



Université de Montréal

**Les cellules stromales multipotentes accélèrent la  
guérison de plaies cutanées chez les souris irradiées  
via la sécrétion de la chimiokine SDF-1 $\alpha$**

Par

Yannick Landry

Département de pharmacologie

Faculté de médecine

Mémoire présenté à la Faculté des études supérieures en vue de  
l'obtention du grade de Maître ès Sciences (M.Sc.) en pharmacologie

Novembre 2008

© Yannick Landry, 2008

Université de Montréal  
Faculté des études supérieures

Ce mémoire intitulé :

**Les cellules stromales multipotentes accélèrent la  
guérison de plaies cutanées chez les souris irradiées  
via la sécrétion de la chimiokine SDF-1 $\alpha$**

Présenté par  
Yannick Landry

a été évalué par un jury composé des personnes suivantes :

**Président-rapporteur :** Pierre-André Lavoie, PhD

**Directeur de recherche :** Christian Beauséjour, PhD

**Membre du jury :** Jean-François Gauchat, PhD

## RÉSUMÉ

Le traitement du cancer à l'aide d'une exposition aux radiations ionisantes (RI) peut mener au développement de plusieurs effets secondaires importants, dont un retard de réparation et de régénération des tissus. Les mécanismes responsables de ces effets demeurent largement inconnus encore aujourd'hui, ce qui a pour effet de limiter le développement d'approches thérapeutiques. À l'aide d'un modèle de guérison de plaie cutanée chez la souris, nous avons cherché à déterminer les mécanismes par lesquels l'exposition aux RI limite la régénération de la peau. Nos résultats démontrent que l'induction de la "stromal-derived growth factor 1 $\alpha$ " (SDF-1 $\alpha$ ), une cytokine normalement surexprimée dans les tissus hypoxiques, est sévèrement diminuée dans les plaies de souris irradiées versus non-irradiées. Ce défaut corrèle avec un retard de guérison des plaies et est encore évident plusieurs mois suivant l'exposition aux RI, suggérant qu'il y a une altération permanente de la capacité de la peau à se réparer.

Parce que SDF-1 $\alpha$  est secrété principalement par les fibroblastes du derme, nous avons évalué le potentiel des cellules stromales multipotentes (MSCs), qui sont reconnues pour sécréter des niveaux élevés de SDF-1 $\alpha$ , à accélérer la régénération de la peau chez les souris irradiées. L'injection de MSCs en périphéries des plaies a mené à une accélération remarquable de la guérison de la peau chez les souris exposées aux RI. Les actions des MSCs étaient principalement paracrines, dû au fait que les cellules n'ont pas migré à l'extérieur de leur site d'injection et ne se sont pas différenciées en kératinocytes. L'inhibition spécifique de l'expression de SDF-1 $\alpha$  a mené à une réduction drastique de l'efficacité des MSCs à accélérer la fermeture de plaie indiquant que la sécrétion de SDF-1 $\alpha$  par les MSCs est

largement responsable de leur effet bénéfique. Nous avons découvert aussi qu'un des mécanismes par lequel SDF-1 $\alpha$  accélère la guérison de plaie implique l'augmentation de la vascularisation au niveau de la peau blessée.

Les résultats présentés dans ce mémoire démontrent collectivement que SDF-1 $\alpha$  est une importante cytokine dérégulée au niveau des plaies cutanées irradiées, et que le déclin du potentiel de régénération des tissus qui est observé suivant une exposition au RI peut être renversé, s'il est possible de restaurer le microenvironnement de la blessure avec un support stromal adéquat.

**Mots-clés:** SDF-1 $\alpha$ , radiation ionisante, guérison de plaie cutanée, MSCs

## ABSTRACT

Cancer treatment using ionizing radiation (IR) may lead to significant side effects, like delayed tissue repair and regeneration. The mechanisms mediating these defects remain largely unknown at present, thus limiting the development of therapeutic approaches. Using a wound healing model, we investigate the mechanisms by which IR exposure limits skin regeneration. Our results show that induction of the stromal-derived growth factor 1 $\alpha$  (SDF-1 $\alpha$ ), a cytokine normally overexpressed in hypoxic tissues, is severely impaired in the wounded skin of irradiated, compared to non-irradiated, mice. This defect is correlated with delayed healing, and is evident for several months following exposure to IR, suggesting permanent impairment of skin repair.

Because SDF-1 $\alpha$  is secreted mainly by dermal fibroblasts, we evaluated the potential of multipotent stromal cells (MSCs), which secrete high levels of SDF-1 $\alpha$ , to improve skin regeneration in irradiated mice. Injection of MSCs into the wound margin led to remarkable enhancement of skin healing in mice exposed to IR. The MSC actions were mainly paracrine, as the cells did not migrate away from the injection site or differentiate into keratinocytes. Specific knockdown of SDF-1 $\alpha$  expression led to drastically reduced efficiency of MSCs in improving wound closure, indicating that SDF-1 $\alpha$  secretion by MSCs is largely responsible for their beneficial action. We also found that one mechanism by which SDF-1 $\alpha$  enhances wound closure likely involves increased skin vascularization.

Findings presented in this thesis collectively indicate that SDF-1 $\alpha$  is an important deregulated cytokine in irradiated wounded skin, and that the decline in tissue

regeneration potential following IR can be reversed, given adequate microenvironmental support.

**Key Words:** SDF-1 $\alpha$ , ionizing radiation, wound healing, MSCs

# TABLE DES MATIÈRES

<b>LISTE DES TABLEAUX</b> .....	<b>IX</b>
<b>LISTE DES FIGURES</b> .....	<b>X</b>
<b>LISTE DES SIGLES ET ABRÉVIATIONS</b> .....	<b>XI</b>
<b>REMERCIEMENTS</b> .....	<b>XIII</b>
<b>CHAPITRE I</b> .....	<b>1</b>
1.1 MISE EN CONTEXTE .....	1
1.2 CONTENU DU MEMOIRE .....	2
<b>CHAPITRE II</b> .....	<b>4</b>
2.1 LES RADIATIONS IONISANTES .....	4
2.2 LES EFFETS DES RI SUR LA PEAU.....	5
<b>CHAPITRE III</b> .....	<b>9</b>
3.1 LES EFFETS CELLULAIRES DU DOMMAGE À L'ADN .....	9
3.2 LE PHÉNOTYPE DE SÉNESCENCE.....	10
3.3 SÉNESCENCE ET EFFETS SECONDAIRES À LONG TERME .....	12
<b>CHAPITRE IV</b> .....	<b>15</b>
4.1 LES PROCESSUS DE GUÉRISON DE PLAIES CUTANÉES.....	15
4.2 LE RÔLE DES FACTEURS DE CROISSANCE ET DES CYTOKINES .....	18
4.2.1 " <i>Platelet-Derived Growth Factor</i> ".....	19
4.2.2 " <i>Epidermal Growth Factor</i> ".....	21
4.2.3 " <i>Insulin-like Growth Factors</i> " .....	22
4.2.4 " <i>Transforming Growth Factor-β</i> " .....	24
4.2.5 " <i>Fibroblast Growth Factors</i> " .....	26
4.2.6 " <i>Vascular Endothelial Growth Factor</i> " .....	28
4.2.7 " <i>Stromal-derived growth factor 1α</i> ".....	30
4.2.8 " <i>Matrix Metalloproteinase</i> " .....	32
4.2.9 " <i>Plasminogen activator inhibitor-1</i> " .....	34
<b>CHAPITRE V</b> .....	<b>37</b>
5.1 LA THERAPIE CELLULAIRE A BASE DE CELLULES SOUCHES .....	37
5.2 LES CELLULES SOUCHES .....	38
5.3 LES CELLULES SOUCHES MESENCHYMATEUSES ET LEUR POTENTIEL THERAPEUTIQUE .....	41
5.4 LES MSCs EN TANT QU'AGENT THERAPEUTIQUE POUR ACCELERER LA GUERISON DE PLAIES CUTANÉES .....	43
<b>CHAPITRE VI</b> .....	<b>45</b>
6.1 HYPOTHESES DE TRAVAIL.....	45
6.2 OBJECTIFS .....	45
<b>CHAPITRE VII</b> .....	<b>48</b>
RÉSULTATS .....	48
<i>Article: Secretion of SDF-1α by Multipotent Stromal Cells Enhances Wound         Healing of Skin Exposed to Ionizing Radiation</i> .....	48



<b>CHAPITRE VIII</b> .....	<b>85</b>
DISCUSSION ET PERSPECTIVES .....	85
<b>CHAPITRE IX</b> .....	<b>90</b>
CONCLUSION .....	90
<b>BIBLIOGRAPHIE</b> .....	<b>91</b>
A1. RESULTATS SUPPLEMENTAIRES .....	XV
A2. ACCORD DES COAUTEURS .....	XVI

## **LISTE DES TABLEAUX**

<b>TABLEAU 1.</b> Effets du TGF- $\beta$ 1 sur les cellules impliqués dans le processus de guérison cutanée.....	25
--	----

### **Annexe**

<b>TABLEAU A1.1</b> L'injection locale de MSC-IR ralentit la guérison cutanée.....	xv
--	----

## LISTE DES FIGURES

<b>FIGURE 1.</b> Les trois scénarios possibles suivant la création de dommages à l'ADN.....	9
<b>FIGURE 2.</b> Les voies de signalisation cellulaire menant à la sénescence et à l'apoptose.....	11
<b>FIGURE 3.</b> Morphologie caractéristique des fibroblastes sénescents en culture.....	12
<b>FIGURE 4.</b> Rôle du PAI-1 et de l'uPA dans le remodelage de la matrice extracellulaire.....	35
<b>FIGURE 5.</b> Hiérarchie des cellules souches humaines.....	39

## LISTE DES SIGLES ET ABRÉVIATIONS

ADN	Acide désoxyribonucléique
ARN	Acide ribonucléique
ARNm	ARN messenger
Ca <sup>2+</sup>	Ion calcium
CXC	Motif cystéine-X-cystéine
CXCR4	Récepteur de SDF-1 $\alpha$
EGF	"Epidermal growth factor"
EGFR/HER/ERbB	Récepteur de l'EGF
FGF/FGFR	"Fibroblast growth factor" et son récepteur
GFP	"Green fluorescent protein"
Gy	Gray (unité de mesure, 1 Gy = 100 rad)
H2AX	Variante de l'histone H2A
HB-EGF	"Heparin-binding EGF"
HIF-1	"Hypoxia inducible factor-1"
HUVECs	"Human umbilical vein endothelial cells"
IGF	"Insulin-like growth factor"
IL	Interleukine
MAPK	"Mitogen-activated protein kinase"
MEF	Fibroblaste embryonnaire de souris
MMP	Métalloprotéase de la matrice
MSC	Cellule stromale multipotente
nM	Nanomolaire
NO	Oxyde nitrique
p16	"Cyclin-dependent kinase inhibitor 2A" ou CDKN2A

p16 <sup>INK4A</sup>	Produit majeur du gène CDKN2A
p21	"Cyclin-dependent kinase inhibitor 1A" ou CDKN1A
p53	Protéine 53 (suppresseur de tumeur)
PAI-1	"Plasminogen activator inhibitor 1"
PDGF	"Platelet-derived growth factor"
PI3K	Phosphoinositol-3-Kinase
PLGF	"Placenta growth factor"
pRB	Protéine du rétinoblastome (suppresseur de tumeur)
Rad	Unité de mesure, dose de radiation absorbée
RI	Radiations ionisantes
SA-βgal	Beta-galactosidase associée à la sénescence
SDF-1α (CXCL12)	"Stromal-derived growth factor 1α"
ShRNA	"short hairpin RNA"
TBI	Irradiation du corps entier
TIMPs	"Target inhibitor of metalloproteases"
TGF-β	"Transforming growth factor β"
μg	Microgramme
μl	Microlitre
μM	Micromolaire
uPA/uPAR	"urokinase-type plasminogen activator" et son récepteur
VEGF/VEGFR	"Vascular endothelial growth factor" et son récepteur
Zn <sup>2+</sup>	Ion zinc
53BP1	"p53 Binding Protein 1"

## REMERCIEMENTS

Ce projet n'aurait pas été possible sans le soutien et la présence d'amis, de membres de ma famille, de collègues et de professeurs qui, chacun à leur manière, m'ont aidé à persévérer dans ma démarche. Pour cela, je les en remercie sincèrement.

J'aimerais toutefois souligner ma reconnaissance envers les personnes qui ont directement contribué à la réalisation de mes travaux de maîtrise.

Mon directeur de recherche, Christian Beauséjour, a été d'un appui plus qu'important au cours de mon cheminement aux études graduées. Par sa rigueur scientifique, ses réponses à mes questions au-delà de mes attentes et sa grande passion pour les sciences, il a su être en mesure de m'offrir un environnement propice à mon apprentissage. D'une disponibilité exemplaire, jamais il n'a ignoré mes toc-tocs discrets à sa porte. Je le remercie donc pour son support constant.

Ma gratitude s'adresse, de plus, à Oanh Lê, notre dévouée assistante de recherche au laboratoire. Oanh a toujours cru en moi et en mes capacités et a toujours été là pour me supporter dans les périodes moins évidentes. Je ne l'oublierai jamais. Je la remercie également pour son aide dans les moments où j'avais besoin d'une deuxième paire de mains pour m'aider à accomplir tout ce que j'avais à faire !

Merci aussi aux autres membres du laboratoire, Cynthia et Basma, pour toutes les discussions que l'on ait pu avoir ensemble. Merci aussi pour votre aide et vos commentaires.

Je n'ai que de bons mots pour le personnel de l'animalerie du Centre de Recherche de l'Hôpital Ste-Justine qui a été en quelque sorte ma deuxième équipe de travail (que d'heures passées à partager leur lieu de travail!). Un merci spécial à Denise Carrier et Stéphane Faubert pour leur aide dans l'élaboration du modèle de guérison de plaie cutanée.

Je voudrais remercier également Dr Jacques Galipeau, Dr Elie Haddad, Dr Nicholas Heveker ainsi que les membres de leur laboratoire respectif pour leurs commentaires, critiques et suggestions lors de nos réunions scientifiques. Toutes les idées discutées en groupe ont été d'une aide précieuse pour permettre l'avancement du projet.

Enfin, je désire remercier la Fondation de l'Hôpital Ste-Justine et la Fondation des Étoiles qui m'ont apporté leur soutien financier au cours de mes études graduées. Je remercie également la Faculté des études supérieures pour la bourse d'excellence qu'elle m'a accordée.

# CHAPITRE I

## INTRODUCTION GÉNÉRALE

### 1.1 Mise en contexte

De nos jours, une approche multimodale de traitement est favorisée pour traiter les jeunes patients cancéreux. Par exemple, pour traiter la leucémie et les tumeurs cérébrales, la  $\gamma$ -irradiation est utilisée en combinaison avec de nombreux agents chimiothérapeutiques incluant des agents alkylants, des antimétabolites et des antibiotiques anti-tumoraux. L'introduction de ces méthodes de traitement plus efficaces a dramatiquement augmenté le taux de survie des enfants aux prises avec le cancer. En effet, on estime aujourd'hui que 80% des enfants atteints ont des chances de voir leur maladie disparaître à la suite de leur traitement (1). Au fil des années, les survivants d'un cancer juvénile représentent un groupe de plus en plus important de jeunes adultes.

Avant 2006, il n'existait pas de données fiables estimant la morbidité à long terme associée aux méthodes employées pour traiter le cancer chez les enfants. Depuis, deux études majeures ont révélé que le taux de guérison exceptionnel obtenu avec les façons actuelles de traiter avait un coût considérable sur la qualité et l'espérance de vie des survivants (2,3). En effet, ces études ont démontré que les enfants qui guérissaient de leur cancer développaient, une fois atteint l'âge adulte, un ou plusieurs problème(s) distinct(s) de leur première maladie. Ces complications, qui ne se seraient pas manifestées sans thérapie préalable contre le cancer, incluent entre autre le développement d'un second néoplasme, l'apparition de retards de régénération et de réparation des tissus et



organes ainsi que le développement de problèmes cognitifs et psychosociaux. Les deux études ont permis de fournir des résultats éloquentes sur le rôle majeur que joue la radiothérapie dans le développement d'effets secondaires à long terme. Par exemple, l'étude menée par Geenen et collègues (2) a démontré que parmi les patients traités avec la radiothérapie seulement, 55% ont eu des complications sévères à l'âge adulte, comparativement à seulement 15% des patients qui n'ont été traité qu'avec la chimiothérapie. Ces résultats, combinés à plusieurs autres observations, ont permis de déterminer que la radiothérapie était le plus important facteur de risque pour le développement de complications graves à long terme.

## **1.2 Contenu du mémoire**

Dans le cadre de mon projet de maîtrise, nous avons concentré nos recherches sur une des complications importantes qui survient chez les patients exposés aux RI, soit le retard de régénération des tissus. Nous voulions avant tout comprendre comment les RI induisent à long terme ce type de délai chez les survivants du cancer et savoir si cet état était réversible. Les objectifs de ce mémoire sont donc: 1) de tenter de déterminer les mécanismes responsables du retard de réparation des tissus, plus particulièrement la peau, qui survient à la suite d'une exposition aux RI et 2) de tenter de renverser ce phénotype à l'aide d'une thérapie cellulaire adaptée. Un modèle de guérison de plaie cutanée chez la souris a été développé au laboratoire afin de nous aider à répondre aux deux buts que nous nous sommes fixés.

Dans les prochains chapitres, une revue de la littérature pertinente à nos deux objectifs est effectuée. Dans le chapitre II, j'élabore sur quelques notions

concernant la radiothérapie et ses dommages connus au niveau de la peau. J'enchaîne ensuite en révisant certains concepts concernant la sénescence cellulaire, qui pourrait possiblement avoir un rôle à jouer dans les retards de régénération des tissus dus aux RI. Dans le chapitre IV, j'analyse l'état des connaissances existantes dans la littérature sur la guérison de plaies cutanées et plus particulièrement sur le rôle d'importance que jouent les facteurs de croissance et cytokines dans ce processus. Le chapitre V quant à lui est consacré à une révision des concepts liés à l'utilisation des MSCs comme outil thérapeutique pour traiter différentes pathologies, dont les défauts de réparation des tissus. Les objectifs généraux de ce mémoire ainsi que les hypothèses qui y seront abordées sont présentés au chapitre VI.

Le chapitre VII constitue le corps du mémoire, soit un article soumis à la revue *Cancer Research* et portant sur les résultats expérimentaux obtenus. Le chapitre VIII discute de la teneur de ces résultats en relation avec la littérature et propose des avenues de recherche qui pourraient être explorées afin d'avancer l'état de nos connaissances sur l'implication du phénotype de sénescence dans le retard de réparation de la peau suivant une exposition aux RI. Finalement, l'impact global de ces résultats est abordé et des conclusions sont tirées au chapitre IX. Certains résultats supplémentaires, pertinents à ce mémoire, sont présentés en annexe.

## CHAPITRE II

### 2.1 Les radiations ionisantes

L'utilisation des RI comme modalité de traitement est basée sur l'habilité des tissus cibles à absorber de l'énergie provenant de la désintégration d'une source radioactive, ce qui cause l'excitation ou « l'ionisation » des électrons de plus haute énergie qui sont en orbite autour du noyau des cellules. L'énergie est relâchée lorsque ces électrons reviennent sur leur précédente orbite, beaucoup plus stable, résultant en un dommage cellulaire aux structures telles que l'ADN. C'est ce que l'on appelle l'effet direct des radiations. Il existe aussi une action indirecte qui cause encore plus de dommage. En effet, il est possible que les électrons de haute énergie interagissent avec des molécules d'eau, produisant des radicaux libres hautement réactifs. Deux tiers des dommages cellulaires totaux seraient causés par la création de ces radicaux hydroxyles (OH<sup>-</sup>) (4).

L'intérêt pour l'étude des effets biologiques des RI a débuté au début du 20<sup>e</sup> siècle. En 1906, il fut d'abord observé que les radiations étaient cytotoxiques pour les cellules germinales testiculaires alors que les cellules de Sertoli matures (cellules différenciées associées avec les spermatocytes en développement) étaient laissées relativement non-endommagées (5). Cette observation a permis de mener à la conclusion que les radiations affectaient davantage les cellules en division. Dès les années 1920, les radiations furent donc utilisées comme méthode de traitement contre le cancer (6,7). Les cellules en divisions sont plus susceptibles au dommage que les cellules quiescentes car il a été rapporté que les cellules se situant en phase G2 et M du cycle cellulaire étaient les plus sensibles aux effets

des radiations, alors que les cellules en phase G1 sont celles qui sont le plus résistantes (8,9). Cette observation est d'importance au niveau de la biologie des tumeurs, car les cellules cancéreuses qui prolifèrent anormalement rapidement sont celles qui seront le plus susceptibles aux dommages causés par les RI. Cependant, certains tissus sains à haut taux de renouvellement cellulaire tels que la muqueuse gastrique et l'épiderme seront aussi affectés, ce qui peut mener entre autre à des défauts de régénération de ces tissus.

## **2.2 Les effets des RI sur la peau**

Lors de traitements de radiothérapie, les RI sont administrées à travers la peau afin d'atteindre leur tissu cible. Malheureusement, cela a pour effet d'induire des dommages non désirés aux tissus environnants, résultant notamment en l'apparition de modifications importantes de la peau. Ces altérations peuvent être divisées en atteintes aiguës ou chroniques.

Les atteintes aiguës sont reconnues pour être réversibles et d'intensité proportionnelle à la dose totale d'exposition aux radiations. Ces effets sont généralement associés avec une réaction inflammatoire importante suivie de la nécrose progressive de la peau (10). Les zones nécrotiques guérissent normalement après la conclusion du traitement.

Les atteintes chroniques quant à elles apparaissent environ 4-6 mois après l'exposition aux radiations et sont habituellement irréversibles. Elles peuvent inclure des modifications de la peau telles que : hypo- ou hyperpigmentation provenant d'une destruction ou d'une augmentation de l'activité des mélanocytes,

augmentation de la fibrose, dysfonction des glandes sébacées, perte des follicules pileux, dilatation des capillaires sanguins cutanés (télangiectasie), nécrose et formation de tumeurs (10,11). En plus de ces modifications, les tissus conjonctifs situés sous la peau démontrent eux aussi des altérations histologiques en réponse aux RI. En effet, il a été remarqué que le tissu adipeux et la matrice cellulaire étaient remplacés graduellement par du tissu fibreux dense et des fibroblastes atypiques (12). Ces derniers sont dit atypiques car ils ne semblent pas être en mesure de proliférer aussi bien que des fibroblastes normaux, ils ont des capacités de migration anormales et ils favorisent le dépôt d'un type de collagène immature (13,14). Des observations ont permis de déterminer que même quinze à vingt ans suivant une exposition aux RI, les fibroblastes associés à la peau présentaient toujours des structures anormales telles que des mitochondries dégénérées, de multiples vacuoles et un réticulum endoplasmique rugueux irrégulier, indiquant la présence de dommages permanents (11).

L'exposition aux radiations est aussi connue pour avoir des effets néfastes au niveau des structures vasculaires de la peau. Suivant une exposition aux RI, les vaisseaux sanguins superficiels se dilatent. Progressivement, les artères et artérioles situées dans la peau irradiée perdent leur élasticité et subissent une sclérose vasculaire, résultant en l'hypoxie continue du tissu (15). La perte d'approvisionnement sanguin peut continuer à évoluer de façon quasi linéaire pour le reste de la vie du patient irradié, ce qui peut mener à long terme à des déficits localisés de guérison de plaies cutanées chez ces personnes (16,17). Plusieurs auteurs avancent qu'il pourrait s'agir de la principale cause expliquant la faible capacité des tissus irradiés à se régénérer. De nombreux autres chercheurs

suggèrent plutôt que ce serait les dommages permanents aux cellules stromales (fibroblastes) situées à la base de l'épiderme qui seraient responsables de l'apparition des défauts de guérison survenant à long terme (11,13,14). Cependant, il ne serait pas surprenant qu'autant la dégénérescence vasculaire que la toxicité stromale aient un rôle critique à jouer dans le développement des atteintes chroniques causées par les RI.

Les données présentées jusqu'à maintenant dans cette section proviennent d'études où les doses de RI administrées étaient très élevés, telles que celles utilisées lors de traitement ciblés visant à faire régresser une tumeur. Ces hautes doses correspondent à plus de 50 Gy (la quantité d'énergie de radiation délivrée par unité de masse de tissus est quantifiée en doses de radiation absorbées (rad) ou en gray (Gy), où un Gy équivaut à 100 rad ou un joule d'énergie de radiation absorbée par kilogramme de tissus). Il existe toutefois moins de données disponibles dans la littérature portant sur les atteintes tissulaires survenant à long terme suivant une exposition à des doses de radiation plus faibles.

