



HAL
open science

Étude des procédés d'amplification de cellules souches mésenchymateuses humaines

Céline Martin

► **To cite this version:**

Céline Martin. Étude des procédés d'amplification de cellules souches mésenchymateuses humaines. Génie des procédés. Université de Lorraine, 2016. Français. NNT : 2016LORR0261 . tel-01492968

HAL Id: tel-01492968

<https://theses.hal.science/tel-01492968>

Submitted on 20 Mar 2017

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

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



AVERTISSEMENT

Ce document est le fruit d'un long travail approuvé par le jury de soutenance et mis à disposition de l'ensemble de la communauté universitaire élargie.

Il est soumis à la propriété intellectuelle de l'auteur. Ceci implique une obligation de citation et de référencement lors de l'utilisation de ce document.

D'autre part, toute contrefaçon, plagiat, reproduction illicite encourt une poursuite pénale.

Contact : ddoc-theses-contact@univ-lorraine.fr

LIENS

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 122. 4

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 335.2- L 335.10

http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg_droi.php

<http://www.culture.gouv.fr/culture/infos-pratiques/droits/protection.htm>

Étude des procédés d'amplification de cellules souches mésenchymateuses humaines

THÈSE

présentée et soutenue publiquement le 8 Décembre 2016

pour l'obtention du

Doctorat de l'Université de Lorraine

(mention Génie des Procédés et des Produits)

par

Céline Martin

Composition du jury

Rapporteurs : Christophe EGLES, Professeur, BMBI, UTC, Compiègne
Caroline GENTRIC, Professeur, GEPEA, Université de Nantes, St Nazaire

Examineurs : Annie MARC, Directeur de Recherche CNRS, LRGP, UL, Nancy
Éric OLMOS, Professeur, LRGP, UL, Nancy
Natalia DE-ISLA, Maître de Conférences HdR, IMoPa, UL, Nancy
Emma PETIOT, Maître de Conférences, VirPath, UCBL1, Lyon

Invités : Emmanuel GUÉDON, Directeur de Recherche CNRS, LRGP, UL, Nancy
Isabelle CHEVALOT, Professeur, LRGP, UL, Nancy

Pour Roseline

...laugh uncontrollably, and never regret anything that made you smile

Remerciements

Je tiens à remercier M. Laurent Falk, Directeur du Laboratoire Réactions et Génie des Procédés, de m'avoir accueillie au sein du laboratoire LRGP pour la durée de cette thèse.

Mes remerciements vont également à Mme Annie Marc (directrice de thèse) et M. Eric Olmos (co-directeur) pour avoir dirigé et encadré ce travail avec compétence et rigueur.

Les conseils de Mme Isabelle Chevalot et de M. Emmanuel Guédon ont aussi grandement apporté à la réflexion scientifique autour de ce projet.

J'adresse des remerciements respectueux aux professeurs Christophe Egles et Caroline Gentric pour avoir accepté de juger ces travaux.

Je remercie aussi Mme Emma Petiot et Mme Natalia De-Isla de faire partie du jury de cette thèse. L'aide et l'expertise de Mme De-Isla en matière de culture des CSM m'ont été précieuses pour réaliser ce travail.

L'aide fournie par M. Stéphane Delaunay, M. Emmanuel Rondags, et M. Frantz Fournier a également éclairé ces travaux.

Toute ma reconnaissance va à M. Fabrice Blanchard et M. Arnaud Aymes pour leur soutien technique avisé et leur savoir-faire.

Les fondations de ce projet ont été posées par Frédérique Balandras et Caroline Ferrari dont le travail m'a été d'une grande utilité. Je les en remercie.

Cette thèse a aussi été réalisée avec le soutien de deux chercheuses brillantes détachées de l'Université de Liège, Marie-Laure Collignon et Angélique Delafosse. Je tiens à les remercier pour leur bonne humeur aussi bien que pour leur compétence en matière de génie chimique.

