Allen, D, Leslie, CG, Henson, PM, and Cherniack, RM, *Bleomycin-induced lung injury in the rabbit. Analysis and correlation of bronchoalveolar lavage, morphometrics, and fibroblast stimulating activity*. Am Rev Respir Dis, 1985. **132**(3): p. 590-5.
22. Dubaybo, BA, Crowell, LA, and Thet, LA, *Changes in tissue fibronectin in elastase induced lung injury*. Cell Biol Int Rep, 1991. **15**(8): p. 675-86.
23. Tucker, SL and Travis, EL, *Time course for the hazard of radiation-induced pneumonitis death in mice*. Int J Radiat Biol, 1992. **62**(5): p. 627-39.
24. Theise, ND, Henegariu, O, Grove, J, Jagirdar, J, Kao, PN, Crawford, JM, Badve, S, Saxena, R, and Krause, DS, *Radiation pneumonitis in mice: a severe injury model for pneumocyte engraftment from bone marrow*. Exp Hematol, 2002. **30**(11): p. 1333-8.
25. Hong, KU, Reynolds, SD, Watkins, S, Fuchs, E, and Stripp, BR, *In vivo differentiation potential of tracheal basal cells: evidence for multipotent and unipotent subpopulations*. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2004. **286**(4): p. L643-9.

26. Hong, KU, Reynolds, SD, Giangreco, A, Hurley, CM, and Stripp, BR, *Clara cell secretory protein-expressing cells of the airway neuroepithelial body microenvironment include a label-retaining subset and are critical for epithelial renewal after progenitor cell depletion*. Am J Respir Cell Mol Biol, 2001. **24**(6): p. 671-81.
27. Giangreco, A, Reynolds, SD, and Stripp, BR, *Terminal bronchioles harbor a unique airway stem cell population that localizes to the bronchoalveolar duct junction*. Am J Pathol, 2002. **161**(1): p. 173-82.
28. Engelhardt, JF, Allen, ED, and Wilson, JM, *Reconstitution of tracheal grafts with a genetically modified epithelium*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1991. **88**(24): p. 11192-6.
29. Engelhardt, JF, Schlossberg, H, Yankaskas, JR, and Dudus, L, *Progenitor cells of the adult human airway involved in submucosal gland development*. Development, 1995. **121**(7): p. 2031-46.
30. Engelhardt, JF, Yankaskas, JR, and Wilson, JM, *In vivo retroviral gene transfer into human bronchial epithelia of xenografts*. J Clin Invest, 1992. **90**(6): p. 2598-607.
31. Presente, A, Sehgal, A, Dudus, L, and Engelhardt, JF, *Differentially regulated epithelial expression of an Eph family tyrosine kinase (fHek2) during tracheal surface airway and submucosal gland development*. Am J Respir Cell Mol Biol, 1997. **16**(1): p. 53-61.
32. Sehgal, A, Presente, A, and Engelhardt, JF, *Developmental expression patterns of CFTR in ferret tracheal surface airway and submucosal gland epithelia*. Am J Respir Cell Mol Biol, 1996. **15**(1): p. 122-31.
33. Duan, D, Sehgal, A, Yao, J, and Engelhardt, JF, *Lef1 transcription factor expression defines airway progenitor cell targets for in utero gene therapy of submucosal gland in cystic fibrosis*. Am J Respir Cell Mol Biol, 1998. **18**(6): p. 750-8.
34. Dupuit, F, Gaillard, D, Hinnrasky, J, Mongodin, E, de Bentzmann, S, Copreni, E, and Puchelle, E, *Differentiated and functional human airway epithelium regeneration in tracheal xenografts*. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2000. **278**(1): p. L165-76.
35. Hajj, R, Baranek, T, Le Naour, R, Lesimple, P, Puchelle, E, and Coraux, C, *Basal cells of the human adult airway surface epithelium retain transit-amplifying cell properties*. Stem Cells, 2007. **25**(1): p. 139-48.
36. Evans, MJ and Kaufman, MH, *Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos*. Nature, 1981. **292**(5819): p. 154-6.
37. Williams, RL, Hilton, DJ, Pease, S, Willson, TA, Stewart, CL, Gearing, DP, Wagner, EF, Metcalf, D, Nicola, NA, and Gough, NM, *Myeloid leukaemia inhibitory factor maintains the developmental potential of embryonic stem cells*. Nature, 1988. **336**(6200): p. 684-7.
38. Lanza, R and Rosenthal, N, *The stem cell challenge*. Sci Am, 2004. **290**(6): p. 92-9.
39. Ali, NN, Edgar, AJ, Samadikuchaksaraei, A, Timson, CM, Romanska, HM, Polak, JM, and Bishop, AE, *Derivation of type II alveolar epithelial cells from murine embryonic stem cells*. Tissue Eng, 2002. **8**(4): p. 541-50.