Le traitement de la leucémie lymphoblastique aiguë, une des formes de cancer pédiatrique les plus rencontrées, nécessite souvent que l'on procède à une greffe de moelle osseuse chez les patients atteints. Les enfants transplantés sont alors exposés à une irradiation du corps entier (TBI) d'une dose d'environ 10 Gy. Jusqu'à récemment, les effets d'une telle dose d'irradiation sur la capacité de réparation et de régénération de la peau demeuraient inconnus. Une étude publiée en 2006 a cependant démontré qu'une dose de 12 Gy était en mesure de retarder la guérison de plaies cutanée chez le rat à long terme (plus de 12 semaines suivant

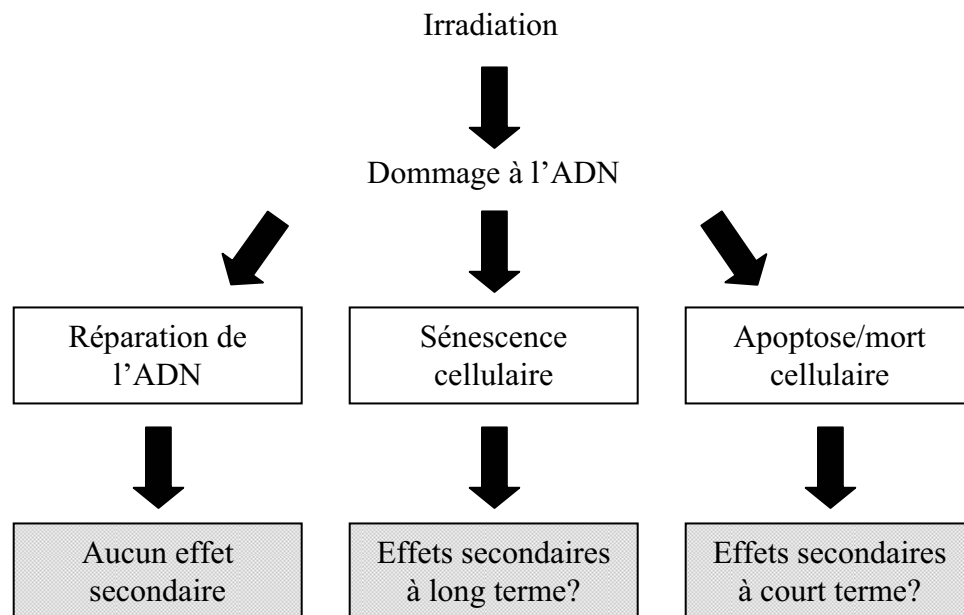
une exposition aux RI) (18). Cette observation corrèle avec d'autres résultats démontrant que la TBI pourrait être en mesure de causer une suppression permanente de la réponse néovasculaire chez la souris (19) et pourrait être capable d'endommager de façon irréversible un environnement composé de cellules stromales (20). Donc, à la lumière de ces résultats, il semble qu'une exposition à une dose de RI d'environ 10 Gy pourrait être suffisante afin d'induire des dommages permanents au niveau de la peau.

Mais comment les RI parviennent-elles, même à plus faibles doses, à causer de la toxicité vasculaire et stromale? Une possibilité est que les cellules endothéliales des vaisseaux sanguins et les fibroblastes du derme exposés aux RI subissent d'importants dommages à l'ADN qui ne sont réparés qu'en partie. Cela pourrait avoir comme conséquence d'entraîner ces cellules vers un état de sénescence (21,22). À ce moment, les cellules endothéliales et les fibroblastes pourraient ne plus être en mesure d'assurer leurs fonctions normales dans la régénération de tissus (formation de nouveaux vaisseaux sanguins, recrutement de cellules souches et progénitrices). Il s'agit du sujet qui sera abordé dans le prochain chapitre ainsi que dans la discussion à la fin de ce mémoire.

# CHAPITRE III

## 3.1 Les effets cellulaires du dommage à l'ADN

Suivant une exposition aux RI, les cellules endothéliales ou stromales endommagées, situées dans la peau, seront confrontées à trois options (voir Fig.1).



**Fig.1** Les trois scénarios possibles suivant la création de dommages à L'ADN.

Si le niveau de dommages à l'ADN créés est faible, les cellules seront capables de les réparer avec leur propre machinerie. Selon ce scénario, peu ou même aucun effet secondaire n'est attendu d'un tel traitement. À l'inverse, il est possible que l'exposition aux RI cause la création d'un très haut niveau de dommages à l'ADN. Dans cette situation, les cellules ne seront pas capables de les réparer entièrement et elles seront éliminées, principalement par apoptose. C'est ce scénario qui est probablement responsable des conséquences à court terme observés à la suite de traitements contre le cancer (ex. nécrose de la peau). Finalement, il est possible



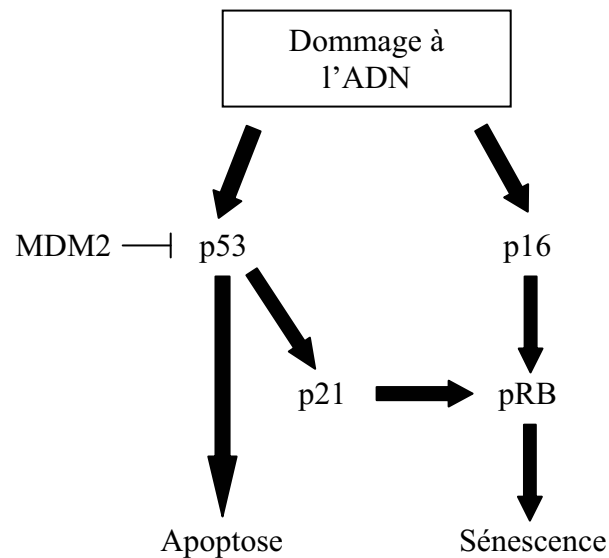
aussi que les cellules réparent leurs dommages de façon incomplète, mais que, pour des raisons encore inexpliquées, ces dernières contournent la voie apoptotique menant à la mort cellulaire. En culture, les cellules qui rencontrent cette situation sont dites être en état de sénescence cellulaire. Les prochaines sections décriront en détail le phénotype de sénescence et expliqueront comment ce dernier pourrait être lié aux effets secondaires à long terme causés par l'exposition aux RI.

### **3.2 Le phénotype de sénescence**

La sénescence cellulaire a été décrite pour la première fois en 1961, soit il y a plus de 47 ans, comme le processus qui limite la durée de vie répliquative des cellules normales humaines en culture (23). La sénescence implique l'arrêt permanent et irréversible de la prolifération cellulaire en phase G1 et peut être induite par plusieurs stimuli (24). Celui qui est le plus caractérisé est le raccourcissement des télomères (séquences répétées d'ADN situé à chaque extrémité des chromosomes) causé par la réplication incomplète de leur ADN (25,26,27). En effet, dû à une inhabilité de la machinerie de réplication à copier les extrémités de molécules linéaires, les télomères deviennent progressivement plus courts à chaque division cellulaire (28). Éventuellement, les télomères atteignent une taille critique et engagent une réponse de dommages à l'ADN menant à l'arrêt de la prolifération des cellules et donc à leur sénescence (29,30). D'autres stimuli ont cependant un rôle d'importance à jouer dans le processus d'induction de la sénescence. Entre autre, il a été rapporté que l'exposition au stress oxydatif et à la gamma-irradiation peuvent induire la sénescence par la création de dommage à l'ADN (31,32). Aussi, plusieurs cellules entrent en

sénescence lorsqu'elles surexpriment certains oncogènes, tels que ceux de la voie RAS-RAF-MEK (33-35). Encore une fois, ce type de stimulus peut agir par un mécanisme qui implique la formation de dommages à l'ADN (36-37). Il semble donc que la majorité des inducteurs de sénescence agissent d'une façon similaire.

Dans la grande majorité des cas, deux voies centrales de signalisation cellulaire peuvent mener à la sénescence (voir Fig.2). Il est bien connu que la



**Fig.2** Les voies de signalisation cellulaire menant à la sénescence et à l'apoptose.

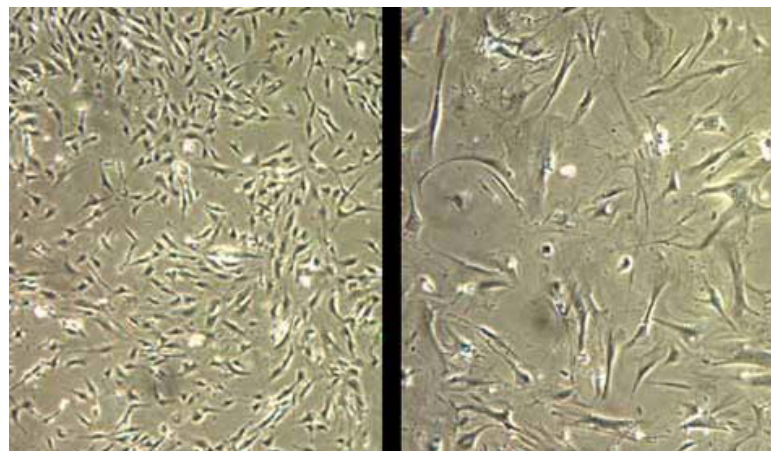
réponse au dommage à l'ADN mène à l'activation du suppresseur de tumeur p53, régulé normalement de façon négative par la protéine déstabilisatrice « murine double minute-2 » (MDM2), et peut conduire à l'apoptose. Par contre, il a été démontré qu'il était aussi possible que la dysfonction des télomères ainsi que l'exposition au stress oxydatif et aux RI causent du dommage à l'ADN qui signale par p53 mais active la transcription de p21 (38). Cela cause alors l'engagement de la signalisation de pRB, qui mène à l'hétérochromatinisation de gènes importants

pour la prolifération et à l'induction de la sénescence. La deuxième voie possible, p16-pRB, peut aussi conduire à la sénescence. Toutefois, cette voie est médiée par d'autres formes de stress, dits non-génotoxiques, ainsi que par la surexpression d'oncogènes. Il est à noter cependant que ce dernier inducteur de sénescence peut activer autant la voie de signalisation p16-pRB que la voie p21-p53 (39).

### 3.3 Sénescence et effets secondaires à long terme

La grande majorité des informations disponibles sur la sénescence proviennent d'études réalisées au moyen de modèles cellulaires. Jusqu'à il y a quelques années, la preuve de l'existence de ce processus à des niveaux appréciables au sein d'organismes plus complexes était toujours manquante. Plusieurs études sont toutefois venues confirmer récemment l'importance de ce processus *in vivo* en montrant que les cellules sénescents s'accumulent dans les tissus en provenance d'humains, de primates et de souris (40-43).

#### Fibroblastes



Présénescents

Sénescents

**Fig.3** Morphologie caractéristique des fibroblastes sénescents en culture.

Les cellules sénescents possèdent une morphologie distinctive large et aplatie (figure 3) et sont positives pour la beta-galactosidase associée à la sénescence (SA- $\beta$ gal). Cette activité enzymatique, détectable par des techniques histochimiques, est fortement associée avec la sénescence et en est le principal marqueur (44). D'autres marqueurs permettant l'identification biochimique des foyers permanents de dommages à l'ADN ont été reconnus pour être aussi efficaces. En effet, la quantification des foyers créés par  $\gamma$ -H2AX et 53BP1, deux protéines impliquées dans la réparation de l'ADN, a été utilisée avec succès pour évaluer la présence de cellules sénescents dans la peau de babouin (43,45). Finalement, l'expression de p16<sup>INK4a</sup> est aussi un marqueur fiable de sénescence dans la peau humaine (46). En effet, p16<sup>INK4a</sup>, un régulateur positif de p53 et pRB, est aussi capable d'induire la sénescence cellulaire (47,48). Les niveaux de cette protéine augmentent dans plusieurs types de tissus avec l'âge et il a été démontré qu'ils pourraient être responsables de la diminution de la capacité des tissus à se régénérer et se réparer. (49). Cela suggère que l'accumulation de cellules sénescents, positives pour p16<sup>INK4a</sup>, pourrait contribuer au phénotype de vieillissement et au développement de pathologies qui surviennent habituellement de façon tardive au cours de la vie, tel que le cancer. Il est intéressant de remarquer que certaines composantes du phénotype de vieillissement (régénération retardée, apparition de cancer), dues entre autre à la sénescence, corrélerent avec quelques uns des effets secondaires à long terme observés à la suite d'une exposition aux RI.

La sénescence induite par les RI au niveau des cellules saines de la peau peut placer cette dernière à risque d'effets secondaires à long terme. Une des

principales caractéristiques des cellules sénescents est leur sécrétion de molécules biologiquement actives. Les fibroblastes sénescents sécrètent des facteurs de croissance, des cytokines inflammatoires et des composants et enzymes de dégradation de la matrice extracellulaire (MEC) (50). À plusieurs égards, ce phénotype sécrétoire ressemble à celui d'une réponse inflammatoire, car on note entre autre une sécrétion importante des cytokines inflammatoires interleukine IL-1 et IL-6 (51). Comme ces molécules ont le pouvoir de perturber le microenvironnement normal des tissus et d'affecter le comportement des cellules avoisinantes (52), il est possible que l'accumulation de cellules sénescents in vivo puisse modifier l'homéostasie des tissus. Donc, il nous est possible de penser que la sénescence de cellules normales cutanées (fibroblastes, cellules endothéliales, et même cellules souches ou progénitrices), causée par une exposition aux RI, pourrait altérer le potentiel de la peau à se réparer et à remplacer ses cellules endommagées ou dysfonctionnelles. En d'autres mots, les RI, de par leur capacité à induire la sénescence prématurée des cellules de la peau, pourraient causer une accélération du vieillissement de cette dernière.

# CHAPITRE IV

## 4.1 Les processus de guérison de plaies cutanées

Afin de déterminer comment les RI pourraient conduire à des retards à long terme de réparation et de régénération de la peau, il est important de bien comprendre les processus impliqués dans la guérison de cette dernière suivant une blessure et de savoir quels sont les acteurs moléculaires qui y jouent un rôle important.

La peau adulte consiste en deux principales couches de tissus : un épiderme formé de kératinocytes stratifiés et une région sous-jacente riche en collagène et en tissus conjonctifs, appelée derme et hypoderme, jouant un rôle de support pour la première couche. Parce que la peau sert de barrière protectrice contre le monde extérieur, toute atteinte doit être rapidement et efficacement réparée. La guérison de plaies cutanées est un processus biologique très complexe qui est reconnu pour être similaires chez tous les vertébrés (53). Elle implique divers facteurs de croissances et cytokines qui sont impliqués dans les trois étapes distinctes du processus : inflammation, formation de nouveaux tissus (phase proliférative) et remodelage (54).

La première étape du processus de guérison, la phase inflammatoire, commence immédiatement après l'induction des dommages cutanés et se poursuit durant les 3 à 4 jours suivants. Il s'agit d'une période de migration cellulaire active (55). Elle débute par la formation d'un caillot et se termine par la mise en place d'une matrice temporaire servant à la migration des fibroblastes et

monocytes (56). Le caillot sanguin sert tout d'abord à protéger les tissus blessés et à créer une matrice provisoire permettant la migration cellulaire durant le processus de réparation. Le caillot consiste à un amas de plaquettes entremêlé de fibres de fibrine, provenant du clivage du fibrinogène par la thrombine, ainsi que des protéines de la matrice extracellulaire telles que la fibronectine, la vitronectine et la thrombospondine (53). Cet amalgame de protéines relâche, via la dégranulation des plaquettes, des cytokines et des facteurs de croissances qui vont se mêler avec ceux présents dans le sérum des vaisseaux sanguins. Ce cocktail pourra alors débiter le processus de fermeture de plaie, notamment en recrutant des cellules inflammatoires circulantes au site de guérison. Les premières recrutées sont les neutrophiles, suivis par les monocytes, qui vont se différencier en macrophages, et les lymphocytes. Ces cellules éliminent les bactéries au niveau de la blessure, phagocytent des débris cellulaires et accélèrent le processus de néovascularisation par voie autocrine ou paracrine (55,56). Ce sont les facteurs de croissances et les cytokines relâchées en grande quantité par ces cellules qui médient le procédé en stimulant la mitogénèse et l'angiogénèse ainsi que l'activation de fibroblastes pour que ceux-ci augmentent leur production de collagène (57,58). De plus, la réépithélialisation débute dans les 24 heures suivant la formation de la plaie via la migration de cellules basales dans cette dernière (59).

La seconde étape du processus de guérison de plaies, la formation de nouveaux tissus, débute deux jours après induction de la blessure, avant même la fin de l'étape précédente (58). Cette dernière continue pendant au moins trois semaines et est caractérisée par la migration et la prolifération de différents types

cellulaires. Le rétablissement de l'épiderme est complété durant cette phase dû à la migration des kératinocytes au niveau de l'atteinte cutanée. Il est suggéré que l'absence de cellules au niveau de la plaie stimulerait la migration et la prolifération des kératinocytes, permettant à ceux-ci de traverser la matrice temporaire formée par les produits de la cascade de coagulation (56). La formation massive de capillaires sanguins (un procédé portant le nom d'angiogénèse) débute aussi au cours de cette phase, stimulée par les conditions hypoxiques qui résident au niveau local et le recrutement de cellules progénitrices endothéliales dérivées de la moelle osseuse (58). Aussi, les fibroblastes du derme prolifèrent et les mastocytes et macrophages demeurent en état d'activation (60). L'association des nouveaux fibroblastes et des macrophages avec les capillaires en formation entraîne un remplacement de la matrice fibreuse par du tissu de granulation (appelée ainsi dû à l'apparence granuleuse des nombreux capillaires), ce qui aide également à la migration des kératinocytes. Vers la fin de cette étape, des fibroblastes en provenance de l'environnement de la plaie ou de la moelle osseuse sont stimulés par des macrophages et certains se différencient en myofibroblastes (61). Ces cellules produisent des protéines contractiles telles que l'actine et la myosine et interagissent avec des fibroblastes afin de stimuler la contraction de la blessure et sa fermeture par la formation d'une matrice extracellulaire principalement formée de collagène (62).

La troisième phase de la fermeture de plaie, le remodelage, débute deux à trois semaines à la suite de l'induction de la blessure et se poursuit durant environ deux ans. Durant cette étape, tous les processus activés précédemment sont arrêtés. Beaucoup de cellules endothéliales, macrophages et myofibroblastes sont



par la suite éliminés, par apoptose ou parce qu'ils quittent la plaie, laissant une masse consistant majoritairement de collagène et de protéines de la matrice extracellulaire (63). Six à douze mois plus tard, la matrice de collagène est remodelée, passant d'un squelette composé de collagène de type III à un principalement composé de collagène de type I. Ce processus est mis en branle par les métalloprotéinases de la matrice qui sont sécrétées par les fibroblastes, cellules endothéliales et macrophages et a pour effet de solidifier les tissus réparés (64).

## **4.2 Le rôle des facteurs de croissance et des cytokines**

Toutes les étapes du processus de réparation sont contrôlées par une large variété de facteurs de croissance et de cytokines. Il a été démontré que l'administration directe de ces molécules au site d'une blessure via application topique ou livraison virale de protéines recombinantes accélérât la guérison de plaie cutanée chez les souris. Par exemple, les protéines sonic hedgehog, vascular endothelial growth factor (VEGF) et stromal derived growth factor-1 $\alpha$  (SDF-1 ou CXCL12) accélèrent la réparation de plaies principalement en augmentant l'angiogénèse au niveau local (65-67). Dans cette section, je discuterai des facteurs de croissance et cytokines qui jouent des rôles de premier plan dans la réparation de blessures. Ces molécules représentent un intérêt certain car leur application pourrait être en mesure de renverser, ou à tout le moins atténuer, les retards de guérison cutanée causés par les RI. Mais comme le(s) mécanisme(s) moléculaire(s) impliqué(s) dans l'apparition de ces délais de réparation est (sont) toujours inconnu(s) jusqu'à présent, nous ne pouvons pas être certains que même

un seul de ces facteurs de croissance ou cytokines puisse vraiment avoir un effet thérapeutique significatif.

#### **4.2.1 "Platelet-Derived Growth Factor"**

Le "platelet-derived growth factor" (PDGF) est un peptide homo- ou hétérodimérique formé de chaînes A et B reliées ensemble au moyen de ponts disulfures. Les différentes isoformes possibles (PDGF-AA, PDGF-AB, PDGF-BB, PDGF-CC et PDGF-DD) exercent leurs effets cellulaires en se liant à trois différents récepteurs transmembranaires à activité tyrosine kinase, qui sont des homo- ou hétérodimères de chaînes  $\alpha$  et  $\beta$  (68,69). Il est bien établi de nos jours que le PDGF joue un rôle critique dans la régulation de multiples aspects de la croissance, différenciation et survie cellulaire (69).

Le PDGF agit sur plusieurs types de cellules impliquées dans la guérison de plaies cutanées. Il a entre autre des propriétés chimiotactiques envers les fibroblastes, les neutrophiles et les macrophages (70). Aussi, il augmente la prolifération des fibroblastes et stimule les macrophages pour que ces derniers sécrètent d'autres facteurs de croissance importants pour la réparation des tissus. Il a été démontré également que le PDGF favorise la production de la fibronectine (71), du collagène (72), des protéoglycanes (73), et de l'acide hyaluronique (74), toutes des molécules de la matrice extracellulaire. Finalement, le PDGF stimule les fibroblastes afin qu'ils contractent les matrices de collagène et qu'ils adoptent le phénotype de myofibroblastes (69,75).

Pour que le PDGF puisse exercer ses effets, il doit être présent et agir au niveau des sites de réparation de la peau. Certaines analyses sur l'expression du PDGF et de ses récepteurs durant le processus de guérison de plaie ont démontré que ce dernier est relâché par les plaquettes et sécrétés par les macrophages activés (76), les fibroblastes activés (77), les cellules endothéliales (78) et les kératinocytes de l'épiderme (79), suggérant que le PDGF est présent au niveau des tissus cutanés blessés pour participer entre autres aux phases de réépithélialisation et d'angiogénèse. Aussi, il a été démontré par immunohistochimie que les fibroblastes et les cellules de muscle lisse situées en périphérie des blessures contiennent de faibles niveaux de récepteurs (80). Donc le PDGF peut signaler et engendrer une réponse cellulaire locale. De façon intéressante, il a été découvert que le retard de fermeture de plaie survenant chez les souris âgées était associé avec un délai dans l'apparition des isoformes PDGF-AA et -BB ainsi que des récepteurs  $\alpha\alpha$  et  $\beta\beta$  (81), indiquant qu'un certain niveau d'expression de PDGF et de ses récepteurs sont requis pour les processus normaux de guérison.

Plusieurs études *in vivo* ont démontré que l'application topique de PDGF-BB était efficace pour accélérer la réparation de plaies (82-85). Des analyses de sections de peau de plaies ont démontré que ce facteur de croissance induit la prolifération et différenciation des fibroblastes (86). De façon importante, une étude clinique a révélé que le PDGF-BB pourrait accélérer la guérison chez des patients présentant des déficits dans ce domaine, comme les personnes diabétiques (87). Le PDGF-BB humain recombinant a donc été approuvé par la U.S. Food and Drug Administration pour le traitement d'ulcères aux pieds chez ce type de

patients (88,89). Pour cette raison, il pourrait être possible que l'application locale de PDGF-BB puisse accélérer la guérison d'une peau irradiée.

#### 4.2.2 "Epidermal Growth Factor"

La famille de l'"epidermal growth factor" (EGF) comprend plusieurs membres dont, parmi les plus notables, l'EGF et l'heparin-binding EGF (HB-EGF). Ces facteurs de croissance signalent via leur liaison à quatre récepteurs: EGFR/ERbB1, HER2/ErbB2, HER3/ErbB3 et HER4/ErbB4, qui, suivant la liaison des ligands, forment des homo-ou hétérodimères (90). Plusieurs résultats expérimentaux ont démontré que l'EGF et l'HB-EGF étaient capables d'accélérer la réparation de plaies, suggérant que ces facteurs de croissance pourraient avoir eux aussi un rôle d'importance à jouer dans ce processus (91-93).

Une des premières évidences que les ligands de la famille de l'EGF jouent un rôle important dans la réparation de tissus est que le traitement d'une blessure avec un anticorps contre EGF a pour effet de neutraliser l'activité chimiotactique des cellules endothéliales (94). Aussi, il a été démontré que le HB-EGF agit de façon synergique avec l'insulin-like growth factor-1 (IGF-1), un autre facteur de croissance présent au niveau des plaies, pour stimuler la prolifération des kératinocytes *in vitro* (95). Il semble donc que le HB-EGF pourrait être impliqué de façon importante dans le processus de réépithélialisation. Une étude publiée en 2000 est venue confirmer ce rôle critique. Les auteurs de cette étude ont démontré que l'application au niveau de plaies de souris d'un composé empêchant le HB-EGF de passer à sa forme bioactive entraînait un important retard dans la migration des kératinocytes à la blessure (96). Cette inhibition était réversible

lorsque le HB-EGF sous forme de protéine recombinante était ajouté en même temps que le composé (OSU8-1). Ces résultats indiquent donc que des ligands de l'EGFR, tels qu'EGF et HB-EGF, sont importants pour la migration des kératinocytes autant *in vitro* qu'*in vivo*.

### 4.2.3 "Insulin-like Growth Factors"

L'"insulin-like growth factor I" (IGF- I) et l'"insulin-like growth factor II" (IGF-II) sont reconnus pour promouvoir la prolifération et la survie de nombreux types cellulaires. Ils exercent leur fonctions de façon autocrine, paracrine ou endocrine et leurs actions sont médiées par le récepteur à activité tyrosine kinase IGF de type I. Il est à noter que l'IGF-II a aussi la capacité de lier le récepteur IGF de type II/mannose-6-phosphate, ce qui résulte en l'internalisation et la dégradation de ce facteur de croissance (97).