Ce travail a aussi bénéficié de l'apport expérimental de 3 stagiaires : Alexandre Piccini, Sonia Kridi et Anne Schnitzler. Leur résistance admirable aux expérimentations répétitives et tardives ont permis de générer nombre de ces données.

Je n'aurais pu mener à terme ce projet sans l'amitié, l'ambiance formidable et le soutien moral de tous mes collègues de la salle de pause du 2^{ème} étage de l'ENSAIA. Je tiens donc à remercier Éric pour les paquets de bonbons les jours de fatigue, d'avoir été un compétiteur exemplaire au jeu des 1000 € et sa patience face aux réunions impromptues. Les bons petits plats italiens de Fabrice resteront

aussi dans la liste des bons moments. Merci à Arnaud pour les pause cafés et mes très bons souvenirs de la coupe de monde. Toute mon amitié va aux doctorants de cette équipe, Léna et ses bouteilles, Aline et ses fou rires, Julien, Alice, Karim, Pierrick, Aurélie, Nadia, Florent, et Felipe. Leur aptitude à l'organisation de barbecues, de soirées à l'Opéra et d'apéritifs doit être reconnue à sa juste valeur et a permis de créer des souvenirs de Nancy que je garderai précieusement.

Merci à Alexandre d'avoir eu besoin d'un spectrophotomètre, et en conséquence, de m'avoir soutenue et supportée en compagnie de 2 pestes pendant les hauts et les bas de ces trois dernières années.

Je remercie de grand cœur mes amis de toujours Mathieu, Nicolas, Anthony et Noémie, vous m'accompagnez ainsi du brevet, au bac et finalement au doctorat. Merci à Serge et Monique d'avoir jeté un œil sur ces pages et aidé à les améliorer. Tout mon amour va également à ma famille, Béatrice, Benoît, Françoise, et Pierre. Ma mère, Roseline, m'a donné tous les moyens pour poursuivre mes passions. Sans son amour et soutien, je n'aurais jamais soutenu une thèse en biologie et j'espère qu'elle en serait heureuse et fière.

Sommaire

Liste des figures	ix
Liste des tableaux	xv
Introduction générale	1

Chapitre 1 **État de l'Art**

1	Les cellules souches et leur intérêt thérapeutique	9
1.1	Les différents types de cellules souches	9
1.2	Les thérapies cellulaires	17
2	Les Cellules Souches Mésoenchymateuses	26
2.1	Historique	27
2.2	Identités et controverses	30
2.3	Rôles physiologiques	34
3	Procédés d'amplification des CSM	42
3.1	Systèmes de culture de cellules adhérentes	43
3.2	Intensification des procédés d'amplification des CSM	51
3.3	Article de revue : Qualité cellulaire et paramètres opératoires	64
4	Perspectives et limitations des CSM à usage thérapeutique	83
5	Références bibliographiques	85

Chapitre 2 **Matériels et Méthodes**

1	Banques cellulaires et croissance planaire	112
1.1	Banques cellulaires	112
1.2	Culture statique	114
1.3	Comptage cellulaire	115

1.4	Observations morphologiques par microscopie photonique	116
1.5	Paramètres cinétiques	116
2	Culture de CSM sur microporteurs	116
2.1	Dosages métaboliques : Glucose, Lactate, LDH et ions ammoniums	116
2.2	Protocole de culture sur microporteurs	117
2.3	Observations morphologiques des cellules sur microporteurs	123
2.4	Plan d'expériences sous Modde 7	124
3	Milieux de culture sans sérum	124
3.1	Milieux et suppléments	124
3.2	Cultures sur plaque 96-puits	127
3.3	Cultures sur plaque 6-puits	127
3.4	Suivis et analyses des cultures en microplaques	128
4	Analyses biologiques	134
4.1	Analyse des CSM par observations microscopiques	134
4.2	Analyses moléculaires : ARNm, télomères et ADN génomique	137
4.3	Analyse des antigènes de surface par cytométrie	144
5	Références bibliographiques	146