40. Coraux, C, Nawrocki-Raby, B, Hinnrasky, J, Kileztky, C, Gaillard, D, Dani, C, and Puchelle, E, *Embryonic stem cells generate airway epithelial tissue*. Am J Respir Cell Mol Biol, 2005. **32**(2): p. 87-92.
41. Rippon, HJ, Lane, S, Qin, M, Ismail, NS, Wilson, MR, Takata, M, and Bishop, AE, *Embryonic stem cells as a source of pulmonary epithelium in vitro and in vivo*. Proc Am Thorac Soc, 2008. **5**(6): p. 717-22.
42. Friedenstein, AJ, Chailakhjan, RK, and Lalykina, KS, *The development of fibroblast colonies in monolayer cultures of guinea-pig bone marrow and spleen cells*. Cell Tissue Kinet, 1970. **3**(4): p. 393-403.
43. Prockop, DJ, *Marrow stromal cells as stem cells for nonhematopoietic tissues*. Science, 1997. **276**(5309): p. 71-4.
44. Pittenger, MF, Mackay, AM, Beck, SC, Jaiswal, RK, Douglas, R, Mosca, JD, Moorman, MA, Simonetti, DW, Craig, S, and Marshak, DR, *Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells*. Science, 1999. **284**(5411): p. 143-7.
45. Dominici, M, Le Blanc, K, Mueller, I, Slaper-Cortenbach, I, Marini, F, Krause, D, Deans, R, Keating, A, Prockop, D, and Horwitz, E, *Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement*. Cytotherapy, 2006. **8**(4): p. 315-7.
46. Peister, A, Mellad, JA, Larson, BL, Hall, BM, Gibson, LF, and Prockop, DJ, *Adult stem cells from bone marrow (MSCs) isolated from different strains of inbred mice vary in surface epitopes, rates of proliferation, and differentiation potential*. Blood, 2004. **103**(5): p. 1662-8.
47. Kolf, CM, Cho, E, and Tuan, RS, *Mesenchymal stromal cells. Biology of adult mesenchymal stem cells: regulation of niche, self-renewal and differentiation*. Arthritis Res Ther, 2007. **9**(1): p. 204.
48. Sensebe, L, *Clinical grade production of mesenchymal stem cells*. Biomed Mater Eng, 2008. **18**(1 Suppl): p. S3-10.
49. Colter, DC, Class, R, DiGirolamo, CM, and Prockop, DJ, *Rapid expansion of recycling stem cells in cultures of plastic-adherent cells from human bone marrow*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2000. **97**(7): p. 3213-8.
50. Koc, ON, Gerson, SL, Cooper, BW, Dyhouse, SM, Haynesworth, SE, Caplan, AI, and Lazarus, HM, *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**(2): p. 307-16.
51. Le Blanc, K, Rasmusson, I, Sundberg, B, Gotherstrom, C, Hassan, M, Uzunel, M, and Ringden, O, *Treatment of severe acute graft-versus-host disease with third party haploidentical mesenchymal stem cells*. Lancet, 2004. **363**(9419): p. 1439-41.
52. Ning, H, Yang, F, Jiang, M, Hu, L, Feng, K, Zhang, J, Yu, Z, Li, B, Xu, C, Li, Y, Wang, J, Hu, J, Lou, X, and Chen, H, *The correlation between cotransplantation of mesenchymal*

stem cells and higher recurrence rate in hematologic malignancy patients: outcome of a pilot clinical study. Leukemia, 2008. **22**(3): p. 593-9.

53. Uccelli, A, Moretta, L, and Pistoia, V, *Mesenchymal stem cells in health and disease.* Nat Rev Immunol, 2008. **8**: p. 726-736.
54. Prockop, DJ and Olson, SD, *Clinical trials with adult stem/progenitor cells for tissue repair: let's not overlook some essential precautions.* Blood, 2007. **109**(8): p. 3147-51.
55. Kogler, G, Sensken, S, Airey, JA, Trapp, T, Muschen, M, Feldhahn, N, Liedtke, S, Sorg, RV, Fischer, J, Rosenbaum, C, Greschat, S, Knipper, A, Bender, J, Degistirici, O, Gao, J, Caplan, AI, Colletti, EJ, Almeida-Porada, G, Muller, HW, Zanjani, E, and Wernet, P, *A new human somatic stem cell from placental cord blood with intrinsic pluripotent differentiation potential.* J Exp Med, 2004. **200**(2): p. 123-35.
56. Kogler, G, Sensken, S, and Wernet, P, *Comparative generation and characterization of pluripotent unrestricted somatic stem cells with mesenchymal stem cells from human cord blood.* Exp Hematol, 2006. **34**(11): p. 1589-95.
57. Rubinstein, P, *Why cord blood?* Hum Immunol, 2006. **67**(6): p. 398-404.
58. Gluckman, E, Broxmeyer, HA, Auerbach, AD, Friedman, HS, Douglas, GW, Devergie, A, Esperou, H, Thierry, D, Socie, G, Lehn, P, and et al., *Hematopoietic reconstitution in a patient with Fanconi's anemia by means of umbilical-cord blood from an HLA-identical sibling.* N Engl J Med, 1989. **321**(17): p. 1174-8.
59. Wagner, JE, Kernan, NA, Steinbuch, M, Broxmeyer, HE, and Gluckman, E, *Allogeneic sibling umbilical-cord-blood transplantation in children with malignant and non-malignant disease.* Lancet, 1995. **346**(8969): p. 214-9.
60. Deng, W, Obrocka, M, Fischer, I, and Prockop, DJ, *In vitro differentiation of human marrow stromal cells into early progenitors of neural cells by conditions that increase intracellular cyclic AMP.* Biochem Biophys Res Commun, 2001. **282**(1): p. 148-52.
61. Kotton, DN, Ma, BY, Cardoso, WV, Sanderson, EA, Summer, RS, Williams, MC, and Fine, A, *Bone marrow-derived cells as progenitors of lung alveolar epithelium.* Development, 2001. **128**(24): p. 5181-8.
62. Jiang, Y, Jahagirdar, BN, Reinhardt, RL, Schwartz, RE, Keene, CD, Ortiz-Gonzalez, XR, Reyes, M, Lenvik, T, Lund, T, Blackstad, M, Du, J, Aldrich, S, Lisberg, A, Low, WC, Largaespada, DA, and Verfaillie, CM, *Pluripotency of mesenchymal stem cells derived from adult marrow.* Nature, 2002. **418**(6893): p. 41-9.
63. Wang, G, Bunnell, BA, Painter, RG, Quiniones, BC, Tom, S, Lanson, NA, Jr., Spees, JL, Bertucci, D, Peister, A, Weiss, DJ, Valentine, VG, Prockop, DJ, and Kolls, JK, *Adult stem cells from bone marrow stroma differentiate into airway epithelial cells: potential therapy for cystic fibrosis.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2005. **102**(1): p. 186-91.
64. Sueblinvong, V, Loi, R, Eisenhauer, PL, Bernstein, IM, Suratt, BT, Spees, JL, and Weiss, DJ, *Derivation of lung epithelium from human cord blood-derived mesenchymal stem cells.* Am J Respir Crit Care Med, 2008. **177**(7): p. 701-11.