Au niveau de la peau normale, seulement quelques cellules du derme et de l'épiderme expriment les IGFs et leurs récepteurs. Un des plus importants producteurs sont les fibroblastes (98). Les IGFs, une fois sécrétées, peuvent agir directement sur leurs cellules productrices et favoriser leur prolifération (99), leur survie (100) et leur migration (101). Elles peuvent aussi stimuler les fibroblastes à produire des facteurs de croissance qui peuvent à leur tour agir de façon locale ou paracrine sur l'épiderme (102). Il a été démontré que le vieillissement pouvait affecter les fonctions biologiques des fibroblastes autant *in vitro* qu'*in vivo*, et que cette différence pouvait être entre autre due à des modifications de la réponse à l'IGF-I. Par exemple, seulement les fibroblastes humains jeunes et non sénescents sont capable de proliférer en réponse à une stimulation avec l'IGF-I *in vitro*, et ce,

même si des niveaux similaires de récepteurs IGF de type I sont exprimés dans les deux types de cellules (103). De plus, il a été démontré que les fibroblastes sénescents n'expriment pas l'ARN messager (ARNm) d'IGF-I, indiquant qu'il pourrait y avoir potentiellement une ablation de la composante autocrine de l'action de l'IGF-I (104). Comme la prolifération des fibroblastes est nécessaire au processus de réparation des tissus cutanés, il est possible que l'expression déficiente d'IGF-I contribue aux retards de guérison de la peau qui surviennent avec l'âge.

Les IGFs sont aussi exprimés par les kératinocytes de l'épiderme. Il a été démontré que l'IGF-I est présent sous forme d'ARNm et de protéine dans l'épiderme humain. De façon plus précise, IGF-I est localisé au niveau des cellules des follicules pileux (105). Plusieurs études portant sur la guérison de plaies ont permis de déterminer que les ARNm de l'IGF-I et l'IGF-II étaient exprimés par les kératinocytes durant le processus de réparation de la peau (106-108). Les principaux rôles des IGFs au niveau des kératinocytes incluent la stimulation de leur prolifération et de leur différenciation, leur protection contre l'apoptose et leur augmentation du transport du glucose (98).

Les IGFs semblent être essentiels à la guérison de plaies cutanées. En effet, les niveaux d'ARNm et protéines d'IGF-I et IGF-II sont modulés durant les premières heures et/ou jours du processus et cette augmentation corrèle avec les étapes de prolifération cellulaire et la migration (107,109,110). Étant donné l'importance de l'expression des IGFs, il est possible que les retards de réparation de la peau soient partiellement dus à son altération. Des études récentes ont

démontré que les IGFs pourraient jouer un rôle de premier plan dans les anomalies de guérison cutanées observées chez les patients diabétiques. Il semblerait que l'induction de l'expression d'IGF-I et IGF-II soit fortement réduite dans les plaies d'animaux diabétiques (111,112). Consistant avec ces résultats observés au niveau de l'ARN, on note aussi une apparition retardée de la forme protéique des IGFs. Afin de renverser le retard de guérison associé avec le diabète, l'application locale d'IGF-I a été testée (113). Le traitement à l'aide de ce facteur de croissance s'est révélé efficace pour améliorer la vitesse de fermeture de plaies, supportant son rôle d'importance dans la guérison de la peau et son potentiel thérapeutique dans le traitement de troubles pouvant affecter ce processus.

#### **4.2.4 "Transforming Growth Factor- $\beta$ "**

Les membres de la famille du "transforming growth factor- $\beta$ " (TGF- $\beta$ ) sont reconnus pour jouer différents rôles importants, notamment au niveau du développement, de l'homéostasie et du processus de réparation des tissus. De par leurs propriétés, il s'agit d'une des familles de cytokines les plus étudiées. Les trois isoformes présents chez les mammifères sont désignés par TGF- $\beta$ 1 (généralement considéré comme le plus abondant), TGF- $\beta$ 2 et TGF- $\beta$ 3. Ces derniers sont synthétisés sous forme de précurseurs latents qui peuvent exercer leurs actions biologiques suivant un clivage protéolytique et une liaison aux récepteurs de type sérine-thréonine kinase (114). Les trois isoformes ont des fonctions à la fois distinctes et similaires. Il a été démontré qu'ils ont tous une action mitogénique pour les fibroblastes, mais inhibent la prolifération de plusieurs autres types cellulaires, dont les kératinocytes. Les TGF- $\beta$ s sont aussi

d'importants stimulateurs de protéines de la matrice extracellulaire et des intégrines (115).

Immédiatement après induction d'une blessure, le TGF- $\beta$ 1 est relâché en grande quantité par les plaquettes (116). Ceci a pour effet d'attirer des neutrophiles, macrophages et fibroblastes qui vont à leur tour augmenter les niveaux de TGF- $\beta$ 1 dans différents types cellulaires. Ces différentes sources assurent un approvisionnement constant de TGF- $\beta$ 1 durant les étapes du processus de réparation des tissus (117). L'expression des TGF- $\beta$ s est à son maximum 7 jours après le début de la guérison et se maintient à des niveaux élevés jusqu'au jour 16 (118). Sur la base de ces études qui ont démontré l'expression des TGF- $\beta$ s et de leurs récepteurs dans la peau après blessure et aussi par l'observation que l'application de ces cytokines sur des plaies entraîne un effet bénéfique, il a été suggéré que les TGF- $\beta$ s stimulent la réépithélialisation et la formation du tissu de granulation.

<b>Type cellulaire</b>	<b>Effet de TGF-<math>\beta</math>1</b>
Fibroblastes	chimiotaxie Augmentation de la synthèse de composants de la matrice extracellulaire
Cellules endothéliales	Diminution de la prolifération Diminution de la motilité
Macrophages	Chimiotaxie Augmentation de la maturation
Kératinocytes	Augmentation de la maturation Diminution de la prolifération

**Tableau 1.** Effets du TGF- $\beta$ 1 sur les cellules impliquées dans le processus de guérison cutanée.



Plusieurs cellules impliquées dans la guérison de plaies répondent au TGF- $\beta$ 1 (tableau 1). On retrouve parmi celles-ci les cellules endothéliales (119), les kératinocytes (120), les macrophages (121) et les fibroblastes (114). Les effets du TGF- $\beta$ 1 peuvent paraître contradictoires, celui-ci agissant en inhibant la prolifération des cellules endothéliales et des kératinocytes mais en augmentant l'attraction des macrophages et fibroblastes à la blessure. Plusieurs en sont venus à la conclusion que le TGF- $\beta$ 1 joue à la fois un rôle de régulateur positif et négatif de la réépithélialisation. Néanmoins, il semble tout de même jouer un rôle positif de haute importance dans le processus, car des études ont démontré que l'expression aberrante de TGF- $\beta$ 1 était associée avec les retards de guérison cutanée vus chez les souris âgées (81) et les rats diabétiques (112).

#### **4.2.5 "Fibroblast Growth Factors"**

Les "fibroblast growth factors" (FGFs) forment une famille de 22 membres qui sont présents à la fois chez l'humain et chez la souris (122). Ils stimulent la prolifération de plusieurs types cellulaires originaires du mésoderme, de l'ectoderme ou de l'endoderme et peuvent agir comme des facteurs angiogéniques *in vivo*. La seule exception est FGF-7 (aussi appelé keratinocyte growth factor, KGF) qui est spécifique seulement pour certains types de cellules endothéliales (123).

Les effets biologiques des FGFs sont médiés via leur liaison à 4 récepteurs transmembranaires de haute-affinité appartenant à la famille des récepteurs tyrosine-kinase, les récepteurs FGF 1-4 (FGFR1-4) (124). Tous les FGFs se lient à un ou des récepteurs spécifiques, excepté FGF-1, qui se lie à tous les récepteurs,

et FGF-7 qui n'interagit qu'avec une version du FGFR2 ayant subi un épissage alternatif, FGFR2IIIb (125). Les récepteurs FGFs sont composés de deux ou trois domaines immunoglobulin-like et d'une région acide située au niveau de la partie extracellulaire du récepteur. La liaison à ces récepteurs mène à leur oligomérisation et à l'initiation de la cascade de signalisation intracellulaire (124).

Les FGFs n'ont pas seulement un effet mitogénique sur leurs cellules cibles. Ils peuvent aussi réguler la migration et la différenciation des cellules, et même quelques FGFs ont des propriétés cytoprotectrices sous certaines conditions de stress, telle qu'une exposition aux radiations par exemple (123). Plusieurs études ont révélé que ces facteurs de croissance jouent un rôle dans la réparation de la peau à la suite d'une blessure. En particulier, FGF-1 et FGF-2 ont été reconnus pour stimuler l'angiogénèse dans divers systèmes (126). Aussi, il a été déterminé chez des souris transgéniques que la perte de fonction pour FGF-2 pouvait entraîner des retards de réépithélialisation de plaies cutanées (127). De plus, il a été suggéré que FGF-7, FGF-10 et FGF-22 agissent de concert avec FGFR2IIIb pour stimuler la prolifération des kératinocytes autant au niveau de la peau normale qu'en réparation. De façon intéressante, la surexpression d'un dominant négatif du récepteur FGFR2IIIb a semblé allonger significativement le temps de réépithélialisation de plaies chez la souris (128). Si on ajoute les résultats de nombreuses études où il a été démontré que l'application locale de FGF-1, FGF-2, FGF-4, FGF-7 et FGF-10 accélère la réparation des tissus (123), il est clair que les FGFs semblent être de sérieux candidats pour contribuer au processus de guérison de la peau.

Le FGF-2 est un des FGFs le mieux caractérisé. Il est reconnu pour stimuler *in vitro* la prolifération des fibroblastes, des cellules endothéliales et des cellules de muscle lisse. Il est aussi impliqué dans la régulation de la survie et de la migration cellulaire ainsi que dans la production et dégradation de la matrice (129). Deux études ont démontré que ce facteur de croissance pourrait avoir un rôle critique à jouer dans les retards de guérison qui surviennent chez les animaux âgés et diabétiques. En effet, il semble que ce dernier soit diminué dans les plaies de souris âgées et que cette baisse soit associée avec une réponse réduite de l'angiogénèse au niveau local (130). Aussi, il a été démontré que FGF-2 est surexprimé au site d'une blessure dans la peau de rats normaux mais non dans celle de rats diabétiques (131). Il est donc possible que des défauts d'expression de FGF-2 soient également la cause des retards de réparation de la peau survenant à la suite d'une exposition aux RI.

#### **4.2.6 "Vascular Endothelial Growth Factor"**

La famille du "vascular endothelial growth factor" (VEGF) comprend divers membres dont VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D, VEGF-E, VEGF-F et le placenta growth factor (PLGF). Ces facteurs agissent en liant trois différents récepteurs transmembranaires à activités tyrosine kinase désignés par VEGFR-1 (Flt-1), VEGFR-2 (Flk-1/KDR) et VEGFR-3. Les mécanismes moléculaires par lesquels les VEGFs induisent leurs effets ne sont pas encore parfaitement caractérisés, mais il semble que le récepteur VEGFR-2 médie presque tous les effets cellulaires connus de ces facteurs de croissance. La Phosphoinositol-3-kinase (PI3K)/Akt, la mitogen-activated protein kinase (MAPK), le calcium

(Ca<sup>2+</sup>) et l'oxyde nitrique (NO) sont des médiateurs clés des effets de la signalisation du VEGFR-2 (132).

Les VEGFs agissent sur leurs récepteurs, qui sont exprimés principalement sur des cellules endothéliales, et, avec d'autres cytokines (FGF, PDGF et les angiopoïétines), induisent et maintiennent la vasculature (133). VEGF-A (souvent simplement appelé VEGF) est le membre le plus connu de la famille. Au moins six isoformes de VEGF-A de différentes tailles ont été découverts jusqu'à maintenant (121, 145, 165, 183, 189 et 206 acides aminés) (134). Ce facteur de croissance est connu pour jouer un rôle majeur dans la régulation de la vasculogénèse (néovascularisation à partir du recrutement de cellules progénitrices dérivées de la moelle osseuse) et de l'angiogénèse (formation de vaisseaux sanguins à partir de la prolifération des cellules endothéliales des vaisseaux existants) durant le développement embryonnaire, la croissance tumorale et la réparation de tissus (66). Cela indique donc qu'il pourrait s'agir d'un régulateur important du développement vasculaire durant le processus de guérison de plaies cutanées.

Le VEGF-A est fortement exprimé par les kératinocytes et les macrophages en condition ischémique, situation qui prévaut au niveau de la peau blessée. Alors que l'hypoxie est importante pour la régulation de VEGF-A, d'autres voies incluant des facteurs de croissance, des cytokines inflammatoires et des hormones peuvent permettre aussi sa surexpression (132). L'augmentation des niveaux d'ARNm de VEGF-A agit pour faciliter la réparation des tissus en augmentant la perméabilité vasculaire, permettant ainsi d'augmenter l'efflux de

cellules inflammatoires au site de la blessure. Il permet aussi d'augmenter la migration et la prolifération des cellules endothéliales (66). La surexpression de VEGF au moyen de méthodes de thérapie génique a été démontrée efficace pour permettre l'augmentation de la densité de vaisseaux au niveau des plaies et permettre leur fermeture plus rapide. Plus particulièrement, le transfert génique au moyen d'un adénovirus permettant l'expression de VEGF-A165 semble accélérer la réparation cutanée chez les souris diabétiques par augmentation de l'angiogénèse (135).

#### **4.2.7 "Stromal-derived growth factor 1 $\alpha$ "**

Le "stromal-derived growth factor 1 $\alpha$ " (SDF-1 $\alpha$ , CXCL12) est une chimiokine à motif cystéine-x-cystéine (CXC) qui a été originellement isolée d'une lignée cellulaire murine de cellules stromales de la moelle osseuse (136). Elle est l'une des chimiokines les plus conservées parmi les espèces. En effet, le SDF-1 $\alpha$  chez la souris et l'humain sont à 99% identiques (137). Le SDF-1 $\alpha$  agit en liant son unique récepteur, le CXCR4, qui est un membre de la famille des récepteurs couplé aux protéines G (138). La perte de fonction de SDF-1 $\alpha$  ou CXCR4 chez la souris génère des effets similaires, soit une hématopoïèse normale au niveau du foie foetal mais une absence de prise des cellules hématopoïétiques dans la moelle (139-141). Cela a pour effet de contribuer, en combinaison avec de sévères défauts circulatoires, à la mort des souris au stade embryonnaire. SDF-1 $\alpha$  et CXCR4 semblent donc jouer un rôle critique dans l'établissement de la moelle osseuse, siège de l'hématopoïèse après la naissance, et dans la formation de vaisseaux sanguins.

Le SDF-1 $\alpha$  est exprimé de façon basale dans de nombreux tissus. Sous certaines conditions pathologiques, SDF-1 $\alpha$  a été reconnu pour contribuer au recrutement de cellules progénitrices endothéliales au site de réparation d'un infarctus du myocarde et au niveau du microenvironnement de tumeurs (142,143). Plusieurs s'entendent pour dire qu'il est l'un des plus importants inducteurs de la vasculogénèse. Au niveau de la moelle osseuse, l'organe où il a été le plus étudié, il est exprimé constitutivement par les ostéoblastes, les fibroblastes et les cellules endothéliales (144). Le SDF-1 $\alpha$  est une cytokine possédant des propriétés chimioattractantes pour les cellules possédant le récepteur CXCR4, telles que les monocytes, les lymphocytes et les cellules souches hématopoïétiques CD34+ (145,146). De plus, l'interaction SDF-1 $\alpha$ /CXCR4 est impliquée dans le nichage à la moelle et la circulation de leucocytes durant le processus de lymphopoïèse et de myélopoïèse (140).

SDF-1 $\alpha$  est exprimé de façon constitutive dans la peau normale humaine et est reconnu pour contribuer à l'homéostasie de cet organe. Plusieurs observations ont permis de suggérer que cette cytokine pourrait jouer un rôle central dans le recrutement de cellules au niveau de tissus blessés et hypoxiques afin de faciliter le processus de réparation de plaies. En effet, il a été démontré que SDF-1 $\alpha$  est finement régulée durant les étapes de guérison (147). Cette régulation est possible, car le promoteur de SDF-1 $\alpha$  possède des sites de liaison à l'hypoxia inducible factor-1 (HIF-1), protéine dont l'expression est augmentée dans les blessures dû à la diminution de la quantité d'oxygène présent (148).

À la suite de l'induction d'une blessure, il y a surexpression de SDF-1 $\alpha$  dans la peau avoisinant la plaie et cette augmentation des niveaux pourrait contribuer à l'accumulation de cellules progénitrices endothéliales localement et donc, accélérer la néovascularisation (147). Cette observation a été confirmée par une étude qui a démontré que le recrutement altéré de progéniteurs endothéliaux dans les plaies de souris diabétiques était dû à la diminution des niveaux de SDF-1 $\alpha$ . Lorsque que la cytokine était injectée, le défaut de migration était renversé et il y avait accélération de la réparation de la peau (149). Donc, de par son rôle important dans la vasculogénèse et la guérison de plaies, cette cytokine représente une candidate de choix à étudier dans notre modèle.

#### **4.2.8 "Matrix Metalloproteinase"**

Les métalloprotéinases de la matrice (MMPs) sont des endopeptidases qui contiennent des ions Zn<sup>2+</sup> et Ca<sup>2+</sup> dans leur site actif, d'où le préfixe «métallo» dans leur nom. Il y a 25 MMPs qui ont été découvertes jusqu'à maintenant, dont 24 qui sont retrouvées chez les mammifères (150). Le rôle le plus connu de ces peptidases est de dégrader la matrice extracellulaire. Cependant, il ne s'agit pas du rôle prédominant de ces enzymes. En effet, les MMPs agissent aussi en clivant un large éventail de protéines n'appartenant pas à la matrice telles que des cytokines, des chimiokines et des récepteurs, régulant ainsi leurs activités (150). Les MMPs sont régulées en trois étapes: (i) au niveau transcriptionnel par de multiples cytokines, facteurs de croissance, neurohormones; (ii) par leurs inhibiteurs spécifiques dans les tissus, les TIMPs («target tissue inhibitor of metalloproteinases»); et (iii) par activation directe dû au stress oxydatif et/ou un clivage protéolytique (151). Certains membres des MMPs sont exprimés dans les

tissus normaux, suggérant que ces dernières jouent un rôle dans l'homéostasie. Cependant, la plupart de ces enzymes sont seulement induites durant les processus de réparation et de remodelage des tissus, dans les réactions inflammatoires et au niveau des tumeurs afin de faciliter l'invasion de cellules métastatiques (152,153).

Les MMPs participent à toutes les phases du processus de guérison de plaies cutanées. Par exemple, ces enzymes peuvent activer des cytokines et chimiokines qui sont relâchées en grande quantité durant la phase inflammatoire en les clivant et ainsi, augmenter leur activité ou les dégrader. Le VEGF et le TGF- $\beta$  en sont de bons exemples (154). Aussi, les MMPs sont capables de cliver des jonctions cellule-cellule et des contacts cellule-matrice dans le but de promouvoir la réépithélialisation. Par exemple, il a été suggéré que MMP-9 était nécessaire pour cliver et activer l'EGF et permettre à ce dernier de stimuler la migration des kératinocytes lors d'une blessure (155). Bien entendu, les MMPs ont également un rôle à jouer dans le remodelage de la matrice extracellulaire, nécessaire pour la contraction de blessures. Elles agissent entre autre en favorisant la dégradation de protéines telle que le collagène. Il a été observé chez des souris MMP-3<sup>-/-</sup> que les filaments d'actine, responsables de la contraction de plaies, était désorganisés. La contraction réduite des blessures a résulté en l'augmentation de la taille de la plaie et donc, au ralentissement de la vitesse de guérison (156). Cette protéase semble donc contribuer de façon majeure à la phase de remodelage. On peut donc conclure que de façon générale, les MMPs sont des enzymes régulatrices clés de multiples aspects de la guérison de plaies, et que dans notre situation, il s'agit de candidates potentielles à prendre en considération.

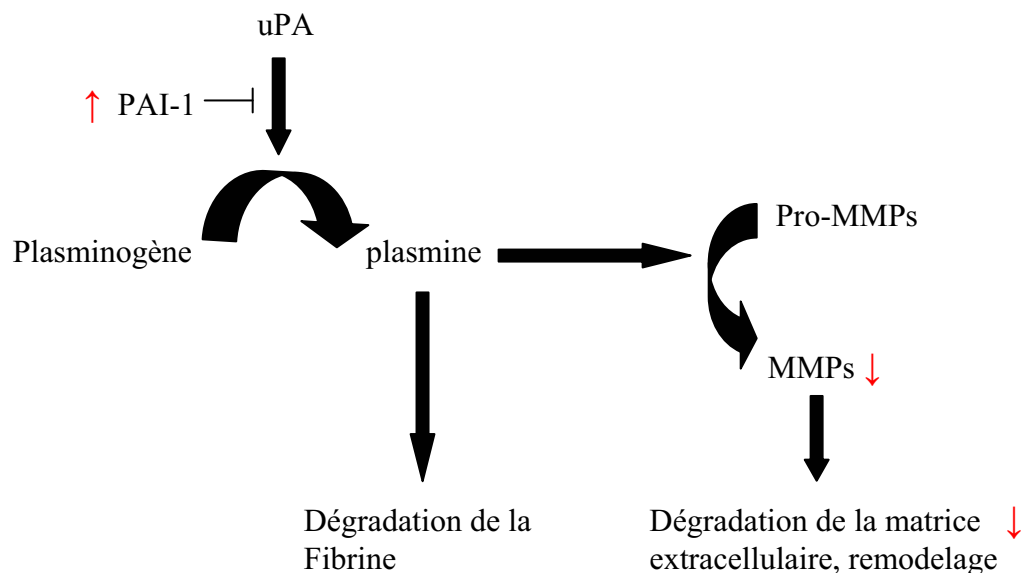


#### 4.2.9 "Plasminogen activator inhibitor-1"

Le "plasminogen activator inhibitor-1" (PAI-1) a été découvert pour la première fois dans le milieu conditionné provenant de cellules endothéliales humaines en culture. Il a été par la suite détecté dans le plasma, les plaquettes et le milieu conditionné de fibrosarcomes et hépatocytes. Le PAI-1 est aussi produit par les cellules de muscle lisse vasculaire, les fibroblastes, les monocytes/macrophages et les cellules stromales des tissus adipeux (157). La présence du PAI-1 a été démontrée dans de nombreux tissus, suggérant que des cellules communes à ces tissus, telles que les cellules endothéliales et les cellules de muscle lisse, pourraient être la source principale de sa production.

Le PAI-1 est reconnu pour son rôle dans l'athérosclérose, dans certains problèmes métaboliques tels que l'obésité et la résistance à l'insuline, le stress chronique, le remodelage osseux, l'invasion de tumeur, la formation de métastases, l'angiogénèse et la guérison de plaies (158). Tous ces processus physiologiques et patho-physiologiques dépendent de l'activité de l'urokinase-type plasminogen activator (uPA). En effet, cette protéase y joue un rôle important car elle est impliquée dans l'activation de la plasmine, une sérine protéase qui participe à l'activation des MMPs (Fig. 4). Avec son régulateur majeur, PAI-1, qui agit en empêchant sa liaison avec son récepteur urokinase-type plasminogen activator receptor (uPAR), elle module de façon importante le remodelage de la matrice extracellulaire. Au niveau transcriptionnel, uPA et PAI-1 sont régulés par différents facteurs de croissances et suppresseurs de tumeur tels que *c-myc*, p53, TGF- $\beta$  et HIF-1 (158).

### Dommmage à l'ADN/sénescence



**Fig.4** Rôle du PAI-1 et de l'uPA dans le remodelage de la matrice extracellulaire.

Des modèles murins de perte de fonction de PAI-1 et uPA ont démontré des résultats inverses au niveau de la réparation de plaies cutanées. En effet, les souris ayant une perte de fonction de PAI-1 guérissent plus rapidement leurs plaies alors que les souris knockout pour uPA ont une guérison retardée. Cette différence semble dépendre du taux de prolifération des fibroblastes, qui est nettement supérieur chez les souris knockout pour PAI-1 (159,160). Ces études confirment donc le rôle d'importance que joue l'uPA dans la réparation de tissus. Ils supportent également le fait que PAI-1, de par son rôle de régulateur de l'activité de l'uPA, est néfaste à la guérison cutanée.

Fait intéressant, PAI-1 est reconnu comme un marqueur de sénescence chez les fibroblastes, autant *in vivo* qu'*in vitro* (161). Cela est dû entre autre au fait que l'activation de p53 dans les cellules sénescents à pour effet de réguler à la hausse les niveaux de PAI-1. Donc, il est possible de postuler que la formation

de cellules sénescents au niveau de la peau, comme par exemple suite à une exposition aux RI, pourrait entraîner une élévation de la sécrétion de PAI-1 au niveau local, empêchant ainsi uPA d'activer les MMPs et ainsi retarder le remodelage de la matrice, étape cruciale de la guérison de plaies (Fig. 4). Ce dernier point n'est cependant qu'une hypothèse et sera investigué dans ce mémoire.