Chapitre 3

Pertinence du modèle cellulaire choisi et robustesse des réponses biologiques

1	Introduction	149
2	Impact de la cryoconservation sur la croissance et la différenciation des CSM	151
2.1	Méthodes de congélation	152
2.2	Stabilité des banques cellulaires au cours du temps de stockage	155
3	Variabilités biologiques des CSM	161
3.1	Donneurs et sources tissulaires de CSM	162
3.2	Variabilité intrinsèque des cultures de CSM	165
4	Synthèse	168
5	Références bibliographiques	171

Chapitre 4

Comparaison des performances de bioréacteurs de cultures

1	Introduction	177
2	Croissance planaire <i>versus</i> croissance en suspension	178
2.1	Comptage cellulaire	178
2.2	Comparaison de deux types de microporteurs	179
2.3	Comparaison de croissance dans divers systèmes de culture	182

3	Études des paramètres hydrodynamiques et de mise en suspension	185
3.1	Mise en suspension de microporteurs en fioles d'Erlenmeyer	185
3.2	Études des paramètres hydrodynamiques en minibioréacteurs agités	187
3.3	Impact des paramètres hydrodynamiques sur la croissance des CSM	194
3.4	Cultures à petite échelle et régulations	197
4	Synthèse	203
5	Références bibliographiques	206

Chapitre 5

Vers un milieu sans sérum pour la culture de CSM

1	Introduction	211
2	Comparaison de milieux commerciaux	212
2.1	Effets des hydrolysats de protéines végétales	212
2.2	Milieux complets sans sérum	213
2.3	Adhérence cellulaire	216
3	Étude de la supplémentation de milieux définis pour la croissance des CSM	220
3.1	Apport en Glutamine	220
3.2	Formulations par plan d'expériences	224
4	Synthèse	237
5	Références bibliographiques	241

Chapitre 6

Impact du procédé d'amplification sur la qualité des CSM

1	Introduction	249
2	Impact du procédé d'amplification sur l'identité des CSM	250
2.1	Présence ou absence des antigènes de surface	250
2.2	Potentiel de différenciation en ostéocytes, chondrocytes et adipocytes	251
3	Impact des procédés d'amplification sur le vieillissement des CSM	256
3.1	Suivi du caractère souche en cours de culture	256
3.2	Suivi de l'acquisition d'un phénotype sénescence	257
4	Synthèse	265
5	Références bibliographiques	268

Conclusion générale et Perspectives

271

Annexes	283
Annexe A Composition des milieux de culture	283
A.1 Milieu Essentiel Minimum de modification alpha	285
A.2 Milieu de Dulbecco modifié selon Iscove	287
A.3 Milieu F12 de Ham	289
A.4 Liste des composés présents dans le supplément B27	291
A.5 Plans de formulation	293
Annexe B Articles publiés	297
B.1 Critical agitation for microcarrier suspension in orbital shaken bioreactors	298
B.1.1 Nomenclature	299
B.1.2 Introduction	300
B.1.3 Material and methods	303
B.1.4 Results	308
B.1.5 Discussion	312
B.1.6 Conclusion	319
B.1.7 Acknowledgements	320
B.2 LES of microcarrier exposure to damaging eddies	321
B.2.1 Introduction	323
B.2.2 Experimental set-up and numerical approaches	329
B.2.3 Results and discussion	333
B.2.4 Conclusion	346
B.3 References	349
Liste des Abréviations	355