65. Berger, MJ, Adams, SD, Tigges, BM, Sprague, SL, Wang, XJ, Collins, DP, and McKenna, DH, *Differentiation of umbilical cord blood-derived multilineage progenitor cells into respiratory epithelial cells*. *Cytotherapy*, 2006. **8**(5): p. 480-7.
66. Krause, DS, Theise, ND, Collector, MI, Henegariu, O, Hwang, S, Gardner, R, Neutzel, S, and Sharkis, SJ, *Multi-organ, multi-lineage engraftment by a single bone marrow-derived stem cell*. *Cell*, 2001. **105**(3): p. 369-77.
67. Grove, JE, Lutzko, C, Priller, J, Henegariu, O, Theise, ND, Kohn, DB, and Krause, DS, *Marrow-derived cells as vehicles for delivery of gene therapy to pulmonary epithelium*. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 2002. **27**(6): p. 645-51.
68. MacPherson, H, Keir, P, Webb, S, Samuel, K, Boyle, S, Bickmore, W, Forrester, L, and Dorin, J, *Bone marrow-derived SP cells can contribute to the respiratory tract of mice in vivo*. *J Cell Sci*, 2005. **118**(Pt 11): p. 2441-50.
69. Beckett, T, Loi, R, Prenovitz, R, Poynter, M, Goncz, KK, Suratt, BT, and Weiss, DJ, *Acute lung injury with endotoxin or NO₂ does not enhance development of airway epithelium from bone marrow*. *Mol Ther*, 2005. **12**(4): p. 680-6.
70. Rojas, M, Xu, J, Woods, CR, Mora, AL, Spears, W, Roman, J, and Brigham, KL, *Bone marrow-derived mesenchymal stem cells in repair of the injured lung*. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 2005. **33**(2): p. 145-52.
71. Loi, R, Beckett, T, Goncz, KK, Suratt, BT, and Weiss, DJ, *Limited restoration of cystic fibrosis lung epithelium in vivo with adult bone marrow-derived cells*. *Am J Respir Crit Care Med*, 2006. **173**(2): p. 171-9.
72. Bruscia, EM, Price, JE, Cheng, EC, Weiner, S, Caputo, C, Ferreira, EC, Egan, ME, and Krause, DS, *Assessment of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR) activity in CFTR-null mice after bone marrow transplantation*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2006. **103**(8): p. 2965-70.
73. Aliotta, JM, Keaney, P, Passero, M, Dooner, MS, Pimentel, J, Greer, D, Demers, D, Foster, B, Peterson, A, Dooner, G, Theise, ND, Abedi, M, Colvin, GA, and Quesenberry, PJ, *Bone marrow production of lung cells: the impact of G-CSF, cardiotoxin, graded doses of irradiation, and subpopulation phenotype*. *Exp Hematol*, 2006. **34**(2): p. 230-41.
74. MacPherson, H, Keir, PA, Edwards, CJ, Webb, S, and Dorin, JR, *Following damage, the majority of bone marrow-derived airway cells express an epithelial marker*. *Respir Res*, 2006. **7**: p. 145.
75. Herzog, EL, Van Arnem, J, Hu, B, and Krause, DS, *Threshold of lung injury required for the appearance of marrow-derived lung epithelia*. *Stem Cells*, 2006. **24**(8): p. 1986-92.
76. Ortiz, LA, Gambelli, F, McBride, C, Gaupp, D, Baddoo, M, Kaminski, N, and Phinney, DG, *Mesenchymal stem cell engraftment in lung is enhanced in response to bleomycin exposure and ameliorates its fibrotic effects*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2003. **100**(14): p. 8407-11.
77. Xu, J, Qu, J, Cao, L, Sai, Y, Chen, C, He, L, and Yu, L, *Mesenchymal stem cell-based angiopoietin-1 gene therapy for acute lung injury induced by lipopolysaccharide in mice*. *J Pathol*, 2008. **214**(4): p. 472-81.

78. Pereira, RF, Halford, KW, O'Hara, MD, Leeper, DB, Sokolov, BP, Pollard, MD, Bagasra, O, and Prockop, DJ, *Cultured adherent cells from marrow can serve as long-lasting precursor cells for bone, cartilage, and lung in irradiated mice*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1995. **92**(11): p. 4857-61.
79. Wagers, AJ, Sherwood, RI, Christensen, JL, and Weissman, IL, *Little evidence for developmental plasticity of adult hematopoietic stem cells*. Science, 2002. **297**(5590): p. 2256-9.
80. Anjos-Afonso, F, Siapati, EK, and Bonnet, D, *In vivo contribution of murine mesenchymal stem cells into multiple cell-types under minimal damage conditions*. J Cell Sci, 2004. **117**(Pt 23): p. 5655-64.
81. Serikov, VB, Popov, B, Mikhailov, VM, Gupta, N, and Matthay, MA, *Evidence of temporary airway epithelial repopulation and rare clonal formation by BM-derived cells following naphthalene injury in mice*. Anat Rec (Hoboken), 2007. **290**(9): p. 1033-45.
82. Xu, J, Woods, CR, Mora, AL, Joodi, R, Brigham, KL, Iyer, S, and Rojas, M, *Prevention of endotoxin-induced systemic response by bone marrow-derived mesenchymal stem cells in mice*. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2007. **293**(1): p. L131-41.
83. Mei, SH, McCarter, SD, Deng, Y, Parker, CH, Liles, WC, and Stewart, DJ, *Prevention of LPS-induced acute lung injury in mice by mesenchymal stem cells overexpressing angiopoietin 1*. PLoS Med, 2007. **4**(9): p. e269.
84. Kotton, DN, Fabian, AJ, and Mulligan, RC, *Failure of Bone Marrow to Reconstitute Lung Epithelium*. Am J Respir Cell Mol Biol, 2005.
85. Chang, JC, Summer, R, Sun, X, Fitzsimmons, K, and Fine, A, *Evidence That Bone Marrow Cells Do Not Contribute to the Alveolar Epithelium*. Am J Respir Cell Mol Biol, 2005.
86. Aguilar, S, Nye, E, Chan, J, Loebinger, M, Spencer-Dene, B, Fisk, N, Stamp, G, Bonnet, D, and Janes, SM, *Murine but not human mesenchymal stem cells generate osteosarcoma-like lesions in the lung*. Stem Cells, 2007. **25**(6): p. 1586-94.
87. Swenson, ES, Price, JG, Brazelton, T, and Krause, DS, *Limitations of green fluorescent protein as a cell lineage marker*. Stem Cells, 2007. **25**(10): p. 2593-600.
88. Krause, DS, *Engraftment of bone marrow-derived epithelial cells*. Ann N Y Acad Sci, 2005. **1044**: p. 117-24.
89. Loebinger, MR, Aguilar, S, and Janes, SM, *Therapeutic potential of stem cells in lung disease: progress and pitfalls*. Clin Sci (Lond), 2008. **114**(2): p. 99-108.
90. Hashimoto, N, Jin, H, Liu, T, Chensue, SW, and Phan, SH, *Bone marrow-derived progenitor cells in pulmonary fibrosis*. J Clin Invest, 2004. **113**(2): p. 243-52.
91. Kleeberger, W, Versmold, A, Rothamel, T, Glockner, S, Bredt, M, Haverich, A, Lehmann, U, and Kreipe, H, *Increased chimerism of bronchial and alveolar epithelium in human lung allografts undergoing chronic injury*. Am J Pathol, 2003. **162**(5): p. 1487-94.