# CHAPITRE V

## 5.1 La thérapie cellulaire à base de cellules souches

De nos jours, la tendance en médecine régénérative est de développer des approches moléculaires afin d'accélérer la guérison et la réparation tissulaire. L'administration de cytokines et de facteurs de croissance sous forme de protéines recombinantes a été démontrée efficace chez certains modèles animaux (65,66). Cependant, cette approche a pour défaut d'être très dispendieuse, dû aux coûts associés à la production de protéines recombinantes. L'administration de molécules via livraison à l'aide de vecteurs viraux (rétrovirus, adénovirus, lentivirus ...) est aussi une technique qui a fait ses preuves (67). Cependant, son application est encore très limitée en raison des dangers potentiels de cette procédure, tels que le développement de leucémie (162).

Il a été suggéré que la thérapie cellulaire à l'aide de cellules souches pourrait être une technique très prometteuse pour accélérer la régénération de nombreux tissus (163). Les causes de l'amélioration fonctionnelle des tissus suivant la transplantation cellulaire restent, encore aujourd'hui, très controversées. Cependant, il est reconnu que les cellules souches pourraient agir notamment en se différenciant en cellules spécialisées, en se fusionnant avec des cellules et ainsi les reprogrammer, ou en sécrétant des facteurs de croissances et cytokines nécessaires à la guérison (163). Il est important de souligner par contre que les différents modes d'action des cellules souches pourraient également les rendre susceptibles de générer certains types de cancers. En effet, il est possible que ces

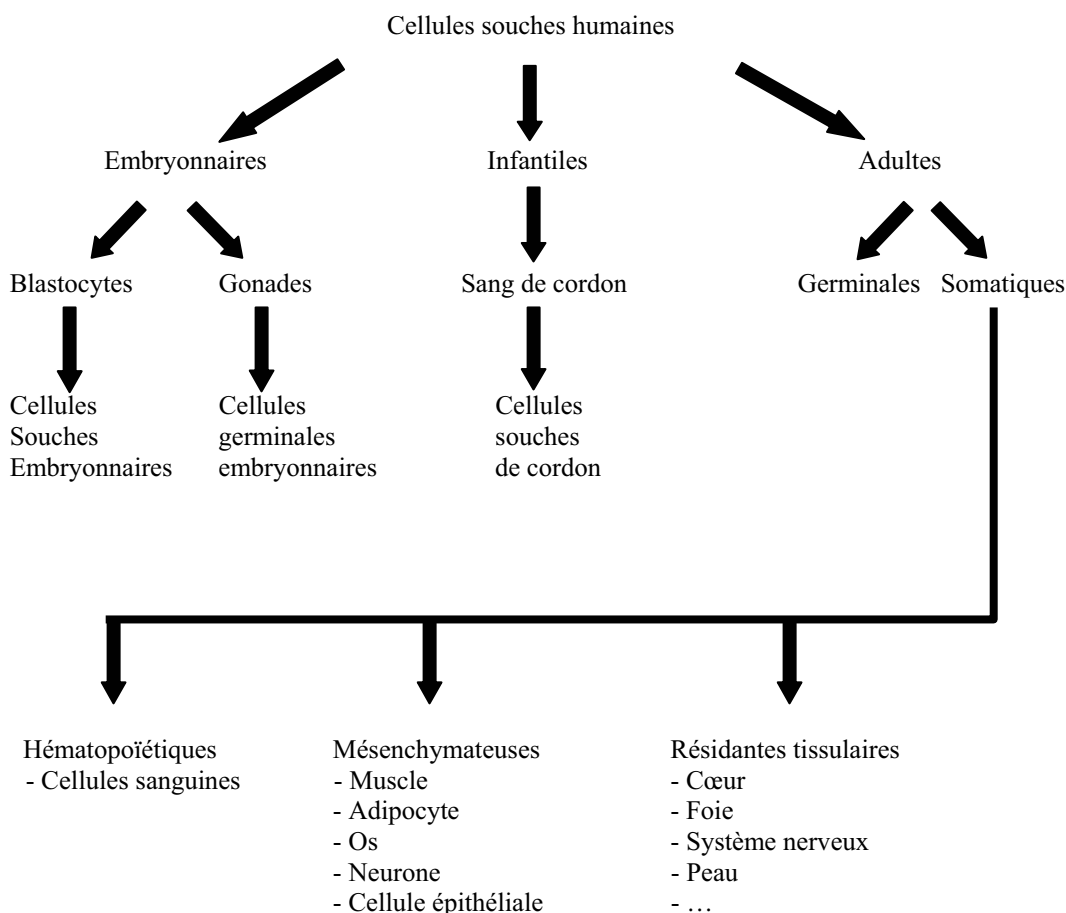
cellules, une fois fusionnées et reprogrammées, soient transformées en cellules malignes. Aussi, il a été suggéré que les cellules souches pourraient être en mesure d'agir sur la croissance de tumeurs en sécrétant diverses molécules favorisant l'angiogénèse et le recrutement et la prolifération de cellules endothéliales au niveau du microenvironnement des tumeurs (164). Par conséquent, il sera très important de tenir compte de ces risques de cancer dans les développements futurs de la médecine régénérative à base de cellules souches.

Il a été démontré récemment qu'il était possible de combiner la thérapie cellulaire et la thérapie génique dans le but de produire des « super cellules », capable de délivrer des gènes thérapeutiques dans les tissus à la suite de leur administration afin de permettre une régénération plus rapide. Donc, les cellules souches, de par leurs actions (différentiation, sécrétions de molécules...) et leur rôle en tant qu'outil de livraison, pourraient représenter, malgré les risques possibles de cancer, une solution potentielle pour accélérer la réparation des tissus chez des modèles animaux où cette fonction est altérée.

## **5.2 Les cellules souches**

Plusieurs conditions doivent être respectées afin qu'une cellule soit considérée comme étant souche. Premièrement, elle doit être capable d'auto-renouvellement en plus de pouvoir se différencier en différents types cellulaires spécialisés (165). Plus spécifiquement, la cellule doit être clonogénique, ce qui signifie qu'elle doit être capable de s'auto-renouveler indéfiniment par division symétrique. Elle doit aussi être capable de se diviser asymétriquement, une cellule ressemblant à sa mère et une autre cellule fille se différenciant en différents types

cellulaires représentant les trois couches primitives de l'embryon : l'ectoderme, l'endoderme et le mésoderme. Finalement, elle doit provenir soit d'une source de cellules souches embryonnaires ou adultes.



**Fig.5** Hiérarchie des cellules souches humaines (Adaptée de Bongso et Lee, 2005).

Il existe différents types de cellules souches humaines, telles que les cellules souches embryonnaires, les cellules souches du cordon ombilical et les cellules souches adultes (165). La figure 5 expose la hiérarchie du développement de ces cellules. En haut de la pyramide, on remarque les cellules dites totipotentes qui sont les premières cellules de l'embryon (blastocyte de 1 à 4 jours). Elles peuvent produire tous les types de cellules des tissus et organes et peuvent donc

engendrer un être humain dans sa totalité. C'est à ce stade que l'on peut pratiquer le clonage reproductif par scission embryonnaire. À un stade de division plus avancé, on retrouve les cellules dites pluripotentes, qui sont les cellules de l'embryon de 16 à 32 cellules ayant la capacité de produire pratiquement tous les types cellulaires possibles mais n'étant pas capable de générer un être humain complet. On les appelle, de par leur origine, les cellules souches embryonnaires (166).

Les cellules souches hématopoïétiques issues de sang de cordon ombilical sont considérées comme des cellules multipotentes, c'est-à-dire qu'elles ont un pouvoir de différenciation plus réduit que celui des cellules embryonnaires. Ces dernières sont différentes des cellules souches hématopoïétiques de la moelle osseuse, car elles nécessitent des facteurs de croissance particulier pour leur développement *in vitro* et possèderaient un risque de rejet «donneur versus receveur» beaucoup moins élevé lors de transplantation (167). Cependant, les cellules souches hématopoïétiques de la moelle osseuse sont aussi multipotentes, car elles peuvent donner naissance aux différentes cellules sanguines présentes dans la circulation périphérique.

Chez les cellules souches adultes, on retrouve plusieurs sous-catégories de cellules, les plus importantes étant les cellules souches hématopoïétiques et mésenchymateuses. Ces deux types de cellules proviennent tous deux de la moelle osseuse mais se distinguent sur de nombreux points, le majeur étant leur capacité d'adhésion *in vitro*. En effet, les cellules souches mésenchymateuses sont adhérentes en culture alors que les précurseurs hématopoïétiques restent

normalement en suspension (168). Les deux types de cellules se différencient aussi au niveau des marqueurs qu'elles expriment. Les cellules hématopoïétiques sont positives pour CD34, CD133, c-Kit+, Sca+ alors que les cellules mésenchymateuses sont positives pour CD44, CD29, CD90 et CD105 mais négatives pour les marqueurs CD34 et CD45 (163). Beaucoup d'intérêt a été porté aux cellules souches mésenchymateuses, notamment en raison de leur facilité à être cultivées in vitro et de leur potentiel à se différencier en différents types cellulaires (ostéocytes, adipocytes, chondrocytes) (163,169-171), faisant d'elles des candidates de choix dans le domaine de la thérapie cellulaire.

### **5.3 Les cellules souches mésenchymateuses et leur potentiel thérapeutique**

Premièrement décrites comme des précurseurs des fibroblastes en provenance de la moelle osseuse par Friedenstein et collègues en 1970 (172), les cellules souches mésenchymateuses (MSCs) existent dans pratiquement tous les tissus conjonctifs des organes (173). Le rôle le plus connu de ces cellules est de supporter et réguler la prolifération des cellules souches hématopoïétiques (174,175). En raison du manque de compréhension de la biologie des MSCs, ces dernières portent différents noms : cellules souches mésenchymateuses, cellules stromales mésenchymateuses, cellules stromales multipotentes, cellules stromales de la moelle ...

Il a été démontré que les MSCs sont capables de transdifférentiation, tel que discuté à la fin de la section précédente. La plasticité de ces cellules est



particulièrement grande et inclut de nombreux autres types cellulaires. Par exemple, il a été observé que des MSCs injectées dans le système nerveux de souris migrent en direction du cerveau et adoptent des caractéristiques morphologiques et phénotypiques des astrocytes et des neurones (176). Il a été rapporté également que les MSCs peuvent se différencier en cellules endothéliales de différents types après leur administration de façon systémique dans un modèle de blessure aux poumons induite par exposition à la bléomycine. Les MSCs présentes aux poumons peuvent adopter les caractéristiques phénotypiques de tous les types cellulaires majeurs présents dans cet organe tels que les fibroblastes, les cellules épithéliales de type I et II et les myofibroblastes (177).

Malgré quelques résultats encourageants, plusieurs études *in vivo* ont démontré que les MSCs se transdifférencient à de très faibles niveaux dans les tissus blessés et donc ne contribuent pas physiquement de façon significative à la régénération des tissus. Par contre, les MSCs sécrètent des facteurs qui accélèrent le processus de réparation par une variété de mécanismes incluant la promotion de la survie et de la prolifération des cellules endogènes (178,179), induction de l'angiogénèse/vasculogénèse (180,181), inhibition des réponses immunitaires et inflammatoires (182,183) et réduction de l'apoptose (184). En conséquence, l'efficacité thérapeutique des MSCs pourrait passer de façon majoritaire par leur capacité à altérer le microenvironnement des tissus plutôt que par leurs aptitudes à se transdifférencier.

Les MSCs ont démontré des résultats prometteurs dans l'amélioration de nombreuses conditions lors d'études précliniques et cliniques. Elles ont d'abord

été utilisées pour traiter les défauts de réparation du squelette chez des animaux et humains atteints d'ostéogénèse imparfaite (OI), un désordre génétique affectant la synthèse de collagène, composante importante des os (185). Par la suite, les MSCs ont été démontrées efficaces en tant que vecteurs thérapeutiques chez des modèles animaux de maladie rénale (186), de diabète (187), de maladie du greffon contre l'hôte (188), d'infarctus du myocarde (189) et de divers troubles neurologiques (190). Les MSCs sont efficaces dans le traitement de ces maladies principalement dû au fait qu'elles sécrètent des facteurs solubles tels que des cytokines et des molécules d'adhésion qui agissent en régulant une multitude d'activités biologiques, dont la régénération de différents types de tissus (163).

#### **5.4 Les MSCs en tant qu'agent thérapeutique pour accélérer la guérison de plaies cutanées**

L'injection de MSCs dans la peau en périphérie immédiate de plaies cutanées accélère la guérison autant chez les souris diabétiques que normales (191,192). Le mécanisme exact par lequel les MSCs accélèrent la fermeture de plaies demeure incertain, dû en bonne partie au fait que la capacité de différenciation de ces cellules en kératinocytes est très controversée (193-195). Dans des études récentes, une différenciation négligeable des MSCs en kératinocytes a été observée, même dans des situations où la migration de ces dernières n'était pas requise (par exemple, lorsque les MSCs sont injectées en périphérie d'une blessure) (191,192). Donc, les MSCs pourraient produire des facteurs solubles qui accélèrent la régénération de la peau indépendamment de leur habilité à se transdifférencier. Pour supporter cette hypothèse, le milieu conditionné collecté de MSCs en culture a été injecté dans des plaies cutanées. La

guérison s'en est trouvée accélérée mais les facteurs responsables de cet effet n'ont pas été identifiés (196). La thérapie cellulaire au moyen de MSCs semble donc représenter une méthode efficace pour accélérer la réparation des tissus. Cependant, même si les MSCs sont efficaces chez les animaux où la fonction de réparation de plaies est altérée (comme chez les diabétiques), il n'est pas certain qu'elles pourraient l'être dans tous les cas. En effet, il reste à déterminer si ces cellules ou leur sécrétome ont des effets thérapeutiques sur les plaies en provenance de peau irradiée, contenant des cellules endommagées et diminuées dans leur potentiel de régénération. Il s'agit d'un des points centraux du projet de recherche présenté dans ce mémoire.

# CHAPITRE VI

## 6.1 Hypothèses de travail

Il a été observé que les jeunes enfants exposés aux RI peuvent développer, une fois atteint l'âge adulte, des effets secondaires graves, incluant des retards de réparation et régénération des tissus. La première question qui nous vient en tête est : « Mais qu'est-ce qui cause ces effets secondaires ? ». Notre hypothèse est que l'exposition aux RI cause du dommage permanent aux cellules saines des tissus. La seconde question qui s'impose est : « Comment les cellules endommagées à la suite d'une exposition aux RI peuvent avoir un impact sur la régénération des tissus une fois atteint l'âge adulte? ». Une des possibilités est que les RI éliminent des cellules souches adultes présentes dans les tissus, réduisant ainsi la quantité de cellules souches disponibles pour assurer les processus de repopulation/régénération qui surviennent plus tard dans la vie. Une autre possibilité est qu'autant les cellules souches adultes que les autres types cellulaires soient endommagés à la suite d'une exposition aux RI, mais non éliminés, et que leur accumulation cause des effets délétères aux tissus environnants. Finalement, la troisième possibilité est que les deux hypothèses présentées précédemment se produisent de façon simultanée.

## 6.2 Objectifs

Notre projet de recherche a été élaboré dans le but de mettre à jour le mécanisme moléculaire responsable des retards de régénérations des tissus, plus particulièrement la peau, qui surviennent à la suite d'une exposition aux RI. Nous

voulions également déterminer s'il était possible de renverser ces effets importants en utilisant une approche de thérapie cellulaire. De façon plus spécifique, nous voulions étudier le potentiel des MSCs à accélérer la guérison cutanée dans notre modèle. Nous avons tenté de répondre à ces deux objectifs en nous posant les questions suivantes :

- 1) Est-ce que le retard de guérison qui survient à long terme à la suite d'une exposition aux RI pourrait être dû à une altération du profil sécrétoire des cellules présentes dans la peau ? Par exemple, est-ce que certains facteurs de croissance et cytokines, importants au processus de réparation, sont moins exprimés dans la peau irradiée après blessure?
  
- 2) Est-ce que les MSCs, réputées efficaces pour accélérer la réparation de plusieurs tissus en raison notamment de leur capacités à sécréter de grandes quantités de facteurs de croissance et cytokines, pourraient accélérer la guérison de peau irradiée ? Est-ce que ces dernières vont être en mesure d'accélérer la guérison même si les cellules souches adultes présentes dans la peau irradiée sont endommagées et possiblement diminuées dans leur potentiel de régénération ?

Les résultats obtenus au cours de ce projet de recherche sont présentés sous forme d'un article qui a été soumis à la revue *Cancer Research*. Ils démontrent qu'une déficience dans l'induction de la cytokine SDF-1 $\alpha$  est la principale cause des retards de réparation de la peau irradiée. Ils révèlent aussi que l'injection de MSCs renverse les effets tissulaires survenant suite à une

exposition aux RI et que cet effet bénéfique est principalement dû à leur sécrétion spécifique de SDF-1 $\alpha$ .

## **CHAPITRE VII**

### **Résultats**

**Article: Secretion of SDF-1 $\alpha$  by Multipotent Stromal Cells Enhances Wound Healing of Skin Exposed to Ionizing Radiation**

Article soumis à la revue Cancer Research

## Secretion of SDF-1 $\alpha$ by Multipotent Stromal Cells Enhances Wound Healing of Skin Exposed to Ionizing Radiation

Yannick Landry, Oanh Lê, Christian M. Beauséjour

CHU Ste-Justine and Département de pharmacologie, Université de Montréal, Montréal, Québec, Canada

**Financial support:** This work was supported by a grant from the Canadian Institute of Health Research #MOP-79317 to C.M.B.

**Correspondence:** Christian Beauséjour  
Chercheur Adjoint  
Département de Pharmacologie  
CHU Sainte-Justine  
3175 Côte Sainte-Catherine  
Montréal, Québec, Canada  
H3T 1C5  
Tel: 514-345-4931 x4385  
Fax: 514-345-4801  
Email: christian.beausejour@recherche-ste-justine.qc.ca

**Running title:** IR prevents SDF-1 $\alpha$  secretion and limits wound healing

**Key Words:** SDF-1 $\alpha$ , ionizing radiation, tissue regeneration, MSCs, microenvironment

### Authors' Contributions:

Y.L.: Collection, analysis and interpretation of the data, manuscript writing  
O.L.: Collection of the data  
C.M.B.: Collection, analysis and interpretation of the data, conception and design, manuscript writing



## ABSTRACT

Patients treated for cancer therapy using ionizing radiation (IR) have delayed tissue repair and regeneration. The mechanisms mediating these defects remain largely unknown at present, thus limiting the development of therapeutic approaches. Using a wound healing model, we here investigate the mechanisms by which IR exposure limits skin regeneration. Our data show that induction of the stromal cell-derived growth factor  $1\alpha$  (SDF- $1\alpha$ ) is severely impaired in the wounded skin of irradiated, compared to non-irradiated, mice. This defect is correlated with delayed healing, and is evident for several months following exposure to IR, suggesting permanent impairment of skin repair. Because SDF- $1\alpha$  is secreted mainly by dermal fibroblasts, we evaluated the potential of multipotent stromal cells (MSCs), which secrete high levels of SDF- $1\alpha$ , to improve skin regeneration in irradiated mice. Injection of MSCs into the wound margin led to remarkable enhancement of skin healing in mice exposed to IR. The MSC actions were mainly paracrine, as the cells did not migrate away from the injection site or differentiate into keratinocytes. Specific knockdown of SDF- $1\alpha$  expression led to drastically reduced efficiency of MSCs in improving wound closure, indicating that SDF- $1\alpha$  secretion by MSCs is largely responsible for their beneficial action. We also found that one mechanism by which SDF- $1\alpha$  enhances wound closure likely involves increased skin vascularization. Our findings collectively indicate that SDF- $1\alpha$  is an important deregulated cytokine in irradiated wounded skin, and that the decline in tissue regeneration potential following IR can be reversed, given adequate microenvironmental support.

## INTRODUCTION

Cancer treatment using ionizing radiation (IR) alone or in combination with different types of drugs leads to short- and long-term side effects (1, 2). These defects are wide-ranging, but often involve tissue growth and regeneration. One such example is delayed wound healing following surgical resection of an irradiated tumor (3, 4). Wound healing is a complex biological process involving diverse cytokines implicated in varying stages, from the initial phase of inflammation to migration and proliferation of infiltrating or resident cells (5). Direct supplementation of different cytokines at the injured site via either topical application of recombinant proteins or viral delivery improves wound healing in mice. For instance, sonic hedgehog, vascular endothelial growth factor (VEGF), and stromal derived cell factor-1 $\alpha$  (SDF-1 $\alpha$  or CXCL12), augmented wound healing mainly by enhancing angiogenesis (6-8). Importantly, the efficiency of these cytokines was evaluated in diabetic mice with impaired microcirculation. Because the molecular mechanism(s) involved in IR-based skin regeneration defects are unknown at present, it is uncertain whether cytokine-based angiogenesis therapy would be effective on irradiated tissues of patients treated for cancer.

IR induces irreversible damages to the stroma, reducing by as much as 90% the stromal cells colony forming unit capacity of the bone marrow (9). Importantly, this reduction in the number of stromal progenitor cells is likely permanent as their number does not recover for several years (9-11). Hence, we hypothesised that skin stromal cells also get permanently impaired following exposure to IR.

Interestingly, injection of bone marrow derived multipotent stromal cell (MSC) in the immediate periphery of wounded skin accelerates healing in diabetic mice (12-14). MSCs can be easily expanded *in vitro*, and display the potential to differentiate into several cell types (i.e., adipocytes, osteocytes, or chondrocytes) (15-18), making MSCs attractive candidates for cellular therapy. The exact mechanisms by which MSCs accelerate wound closure remain ambiguous, especially as MSC ability to differentiate into keratinocytes is controversial (19-21). In earlier studies, negligible differentiation into keratinocytes was observed, even in situations where MSC homing to the injured site was not required (i.e., when MSCs were injected in the vicinity of the wound margin) (12, 13). Hence, MSCs may provide paracrine factors that foster skin regeneration independently of the ability of MSCs to transdifferentiate. In support of this hypothesis, conditioned media collected from MSCs and injected within the wound periphery facilitated skin healing; the factors responsible were not identified (22). However, the issue of whether MSCs or their secretome have therapeutic effects on irradiated wounded skin containing damaged cells, likely diminished in their regeneration potential, remains to be clarified.

In this study, we focus on two important topics. Initially, the mechanism responsible for delayed healing following exposure to IR was analyzed. Deficiency in SDF-1 $\alpha$  induction was identified as the main cause of wound repair defects in irradiated skin. Subsequent results showed that injection of MSCs rescued long-term IR damage, which was mainly attributed to the specific secretion of SDF-1 $\alpha$ . Based on these findings, we suggest that the decreased

regeneration potential of irradiated skin is somewhat reversible and may be restored with adequate stromal support.

## **MATERIALS AND METHODS**

### **Isolation, purification and characterisation of MSCs**

Bone marrow was collected by flushing the tibias, femurs and iliacs from C57BL/6 female mice with  $\alpha$ -Minimum Essential Medium ( $\alpha$ -MEM) containing 2% fetal bovine serum (FBS) (Wisent). MSCs were then isolated based on their property to attach polystyrene tissue culture dishes after 7-10 days in  $\alpha$ -MEM containing 15% FBS and 1% penicillin/streptomycin. MSCs were cultured for 2-4 extra passages (corresponding to 6-12 population doublings) after which characterization by flow cytometry confirmed they were negative for CD31, CD45 and positive for CD44, CD105 markers. Cells were further characterized by their ability to differentiate into adipocyte following incubation with medium containing 1  $\mu$ M dexamethasone, 10  $\mu$ g/ml insulin, 0.5  $\mu$ M isobutyl methylxantine (IBMX) and 50  $\mu$ M indomethacine for 1 week. Osteogenic differentiation potential was also confirmed after incubation of the cells with medium containing 100 nM dexamethasone, 50 $\mu$ M ascorbate-2-phosphate (vitamin C), 50 nM vitamin D3 and 10 mM  $\beta$ -glycerophosphate for 2 weeks. Differentiation in adipocytes and osteocytes was revealed by staining with Oil Red O (Sigma) and Alizarin Red S (Sigma), respectively.

### **Wound healing model and analysis**

8 weeks-old female C57BL/6 mice (Charles River, Saint-Constant, Qc, Canada) were  $\gamma$ -irradiated at the sublethal dose of 8 Gy (0.25 Gy/sec) using a Gammacell 220 and cobalt 60 as a source. Mice suffered severe leucopenia for a period of approximately two weeks post-irradiation with no sign of any other side effects.

18 to 22 weeks after irradiation, mice were anesthetised with 2% isoflurane, hair was removed on their dorsal surface and one or two 4-mm full-thickness punch biopsy wounds were created. 24 hours later, mice were placed under anaesthesia and received four 15  $\mu$ l intradermal injections totalizing one million MSCs or mouse embryonic fibroblasts (MEFs) in phosphate buffered saline (PBS). Wound area was measured every other day for the first week, then every day until complete closure. Photographs of wounds were taken to record evolution of healing. The percentage of wound closure was determined as:  $(\text{area of wound day } 0 - \text{area of wound day } X) / \text{area of wound day } 0 \times 100$ . All procedures were approved by the CHU Ste-Justine's Animal Care Committee and animals were handled in accordance with institutional guidelines.