Liste des figures

1	Intégration de nos objectifs de recherche sur un procédé d'amplification de CSM	4
2	Hiérarchie fonctionnelle et développementale des cellules souches	10
3	Méthodes de caractérisation des CS embryonnaires	11
4	Les différents modes de division des cellules souches adultes	13
5	Méthode schématique de transplantation en série	13
6	Méthodes de reprogrammation de cellule somatique adulte en CSPi	16
7	Répartition des essais cliniques en cours en Grande Bretagne en 2014	19
8	Modèles de développement des thérapies cellulaires	23
9	Découverte des CSM en 1970 : Formation de colonies à partir d'un dépôt de moelle osseuse de cochon d'Inde	27
10	Conceptualisation du terme CSM en 1991	28
11	Démonstration des capacités de différenciation de CSM de moelle osseuse humaine <i>in vitro</i>	29
12	Les différents modes d'action hypothétiques des CSM <i>in vivo</i>	35
13	Mécanismes d'immunosuppression par les CSM	40
14	Organisation spatiale des CSM en culture	44
15	Schéma des forces générées par les cellules et la matrice extra-cellulaire au niveau des points d'adhérence	45
16	Technologies de bioréacteurs pour l'intensification de l'amplification des CSM en bioréacteurs.	55
17	Prospective therapeutic use and hypothesized mode of actions (MOA) of hMSC defining current potency assays	72
18	Microcarrier choice impact hMSC expansion depending on 5 parameters.	78

Liste des figures

19	Development overview of a regenerative medicine applied to hMSC therapy	81
20	Intégration de nos objectifs de recherche sur un procédé d'amplification de CSM	84
21	Bioréacteurs mécaniquement agités de 200 mL	121
22	Exemples de mobiles d'agitation utilisés	122
23	Spectres d'absorbance de la résazurine	129
24	Schéma de dérivation des AA à l'OPA	131
25	Dosage des AA totaux primaires et du Glutamax par HPLC : Chromatogramme	131
26	Séquence des télomères ciblée par les amorces de PCRq	142
27	Principe du suivi du stress oxydant	144
28	Graphique à points des doubles marquages des antigènes de surface obtenu par cytométrie capillaire	145
29	Effets des rampes de température de congélation	153
30	Effets des additifs du milieu de cryoconservation	154
31	Effets de la cryoconservation de CSM à long terme en azote liquide	156
32	Maintien des CSM en azote liquide : effets sur la différenciation	159
33	Comparaison de la croissance des CSM : espèces, donneurs et origines tissulaires	164
34	Évolution des capacités de croissance des CSM avec le nombre de passages	166
35	Variabilités intrinsèques de croissance des CSM	167
36	Comparaison des facteurs de variations entre lignées cellulaires et CSM	170
37	Comparaison des méthodes de décrochage des CSMs sur microporteurs	179
38	Corrélations du suivi de la croissance des CSM par leur consommation de glucose	180
39	Impact de la méthode de suivi de la croissance des CSM par leur consommation de glucose au cours du temps (en mol.h ⁻¹)	180
40	Comparaison de cultures de CSM sur microporteurs Cytodex 1 et Cytodex 3	181
41	Comparaison de systèmes de cultures de CSM en conditions statiques ou agitées	183
42	Prédictions de la puissance dissipée par unité de volume en fioles d'Erlenmeyer et cylindres droits en fonction du nombre de Froude critique	187
43	Exemple de champ de vitesses moyennées au cours du temps modélisé par simulation RANS au sein des minibioréacteurs GPC de 200 mL	189
44	Plan d'expériences : conditions opératoires	195

45	Plan d'expériences : modélisation des résultats par Modde7	196
46	Montages des minibioréacteurs GPC : régulation de la température	198
47	Visualisation de l'effet de la température sur les CSM	199
48	Suivis métaboliques des CSM en minibioréacteurs : effet du mode de régulation de la température avec une enceinte chauffée	200
49	Suivis métaboliques des CSM en minibioréacteurs : effet du mode de régulation de la température avec un arrêt de l'agitation	201
50	Synthèse des différents aspects mis en évidence	205
51	Effet de différents hydrolysats végétaux sur la croissance des CSM humaines	213
52	Effet de milieux commerciaux sans sérum sur la croissance des CSM humaines	215
53	Effet de solutions d'adhérence sur la croissance des CSM humaines lors de cultures en milieux commerciaux sans sérum	217
54	Effet de solutions d'adhérence sur la morphologie des CSM humaines lors de cultures en milieux commerciaux sans sérum	219
55	Effet de l'apport en glutamine sur la croissance des CSM humaines : cinétiques	221
56	Suivi des acides aminés dans le surnageant de culture en plaque 6-puits	223
57	Premier essai de formulation d'un milieu sans sérum	225
58	Analyse du plan de formulation par Modde7 : effets significatifs des suppléments	228
59	Modélisation des résultats du plan de formulation par Modde7 en fonction des facteurs d'adhérence	228
60	Effet de l'apport en HEPES et progestérone sur la croissance des CSM humaines	229
61	Effet de l'apport en albumine et putrescine sur la croissance des CSM humaines.	230
62	Comparaison des milieux sans sérum de formulation définie : effets sur la croissance	233
63	Comparaison des milieux sans sérum de formulation définie : effets sur le métabolisme	235
64	Synthèse des résultats sur la formulation de milieux de culture sans SVF pour CSM	240
65	Problématiques de la caractérisation des CSM	249
66	Analyse de la présentation des antigènes de surface caractéristiques des CSM par cytométrie capillaire après cultures en minibioréacteurs	251
67	Visualisation de la différenciation des CSM par marquage histochimique après cultures en minibioréacteurs	252