92. Yamada, M, Kubo, H, Kobayashi, S, Ishizawa, K, Numasaki, M, Ueda, S, Suzuki, T, and Sasaki, H, *Bone marrow-derived progenitor cells are important for lung repair after lipopolysaccharide-induced lung injury*. J Immunol, 2004. **172**(2): p. 1266-72.
93. Ishizawa, K, Kubo, H, Yamada, M, Kobayashi, S, Numasaki, M, Ueda, S, Suzuki, T, and Sasaki, H, *Bone marrow-derived cells contribute to lung regeneration after elastase-induced pulmonary emphysema*. FEBS Lett, 2004. **556**(1-3): p. 249-52.
94. Bruscia, EM, Ziegler, EC, Price, JE, Weiner, S, Egan, ME, and Krause, DS, *Engraftment of donor-derived epithelial cells in multiple organs following bone marrow transplantation into newborn mice*. Stem Cells, 2006. **24**(10): p. 2299-308.
95. Direkze, NC, Forbes, SJ, Brittan, M, Hunt, T, Jeffery, R, Preston, SL, Poulsom, R, Hodivala-Dilke, K, Alison, MR, and Wright, NA, *Multiple organ engraftment by bone-marrow-derived myofibroblasts and fibroblasts in bone-marrow-transplanted mice*. Stem Cells, 2003. **21**(5): p. 514-20.
96. Epperly, MW, Guo, H, Gretton, JE, and Greenberger, JS, *Bone marrow origin of myofibroblasts in irradiation pulmonary fibrosis*. Am J Respir Cell Mol Biol, 2003. **29**(2): p. 213-24.
97. Phillips, RJ, Burdick, MD, Hong, K, Lutz, MA, Murray, LA, Xue, YY, Belperio, JA, Keane, MP, and Strieter, RM, *Circulating fibrocytes traffic to the lungs in response to CXCL12 and mediate fibrosis*. J Clin Invest, 2004. **114**(3): p. 438-46.
98. McAnulty, RJ, *Fibroblasts and myofibroblasts: their source, function and role in disease*. Int J Biochem Cell Biol, 2007. **39**(4): p. 666-71.
99. Yan, X, Liu, Y, Han, Q, Jia, M, Liao, L, Qi, M, and Zhao, RC, *Injured microenvironment directly guides the differentiation of engrafted Flk-1(+) mesenchymal stem cell in lung*. Exp Hematol, 2007. **35**(9): p. 1466-75.
100. Loebinger, MR, Sage, EK, and Janes, SM, *Mesenchymal stem cells as vectors for lung disease*. Proc Am Thorac Soc, 2008. **5**(6): p. 711-6.
101. Wong, AP, Dutly, AE, Sacher, A, Lee, H, Hwang, DM, Liu, M, Keshavjee, S, Hu, J, and Waddell, TK, *Targeted cell replacement with bone marrow cells for airway epithelial regeneration*. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2007. **293**(3): p. L740-52.
102. Gupta, N, Su, X, Popov, B, Lee, JW, Serikov, V, and Matthay, MA, *Intrapulmonary delivery of bone marrow-derived mesenchymal stem cells improves survival and attenuates endotoxin-induced acute lung injury in mice*. J Immunol, 2007. **179**(3): p. 1855-63.
103. Kuang, PP, Lucey, E, Rishikof, DC, Humphries, DE, Bronsnick, D, and Goldstein, RH, *Engraftment of neonatal lung fibroblasts into the normal and elastase-injured lung*. Am J Respir Cell Mol Biol, 2005. **33**(4): p. 371-7.
104. Serrano-Mollar, A, Nacher, M, Gay-Jordi, G, Closa, D, Xaubet, A, and Bulbena, O, *Intratracheal transplantation of alveolar type II cells reverses bleomycin-induced lung fibrosis*. Am J Respir Crit Care Med, 2007. **176**(12): p. 1261-8.