### **Lentiviral gene regulation**

Using RNA collected from murine MSCs, the SDF-1 $\alpha$  cDNA was amplified with the QuantiTect Reverse Transcription Kit (QIAGEN) and standard PCR method using the following primers (forward: 5'-CGGGAATTCCTTGCTGTCCAGCT-CTGCAG-3': reverse: 5'-CGACGTCGACGGTACCGTCCTTTGGGCTGTT-GTGCT-3'). The SDF-1 $\alpha$  amplicon was confirmed by sequencing and, together with the enhanced green fluorescent protein (EGFP), cDNA was introduced into a lentiviral vector backbone under the control of the human Cytomegalovirus (CMV) promoter. A set of five lentivectors expressing shRNAs targeting the murine SDF-1 $\alpha$  were purchased from Open Biosystems (cat nb: RMM3981-NM\_011331). Validation experiments demonstrated that the lentivector expressing the shRNA targeting nucleotides 207-227 (NM\_013655) was the most effective (see Fig.S1). A lentivector expressing a shRNAs against the human p16

gene, with no homology to murine sequences, was used as negative control (23). Briefly, lentivector stocks were prepared by transfecting overnight 293T cells using Lipofectamine 2000 (Invitrogen) with the required transfer vector plasmid, the pMD.Lg/pRRE packaging plasmid, the pMD2.VSV-G envelope-encoding plasmid, and pRSV-Rev. The following morning fresh media was added and then supernatant was collected 30 hours later. Media containing lentivectors was either used directly or concentrated by ultracentrifugation (50,000g in a SW28 rotor for 2 hours) and frozen at  $-80^{\circ}\text{C}$ . Quantification of the virus was done using a commercial enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) kit detecting p24 levels (ZeptoMetrix Corporation, Buffalo, NY).

### **RNA isolation and quantitative real-time PCR**

Excised wounds together with epidermal margins were mechanically grinded in 500  $\mu\text{l}$  trizol reagent using a power-driven homogenizer (OMNI International), and total RNA was extracted using the RNeasy lipid tissue Mini Kit (Qiagen). RNA was then reverse-transcribed using the QuantiTect Reverse Transcription Kit (Qiagen). Quantitative differences in gene expression were determined by real-time quantitative PCR using SYBR-Green PCR master mix (QIAGEN) and a spectrofluorometric thermal cycler (Mx3000P from Stratagene). A list of primers used to detect murine SDF-1 $\alpha$ , MMP-3, MMP-9, MMP-13, VEGF, PAI-1, FGF-2 and 18S is provided as supplementary information (see Table S1). Values are presented as the ratio of target mRNA to 18S rRNA obtained using the relative standard curve method of calculation.

**Protein analysis by ELISA**

Proteins were isolated following three cycles of freeze and thaw from homogenized wounded skin in PBS containing a protease inhibitor cocktail (Sigma, St-Louis, USA). Total protein concentration was determined by standard methods and SDF-1 $\alpha$  specific level was determined using an ELISA kit according to the manufacturer's instructions (RayBiotech). Levels of SDF-1 $\alpha$  protein were normalized for the total amount of protein isolated from wounded skin samples. Determination of SDF-1 $\alpha$  protein concentration in conditioned media from MSCs or MEFs was normalized to the total number of cells present at the time of collection.

**Histological and immunological examination**

Mouse skin samples were snap-frozen in OCT compound (Sakura Finetek USA) and cryosections were stained in hematoxylin for histological evaluation. For immunohistochemical staining, cryosections were fixed with paraformaldehyde 4%, stained using antibodies against the von Willebrand Factor (vWF) endothelial cell marker (RB-281-A;NeoMarker) or the pan-leukocyte CD45 antibody (BD Pharmingen) and then detected with a peroxidase kit (SK-4100) from Vector Laboratories. Vascularization was determined by counting the number of vWF positive vessels in 2 random fields per section between the wound edges. Counts were confirmed by a second double-blind investigator. For immunofluorescence stainings, cryosections were fixed and incubated with an antibody against epidermal cytokeratin subunits (Zo622, Dako) and subsequently by a goat anti-rabbit 594 TxRED-conjugated antibody (Invitrogen). Sections were stained with DAPI and mounted with mounting medium (Vectashield H-1000).



**Statistical analysis**

All results are expressed as means  $\pm$  Standard Error of the Mean (SEM). The statistical differences were assessed using the Student's *t*-test, or ANOVA followed by Tukey-Kramer's post test. Statistical significance was set at  $p < 0.05$ .

## RESULTS

### Long-term Impairment of Wound Healing After Exposure to IR

A significant proportion of cells exposed to IR undergo persistent DNA damage and concomitant inhibition of cell cycle progression *in vitro*. Consequently, we hypothesized that tissue regeneration could be altered for an extended period of time upon exposure to IR. Indeed, up to a minimum of 4 months following exposure to a single sublethal dose of 8 Gy (total body irradiation), C57BL/6 mice displayed severe deficiencies in their ability to heal a full-thickness 4 mm skin punch biopsy (Fig. 1A). Cytokeratin immunostaining and histology confirmed that re-epithelization was delayed by over 25% at 10-13 days after wound induction in irradiated mice, compared to their non-irradiated counterparts (Figs. 1A and B). Interestingly, both groups responded early after injury, as delayed wound closure became evident only about 1 week post-wounding. No differences in the levels of infiltrating leukocytes within the wound periphery were observed between the irradiated and non-irradiated groups at day 3 post-injury (Fig. 1C). Hence, exposure to IR possibly does not interfere with the initial inflammatory response, but leaves permanent scars in tissues, which delay regeneration.

### Absence of SDF-1 Induction in Wounded Skin Previously Exposed to IR

Previous studies showed that expression of several transcription factors, cytokines, and proteases, increased during the response to the wound. One such factor, SDF-1 $\alpha$ , is induced at 4-7 days post-injury (24, 25), immediately preceding the period during which wound healing defects became significant in irradiated mice (Fig. 1A). Using quantitative real-time PCR, we analyzed the levels of several genes implicated in the wound response. Expression of SDF-1 $\alpha$  was

increased (~2-fold) in wounded tissue from control mice, but not in mice previously exposed to IR (Fig. 2A). Protein levels assessed by ELISA on lysates obtained from homogenized wound margins were consistent with this observation (Fig. 2B). The deficiency in SDF-1 $\alpha$  expression at 3 days post-injury is unlikely to be a general defect in gene expression, in view of the finding that induction of VEGF, another cytokine, was not significantly different in control mice or those previously exposed to IR (Fig. 2A). Similarly, expression of the plasminogen activator inhibitor (PAI-1), an important negative regulator of the wound response (26), was not significantly affected (Fig. 2A). Specific metalloproteinase genes (MMPs) that play key roles in tissue remodeling post-injury were additionally analyzed (27, 28). As expected, control mice displayed markedly increased levels of MMP-3 (3.7-fold), MMP-9 (9.5-fold), and MMP-13 (14.3-fold), at 3 days post-wounding (Fig. 2A). Mice previously exposed to IR also displayed significant upregulation of MMP-3 (4.3-fold), MMP-9 (10.2-fold), and MMP-13 (14.1-fold). Despite no clear differences in the -fold induction of all three MMPs analyzed, the absolute amounts of MMP-9 and MMP-13 expressed were considerably lower in wounds from mice previously exposed to IR (Fig. 2A). We are uncertain whether this variation in the absolute amounts of MMP-9 and MMP-13 is important in the rate of wound repair, given the robust increases in MMP-9 and MMP-13 levels in contrast to the lack of change in SDF-1 $\alpha$  level.

### **MSC Injection Enhances Healing of Irradiated Skin**

Next, we analyzed the possibility of overcoming permanently impaired (over 4 months) skin regeneration induced by IR. Initially, we attempted to compensate for the deficiency in SDF-1 $\alpha$  by injecting bone marrow-derived MSCs expressing

high levels of SDF-1 $\alpha$  (Fig 3A). Interestingly, injection of  $1 \times 10^6$  total MSCs directly into the vicinity of the wound margin was very efficient in improving skin healing of irradiated, but not control non-irradiated, mice (Fig. 3A, and data not shown). In fact, at 13 days post-wounding, 100% of wounds (15/15) of non-irradiated mice receiving PBS displayed over 90% closure (hereafter referred to as 'healed') in comparison to only 13% of wounds (2/16) from mice exposed to IR and injected with PBS. In contrast, 72% of wounds (13/18) from irradiated mice injected with MSCs were healed (Fig. 3A). This remarkable capacity of MSCs to improve healing was only partially reproduced by mouse embryonic fibroblasts (MEFs), which may be explained by the fact that MEFs do not secrete detectable levels of SDF-1 $\alpha$  (Fig. S2). Similar injections using MSCs genetically engineered to express EGFP revealed no migration away from the injection site or differentiation into keratinocytes (Figs. 3B-D). Although we cannot eliminate the possibility that MSCs have the potential to differentiate into keratinocytes under specific conditions, high-magnification analysis of newly formed epithelium failed to demonstrate co-localization of EGFP and cytokeratin doubly-positive cells (Fig. 3B-D). Our results suggest that the action of MSCs on irradiated skin is largely paracrine, as the cells are not directly involved in wound remodeling and/or closure.

### **Specific Secretion of SDF-1 $\alpha$ by MSCs Enhances Wound Closure**

To further define the role of SDF-1 $\alpha$  in wound healing, we genetically engineered MSCs to have impaired SDF-1 $\alpha$  secretion. A lentiviral vector was used to stably express shRNA directed against SDF-1 $\alpha$  (the cells are designated 'MSC-shSDF-1'). MSCs were effectively transduced using VSV-G pseudotyped lentivirus, with

modification of nearly 100% of cells after a single round of virus exposure ( $\sim 100$  ng of p24/ $10^5$  cells, data not shown). This remarkable transduction efficacy permits knockdown of SDF-1 $\alpha$  expression without the need to select for a clonal population using antibiotics. As a result, ELISA showed over 90% reduction in SDF-1 $\alpha$  secretion in MSC-shSDF-1 cells, compared to the control population transduced with non-specific shRNA (Fig. 4A). The shRNA targeting nucleotides 207-227 was the most effective among the five sequences examined (Fig. S1). Using the skin punch model, we evaluated the efficacy of MSC-shSDF-1 cells (secreting only  $\sim 40$  pg SDF-1 $\alpha$ / $10^4$  cells) in improving wound closure. Injection of  $1 \times 10^6$  MSC-shSDF-1 cells led to only a slight improvement in skin repair, confirming the extremely high dependence of skin wound healing on SDF-1 $\alpha$ . Specifically, only 25% of the wounds (2/8) from mice injected with these cells and 13% (2/16) of wounds injected with PBS were healed by day 13, far off the 72% (13/18) of wounds healed following the injection of control MSCs secreting over 500 pg of SDF-1 $\alpha$ / $10^4$  cells (Figs. 4A and B). Our findings strongly suggest that the beneficial paracrine effect of MSCs is largely mediated by the action of SDF-1 $\alpha$ . In view of these results, we explored the possibility of delivering supraphysiological amounts of SDF-1 $\alpha$  with the aim of further improving wound healing. MSCs were modified, using lentiviruses, to secrete  $>4000$  pg of SDF-1 $\alpha$ / $10^4$  cells, which is 8-fold greater than the normal amount of SDF-1 $\alpha$  (the cell line is designated MSC-SDF-1) (Fig. 4A). Surprisingly, injured mice injected with  $1 \times 10^6$  MSC-SDF-1 did not display significantly faster regeneration than control animals. Specifically, 70% (7/10) of wounds were healed by day 13, compared to 72% (13/18) wounds in mice injected with control MSCs (Fig. 4B). This observation is consistent with our previous findings that MSC therapy is not

beneficial for non-irradiated mice in which perhaps sufficient amounts of SDF-1 $\alpha$  are induced at the injured site.

### **MSC Injection Increases Wound Vascularization**

To clarify the exact mechanisms by which various populations of MSCs improved wound closure, we measured differences in vascularization, based on the well-known angiogenic and vasculogenic properties of SDF-1 $\alpha$ . Initially, we observed that wound beds from irradiated mice contained a significantly lower number of blood vessels than controls ( $p \leq 0.001$ ), indicating a vascularization defect in skin previously exposed to IR (Fig. 5). Injection of MSCs virally transduced with EGFP, SDF-1, or shSDF-1, in the vicinity of the wound margin, enhanced the blood vessel density in proportion to the amount of SDF-1 $\alpha$  secreted (Fig. 5B). Notably, the number and size of blood vessels was considerably larger upon delivery of supraphysiological levels of SDF-1 $\alpha$  using MSC-SDF-1 (Fig. 5A). Both MEFs and MSC-shSDF-1 cells induced an increase in the blood vessel density to a level equal to or greater than that observed in non-irradiated wound beds, suggesting the presence of pro-angiogenic molecules other than SDF-1 $\alpha$  with the ability to augment wound vascularization. The results imply that while supplementation of MSCs with SDF-1 $\alpha$  restores vascularization of irradiated wound beds, SDF-1 $\alpha$ -regulated mechanisms other than blood vessel density are important in wound closure.

## DISCUSSION

Tissue regeneration defects are common, and constitute a major problem in cancer-treated survivors. The molecular origin of these defects remains largely unknown, and thus development of an adapted therapy is essential. Here, we establish that SDF-1 $\alpha$  plays a role in the delay in wound healing following exposure to IR. SDF-1 $\alpha$  expression at the mRNA and protein levels was impaired in irradiated, compared to non-irradiated, wounded skin, in contrast to other cytokines that were induced in both groups (Fig. 2). A deficit in SDF-1 $\alpha$  was additionally reported in wounded skin from diabetic mice, confirming an important role of this cytokine in wound healing (24). The mechanism of IR-mediated prevention of SDF-1 $\alpha$  induction up to several months after exposure remains to be determined. One possibility is that cells exposed to IR undergo severe DNA damage, consequently entering a state of senescence (29, 30). In contrast to apoptotic cells that are rapidly eliminated after damage, senescent cells persist in tissues and may alter the microenvironment for extended periods (31, 32). Unexpectedly, exposure to a sub-lethal dose of IR (8 Gy) led to the persistent accumulation of damaged cells in several tissues, including skin, for up to at least 4 months post-irradiation (Le et al., manuscript in preparation). The issue of whether damaged/senescent cells are unable to induce SDF-1 $\alpha$  or interfere with its production by other cells is currently under investigation.

A recent study showed that activation of p53, a hallmark of damaged cells, led to attenuation of SDF-1 $\alpha$  expression in some mouse and human fibroblast cell lines *in vitro* (33). This observation supports the hypothesis that damaged skin cells with constitutively activated p53 have a reduced capacity to produce SDF-1 $\alpha$

during the wound response. Additionally, we previously reported that senescent human fibroblasts are impaired in their ability to accumulate the hypoxia inducible factor-1 (HIF-1) under hypoxic conditions *in vitro* (34). The SDF-1 $\alpha$  promoter contains HIF-1 binding sites, and is regulated by oxygen tension (35). Therefore, another possibility is that damaged/senescent cells are unable to induce SDF-1 $\alpha$  expression in response to hypoxia.

Another reported regulator of SDF-1 $\alpha$  is fibroblast growth factor 2 (FGF-2), a cytokine involved in cell growth and other key roles, including wound healing (36, 37). FGF-2 downregulates SDF-1 $\alpha$  expression in MSCs in a post-transcriptional manner. Interestingly, we observed no differences in FGF-2 expression between control and irradiated skin (Fig. S3). Moreover, we cannot rule out the possibility that the inability of irradiated wounded skin to induce SDF-1 $\alpha$  expression can be attributed to a reduction in the number of recruited cells expressing SDF-1 $\alpha$ . However, this is unlikely, given the comparable levels of total infiltrating leukocytes in irradiated versus non-irradiated wounds (Fig. 1C) (although there is a possibility for a variation in the number of T and B cells), and because SDF-1 $\alpha$  secretion was shown to occur through residing stromal and endothelial cells (25). Nonetheless, fewer blood vessels were observed in irradiated than in non-irradiated wounded skin (Fig. 5). Hence, a lower number of residing SDF-1 $\alpha$ -producing endothelial cells in irradiated wounded skin may account for the difference in SDF-1 $\alpha$  expression.

Next, we showed that delayed healing as a consequence of IR exposure is almost completely rescued by paracrine secretion of SDF-1 $\alpha$  from MSCs injected in the



wound periphery. MSC injection has been successfully applied as a therapeutic approach to treat skin wound healing in diabetic mice (13, 14). However, MSC effects on irradiated mice are somewhat surprising, given our initial hypothesis that IR-induced damage would eliminate or permanently impair skin stem/progenitor cells. Under these conditions, regeneration should not respond to paracrine factors, but rather depend on the differentiation of an external source of progenitor cells. Our results suggest that some, if not all, skin stem and progenitor cells preserve autonomous regenerative potential following IR, assuming in the presence of an appropriate microenvironment (i.e., healthy stromal support).

Unexpectedly, injection of MSCs was not beneficial in control non-irradiated mice, inconsistent with previous reports (12, 13). These discrepancies may result from the use of different mouse strains (BalbC vs C57Bl/6) or wound models (10 mm vs 4 mm full-thickness biopsies). The method of MSC delivery may additionally have an impact, as diverse injection protocols were employed (i.e., intravenous as opposed to intradermal). Notably, MEFs accelerated wound closure, albeit at a lower level than MSCs, despite no detectable secretion of SDF-1 $\alpha$  (Figs. 3 and S2). We speculate that the favorable effects of MEFs stem from their ability to increase wound bed vascularization independently of SDF-1 $\alpha$ .

Chen and coworkers reported that unidentified factors secreted by MSCs enhance wound healing (22). SDF-1 $\alpha$  is a strong candidate factor, as specific downregulation of its expression in MSCs severely impairs MSCs capacity to rescue wound closure (Fig. 4). One function of SDF-1 $\alpha$  is to enhance vasculogenesis by recruiting progenitor cells (24, 38). Thus, as one can expect,

injection of MSC-shSDF-1 $\alpha$  displaying over a 90% decrease in SDF-1 $\alpha$  expression relative to control MSCs resulted in wound beds with lower vascularization. This finding suggests that blood vessel formation is linked to SDF-1 $\alpha$  secreted at the injured site, and increased vessel density fosters wound healing.

Although considerable evidence suggests that wound closure efficacy relies, at least in part, on SDF-1 $\alpha$ , wound closure does not seem to be exclusively dependent on vascularization. For example, wounds injected with MSC-shSDF-1 $\alpha$  display similar levels of blood vessels compared to non-irradiated PBS-injected wounds ( $P < 0.500$ ), but exhibit severely impaired healing. Moreover, MSC-SDF-1 $\alpha$  cells, secreting SDF-1 $\alpha$  at a level over 8-fold the basal amount, did not display a superior ability to accelerate wound closure, despite generating more and larger blood vessels than did non-engineered MSCs (Figs. 4 and 5). In this case, a threshold level of SDF-1 $\alpha$  may be sufficient to assure optimal wound closure, and provision of more SDF-1 $\alpha$  does not further improve healing. This theory is supported by our finding that MSC injection does not reduce the healing time of non-irradiated mice displaying normal SDF-1 $\alpha$  expression after wounding. Our results indicate that the therapeutic effect of MSC injection is almost exclusively dependent on secretion of SDF-1 $\alpha$ , and that wound healing is only partially dependent on increased vascularization. We speculate that the MSC secretome could also accelerate wound closure by exerting a mitogenic effect on keratinocytes mainly through SDF-1 $\alpha$ . Indeed, SDF-1 $\alpha$  promotes keratinocyte proliferation *in vitro* (39).

In summary, our findings provide an insight into the underlying mechanisms of the diminished regeneration capability of irradiated skin, and possibly other tissues, up to several months following exposure to IR. Fortunately, this deficiency appears reversible with appropriate stromal support, indicating that MSCs or cytokine-based therapies should be effective in improving wound healing in patients treated for cancer.

## **ACKNOWLEDGMENT**

We thank Drs. E. Campeau and F. Rodier for providing valuable reagents, as well as members of Drs. J. Galipeau, E. Haddad and N. Heveker's respective laboratories for their critical comments. We also want to acknowledge D. Carrier and S. Faubert for their expertise in setting up the skin wound model. This work was supported by a grant from the Canadian Institute of Health Research (CIHR, MOP-79317 to C.B.). Y.L. and C.B. have been respectively supported by a studentship from the Fondation de l'Hôpital Sainte-Justine and by the Health Research Foundation Rx&D/CIHR young investigator award.

## REFERENCES

1. Geenen, M. M., Cardous-Ubbink, M. C., Kremer, L. C., van den Bos, C., van der Pal, H. J., Heinen, R. C., Jaspers, M. W., Koning, C. C., Oldenburger, F., Langeveld, N. E., Hart, A. A., Bakker, P. J., Caron, H. N., and van Leeuwen, F. E. Medical assessment of adverse health outcomes in long-term survivors of childhood cancer. *JAMA*, 297: 2705-2715, 2007.
2. Oeffinger, K. C., Mertens, A. C., Sklar, C. A., Kawashima, T., Hudson, M. M., Meadows, A. T., Friedman, D. L., Marina, N., Hobbie, W., Kadan-Lottick, N. S., Schwartz, C. L., Leisenring, W., and Robison, L. L. Chronic health conditions in adult survivors of childhood cancer. *N Engl J Med*, 355: 1572-1582, 2006.
3. Bujko, K., Suit, H. D., Springfield, D. S., and Convery, K. Wound healing after preoperative radiation for sarcoma of soft tissues. *Surg Gynecol Obstet*, 176: 124-134, 1993.
4. O'Sullivan, B., Davis, A. M., Turcotte, R., Bell, R., Catton, C., Chabot, P., Wunder, J., Kandel, R., Goddard, K., Sadura, A., Pater, J., and Zee, B. Preoperative versus postoperative radiotherapy in soft-tissue sarcoma of the limbs: a randomised trial. *Lancet*, 359: 2235-2241, 2002.
5. Werner, S. and Grose, R. Regulation of wound healing by growth factors and cytokines. *Physiol Rev*, 83: 835-870, 2003.
6. Galiano, R. D., Tepper, O. M., Pelo, C. R., Bhatt, K. A., Callaghan, M., Bastidas, N., Bunting, S., Steinmetz, H. G., and Gurtner, G. C. Topical vascular endothelial growth factor accelerates diabetic wound healing through increased angiogenesis and by mobilizing and recruiting bone marrow-derived cells. *Am J Pathol*, 164: 1935-1947, 2004.
7. Asai, J., Takenaka, H., Kusano, K. F., Ii, M., Luedemann, C., Curry, C., Eaton, E., Iwakura, A., Tsutsumi, Y., Hamada, H., Kishimoto, S., Thorne, T., Kishore, R., and Losordo, D. W. Topical sonic hedgehog gene therapy accelerates wound healing in diabetes by enhancing endothelial progenitor cell-mediated microvascular remodeling. *Circulation*, 113: 2413-2424, 2006.
8. Badillo, A. T., Chung, S., Zhang, L., Zoltick, P., and Liechty, K. W. Lentiviral gene transfer of SDF-1alpha to wounds improves diabetic wound healing. *J Surg Res*, 143: 35-42, 2007.
9. Galotto, M., Berisso, G., Delfino, L., Podesta, M., Ottaggio, L., Dallorso, S., Dufour, C., Ferrara, G. B., Abbondandolo, A., Dini, G., Bacigalupo, A., Cancedda, R., and Quarto, R. Stromal damage as consequence of high-dose chemo/radiotherapy in bone marrow transplant recipients. *Exp Hematol*, 27: 1460-1466, 1999.
10. Piersma, A. H., Brockbank, K. G., Ploemacher, R. E., and Ottenheim, C. P. Recovery of hemopoietic stromal progenitor cells after lethal total-body irradiation and bone marrow transplantation in mice. *Transplantation*, 40: 198-201, 1985.
11. Rombouts, W. J. and Ploemacher, R. E. Primary murine MSC show highly efficient homing to the bone marrow but lose homing ability following culture. *Leukemia*, 17: 160-170, 2003.