68	Analyse de l'expression des gènes de la différenciation des CSM par RT-PCRq après cultures en minibioréacteurs	253
69	Suivi de l'expression des gènes révélateurs de la différenciation précoce des CSM par RT-PCRq au cours de cultures en minibioréacteurs	254
70	Visualisation de la clonogénicité des CSM par test du nombre de unités formant une colonie (CFU)	256
71	Suivi de l'expression du gène Nanog par RT-PCRq au cours de cultures	257
72	Suivis de la sénescence tardive des CSM par marquage histochimique	258
73	Suivi de l'expression des gènes p16 et p21 par RT-PCRq au cours de cultures en minibio- réacteurs	259
74	Mesure de la longueur des télomères par PCRq	260
75	Suivi du stress oxydant par quantification des sites AP de l'ADN génomique de CSM . .	263
76	Synthèse des résultats sur l'intégration de diverses méthodes analytiques	267
1	Schematic representation of Erlenmeyer flask.	303
2	Rheograms of medium-viscosity CMC solutions at a concentration of 0.3 (♠) and 1 % (○). 305	
3	The different steps leading to the complete suspension of Cytodex-1 microcarriers in a 250 mL Erlenmeyer flask	307
4	Comparison of predicted and experimental critical Froude numbers Fr_c : model I	311
5	Comparison of predicted and experimental critical Froude numbers Fr_c : model II . . .	312
6	Comparison of predicted and experimental critical Froude numbers Fr_c : model III . . .	313
7	Comparison of experimental critical agitation rates in shaken Erlenmeyer flasks with agitation rates characteristic of flow regime transitions	316
8	Predictions of power dissipation per unit of volume in shaken Erlenmeyer flasks and cylinders	318
9	Bioreactor design and design of the four-blade Rushton turbine, the Elephant Ear impel- ler and Marine propeller	330
10	Time averaged velocity fields in the axial plane $\Theta=18^\circ$ obtained from RANS simulation with an MRF approach and LES simulation with a sliding mesh approach with an EED impeller rotating at 150 rpm	335
11	Volumetric distributions of turbulent dissipation rate ε	335
12	Power curves of the various impellers studied.	336

13	Illustration of deformations generated by the two side probes and the two immersed tubes on the structure of the time averaged velocity fields generated by the EED impeller rotating at 150 rpm.	338
14	Comparison of the axial profiles of time averaged velocity magnitude ($\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$) at the radial coordinate $r = 10$ mm calculated in various axial planes	338
15	Volumetric distribution of the dimensionless turbulent dissipation rate ($\varepsilon/N^3 d^2$) expressed in log scale when these distributions are computed from LES simulations performed with RT impeller rotating at 88 rpm and 173 rpm	339
16	Dimensionless time averaged velocity fields normalized by the impeller tip speed in the axial plane $\Theta = 18^\circ$ simulated by LES for (left to right and up to down) : EED, EEU, RT, MPD, MPU impellers	340
17	Dimensionless spatial distributions of the logarithm of turbulent dissipation rate $\varepsilon/N^3 d^2$ in the axial plane $\Theta = 18^\circ$ simulated by LES for (left to right and up to down) : EED, EEU, RT, MPD, MPU impellers	341
18	Spatial distributions of a Cytodex 1 TM suspension	342
19	Illustrations of the Cytodex 1 TM cloud height expansion for EED, MPD or RT impellers rotating at N_{js}	342
20	Distributions in volume of logarithm of the turbulent dissipation rate ε	346