105. McCarter, SD, Mei, SH, Lai, PF, Zhang, QW, Parker, CH, Suen, RS, Hood, RD, Zhao, YD, Deng, Y, Han, RN, Dumont, DJ, and Stewart, DJ, *Cell-based angiopoietin-1 gene therapy for acute lung injury*. Am J Respir Crit Care Med, 2007. **175**(10): p. 1014-26.
106. Vallier, L, Rugg-Gunn, PJ, Bouhon, IA, Andersson, FK, Sadler, AJ, and Pedersen, RA, *Enhancing and diminishing gene function in human embryonic stem cells*. Stem Cells, 2004. **22**(1): p. 2-11.
107. Eiges, R, Schuldiner, M, Drukker, M, Yanuka, O, Itskovitz-Eldor, J, and Benvenisty, N, *Establishment of human embryonic stem cell-transfected clones carrying a marker for undifferentiated cells*. Curr Biol, 2001. **11**(7): p. 514-8.
108. Quenneville, SP, Chapdelaine, P, Rousseau, J, Beaulieu, J, Caron, NJ, Skuk, D, Mills, P, Olivares, EC, Calos, MP, and Tremblay, JP, *Nucleofection of muscle-derived stem cells and myoblasts with phiC31 integrase: stable expression of a full-length-dystrophin fusion gene by human myoblasts*. Mol Ther, 2004. **10**(4): p. 679-87.
109. Liu, L, Sanz, S, Heggstad, AD, Antharam, V, Notterpek, L, and Fletcher, BS, *Endothelial targeting of the Sleeping Beauty transposon within lung*. Mol Ther, 2004. **10**(1): p. 97-105.
110. Hackett, PB, Ekker, SC, Largaespada, DA, and McIvor, RS, *Sleeping beauty transposon-mediated gene therapy for prolonged expression*. Adv Genet, 2005. **54**: p. 189-232.
111. Stilwell, JL and Samulski, RJ, *Role of viral vectors and virion shells in cellular gene expression*. Mol Ther, 2004. **9**(3): p. 337-46.
112. Gerrard, L, Zhao, D, Clark, AJ, and Cui, W, *Stably transfected human embryonic stem cell clones express OCT4-specific green fluorescent protein and maintain self-renewal and pluripotency*. Stem Cells, 2005. **23**(1): p. 124-33.
113. Aluigi, M, Fogli, M, Curti, A, Isidori, A, Gruppioni, E, Chiodoni, C, Colombo, MP, Versura, P, D'Errico-Grigioni, A, Ferri, E, Baccarani, M, and Lemoli, RM, *Nucleofection is an efficient nonviral transfection technique for human bone marrow-derived mesenchymal stem cells*. Stem Cells, 2006. **24**(2): p. 454-61.
114. Benihoud, K, Yeh, P, and Perricaudet, M, *Adenovirus vectors for gene delivery*. Curr Opin Biotechnol, 1999. **10**(5): p. 440-7.
115. Bradfute, SB and Goodell, MA, *Adenoviral transduction of mouse hematopoietic stem cells*. Mol Ther, 2003. **7**(3): p. 334-40.
116. Wu, N and Ataai, MM, *Production of viral vectors for gene therapy applications*. Curr Opin Biotechnol, 2000. **11**(2): p. 205-8.
117. Reiser, J, Zhang, XY, Hemenway, CS, Mondal, D, Pradhan, L, and La Russa, VF, *Potential of mesenchymal stem cells in gene therapy approaches for inherited and acquired diseases*. Expert Opin Biol Ther, 2005. **5**(12): p. 1571-84.
118. Smith-Arica, JR, Thomson, AJ, Ansell, R, Chiorini, J, Davidson, B, and McWhir, J, *Infection efficiency of human and mouse embryonic stem cells using adenoviral and adeno-associated viral vectors*. Cloning Stem Cells, 2003. **5**(1): p. 51-62.

119. Olmsted-Davis, EA, Gugala, Z, Gannon, FH, Yotnda, P, McAlhany, RE, Lindsey, RW, and Davis, AR, *Use of a chimeric adenovirus vector enhances BMP2 production and bone formation*. Hum Gene Ther, 2002. **13**(11): p. 1337-47.
120. Ito, H, Goater, JJ, Tiyyapattanaputi, P, Rubery, PT, O'Keefe, RJ, and Schwarz, EM, *Light-activated gene transduction of recombinant adeno-associated virus in human mesenchymal stem cells*. Gene Ther, 2004. **11**(1): p. 34-41.
121. Kumar, S, Mahendra, G, Nagy, TR, and Ponnazhagan, S, *Osteogenic differentiation of recombinant adeno-associated virus 2-transduced murine mesenchymal stem cells and development of an immunocompetent mouse model for ex vivo osteoporosis gene therapy*. Hum Gene Ther, 2004. **15**(12): p. 1197-206.
122. Kumar, S, Mahendra, G, and Ponnazhagan, S, *Determination of osteoprogenitor-specific promoter activity in mouse mesenchymal stem cells by recombinant adeno-associated virus transduction*. Biochim Biophys Acta, 2005. **1731**(2): p. 95-103.
123. Stender, S, Murphy, M, O'Brien, T, Stengaard, C, Ulrich-Vinther, M, Soballe, K, and Barry, F, *Adeno-associated viral vector transduction of human mesenchymal stem cells*. Eur Cell Mater, 2007. **13**: p. 93-9; discussion 99.
124. Lebkowski, JS, Gold, J, Xu, C, Funk, W, Chiu, CP, and Carpenter, MK, *Human embryonic stem cells: culture, differentiation, and genetic modification for regenerative medicine applications*. Cancer J, 2001. **7 Suppl 2**: p. S83-93.
125. Schwarz, EJ, Alexander, GM, Prockop, DJ, and Azizi, SA, *Multipotential marrow stromal cells transduced to produce L-DOPA: engraftment in a rat model of Parkinson disease*. Hum Gene Ther, 1999. **10**(15): p. 2539-49.
126. Chuah, MK, Van Damme, A, Zwinnen, H, Goovaerts, I, Vanslembrouck, V, Collen, D, and Vandendriessche, T, *Long-term persistence of human bone marrow stromal cells transduced with factor VIII-retroviral vectors and transient production of therapeutic levels of human factor VIII in nonmyeloablated immunodeficient mice*. Hum Gene Ther, 2000. **11**(5): p. 729-38.
127. Gropp, M, Itsykson, P, Singer, O, Ben-Hur, T, Reinhartz, E, Galun, E, and Reubinoff, BE, *Stable genetic modification of human embryonic stem cells by lentiviral vectors*. Mol Ther, 2003. **7**(2): p. 281-7.
128. Ma, Y, Ramezani, A, Lewis, R, Hawley, RG, and Thomson, JA, *High-level sustained transgene expression in human embryonic stem cells using lentiviral vectors*. Stem Cells, 2003. **21**(1): p. 111-7.
129. Kosaka, Y, Kobayashi, N, Fukazawa, T, Totsugawa, T, Maruyama, M, Yong, C, Arata, T, Ikeda, H, Kobayashi, K, Ueda, T, Kurabayashi, Y, and Tanaka, N, *Lentivirus-based gene delivery in mouse embryonic stem cells*. Artif Organs, 2004. **28**(3): p. 271-7.
130. Ricks, DM, Kutner, R, Zhang, XY, Welsh, DA, and Reiser, J, *Optimized lentiviral transduction of mouse bone marrow-derived mesenchymal stem cells*. Stem Cells Dev, 2008. **17**(3): p. 441-50.