12. Sasaki, M., Abe, R., Fujita, Y., Ando, S., Inokuma, D., and Shimizu, H. Mesenchymal stem cells are recruited into wounded skin and contribute to wound repair by transdifferentiation into multiple skin cell type. *J Immunol*, *180*: 2581-2587, 2008.
13. Wu, Y., Chen, L., Scott, P. G., and Tredget, E. E. Mesenchymal stem cells enhance wound healing through differentiation and angiogenesis. *Stem Cells*, *25*: 2648-2659, 2007.
14. Badillo, A. T., Redden, R. A., Zhang, L., Doolin, E. J., and Liechty, K. W. Treatment of diabetic wounds with fetal murine mesenchymal stromal cells enhances wound closure. *Cell Tissue Res*, *329*: 301-311, 2007.
15. Fehrer, C., Brunauer, R., Laschober, G., Unterluggauer, H., Reitingger, S., Kloss, F., Gully, C., Gassner, R., and Lepperdinger, G. Reduced oxygen tension attenuates differentiation capacity of human mesenchymal stem cells and prolongs their lifespan. *Aging Cell*, *6*: 745-757, 2007.
16. Phinney, D. G. and Prockop, D. J. Concise review: mesenchymal stem/multipotent stromal cells: the state of transdifferentiation and modes of tissue repair--current views. *Stem Cells*, *25*: 2896-2902, 2007.
17. Pittenger, M. F., Mackay, A. M., Beck, S. C., Jaiswal, R. K., Douglas, R., Mosca, J. D., Moorman, M. A., Simonetti, D. W., Craig, S., and Marshak, D. R. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science*, *284*: 143-147, 1999.
18. Peister, A., Mellad, J. A., Larson, B. L., Hall, B. M., Gibson, L. F., and Prockop, D. J. Adult stem cells from bone marrow (MSCs) isolated from different strains of inbred mice vary in surface epitopes, rates of proliferation, and differentiation potential. *Blood*, *103*: 1662-1668, 2004.
19. Fan, Q., Yee, C. L., Ohyama, M., Tock, C., Zhang, G., Darling, T. N., and Vogel, J. C. Bone marrow-derived keratinocytes are not detected in normal skin and only rarely detected in wounded skin in two different murine models. *Exp Hematol*, *34*: 672-679, 2006.
20. Borue, X., Lee, S., Grove, J., Herzog, E. L., Harris, R., Diflo, T., Glusac, E., Hyman, K., Theise, N. D., and Krause, D. S. Bone marrow-derived cells contribute to epithelial engraftment during wound healing. *Am J Pathol*, *165*: 1767-1772, 2004.
21. Brittan, M., Braun, K. M., Reynolds, L. E., Conti, F. J., Reynolds, A. R., Poulson, R., Alison, M. R., Wright, N. A., and Hodivala-Dilke, K. M. Bone marrow cells engraft within the epidermis and proliferate in vivo with no evidence of cell fusion. *J Pathol*, *205*: 1-13, 2005.
22. Chen, L., Tredget, E. E., Wu, P. Y., and Wu, Y. Paracrine factors of mesenchymal stem cells recruit macrophages and endothelial lineage cells and enhance wound healing. *PLoS ONE*, *3*: e1886, 2008.
23. Beausejour, C. M., Krtolica, A., Galimi, F., Narita, M., Lowe, S. W., Yaswen, P., and Campisi, J. Reversal of human cellular senescence: roles of the p53 and p16 pathways. *Embo J*, *22*: 4212-4222, 2003.
24. Gallagher, K. A., Liu, Z. J., Xiao, M., Chen, H., Goldstein, L. J., Buerk, D. G., Nedeau, A., Thom, S. R., and Velazquez, O. C. Diabetic impairments in NO-mediated endothelial progenitor cell mobilization and homing are reversed by hyperoxia and SDF-1 alpha. *J Clin Invest*, *117*: 1249-1259, 2007.

25. Toksoy, A., Muller, V., Gillitzer, R., and Goebeler, M. Biphasic expression of stromal cell-derived factor-1 during human wound healing. *Br J Dermatol*, *157*: 1148-1154, 2007.
26. Chan, J. C., Duszczyzyn, D. A., Castellino, F. J., and Ploplis, V. A. Accelerated skin wound healing in plasminogen activator inhibitor-1-deficient mice. *Am J Pathol*, *159*: 1681-1688, 2001.
27. Lund, L. R., Romer, J., Bugge, T. H., Nielsen, B. S., Frandsen, T. L., Degen, J. L., Stephens, R. W., and Dano, K. Functional overlap between two classes of matrix-degrading proteases in wound healing. *Embo J*, *18*: 4645-4656, 1999.
28. Madlener, M. Differential expression of matrix metalloproteinases and their physiological inhibitors in acute murine skin wounds. *Arch Dermatol Res*, *290 Suppl*: S24-29, 1998.
29. Campisi, J. and d'Adda di Fagagna, F. Cellular senescence: when bad things happen to good cells. *Nat Rev Mol Cell Biol*, *8*: 729-740, 2007.
30. Rodier, F., Campisi, J., and Bhaumik, D. Two faces of p53: aging and tumor suppression. *Nucleic Acids Res*, *35*: 7475-7484, 2007.
31. Aoshiha, K., Tsuji, T., and Nagai, A. Bleomycin induces cellular senescence in alveolar epithelial cells. *Eur Respir J*, *22*: 436-443, 2003.
32. Wang, Y., Schulte, B. A., LaRue, A. C., Ogawa, M., and Zhou, D. Total body irradiation selectively induces murine hematopoietic stem cell senescence. *Blood*, *107*: 358-366, 2006.
33. Moskovits, N., Kalinkovich, A., Bar, J., Lapidot, T., and Oren, M. p53 Attenuates cancer cell migration and invasion through repression of SDF-1/CXCL12 expression in stromal fibroblasts. *Cancer Res*, *66*: 10671-10676, 2006.
34. Coppe, J. P., Kauser, K., Campisi, J., and Beausejour, C. M. Secretion of vascular endothelial growth factor by primary human fibroblasts at senescence. *J Biol Chem*, *281*: 29568-29574, 2006.
35. Ceradini, D. J., Kulkarni, A. R., Callaghan, M. J., Tepper, O. M., Bastidas, N., Kleinman, M. E., Capla, J. M., Galiano, R. D., Levine, J. P., and Gurtner, G. C. Progenitor cell trafficking is regulated by hypoxic gradients through HIF-1 induction of SDF-1. *Nat Med*, *10*: 858-864, 2004.
36. Nakayama, T., Mutsuga, N., and Tosato, G. FGF2 posttranscriptionally down-regulates expression of SDF1 in bone marrow stromal cells through FGFR1 IIIc. *Blood*, *109*: 1363-1372, 2007.
37. Greenhalgh, D. G., Sprugel, K. H., Murray, M. J., and Ross, R. PDGF and FGF stimulate wound healing in the genetically diabetic mouse. *Am J Pathol*, *136*: 1235-1246, 1990.
38. Orimo, A., Gupta, P. B., Sgroi, D. C., Arenzana-Seisdedos, F., Delaunay, T., Naeem, R., Carey, V. J., Richardson, A. L., and Weinberg, R. A. Stromal fibroblasts present in invasive human breast carcinomas promote tumor growth and angiogenesis through elevated SDF-1/CXCL12 secretion. *Cell*, *121*: 335-348, 2005.
39. Florin, L., Maas-Szabowski, N., Werner, S., Szabowski, A., and Angel, P. Increased keratinocyte proliferation by JUN-dependent expression of PTN and SDF-1 in fibroblasts. *J Cell Sci*, *118*: 1981-1989, 2005.

## FIGURE LEGENDS

**Figure 1.** Wound healing is permanently impaired in mice exposed to IR. Full-thickness wound biopsies were created on the dorsal surface of mice exposed or not to total body irradiation at the sublethal dose of 8 Gy. Mice were allowed to recover from IR for a minimum of 4 months prior to wound induction. (A) Measurement of wound size at different times post injury. Wound surface area is presented as the mean percent healed  $\pm$  SEM (n=15-16 wounds in each groups). (B) Representative immunofluorescence and histological stainings showing delayed re-epithalization of skin previously exposed to irradiation. Wound boundaries are indicated with arrows. W, wound; Ep, epidermis. Cryosections shown were immunostained with an antibody against pan-cytokeratin (in red) and nuclei with DAPI (in blue) 11 days post wounding. Scale bar = 100  $\mu$ m. Cryosections used for histology were counterstained with hematoxylin. Scale bar = 500  $\mu$ m. (C) Leucocytes infiltration in the wound area at day 3 post-wounding as determined by immunohistochemistry with an anti-CD45 antibody. A representative section from 4 independent wounds analysed per group is shown. Scale bar = 250  $\mu$ m. \*P<0.01).

**Figure 2.** Absence of SDF-1 $\alpha$  induction at the RNA and protein levels in wounded skin previously exposed to IR. (A) Total RNA was collected from skin (day 0) or from wounded tissues together with surrounding margins (day 3), and the ratios of SDF-1 $\alpha$ , VEGF, PAI-1, MMP-3, MMP-9 and MMP-13 RNA relative to 18S ribosomal RNA were determined by quantitative real-time PCR. Shown is the expression levels as detected in mice previously exposed to IR (black bar)



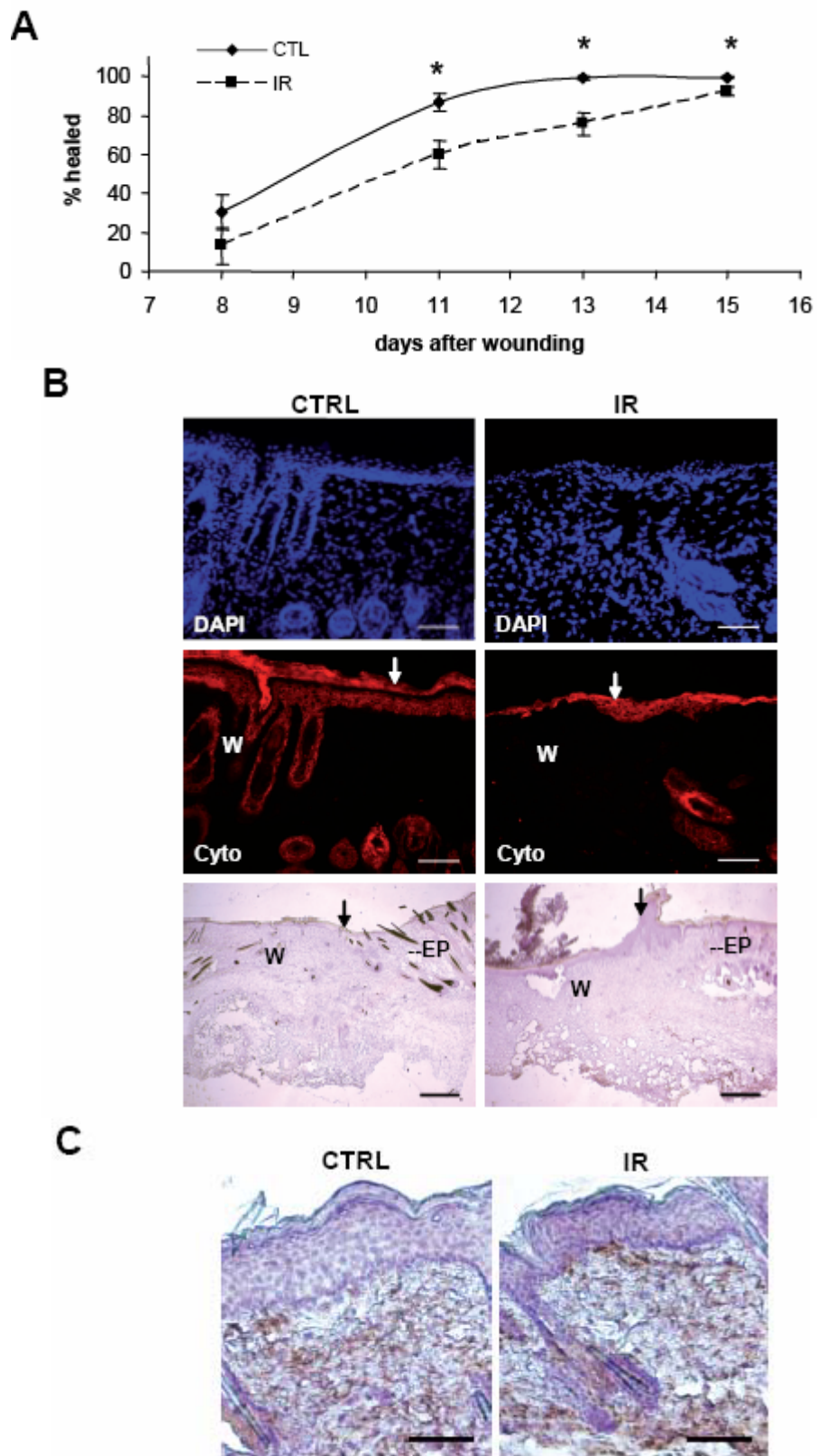
compared to control non-irradiated mice (white bar). Absences of P value at day 0 indicate no significant difference between the expression levels of the two groups of mice. (B) Amount of SDF-1 $\alpha$  protein was determined by ELISA on wound lysates obtained from irradiated mice (black bar) compared to non-irradiated mice (white bar) 3 days after skin injury. Results are expressed as pg of SDF-1 $\alpha$  protein per mg of total protein isolated per wound. Data are mean  $\pm$  SEM; (n=9 mice per group, where each RNA and protein samples is composed of an average of 2 wounds per mice).

**Figure 3.** Local injection of MSCs improves skin wound healing without transdifferentiation. (A) Full-thickness biopsies were created on the dorsal surface of mice previously exposed to IR or not, and the effect of intradermal injection of PBS, MSCs or MEFs (4 injections sites per wound,  $1 \times 10^6$  cells total) on wound healing were analysed. Shown are the proportions of wounds over 90 % closed at day 13. B) Absence of colocalization signal between cytokeratin (in red) and MSCs expressing EGFP (in green) in newly formed epithelium collected 11 days post-wounding. Cryosections were stained with DAPI (in blue). Scale bar = 250  $\mu$ m. C-D) Higher magnification images of epidermis and dermis stained as in B. Scale bar =100  $\mu$ m, 250  $\mu$ m respectively.

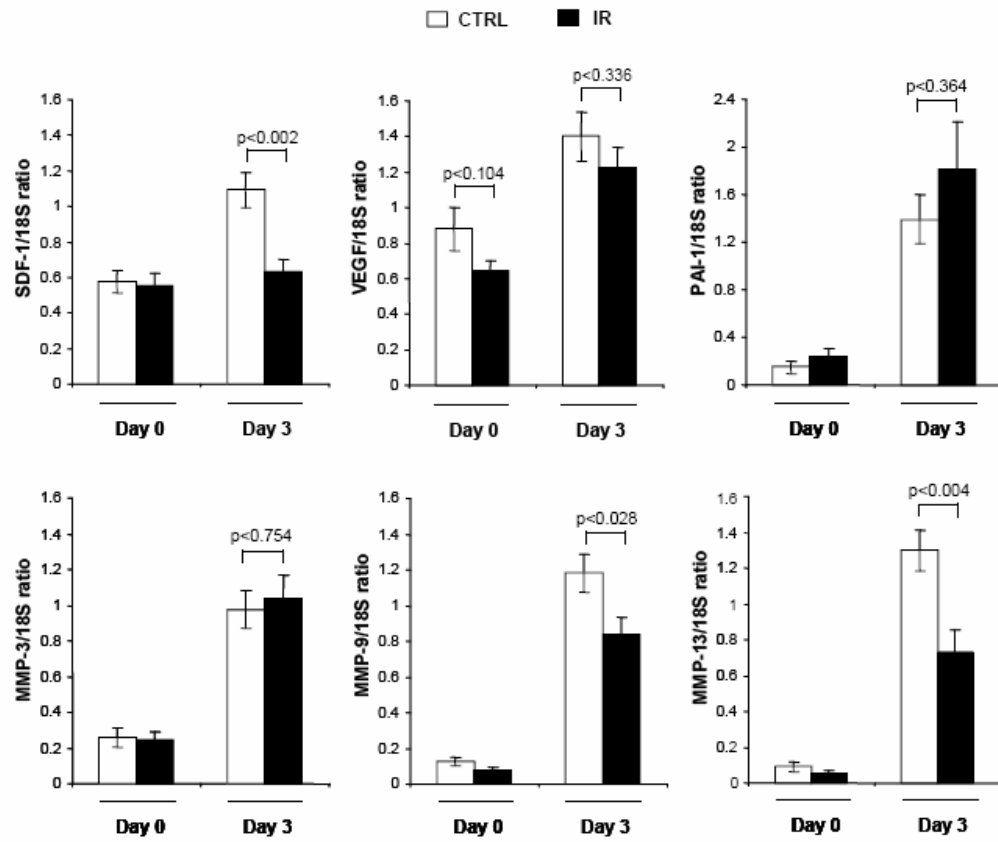
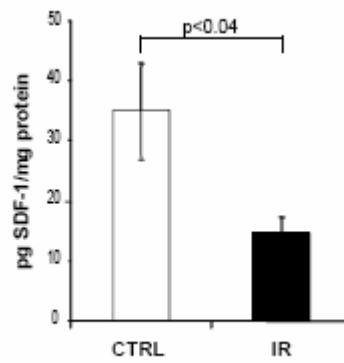
**Figure 4.** Specific secretion of SDF-1 $\alpha$  by MSCs enhanced wound healing. (A) Full-thickness wound biopsies were created on the dorsal surface of mice previously exposed to IR and wound healing was determined following the intradermal injection (4 injections sites per wound) of purified populations of MSC, MSC-ShSDF-1, MSC-SDF-1 or PBS. As in figure 3, the proportions of

wounds over 90 % closed at day 13 are shown. (B) Amount of secreted SDF-1 $\alpha$  in conditioned medium from MSCs genetically modified to express EGFP, shSDF-1, shCTR or SDF-1 was determined by ELISA. Data are expressed as means  $\pm$  SEM of 3 independent measurements.

**Figure 5.** Increased wound vascularization by stromal cell injection. Full-thickness wound biopsies were created on the dorsal surface of mice, and purified populations of MSC-EGFP, MSC-ShSDF-1, MSC-SDF-1, MEF in PBS or PBS alone were injected intradermally the following day (as described in figures 3 and 4). Wound vascularisation density, as determined by vWF stainings, was analysed 15 days after injury. Representative pictures of cryosections counterstained with hematoxylin are shown. Scale bar = 250  $\mu$ m. (B) Quantification of the number of vWF positive vessels per 20x field for each group. Data are mean  $\pm$  SEM; (n= 6 to 12 sections from n=3 to 5 mice; \*P<0.001).



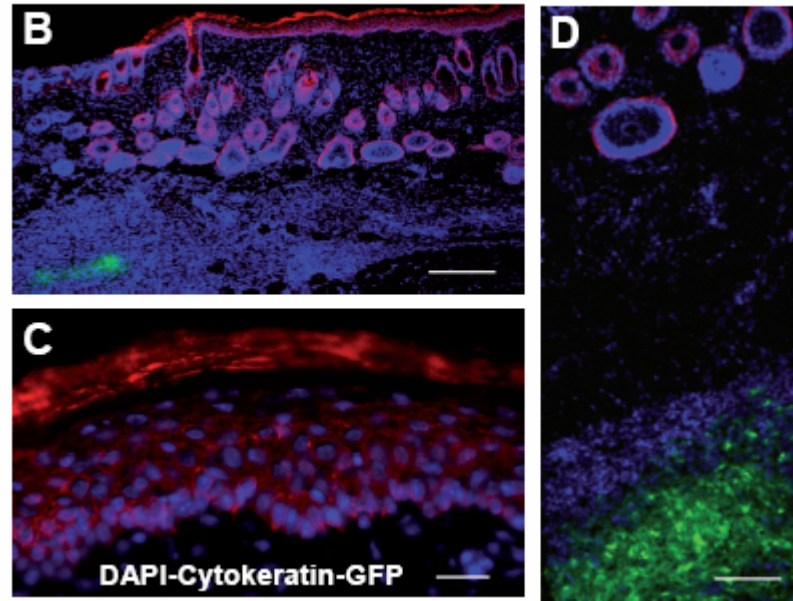
Landry and al. Figure 1. Bottom

**A****B**

Landry and al. Figure 2. Bottom

**A**

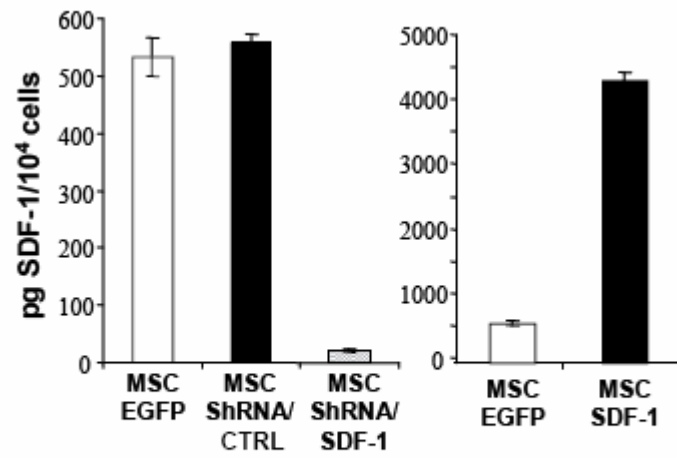
Previously exposed to IR	Injection groups	% of wounds closed at day 13	Number of wounds/group
No	PBS	100	15/15
Yes	PBS	13	2/16
Yes	MSC	72	13/18
Yes	MEF	50	4/8



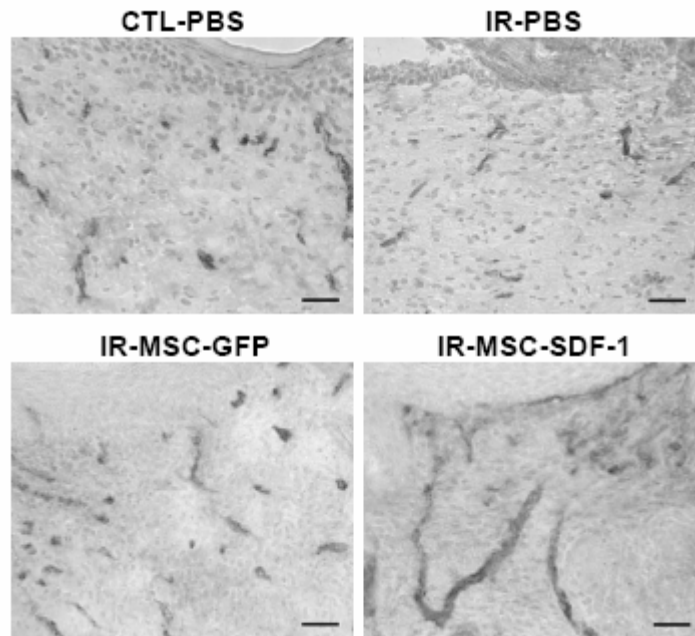
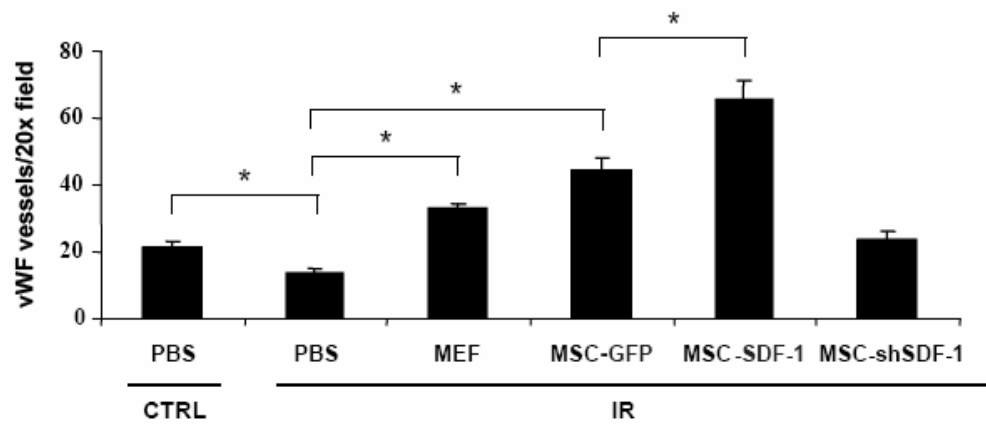
Landry and al. Figure 3. Bottom

**A**

Injection groups	% of wounds closed at day 13	Number of wounds/group
PBS	13	2/16
MSC	72	13/18
MSC-shSDF-1	25	2/8
MSC-SDF-1	70	7/10

**B**

Landry and al. Figure 4. Bottom

**A****B**

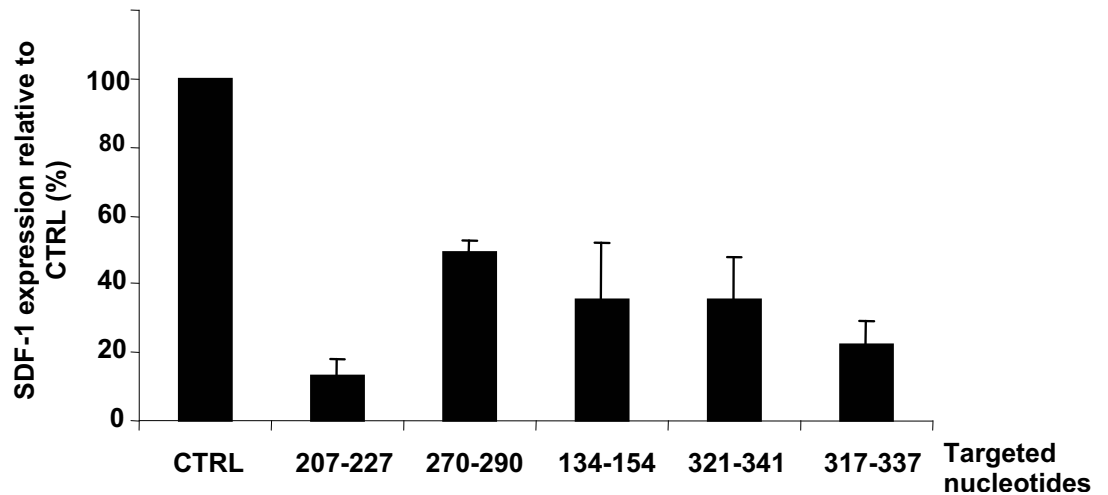
Landry and al. Figure 5. Bottom

## SUPPLEMENTARY MATERIAL

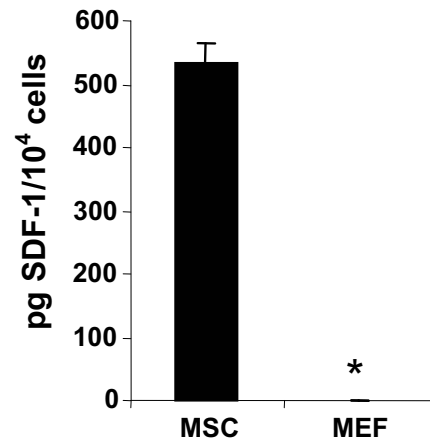
**Table S1.** Murine primers for quantitative real-time PCR

		<b>Forward</b>	<b>Reverse</b>
Stromal cell-derived factor-1	SDF-1 $\alpha$	5'-CAGAGCCAACGTCAAGCATCTGAA-3'	5'-TCTGTTGTTGTTCTTCAGCCGTGC-3'
Vascular endothelial growth factor	VEGF	5'-TACTGCTGTACCTCCACCATG-3'	5'-TCACTTCATGGGACTTCTGCTCT-3'
Plasminogen activator inhibitor 1	PAI-1	5'-TGACTGGGTGGAAAGGCATACCAA-3'	5'TGAAGTAGAGGGCATTACCAGCA-3'
Matrix-metalloproteinase-3	MMP-3	5'-AGCTGAGGACTTTCCAGGTGTTGA-3'	5'-ACACAGGATGCCTTCCTTGGATCT-3'
Matrix-metalloproteinase-9	MMP-9	5'-ACCACAGCCAACATGACCAGGAT-3'	5'-AAGAGTACTGCTTGCCAGGAAGA-3'
Matrix-metalloproteinase-13	MMP-13	5'-TGGAGTGCCTGATGTGGGTGAATA-3'	5'-TGGTGTACATCAGACCAGACCTT-3'
Fibroblast growth factor 2	FGF-2	5'-ACCTTGCTATGAAGGAAGATGGACGG-3'	5'-TACCAACTGGAGTATTTCCGTGACCG-3'
18 S ribosomal RNA	18 S	5'-TCAACTTTCGATGGTAGTCGCCGT-3'	5'-TCCTTGGATGTGGTAGCCGTTTCT-3'

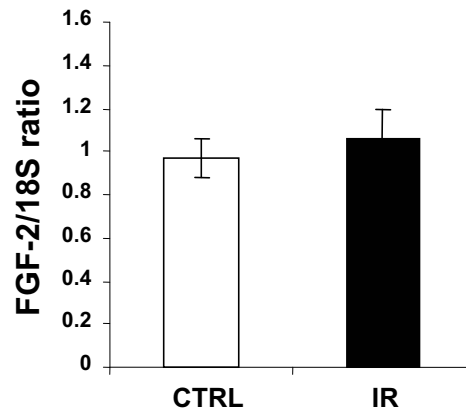




**Figure S1.** Efficacy of lentivectors expressing different shRNA targeting SDF-1. Briefly, MSCs were transfected overnight with shRNA expression vectors (obtained from Open Biosystem) using Lipofectamine 2000 and clones were selected with puromycin (2.5  $\mu\text{g/ml}$ ). Amount of secreted SDF-1 $\alpha$  in conditioned medium from genetically modified MSCs was determined by ELISA. Data are expressed as means  $\pm$  SEM of 2 independent measurements.