131. Chan, J, O'Donoghue, K, de la Fuente, J, Roberts, IA, Kumar, S, Morgan, JE, and Fisk, NM, *Human fetal mesenchymal stem cells as vehicles for gene delivery*. Stem Cells, 2005. **23**(1): p. 93-102.
132. Zhang, XY, La Russa, VF, and Reiser, J, *Transduction of bone-marrow-derived mesenchymal stem cells by using lentivirus vectors pseudotyped with modified RD114 envelope glycoproteins*. J Virol, 2004. **78**(3): p. 1219-29.
133. Boussif, O, Lezoualc'h, F, Zanta, MA, Mergny, MD, Scherman, D, Demeneix, B, and Behr, JP, *A versatile vector for gene and oligonucleotide transfer into cells in culture and in vivo: polyethylenimine*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1995. **92**(16): p. 7297-301.
134. Clamme, JP, Azoulay, J, and Mely, Y, *Monitoring of the formation and dissociation of polyethylenimine/DNA complexes by two photon fluorescence correlation spectroscopy*. Biophys J, 2003. **84**(3): p. 1960-8.
135. Ma, H, Liu, Q, Diamond, SL, and Pierce, EA, *Mouse embryonic stem cells efficiently lipofected with nuclear localization peptide result in a high yield of chimeric mice and retain germline transmission potency*. Methods, 2004. **33**(2): p. 113-20.
136. Chung, S, Andersson, T, Sonntag, KC, Bjorklund, L, Isacson, O, and Kim, KS, *Analysis of different promoter systems for efficient transgene expression in mouse embryonic stem cell lines*. Stem Cells, 2002. **20**(2): p. 139-45.
137. Ward, CM and Stern, PL, *The human cytomegalovirus immediate-early promoter is transcriptionally active in undifferentiated mouse embryonic stem cells*. Stem Cells, 2002. **20**(5): p. 472-5.
138. Siemen, H, Nix, M, Endl, E, Koch, P, Itskovitz-Eldor, J, and Brustle, O, *Nucleofection of human embryonic stem cells*. Stem Cells Dev, 2005. **14**(4): p. 378-83.
139. Singh Roy, N, Nakano, T, Xuing, L, Kang, J, Nedergaard, M, and Goldman, SA, *Enhancer-specified GFP-based FACS purification of human spinal motor neurons from embryonic stem cells*. Exp Neurol, 2005. **196**(2): p. 224-34.
140. Hoelters, J, Ciccarella, M, Drechsel, M, Geissler, C, Gulkan, H, Bocker, W, Schieker, M, Jochum, M, and Neth, P, *Nonviral genetic modification mediates effective transgene expression and functional RNA interference in human mesenchymal stem cells*. J Gene Med, 2005. **7**(6): p. 718-28.
141. Tan, SM and Droge, P, *Comparative analysis of sequence-specific DNA recombination systems in human embryonic stem cells*. Stem Cells, 2005. **23**(7): p. 868-73.
142. Hosseinkhani, H, Hosseinkhani, M, Khademhosseini, A, and Kobayashi, H, *Bone regeneration through controlled release of bone morphogenetic protein-2 from 3-D tissue engineered nano-scaffold*. J Control Release, 2007. **117**(3): p. 380-6.
143. Aluigi, MG, Angelini, C, Falugi, C, Fossa, R, Genever, P, Gallus, L, Layer, PG, Prestipino, G, Rakonczay, Z, Sgro, M, Thielecke, H, and Trombino, S, *Interaction between organophosphate compounds and cholinergic functions during development*. Chem Biol Interact, 2005. **157-158**: p. 305-16.

144. Zerneck, A, Erl, W, Fraemohs, L, Lietz, M, and Weber, C, *Suppression of endothelial adhesion molecule up-regulation with cyclopentenone prostaglandins is dissociated from IkappaB-alpha kinase inhibition and cell death induction*. *Faseb J*, 2003. **17**(9): p. 1099-101.
145. Rols, MP and Teissie, J, *Electroporation of mammalian cells. Quantitative analysis of the phenomenon*. *Biophys J*, 1990. **58**(5): p. 1089-98.
146. Lakshmipathy, U, Pelacho, B, Sudo, K, Linehan, JL, Coucouvanis, E, Kaufman, DS, and Verfaillie, CM, *Efficient transfection of embryonic and adult stem cells*. *Stem Cells*, 2004. **22**(4): p. 531-43.
147. Lorenz, P, Harnack, U, and Morgenstern, R, *Efficient gene transfer into murine embryonic stem cells by nucleofection*. *Biotechnol Lett*, 2004. **26**(20): p. 1589-92.
148. Tompers, DM and Labosky, PA, *Electroporation of murine embryonic stem cells: a step-by-step guide*. *Stem Cells*, 2004. **22**(3): p. 243-9.
149. Peister, A, Mellad, JA, Wang, M, Tucker, HA, and Prockop, DJ, *Stable transfection of MSCs by electroporation*. *Gene Ther*, 2004. **11**(2): p. 224-8.
150. Fuchs, E, Tumber, T, and Guasch, G, *Socializing with the neighbors: stem cells and their niche*. *Cell*, 2004. **116**(6): p. 769-78.
151. Nikolova, G, Jabs, N, Konstantinova, I, Domogatskaya, A, Tryggvason, K, Sorokin, L, Fassler, R, Gu, G, Gerber, HP, Ferrara, N, Melton, DA, and Lammert, E, *The vascular basement membrane: a niche for insulin gene expression and Beta cell proliferation*. *Dev Cell*, 2006. **10**(3): p. 397-405.
152. Stripp, BR, Maxson, K, Mera, R, and Singh, G, *Plasticity of airway cell proliferation and gene expression after acute naphthalene injury*. *Am J Physiol*, 1995. **269**(6 Pt 1): p. L791-9.
153. Nagy, A, Rossant, J, Nagy, R, Abramow-Newerly, W, and Roder, JC, *Derivation of completely cell culture-derived mice from early-passage embryonic stem cells*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1993. **90**(18): p. 8424-8.
154. Dennis, JE and Caplan, AI, *Differentiation potential of conditionally immortalized mesenchymal progenitor cells from adult marrow of a H-2Kb-tsA58 transgenic mouse*. *J Cell Physiol*, 1996. **167**(3): p. 523-38.
155. Moreau, JF, Donaldson, DD, Bennett, F, Witek-Giannotti, J, Clark, SC, and Wong, GG, *Leukaemia inhibitory factor is identical to the myeloid growth factor human interleukin for DA cells*. *Nature*, 1988. **336**(6200): p. 690-2.
156. Bell, P, Limberis, M, Gao, G, Wu, D, Bove, MS, Sanmiguel, JC, and Wilson, JM, *An optimized protocol for detection of E. coli beta-galactosidase in lung tissue following gene transfer*. *Histochem Cell Biol*, 2005. **124**(1): p. 77-85.
157. Cany, J, Avril, A, Pichard, V, Aubert, D, Ferry, N, and Conchon, S, *A transgenic mouse with beta-Galactosidase as a fetal liver self-antigen for immunotherapy studies*. *J Hepatol*, 2007. **47**(3): p. 396-403.

158. Desigaux, L, Gourden, C, Bello-Roufai, M, Richard, P, Oudrhiri, N, Lehn, P, Escande, D, Pollard, H, and Pitard, B, *Nonionic amphiphilic block copolymers promote gene transfer to the lung*. Hum Gene Ther, 2005. **16**(7): p. 821-9.
159. D'Cruz, PM, Yasumura, D, Weir, J, Matthes, MT, Abderrahim, H, LaVail, MM, and Vollrath, D, *Mutation of the receptor tyrosine kinase gene Mertk in the retinal dystrophic RCS rat*. Hum Mol Genet, 2000. **9**(4): p. 645-51.
160. Humphries, MM, Rancourt, D, Farrar, GJ, Kenna, P, Hazel, M, Bush, RA, Sieving, PA, Sheils, DM, McNally, N, Creighton, P, Erven, A, Boros, A, Gulya, K, Capecchi, MR, and Humphries, P, *Retinopathy induced in mice by targeted disruption of the rhodopsin gene*. Nat Genet, 1997. **15**(2): p. 216-9.
161. Inoue, Y, Iriyama, A, Ueno, S, Takahashi, H, Kondo, M, Tamaki, Y, Araie, M, and Yanagi, Y, *Subretinal transplantation of bone marrow mesenchymal stem cells delays retinal degeneration in the RCS rat model of retinal degeneration*. Exp Eye Res, 2007. **85**(2): p. 234-41.
162. Arnhold, S, Heiduschka, P, Klein, H, Absenger, Y, Basnaoglu, S, Kreppel, F, Henke-Fahle, S, Kochanek, S, Bartz-Schmidt, KU, Addicks, K, and Schraermeyer, U, *Adenovirally transduced bone marrow stromal cells differentiate into pigment epithelial cells and induce rescue effects in RCS rats*. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2006. **47**(9): p. 4121-9.
163. Arnhold, S, Absenger, Y, Klein, H, Addicks, K, and Schraermeyer, U, *Transplantation of bone marrow-derived mesenchymal stem cells rescue photoreceptor cells in the dystrophic retina of the rhodopsin knockout mouse*. Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol, 2007. **245**(3): p. 414-22.
164. Mall, M, Grubb, BR, Harkema, JR, O'Neal, WK, and Boucher, RC, *Increased airway epithelial Na⁺ absorption produces cystic fibrosis-like lung disease in mice*. Nat Med, 2004. **10**(5): p. 487-93.
165. Mall, MA, Harkema, JR, Trojanek, JB, Treis, D, Livraghi, A, Schubert, S, Zhou, Z, Kreda, SM, Tilley, SL, Hudson, EJ, O'Neal, WK, and Boucher, RC, *Development of chronic bronchitis and emphysema in beta-epithelial Na⁺ channel-overexpressing mice*. Am J Respir Crit Care Med, 2008. **177**(7): p. 730-42.
166. Zhang, D, Wu, M, Nelson, DE, Pasula, R, and Martin, WJ, 2nd, *Alpha-1-antitrypsin expression in the lung is increased by airway delivery of gene-transfected macrophages*. Gene Ther, 2003. **10**(26): p. 2148-52.
167. Caye-Thomasen, P, Hermansson, A, Tos, M, and Prellner, K, *Polyp pathogenesis--a histopathological study in experimental otitis media*. Acta Otolaryngol, 1995. **115**(1): p. 76-82.
168. Larsen, PL, Tos, M, Kuijpers, W, and van der Beek, JM, *The early stages of polyp formation*. Laryngoscope, 1992. **102**(6): p. 670-7.
169. Norlander, T, Westrin, KM, Fukami, M, Stierna, P, and Carlsoo, B, *Experimentally induced polyps in the sinus mucosa: a structural analysis of the initial stages*. Laryngoscope, 1996. **106**(2 Pt 1): p. 196-203.