**Figure S2.** MEFs secrete undetectable level of SDF-1 $\alpha$ . Amount of secreted SDF-1 $\alpha$  in conditioned medium from MSCs compared to MEFs was determined by ELISA. Data are expressed as means  $\pm$  SEM of 2 independent measurements. \* Below detection levels.



**Figure S3.** Level of FGF-2 is unchanged in irradiated skin. Total RNA was collected from wounds together with surrounding margins (day 3), and the ratios of FGF-2 RNA relative to 18S ribosomal RNA were determined by quantitative real-time PCR. Shown is the expression levels as detected in mice previously exposed to IR (black bar) compared to control non-irradiated mice (white bar). Data are mean  $\pm$  SEM; (n=6).

## CHAPITRE VIII

### DISCUSSION ET PERSPECTIVES

Nos travaux ont permis d'apporter de nouvelles connaissances sur les causes potentielles menant aux retards de régénération tissulaire qui se manifestent chez les survivants d'un cancer. Nous avons entre autre déterminé que SDF-1 $\alpha$  est une cytokine dérégulée au cours du processus de guérison cutanée suivant une exposition aux RI.

Au cours de ce projet de recherche, nous avons également tenté de déterminer si les cellules endommagées/sénescentes étaient déficientes dans leur capacité à induire SDF-1 $\alpha$  en réponse à l'hypoxie, ce qui pourrait expliquer pourquoi les niveaux d'expression de cette cytokine n'augmentent pas dans les plaies de souris irradiées. Nous avons donc tenté de démontrer cette incapacité d'induction de SDF-1 $\alpha$  chez plusieurs types cellulaires provenant de culture primaire ainsi que chez une lignée cellulaire. Plus précisément, nous avons utilisé des ostéoblastes et des MSCs provenant de culture primaire ainsi que des « human umbilical vein endothelial cells » (HUVECs), trois types de cellules qui étaient suspectées fortement pour induire SDF-1 $\alpha$  à la suite de stimuli particuliers et qui étaient facilement accessibles pour la culture in vitro. Notre objectif était de vérifier tout d'abord la capacité de ces cellules à induire SDF-1 $\alpha$ . Pour ce faire, nous avons utilisé deux inducteurs de SDF-1 $\alpha$  reconnus dans la littérature, soit la création de dommage à l'ADN par irradiation (197) et l'hypoxie (148). Une fois les types cellulaires capables d'induire SDF-1 $\alpha$  identifiés, notre but était de rendre les cellules sénescentes pour ensuite évaluer de nouveau leur capacité à induire

SDF-1 $\alpha$ . Il a été démontré récemment qu'il était possible d'induire la sénescence par le traitement de cellules au moyen d'une petite molécule portant le nom de Nutlin-3a (198). Cette molécule est un antagoniste de la protéine régulatrice de p53 MDM2. La Nutlin-3a prévient la reconnaissance de p53 par MDM2 et par conséquent, agit en favorisant l'activation de la voie de signalisation de p53, ce qui mène à l'arrêt du cycle cellulaire et à l'apparition du phénotype de sénescence chez les cellules traitées. Nous avons donc choisi d'utiliser cette molécule pour induire la sénescence chez nos cellules capables de surexprimer SDF-1 $\alpha$ . Cependant, nous ne sommes pas parvenus à obtenir des résultats satisfaisants avec cette démarche, car dès le départ, la capacité à surexprimer SDF-1 $\alpha$  chez nos cellules s'est révélée non-reproductible (résultats non montrés). Comme nous avons beaucoup de variation dans le niveau de surexpression de SDF-1 $\alpha$  chez nos cellules en provenance de culture primaire, nous n'avons pas été en mesure de juger hors de tout doute que les cellules endommagées/sénescents sont incapables de produire SDF-1 $\alpha$ . En conséquence, nous travaillons encore aujourd'hui à tenter de répondre à cette question dans notre laboratoire.

Dans ce mémoire, nous avons démontré que l'injection de MSCs en périphérie de blessures accélère la guérison chez les souris irradiées à un niveau similaire à celui observé chez les souris non-irradiées par un mécanisme impliquant la sécrétion paracrine de facteurs. La diminution spécifique de l'expression de SDF-1 $\alpha$  dans les MSCs a réduit de façon importante la formation de nouveaux vaisseaux sanguins dans les plaies en plus de réduire significativement la capacité des MSCs à accélérer la guérison cutanée, indiquant

que la sécrétion de SDF-1 $\alpha$  par les MSCs est responsable de leurs actions bénéfiques.

Bien que plusieurs évidences laissent suggérer que l'efficacité de guérison de plaies dépend, du moins en partie, de SDF-1 $\alpha$ , nos résultats nous indiquent que la fermeture de plaies ne semble toutefois pas résulter uniquement de la formation de nouveaux vaisseaux sanguins à laquelle participe cette cytokine. En effet, il est possible que le sécrétome des MSCs accélère la guérison de plaies en exerçant un effet mitogénique sur les kératinocytes principalement via SDF-1 $\alpha$ . Ce qu'il serait intéressant de réaliser pour bonifier nos travaux serait de voir si dans notre modèle le SDF-1 $\alpha$  sécrété par les MSCs a véritablement une action directe sur la prolifération des kératinocytes. Pour ce faire, il serait possible d'effectuer sur des coupes de peau de nos différents groupes expérimentaux un marquage des kératinocytes avec le Ki67, un marqueur bien connu de prolifération. Cette expérience supplémentaire pourrait nous confirmer si l'action de SDF-1 $\alpha$  passe majoritairement par un effet sur la prolifération de ces cellules.

Comme il a été discuté précédemment dans le chapitre 4, section 4.2.7, SDF-1 $\alpha$  est une molécule chimioattractante pour les cellules souches CXCR4+ dérivées de la moelle osseuse. Un aspect qu'il aurait été intéressant d'étudier au cours de notre projet est de savoir si l'effet de la sécrétion de SDF-1 $\alpha$  sur la guérison passe par une augmentation du recrutement de cellules souches et progénitrices à la plaie. De même, il aurait pu être intéressant d'essayer de déterminer si à la base le problème d'induction de SDF-1 $\alpha$  dans la peau qui a été exposée aux RI cause les retards de régénération parce qu'il y a moins de cellules

de la moelle recrutées au site de blessure. Cependant ce dernier point est très difficile à réaliser dans notre modèle d'étude. En effet, pour étudier le recrutement de cellules en provenance de la moelle dans les tissus, il faut d'abord procéder chez toutes les souris à une transplantation de moelle osseuse contenant des cellules marquées avec la «green fluorescent protein» (GFP) et cette étape nécessite que tous les animaux soient irradiés. Donc, dans notre cas, il serait impossible de comparer les niveaux de recrutement de cellules avec des animaux témoins.

En lien avec nos résultats démontrant que l'ajout d'un support stromal adéquat (MSCs) dans une peau irradiée améliore le potentiel régénératif de cette dernière, nous avons finalement voulu déterminer quels étaient les effets de la création d'un microenvironnement stromal endommagé/sénescent dans une peau non-irradiée. Nous désirions savoir si cela aurait pour effet de retarder la guérison de blessures comme chez les souris irradiées. Les résultats supplémentaires ajoutés en annexe de ce mémoire (Tableau A1.1) démontrent que l'injection de MSCs irradiés (irradiation plus de 10 jours avant l'expérience afin de permettre l'apparition du phénotype de sénescence) ralentit la guérison de plaies cutanées chez les souris non-irradiées en comparaison avec les souris contrôles injectées avec de la solution saline. Cette baisse du taux de guérison de 30% est difficile à expliquer, car nous avons démontré que c'est une dérégulation de la capacité à induire SDF-1 $\alpha$  dans la peau irradiée qui cause les retards de régénération cutané, alors que dans ce cas-ci, nous avons affaire à une peau normale qui ne présente pas ce problème. Une explication possible de ce retard de guérison est que les MSCs irradiées pourraient sécréter des molécules capables d'inactiver le SDF-1 $\alpha$

présent dans la peau non-irradiée. Il a été récemment découvert que les cellules de la moelle osseuse expriment une enzyme, la carboxypeptidase M, qui a pour fonction de cliver en C-terminal le SDF-1 $\alpha$  et de le rendre non-fonctionnel (199). Par conséquent, il se pourrait que les MSCs sénescents, qui ont un profil sécrétoire altéré, sécrètent en plus grande quantité cette enzyme, inactivant ainsi le SDF-1 $\alpha$  présent dans la peau et ralentissant la guérison. Ce dernier point demeure cependant une hypothèse et nécessite d'être investigué plus en détail en laboratoire.



## **CHAPITRE IX**

### **CONCLUSION**

En résumé, les données rapportées dans ce mémoire donnent des renseignements importants sur les mécanismes impliqués dans la diminution des capacités de régénération de la peau irradiée, et possiblement d'autres tissus, plusieurs mois suivant une exposition aux RI. Plus précisément, nos travaux nous ont permis de déterminer qu'une déficience dans l'induction de la cytokine SDF-1 $\alpha$  est la principale cause des retards de réparation de la peau irradiée. Fort heureusement, tout porte à croire que ce défaut est réversible lorsqu'on est en mesure de fournir un support stromal adéquat au microenvironnement des blessures, ce qui nous indique que les thérapies à base de MSCs ou de cytokines devraient être efficaces pour accélérer la guérison de plaies chez les survivants du cancer.

## BIBLIOGRAPHIE

1. Ries LAG, Melbert D, Krapcho M, et al, National Cancer Institute. SEER Cancer Statistics Review,1975-2004 [http://seer.cancer.gov/csr/1975\\_2004/](http://seer.cancer.gov/csr/1975_2004/)
2. Geenen MM, Cardous-Ubbink MC, Kremer LC, et al. Medical assessment of adverse health outcomes in long-term survivors of childhood cancer. *JAMA* 2007;297:2705-2715.
3. Oeffinger KC, Mertens AC, Sklar CA, et al. Chronic health conditions in adult survivors of childhood cancer. *N Engl J Med.* 2006;355:1572-1582.
4. Mathes SJ, Alexander J. Radiation injury. *Surg Oncol Clin N Am* 1996;5:809-24.
5. Bergonie J, Tribondeau L. Interpretation of some results of radiotherapy and an attempt at determining a logical technique of treatment. *Radiat Res* 1959;11:587–8.
6. Coutard H. Roentgen therapy of epitheliomas of the tonsillar region, hypopharynx, and larynx from 1920 to 1926. *Am J Roentgenol* 1932;28:313–31.
7. Perez CA, Brady LW. Overview. In: Perez CA, Brady LW, eds. *Principles and Practice of Radiation Oncology.* Lippincott. 1992:1–63.
8. Terasima T, Tolmach LJ. X-ray sensitivity and DNA synthesis in synchronous population of HeLa cells. *Science* 1963;140:490–2.
9. Sinclair WK, Morton RA. X-ray sensitivity during the cell generation cycle of cultured Chinese hamster cells. *Radiat Res* 1966;29:450–74.
10. Bernstein EF, Sullivan FJ, Mitchell JB, et al. Biology of chronic radiation effects on tissues and wound healing. *Clin Plast Surg* 1993;20:435–53.
11. Rudolph R, Arganese T, Woodward M. The ultrastructure and etiology of chronic radiotherapy damage in human skin. *Ann Plast Surg* 1982;9:282–92.
12. Mendelsohn FA, Divino CM, Reis ED, et al. Wound care after radiation therapy. *Adv Skin Wound Care* 2002;15:216–24.
13. Dantzer D, Ferguson P, Hill RP, et al. Effect of radiation and cell implantation on wound healing in a rat model. *J Surg Oncol* 2003;83:185–190.

14. Ferguson PC, Boynton EL, Wunder JS, et al. Intra-dermal injection of autologous dermal fibroblasts improves wound healing in irradiated skin. *J Surg Res* 1999;85:331–338.
15. Moore MJ. The effect of radiation on connective tissue. *Otolaryngol Clin N Am* 1984;17:389–99.
16. Kindwall EP. Hyperbaric oxygen's effect on radiation necrosis. *Clin Plast Surg* 1993;20:473–83.
17. Chang HS, Hom DB, Agarwal RP, et al. Effects of basic fibroblast growth factor on irradiated porcine skin flaps. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 1998;124:307–12.
18. Weriel J, Ferguson P, Bell R, et al. Model of radiation-impaired healing of a deep excisional wound. *Wound Rep Reg* 2006;14:498-505.
19. Udagawa T, Birsner AE, Wood M, et al. Chronic suppression of angiogenesis following radiation exposure is independent of hematopoietic reconstitution. *Cancer Res* 2007;67:2040-45.
20. Galotto M, Berisso G, Delfino L, et al. Stromal damage as consequence of high-dose chemo/radiotherapy in bone marrow transplant recipients. *Exp Hematol* 1999;27:1460-1466.
21. Campisi J, d'Adda di Fagagna F. Cellular senescence: when bad things happen to good cells. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2007;8:729-740.
22. Rodier F, Campisi J, Bhaumik D. Two faces of p53: aging and tumor suppression. *Nucleic Acids Res* 2007;35:7475-7484.
23. Hayflick L. The limited in vitro lifetime of human diploid cell strains. *Exp Cell Res* 1965;37:614-636.
24. Beausejour CM, Krtolica A, Galimi F, and al. Reversal of human cellular senescence: role of the p53 and p16 pathways. *EMBO J* 2003;22:4212-4222.
25. Karlseder J, Smorgozewska A, de Lange T. Senescence induced by altered telomere state, not telomere loss. *Science* 2002;295:2446-2449.
26. Wright WE, Shay JW. Cellular senescence as a tumor-protection mechanism: the essential role of counting. *Curr Opin Genet Dev* 2001;11:98-103.

27. Martens UM, Chavez EA, Poon SS, et al. Accumulation of short telomeres in human fibroblasts prior to replicative senescence. *Exp Cell Res* 2000;256:291-299.
28. Chan SW, Chang J, Prescott J and E.H. Blackburn, Altering telomere structure allows telomerase to act in yeast lacking ATM kinases. *Curr Biol* 2001;11:1240–1250.
29. de Lange T, Shelterin: the protein complex that shapes and safeguards human telomeres. *Genes Dev* 2005;19:2100–2110.
30. von Zglinicki T, Saretzki G, Ladhoff J, et al. Human cell senescence as a DNA damage response. *Mech Ageing Dev* 2005;126:111–117.
31. Chen Q, Fisher A, Reagan JD. Et al. Oxidative DNA damage and senescence of human diploid fibroblast cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995;92:4337-4341.
32. Dileonardo A, Linke SP, Clarkin K, et al. DNA damage triggers a prolonged p53-dependant G1 arrest and long-term induction of Cip1 in normal human fibroblasts. *Genes Dev* 1994;8:2540-2551.
33. Lin AW, Barradas M, Stone JC, et al. Premature senescence involving p53 and p16 is activated in response to constitutive MEK/MAPK mitogenic signaling. *Genes Dev* 1998;12:3008-19.
34. Serrano M, Lin AW, Mccurrach ME, et al. Oncogenic ras provokes premature cell senescence associated with accumulation of p53 and p16INK4a. *Cell* 1997;88:593-602.
35. Zhu J, Woods D, McMahon M, Bishop JM. Senescence of human fibroblasts induced by oncogenic Raf. *Genes Dev* 1998;12:2997-3007.
36. Irani K, Xia Y, Zweier JL, et al. Mitogenic signaling mediated by oxidants in Ras-transformed fibroblasts. *Science* 1997;275:1649-52.
37. Lee AC, Fenster BE, Ito H, et al. Ras proteins induce senescence by altering the intracellular levels of reactive oxygen species. *J Biol Chem* 1999;274:7936-40.
38. D'Adda di Fagagna F, Teo SH and Jackson SP. Functional links between telomeres and proteins of the DNA-damage response. *Genes Dev* 2004;18:1781–1799.
39. Sedivy JM. Telomeres limit cancer growth by inducing senescence: long-sought in vivo evidence obtained. *Cancer Cell* 2007;11:389-391.

40. Collado M, Gil J, Efeyan A, et al. Tumour biology: senescence in premalignant tumours. *Nature* 2005;436:642.
41. Michaloglou C, Vredeveld LC, Soengas MS, et al. BRAFE600-associated senescence-like cell cycle arrest of human naevi. *Nature* 2005;436:720-4.
42. Sharpless NE and DePinho RA. Cancer: crime and punishment. *Nature* 2005;436:636-7.
43. Jeyapalan JC, Ferreira M, Sedivy JM, Herbig U. Accumulation of senescent cells in mitotic tissue of aging primates. *Mech Ageing Dev* 2007;128:36-44.
44. Dimri GP, Lee X, Basile G. A biomarker that identifies senescent human cells in culture and in aging skin in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1995;92:9363-7.
45. Herbig U, Ferreira M, Condel L, Carey D, Sedivy JM. Cellular senescence in aging primates. *Science* 2006;311:1257.
46. Ressler S, Bartkova J, Niederegger H, et al. p16INK4A is a robust in vivo biomarker of cellular aging in human skin. *Aging Cell* 2006;5:379-389.
47. Dai CY, Enders GH. p16 INK4a can initiate an autonomous senescence program. *Oncogene* 2000;19:1613-22.
48. McConnell BB, Starborg M, Brookes S, Peters G. Inhibitors of cyclin-dependent kinases induce features of replicative senescence in early passage human diploid fibroblasts. *Curr Biol* 1998;8:351-4.
49. Janzen V, Forkert R, Fleming HE, et al. Stem-cell ageing modified by the cyclin-dependent kinase inhibitor p16INK4a. *Nature* 2006;443:421-426.
49. Krtolica A, Campisi J. Cancer and aging: a model for the cancer promoting effects of the aging stroma. *Int J Biochem Cell Biol* 2002;34:1401-14.
50. Coussens LM, Werb Z. Inflammation and cancer. *Nature* 2002;420:860-7.
51. Krtolica A, Parrinello S, Lockett S, Desprez PY, Campisi J. Senescent fibroblasts promote epithelial cell growth and tumorigenesis: a link between cancer and aging. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2001;98:12072-7.
52. Clark R. Wound repair: Overview and general considerations. *The molecular and cellular biology of wound repair* (2nd ed.), edited by Clark RAF. New York: Plenum 1996:3-50.

53. Werner S, Grose R. Regulation of wound healing by growth factors and cytokines. *Physiol Rev* 2003;83:835-870.
54. Shamberger R. Effect of chemotherapy and radiotherapy on wound healing: experimental studies. *Recent Results Cancer Res* 1985;98:17-34.
55. Tokarek R, Bernstein EF, Sullivan F, et al. Effect of therapeutic radiation on wound healing. *Clin Dermatol* 1994;12:57-70.
56. Davidson JM, Broadley KN. Manipulation of the wound-healing process with basic fibroblast growth factor. *Ann N Y Acad Sci* 1991;638:306-15.
57. Springfield, DS. Surgical wound healing. In: *Multidisciplinary treatment of soft tissue sarcoma* 1993;Chapter 5:81-98.
58. Mustoe TA, Porras-Reyes BH. Modulation of wound healing response in chronic irradiated tissues. *Clin Plast Surg* 1993;20:465-471.
59. Drake DB, Oishi SN. Wound healing considerations in chemotherapy and radiation therapy. *Clin Plast Surg* 1995;22:31-37.
60. Opalenik SR, Davidson JM. Fibroblasts differentiation of bone marrow-derived cells during wound repair. *FASEB J* 2005;19:1561-1563.
61. Werner S, Krieg T, Smola H. Keratinocyte-fibroblast interactions in wound healing. *J Invest Dermatol* 2007;127:998-1008.
62. Gurtner GC, Werner S, Barrandon Y et al. Wound repair and regeneration. *Nature* 2008;453:314-321.
63. Lovorn HN et al. Relative distribution and crosslinking of collagen distinguish fetal from adult sheep wound repair. *J Pediatr Surg* 1999;34:218-223.
64. Galiano RD, Tepper OM, Pelo CR, et al. Topical vascular endothelial growth factor accelerates diabetic wound healing through increased angiogenesis and by mobilizing and recruiting bone marrow-derived cells. *Am J Pathol* 2004;164:1935-1947.
66. Asai J, Takenaka H, Kusano KF, et al. Topical sonic hedgehog gene therapy accelerates wound healing in diabetes by enhancing endothelial progenitor cell-mediated microvascular remodeling. *Circulation* 2006;113:2413-2424.
67. Badillo AT, Chung S, Zhang L, Zoltick P, Liechty KW. Lentiviral gene transfer of SDF-1alpha to wounds improves diabetic wound healing. *J Surg Res* 2007;143:35-42.

68. Heldin CH, Eriksson U, Östman A. New members of the platelet-derived growth factor family of mitogens. *Arch Biochem Biophys* 2002;398:284–290.
69. Heldin CH, Westermark B. Mechanism of action and in vivo role of platelet-derived growth factor. *Physiol Rev* 1999;79:1283–1316.
70. Heldin CH, Westermark B. In: *Role of Platelet-Derived Growth Factor In Vivo* (2nd ed.), edited by R. A. F. Clark. New York: Plenum, 1996:249–273.
71. Blatti SP., Foster DN, Ranganathan G, et al. Induction of fibronectin gene transcription and mRNA is a primary response to growth-factor stimulation of AKR-2B cells. *Proc. Natl. Acad. Sci USA* 1988;85:1119–1123.
72. Canalis E. Effect of platelet-derived growth factor on DNA and protein synthesis in cultured rat calvaria. *Metabolism* 1981;30:970–975.
73. Schönher E, Järveläinen HT, Sandell LJ, et al. Effects of platelet-derived growth factor and transforming growth factor- $\beta$ 1 on the synthesis of a large versican-like chondroitin sulfate proteoglycan by arterial smooth muscle cells. *J Biol Chem* 1991;266:17640–17647.
74. Heldin P, Laurent TC, Heldin CH. Effect of growth factors on hyaluronan synthesis in cultured human fibroblasts. *Biochem J* 1989;258:919–922.
75. Clark RA. Regulation of fibroplasia in cutaneous wound repair. *Am J Med Sci* 1993;306:42–48.
76. Shimokado K, Raines EW, Madtes DK, et al. A significant part of macrophage-derived growth factor consists of at least two forms of PDGF. *Cell* 1985;43:277–286.
77. Paulsson Y, Hammacher A, Heldin CH, et al. Possible positive autocrine feedback in the prereplicative phase of human fibroblasts. *Nature* 1987;328:715–717.
78. Harlan JM, Thompson PJ, Ross R, et al.  $\alpha$ -Thrombin induces release of platelet-derived growth factor-like molecule(s) by cultured human endothelial cells. *J Cell Biol* 1986;103:1129–1133.
79. Ansel JC, Tiesman JP, Olerud JE, et al. Human keratinocytes are a major source of cutaneous platelet-derived growth factor. *J Clin Invest* 1993;92:671–678.