170. Alton, EW, Stern, M, Farley, R, Jaffe, A, Chadwick, SL, Phillips, J, Davies, J, Smith, SN, Browning, J, Davies, MG, Hodson, ME, Durham, SR, Li, D, Jeffery, PK, Scallan, M, Balfour, R, Eastman, SJ, Cheng, SH, Smith, AE, Meeker, D, and Geddes, DM, *Cationic lipid-mediated CFTR gene transfer to the lungs and nose of patients with cystic fibrosis: a double-blind placebo-controlled trial*. Lancet, 1999. **353**(9157): p. 947-54.
171. Hyde, SC, Pringle, IA, Abdullah, S, Lawton, AE, Davies, LA, Varathalingam, A, Nunez-Alonso, G, Green, AM, Bazzani, RP, Sumner-Jones, SG, Chan, M, Li, H, Yew, NS, Cheng, SH, Boyd, AC, Davies, JC, Griesenbach, U, Porteous, DJ, Sheppard, DN, Munkonge, FM, Alton, EW, and Gill, DR, *CpG-free plasmids confer reduced inflammation and sustained pulmonary gene expression*. Nat Biotechnol, 2008. **26**(5): p. 549-51.
172. Van Vranken, BE, Romanska, HM, Polak, JM, Rippon, HJ, Shannon, JM, and Bishop, AE, *Coculture of embryonic stem cells with pulmonary mesenchyme: a microenvironment that promotes differentiation of pulmonary epithelium*. Tissue Eng, 2005. **11**(7-8): p. 1177-87.
173. Lin, YM, Boccaccini, AR, Polak, JM, Bishop, AE, and Maquet, V, *Biocompatibility of poly-DL-lactic acid (PDLLA) for lung tissue engineering*. J Biomater Appl, 2006. **21**(2): p. 109-18.
174. Mondrinos, MJ, Koutzaki, S, Jiwanmall, E, Li, M, Dechadarevian, JP, Lelkes, PI, and Finck, CM, *Engineering three-dimensional pulmonary tissue constructs*. Tissue Eng, 2006. **12**(4): p. 717-28.
175. Kunisaki, SM, Freedman, DA, and Fauza, DO, *Fetal tracheal reconstruction with cartilaginous grafts engineered from mesenchymal amniocytes*. J Pediatr Surg, 2006. **41**(4): p. 675-82; discussion 675-82.
176. Kunisaki, SM, Fuchs, JR, Kaviani, A, Oh, JT, LaVan, DA, Vacanti, JP, Wilson, JM, and Fauza, DO, *Diaphragmatic repair through fetal tissue engineering: a comparison between mesenchymal amniocyte- and myoblast-based constructs*. J Pediatr Surg, 2006. **41**(1): p. 34-9; discussion 34-9.
177. Liu, M, Tanswell, AK, and Post, M, *Mechanical force-induced signal transduction in lung cells*. Am J Physiol, 1999. **277**(4 Pt 1): p. L667-83.
178. Mondrinos, MJ, Koutzaki, S, Lelkes, PI, and Finck, CM, *A tissue-engineered model of fetal distal lung tissue*. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2007. **293**(3): p. L639-50.

8 ANNEXES

Annexe 1 :

Manuscrit soumis à Journal of Cellular and Molecular Medicine :

«Cardiac Cell Therapy: Overexpression of Connexin43 in Skeletal Myoblasts and Prevention of Ventricular Arrhythmias »

Sarah Fernandes, Harold V.M. van Rijen, Stéphane Evain, Virginie Forest, Anne-Laure Leblond, Jean Mérot, Flavien Charpentier, Jacques M.T. de Bakker, Patricia Lemarchand.

Annexe 2 :

Revue de l'EMC, traité de pneumologie, 2007 Elsevier Masson SAS :

« Thérapie génique et cellulaire des maladies respiratoires »

Anne-Laure Leblond et Patricia Lemarchand

Annexe 3 :

Valorisation des compétences des docteurs « un nouveau chapitre de la thèse ® », Association Bernard Grégory (ABG). Mentor : Sophie Bellec, consultante en ressources humaines.

« Thérapie cellulaire de la mucoviscidose : une stratégie d'avenir ? »

Titre :

THERAPIE CELLULAIRE DES MALADIES RESPIRATOIRES : UTILISATION DE LA VOIE AERIENNE POUR L'IMPLANTATION DE CELLULES SOUCHES.

Résumé :

Une destruction progressive et irréversible de l'épithélium des voies aériennes est observée chez les patients atteints de maladies respiratoires. Une stratégie de thérapie cellulaire consisterait à utiliser des cellules souches pour coloniser les zones épithéliales lésées et réparer l'épithélium. Les premiers travaux de thérapie cellulaire respiratoire ont porté sur l'administration systémique de cellules souches adultes chez des souris irradiées. Ces études ont conduit à des résultats modestes et controversés à cause des méthodes de détection par fluorescence. L'objectif de ce projet était de développer une stratégie de thérapie cellulaire visant l'épithélium, tout en évitant l'irradiation des souris et l'utilisation de la fluorescence. Des cellules souches embryonnaires et des cellules souches mésenchymateuses ont été injectées en intratrachéal chez des souris présentant des lésions épithéliales dans les voies aériennes. Ces lésions étaient induites par l'injection préalable d'un détergent, le polidocanol. Des méthodes quantitatives ont montré que 0.4 à 5,5 % des cellules souches survivent dans les voies aériennes lésées. Cette survie s'avère dépendante de l'état de différenciation des cellules et de la présence de lésions. Une méthode biochimique a permis de détecter des cellules souches dans la lumière de la trachée et des bronches. 7 jours après l'injection de détergent, lorsque l'épithélium est spontanément régénéré, des cellules souches administrées ont été localisées dans les voies aériennes. Ces résultats confortent l'utilisation de la voie aérienne dans le développement d'une stratégie de thérapie cellulaire pour les pathologies respiratoires avec des lésions épithéliales telles que la mucoviscidose.

Mots clés :

Thérapie cellulaire, maladies respiratoires, épithélium des voies aériennes

Title :

CELL THERAPY FOR RESPIRATORY DISEASE WITH INTRATRACHEAL ADMINISTRATION OF STEM CELLS.

Abstract :

Over the past decade, interest has increased in the use of stem cells from bone marrow to optimize lung repair after systemic administration in irradiated mice. These studies lead to limited and controversial results because of fluorescent detection methods. The objective of our work was to develop a stem cell based strategy while avoiding animal irradiation and controversial detection methods. Embryonic and mesenchymal stem cells were intratracheally injected in a murine model with acute epithelial airway injury. Epithelial injury was induced by intratracheal detergent administration. Quantitative methods showed that 0.4 to 5.5% stem cells survived specifically in the injured airway, whereas no differentiated cells survived in injured airway. Importantly, stem cells did not survive in healthy airway. With biochemical staining, mesenchymal stem cells were detected in injured trachea lumen and bronchi. 7 days after detergent administration while airway epithelium was totally repaired, stem cells were located in regenerated bronchia. With this experimental design, we demonstrated the feasibility of intratracheal cell delivery for airway diseases with acute epithelial airway injury.

Key words :

Cell therapy, respiratory diseases, airway epithelium