80. Terracio L, Ronnstrand L, Tingstrom A, et al. Induction of platelet-derived growth factor receptor expression in smooth muscle cells and fibroblasts upon tissue culturing. *J Cell Biol* 1988;107:1947-1957.
81. Ashcroft GS, Horan MA, Ferguson MW. The effects of ageing on wound healing: immunolocalisation of growth factors and their receptors in a murine incisional model. *J Anat* 1997;190:351-365.
82. Robson MC, Phillips LG, Thomason A, et al. Platelet-derived growth factor BB for the treatment of chronic pressure ulcers. *Lancet* 1992;339:23-25.
83. Cohen MA, Eaglstein WH. Recombinant human platelet-derived growth factor gel speeds healing of acute full-thickness punch biopsy wounds. *J Am Acad Dermatol* 2001;45:862-875.
84. Brown RL, Breeden MP, Greenhalgh DG. PDGF and TGF-alpha act synergistically to improve wound healing in the genetically diabetic mouse. *J Surg Res* 1994;56:562-570.
85. Sprugel KH, Greenhalgh DG, Murray MJ, et al. Platelet-derived growth factor and impaired wound healing. *Prog Clin Biol Res* 1991;365:327-340.
86. Pierce GF, Tarpley JE, Allman RM, et al. Tissue repair processes in healing chronic pressure ulcers treated with recombinant platelet-derived growth factor BB. *Am J Pathol* 1994;145:1399-1410.
87. Steed DL, The diabetic ulcer study group. Clinical evaluation of recombinant human platelet-derived growth factor for the treatment of lower extremity diabetic ulcers. *J Vasc Surg* 1995;21:71-81.
88. Wieman TJ, Smiell JM, Su Y. Efficacy and safety of a topical gel formulation of recombinant human platelet-derived growth factor-BB (becaplemin) in patients with chronic neuropathic diabetic ulcers: a phase III randomized placebo-controlled double-blind study. *Diab Care* 1998;21:822-827.
89. Wieman TJ. Clinical efficacy of becaplemin (rhPDGF-BB) gel. *Am J Surg* 1998;176:74S-79S.
90. Yarden Y. The EGFR family and its ligands in human cancer: signalling mechanisms and therapeutic opportunities. *Eur J Cancer* 2001;37:3-8.



91. Greenhalgh DG. The role of growth factors in wound healing. *J Trauma* 1996;41:159–167.
92. Shultz GS, White M, Mitchell R, et al. Epithelial wound healing enhanced by transforming growth factor- $\alpha$  and vaccinia growth factor. *Science* 1987;235:350–352.
93. Steed DL. Modifying the wound healing response with exogenous growth factors. *Clin Plast Surg* 1998;25:397–405.
94. Grotendorst GR, Soma Y, Takehara K, et al. EGF and TGF- $\alpha$  are potent chemoattractants for endothelial cells and EGF-like peptides are present at sites of tissue regeneration. *J Cell Physiol* 1989;139:617–623.
95. Marikovsky, M, Vogt P, Eriksson E, et al. Wound fluid-derived heparin-binding EGF-like growth factor (HB-EGF) is synergistic with insulin-like growth factor-I for Balb/MK keratinocyte proliferation. *J Invest Dermatol* 1996;106:616–621.
96. Tokumaru S, Higashiyama S, Endo T, et al. Ectodomain shedding of epidermal growth factor receptor ligands is required for keratinocyte migration in cutaneous wound healing. *J Cell Biol* 2000;151:209–219.
97. O'Dell SD, Day INM. Molecules in focus: insulin-like growth factor II (IGF-II). *Int J Biochem Cell Biol* 1998;30:767–771.
98. Edmondson SR, Thumiger SP, Werther GA, et al. Epidermal Homeostasis: The Role of the Growth Hormone and Insulin-like Growth factor Systems. *Endocrine Reviews* 2003;24:737-764.
99. Conover CA, Rosenfeld RG, Hintz RL. Hormonal control of the replication of human fetal fibroblasts: role of somatomedin C/insulin-like growth factor I. *J Cell Physiol* 1986;128:47–54.
100. Tamm I, Kikuchi T. Activation of signal transduction pathways protects quiescent Balb/c-3T3 fibroblasts against death due to serum deprivation. *J Cell Physiol* 1991;148:85–95.
101. Yoshimoto H, Ishihara H, Ohtsuru A, et al. Overexpression of insulin-like growth factor-1 (IGF-I) receptor and the invasiveness of cultured keloid fibroblasts. *Am J Pathol* 1999;154:883–889.
102. Ghahary A, Shen Q, Shen YJ, et al. Induction of transforming growth factor  $\beta$  1 by insulin-like growth factor-1 in dermal fibroblasts. *J Cell Physiol* 1998;174:301–309.

103. Sell C, Ptasznik A, Chang CD, et al. IGF-1 receptor levels and the proliferation of young and senescent human fibroblasts. *Biochem Biophys Res Commun* 1993;194:259–265.
104. Ferber A, Chang C, Sell C, et al. Failure of senescent human fibroblasts to express the insulin-like growth factor-1 gene. *J Biol Chem* 1993;268:17883–17888.
105. Rudman SM, Philpott MP, Thomas GA, et al. The role of IGF-I in human skin and its appendages: morphogen as well as mitogen? *J Invest Dermatol* 1997;109:770–777.
106. Hodak E, Gottlieb AB, Anzilotti M, et al. The insulin-like growth factor 1 receptor is expressed by epithelial cells with proliferative potential in human epidermis and skin appendages: correlation of increased expression with epidermal hyperplasia. *J Invest Dermatol* 1996;106:564–570.
107. Gartner MH, Benson JD, Caldwell MD. Insulin-like growth factors I and II expression in the healing wound. *J Surg Res* 1992;52:389–394.
108. Brown DL, Kane CD, Chernausk SD, et al. Differential expression and localization of insulin-like growth factors I and II in cutaneous wounds of diabetic and nondiabetic mice. *Am J Pathol* 1997;151:715–724.
109. Marikovsky M, Vogt P, Eriksson E, et al. Wound fluid-derived heparin-binding EGF-like growth factor (HB-EGF) is synergistic with insulin-like growth factor-I for Balb/MK keratinocyte proliferation. *J Invest Dermatol* 1996;106:616–621.
110. Vogt PM, Lehnhardt M, Wagner D, et al. Determination of endogenous growth factors in human wound fluid: temporal presence and profiles of secretion. *Plast Reconstr Surg* 1998;102:117–123.
111. Velander P, Theopold C, Hirsch T, et al. Impaired wound healing in an acute diabetic pig model and the effects of local hyperglycemia. *Wound Repair Regen* 2008;16:288-93.
112. Bittar MS, Labbad ZN. Transforming growth factor-beta and insulin-like growth factor-I in relation to diabetes-induced impairment of wound healing. *J Surg Res* 1996;61:113–119.
113. Hirsch T, Spielmann M, Velander P, et al. Insulin-like growth factor-1 gene therapy and cell transplantation in diabetic wounds. *J Gene Med* 2008.

114. Roberts AB. Molecular and cell biology of TGF-beta. *Miner Electrolyte Metab* 1998;24:111–119.
115. Massagué J. TGF-beta signal transduction. *Annu Rev Biochem* 1998;67:753–791.
116. Assoian RK, Komoriya A, Meyers CA, et al. Transforming growth factor-beta in human platelets. Identification of a major storage site, purification, and characterization. *J Biol Chem* 1983;258:7155–7160.
117. Roberts AB, Sporn MB. Transforming growth factor- $\beta$ . In: *The Molecular and Cellular Biology of Wound Repair* (2nd ed.), edited by Clark RAF. New York: Plenum 1996:275–308.
118. Cromack, DT et al. Transforming growth factor beta levels in rat wound chambers. *J Surg Res* 1987;42:622-628.
119. Muller, G et al. Inhibitory action of transforming growth factor beta on endothelial cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1987;84:5600-5604.
120. Mansbridge, JN, Hanawalt, PC. Role of transforming growth factor beta in the maturation of human epidermal keratinocytes. *J Invest Dermatol* 1988;90:336-341.
121. Wahl, SM et al. Transforming growth factor type beta induces monocyte chemotaxis and growth factor production. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1987;84:5788-5792.
122. Ornitz DM, Itoh N. Fibroblast growth factors. *Genome Biol* 2001;2:1–3005.
123. Werner S. Keratinocyte growth factor: a unique player in epithelial repair processes. *Cytokine Growth Factor Rev* 1998;2:153–165.
124. Johnson DE, Williams LT. Structural and functional diversity in the FGF receptor multigene family. *Adv Cancer Res* 1993;60:1–41.
125. Ornitz DM, Xu J, Colvin JS, et al. Receptor specificity of the fibroblast growth factor family. *J Biol Chem* 1996;27:15292–15297.
126. Risau W. Angiogenic growth factors. *Prog Growth Factor Res* 1990;2:71–79.
127. Ortega S, Ittmann M, Tsang SH, et al. Neuronal defects and delayed wound healing in mice lacking fibroblast growth factor-2. *PNAS* 1998;95:5672-5677.

128. Werner S, Smola H, Liao X, et al. The functions of KGF in epithelial morphogenesis and wound re-epithelialisation. *Science* 1994;266:819-822.
129. Detillieux KA, Sheikh F, Kardami E, et al. Biological activities of fibroblast growth factor-2 in the adult myocardium. *Cardiovasc Res* 2003;57:8-19.
130. Swift ME, Kleinman HK, DiPietro LA. Impaired wound repair and delayed angiogenesis in aged mice. *Lab Invest* 1999;79:1479–1487.
131. Shukla A, Dubey MP, Srivastana R, et al. Differential expression of proteins during healing of cutaneous wounds in experimental normal and chronic models. *Biochem Biophys Res Commun* 1998;244:434–439.
132. Roy H, Bhardwaj S, Ylä-Herttuala S. Biology of vascular endothelial 2006;580:2879-2887.
133. Carmeliet P. Mechanisms of angiogenesis and arteriogenesis. *Nat Med* 2000;6:389–395.
134. Ferrara N, Gerber HP, LeCouter J. The biology of VEGF and its receptors, *Nat Med* 2003;9:669–676.
135. Romano Di Peppe S, Mangoni A, Zambruno G, et al. Adenovirus-mediated VEGF(165) gene transfer enhances wound healing by promoting angiogenesis in CD1 diabetic mice. *Gene Ther* 2002;9:1271–1277.
136. Nagasawa T, Nakajima T, Tachibana K, et al. Molecular cloning and characterization of a murine pre-B-cell growth-stimulating factor/stromal cell-derived factor 1 receptor, a murine homolog of the human immunodeficiency virus 1 entry coreceptor fusin. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 1996;93:14726–14729.
137. Shirozu M, Nakano T, Inazawa J, et al. Structure and chromosomal localization of the human stromal cell-derived factor 1 (SDF1) gene. *Genomics* 1995;28:495.
138. Nagasawa T, Tachibana K, Kawabata K. A CXC chemokine SDF-1/PBSF. A ligand for a HIV receptor, CXCR4. *Adv Immunol* 1999;71:211-228.
139. Aiuti A, Taviani M, Cipponi A, et al. Expression of CXCR4, the receptor for stromal cell-derived factor-1 on fetal and adult human lymphohematopoietic progenitors. *Eur J Immunol* 1999;29:1823–1831.

140. Nagasawa T, Hirota S, Tachibana K, et al. Defects of B-cell lymphopoiesis and bone-marrow myelopoiesis in mice lacking the CXC chemokine PBSF/SDF-1. *Nature* 1996;382:635–638.
141. Peled A, Petit I, Kollet O, et al. Dependence of human stem cell engraftment and repopulation of NOD/SCID mice on CXCR4, *Science* 1999;283:845–848.
142. Askari AT, Unzek S, Popovic ZB et al. Effect of stromal-cell-derived factor 1 on stem-cell homing and tissue regeneration in ischaemic cardiomyopathy. *Lancet* 2003;362:697–703.
143. Orimo A, Gupta PB, Sgroi DC, et al. Stromal Fibroblast present in invasive human breast carcinomas promote tumor growth and angiogenesis through elevated SDF-1/CXCL12 secretion. *Cell* 2005;121:335-348.
144. Jung J, Wang J, Schneider A, et al. Regulation of SDF-1 (CXCL12) production by osteoblast; a possible mechanism for stem cell homing. *Bone* 2006;38:497-508.
145. Bleul C, Fuhlbrigge R, Casanovas JM, et al. A highly efficacious lymphocyte chemoattractant stromal cell-derived factor 1 (SDF-1). *J Exp Med* 1996;184:1101-1109.
146. Mohle R, Bautz F, Rafii S, et al. The chemokine receptor CXCR-4 is expressed on CD34+ hematopoietic progenitors and leukemic cells and mediates transendothelial migration induced by stromal cell-derived factor-1. *Blood* 1998;91:4523-4530.
147. Toksoy A, Müller V, Gillitzer R, et al. Biphasic expression of stromal cell-derived factor-1 during human wound healing. *Br J Dermatol* 2007; 157:1148-54.
148. Ceradini DJ, Kulkarni AR, Callaghan MJ, et al. Progenitor cell trafficking is regulated by hypoxic gradients through HIF-1 induction of SDF-1. *Nat Med*;10:858-864.
149. Gallagher KA, Liu ZJ, Xiao M, et al. Diabetic impairments in NO-mediated endothelial progenitor cell mobilization and homing are reversed by hypoxia and SDF-1 $\alpha$ . *J Clin Invest* 2007;117:1249-59.

150. Parks WC, Wilson CL, Lopez-Boado YS. Matrix metalloproteinases as modulators of inflammation and innate immunity. *Nat Rev Immunol* 2004; 4:617–629.
151. Mandal M, Mandal A, Das S, et al. Clinical implication of matrix metalloproteinases. *Mol Cell Biochem* 2003;252:305-329.
152. Woessner JF. Matrix metalloproteinases and their inhibitors in connective tissue remodeling. *FASEB J* 1991;5:2145–2154.
153. Stetler-Stevenson WG, Liotta LA, Kleiner DE. Extracellular matrix-6. Role of matrix metalloproteinases in tumor invasion and metastasis. *FASEB J* 1993;7:1434–1441.
154. Gill SE, Parks WC. Metalloproteinases and their inhibitors: Regulators of wound healing. *Int J Biochem Cell Biol* 2008;40:1334-1347.
155. McCawley LJ, O'Brien P, Hudson LG. Epidermal growth factor (EGF)- and scatter factor/hepatocyte growth factor (SF/HGF)- mediated keratinocyte migration is coincident with induction of matrix metalloproteinase (MMP)-9. *J Cell Physiol* 1998;176:255–265.
156. Bullard KM, Lund L, Mudgett JS, et al. Impaired wound contraction in stromelysin-1-deficient mice. *Ann Surg* 1999;230:260–265.
157. Kruihof EKO. Plasminogen activator inhibitors—a review. *Enzyme* 1988; 40:113–21
158. Kortlever RM, Bernardis R. Senescence, wound healing and cancer: the PAI-1 connection. *Cell Cycle* 2006;5:2697-2703.
159. Carmeliet P, Schoonjans L, Kieckens L, et al. Physiological consequences of loss of plasminogen activator gene function in mice. *Nature* 1994;368:419-24.
160. Chan JC, Duszczyszyn DA, Castellino FJ, et al. Accelerated skin wound healing in plasminogen activator inhibitor-1-deficient mice. *Am J Pathol* 2001;159:1681-8.
161. Martens JW, Sieuwerts AM, Bolt deVries J, et al. Aging of stromal-derived human breast fibroblasts might contribute to breast cancer progression. *Thromb Haemost* 2003;89:393-404.
162. Pike-Overzet K, vander Burg M, Wagemaker G. New insights and unresolved issues regarding insertional mutagenesis in X-linked SCID gene therapy. *Mol Ther* 2007;15:1910-6.

163. Phinney Dg, Prockup DJ. Concise review: Mesenchymal stem/multipotent stromal cells: the state of transdifferentiation and modes of tissue repair-current views. *Stem Cells* 2007;25:2896-2902.
164. Lazennec G, Jorgensen C. Concise review: adult multipotent stromal cells and cancer: risk or benefit? *Stem Cells* 2008;26:1387-1394.
165. Bongso A, Lee EH. (2005) *Stem Cells: From Bench to Bedside*. World Scientific Publishing. National University of Singapore.
166. Lanza R, Gearhart J, Hogan B, et al. (2004) *Handbook of Stem Cells: Embryonic Stem Cells*. Elsevier Academic Press. London, UK Vol.1.
167. Rogers I, Casper R. (2004) *Umbilical cord blood stem cells. Best practice and research Clinical Obstetrics and Gynaecology*, N. Fisk and J Itskovitz. London.
168. Lanza R, Blau H, Melton D, et al. (2004) *Handbook of Stem Cells: Adult and Fetal Stem Cells*. Elsevier Academic Press. London, UK Vol.2.
169. Fehrer C, Brunauer R, Laschober G, et al. Reduced oxygen tension attenuates differentiation capacity of human mesenchymal stem cells and prolongs their lifespan. *Aging Cell* 2007;6:745-757.
170. Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, et al. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science* 1999;284:143-147.
171. Peister A, Mellad JA, Larson BL, Hall BM, Gibson LF, 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;103:1662-1668.
172. Friedenstein AJ, Chailakhjan RK, Lalykina KS. The development of fibroblast colonies in monolayer cultures of guinea-pig bone marrow and spleen cells. *Cell Tissue Kinet* 1970;3:393-403.
173. da Silva Meirelles L, Chagastelles PC, Nardi NB. Mesenchymal stem cells reside in virtually all post-natal organs and tissues. *J Cell Sci* 2006;119:2204-2213.
174. Wilson A, Trumpp A. Bone-marrow haematopoietic-stem-cell niches. *Nat Rev Immunol* 2006;6:93-106.
175. Morrison SJ, Spradling AC. Stem cells and niches: mechanisms that promote stem cell maintenance throughout life. *Cell* 2008;132:598-611.

176. Kopen GC, Prockop DJ, Phinney DG. Marrow stromal cells migrate throughout forebrain and cerebellum, and they differentiate into astrocytes after injection into neonatal mouse brains. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999;96:10711–10716.
177. Rojas M, Xu J, Woods CR, et al. Bone marrow-derived mesenchymal stem cells in repair of the injured lung. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2005;33:145–152.
178. Mahmood A, Lu D, Chopp M. Marrow stromal cell transplantation after traumatic brain injury promotes cellular proliferation within the brain. *Neurosurgery* 2004;55:1185–1193.
179. Crigler L, Robey RC, Asawachaicham A, et al. Human mesenchymal stem cell subpopulations express a variety of neuro-regulatory molecules and promote neuronal cell survival and neuritogenesis. *Exp Neurol* 2006;198:54–64.
180. Shyu KG, Wang BW, Hung HF, et al. Mesenchymal stem cells are superior to angiogenic growth factor genes for improving myocardial performance in the mouse model of acute myocardial infarction. *J Biomed Sci* 2006;13:47–58.
181. Tang J, Xie Q, Pan G, et al. Mesenchymal stem cells participate in angiogenesis and improve heart function in rat model of myocardial ischemia with reperfusion. *Eur J Cardiothorac Surg* 2006;30:353–361.
182. Ortiz LA, DuTreil M, Fattman C, et al. Interleukin 1 receptor antagonist mediates the anti-inflammatory and anti-fibrotic effect of mesenchymal stem cells during lung injury. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2007;104:11002–11007.
183. Zappia E, Casazza S, Pedemonte E et al. Mesenchymal stem cells ameliorate experimental autoimmune encephalomyelitis inducing T-cell anergy. *Blood* 2005;106:1755–1761.
184. Hung SC, Pochampally RR, Chen SC, et al. Angiogenic effects of human multipotent stromal cells (MSCs) conditioned medium activates the PI3K-Akt pathway in hypoxic endothelial cells to inhibit apoptosis, increase survival, and stimulate angiogenesis. *Stem Cells* 2007;25:2363-70.
185. Horwitz EM, Gordon PL, Koo WK et al. Isolated allogeneic bone marrow-derived mesenchymal cells engraft and stimulate growth in children with



- osteogenesis imperfecta: Implications for cell therapy of bone. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002;99:8932–8937.
- 186.** Kunter U, Rong S, Djuric Z et al. Transplanted mesenchymal stem cells accelerate glomerular healing in experimental glomerulonephritis. *J Am Soc Nephrol* 2006;17:2202–2212.
- 187.** Lee RH, Seo MJ, Reger RL et al. Multipotent stromal cells from human marrow home to and promote repair of pancreatic islets and renal glomeruli in diabetic pancreatic islets and renal glomeruli in diabetic NOD/scid mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006;103:17438–17443.
- 188.** Ringden O, Uzunel M, Rasmusson L et al. Mesenchymal stem cells for the treatment of therapy-resistant graft-versus-host disease. *Transplantation* 2006;81:1390–1397.
- 189.** Minguell JJ, Erices A. Mesenchymal stem cells and the treatment of cardiac disease. *Exp Biol Med (Maywood)* 2006;231:39–49.
- 190.** Phinney DG, Isakova I. Plasticity and therapeutic potential of mesenchymal stem cells in the nervous system. *Curr Pharm Des* 2005;11:1255–1265.
- 191.** Sasaki M, Abe R, Fujita Y, et al. Mesenchymal stem cells are recruited into wounded skin and contribute to wound repair by transdifferentiation into multiple skin cell type. *J Immunol* 2008;180:2581-2587.
- 192.** Wu Y, Chen L, Scott PG, et al. Mesenchymal stem cells enhance wound healing through differentiation and angiogenesis. *Stem Cells* 2007;25:2648-2659.
- 193.** Fan Q, Yee CL, Ohyama M, et al. Bone marrow-derived keratinocytes are not detected in normal skin and only rarely detected in wounded skin in two different murine models. *Exp Hematol* 2006;34:672-679.
- 194.** Borue X, Lee S, Grove J, et al. Bone marrow-derived cells contribute to epithelial engraftment during wound healing. *Am J Pathol* 2004;165:1767-1772.
- 195.** Brittan M, Braun KM, Reynolds LE, et al. Bone marrow cells engraft within the epidermis and proliferate in vivo with no evidence of cell fusion. *J Pathol* 2005;205:1-13.

196. Chen L, Tredget EE, Wu PY, et al. Paracrine factors of mesenchymal stem cells recruit macrophages and endothelial lineage cells and enhance wound healing. *PLoS ONE* 2008;3:e1886.
197. Ponomaryov T, Peled A, Petit I, et al. Induction of the chemokine stromal-derived factor-1 following DNA damage improves human stem cell function. *J Clin Invest* 2000;106:1331-1339.
198. Efayan A, Ortega-Molina A, Velasco-Miguel S, et al. Induction of p53-dependent senescence by the MDM2 antagonist Nutlin-3a in mouse cells of fibroblast origin. *Cancer Res* 2007;67:7350-7357.
199. Marquez-Curtis L, Jalili A, Deiteren K, et al. Carboxypeptidase M expressed by human bone marrow cells cleaves the C-terminal lysine of stromal cell-derived factor-1 $\alpha$ : another player in hematopoietic stem/progenitor cell mobilization? *Stem Cells* 2008;26:1211-1220.

## ANNEXES

### A1. Résultats supplémentaires

Préalablement exposé aux RI	Groupes d'injection	% de plaies fermées au jour 13	Nombre de plaies/groupe
Non	PBS	100	15/15
Non	MSC-IR	70	7/10
Oui	PBS	13	2/16

**Tableau A1.1** L'injection locale de MSC-IR ralentit la guérison cutanée. Des plaies circulaires ont été créées sur la surface dorsale de souris préalablement exposées aux RI ou non et la guérison a été déterminée à la suite de l'injection intradermale (4 sites d'injection par plaie) d'une population purifiée de MSC-IR ou de PBS. Les proportions de plaies fermées à plus de 90% au jour 13 sont montrées.

## A2. Accord des coauteurs

### 1. Identification de l'étudiant

Landry, Yannick

M.Sc. Pharmacologie

### 2. Description de l'article

*Ordre des auteurs* : Yannick Landry, Oanh Lê, Christian M. Beauséjour

*Titre de l'article* : Secretion of SDF-1 $\alpha$  by Multipotent Stromal Cells Enhances Wound Healing of Skin Exposed to Ionizing Radiation.

*Revues de soumission proposées* : Cancer Research

*État actuel de l'article* : Soumis

### 3. Déclaration des coauteurs

À titre de coauteur de l'article identifié ci-dessus, je suis d'accord pour que **Yannick Landry** inclue cet article dans son mémoire de maîtrise qui a pour titre **Les cellules stromales multipotentes accélèrent la guérison de plaies cutanées chez les souris irradiées via la sécrétion de la chimiokine SDF-1 $\alpha$ .**

---

Coauteur

Signature

Date

---

Coauteur

Signature

Date