Liste des tableaux

1	Exemples de cellules souches adultes	14
2	Comparaison des différents types de cellules souches	18
3	Récapitulatif des risques liés aux thérapies cellulaires à base de cellules souches	22
4	Critères de définition des CSM par l'ISCT	29
5	Isolement de CSM à partir de tissus adultes et péri-natals	30
6	Caractéristiques des microporteurs commerciaux	48
7	Conditions opératoires et performances quantitatives de l'amplification de CSM en systèmes tridimensionnels	57
8	Principal growth factors used for hMSC expansion and their effects on hMSC critical quality attributes (CQA)	76
9	Caractéristiques des banques cellulaires utilisées	113
10	Principes des dosages effectués à l'analyseur automatique	117
11	Valeurs de N_{j_s} couramment utilisées	119
12	Potentiels d'oxydoréduction de la chaîne respiratoire mitochondriale	129
13	Dosage des AA totaux primaires et du Glutamax par HPLC : Temps de rétention	132
14	Récapitulatif des amorces de RT-PCRq utilisées	141
15	Amorces et protocole de PCRq	143
16	Suivi des antigènes de surface caractérisant les CSMs par cytométrie	145
17	Puissances globales dissipées obtenues par CFD	189
18	Fréquences critiques de mise en suspension N_c et N_H	190
19	Taux maximal de dissipation de l'énergie turbulent ε_{Tmax}	191
20	Fréquences maximales d'agitation selon Kolmogorov	191

21	Valeurs de la fonction de circulation et de dissipation de l'énergie <i>FDCE</i> en minibioreacteurs GPC de 200 mL	193
22	Effet de l'apport en glutamine sur la croissance des CSM humaines : paramètres macro-cinétiques de cultures	223
23	Formulation par plan d'expériences 1 : suppléments testés.	226
24	Formulation par plan d'expériences 2 : suppléments testés	231
25	Évolutions des formulations sans sérum	232
26	Comparaison des milieux sans sérum de formulation définie : paramètres macro-cinétiques	233
27	Cinétiques de croissance et phénomènes de sénescence	262
1	Plan d'expériences : formulation du milieu 2	293
2	Plan d'expériences : formulation du milieu 4	295
1	Dimensions of Erlenmeyer flasks.	303
2	Values of the ratio h_L/d for each filling ratio α for experiments in Erlenmeyer shaken flasks.	305
3	Characteristics of the hydrated particles.	306
4	Dimensional matrix of the physical quantities influencing N_c	309
5	New dimensional matrix obtained after transforming the core matrix into a unit matrix.	309
6	Comparison of asymptotic turbulent power number N_p obtained in the study by RANS simulations with literature values	336
7	Impeller pumping number N_{qp} (-) computed in this study using LES.	339
8	Minimum impeller agitation rates N_{js} and N_H	342
9	Comparison of the quantitative properties of distribution in volume of $\log(\epsilon)$ in the zones visited by the microcarrier cloud (12 g.L ⁻¹), at the same power input	347

Introduction générale

Ce travail s'inscrit dans le contexte des avancées médicales récentes en thérapies cellulaires et tissulaires qui visent, non pas à guérir au moyen de molécules pharmaceutiques, mais à réparer le corps en utilisant son plus petit constituant, la cellule. Les thérapies cellulaires et tissulaires ont longtemps été limitées à la culture, ou plutôt le maintien *in vitro*, de cellules primaires (ex : moelle osseuse, greffe d'organes, don de sang et de plaquettes). En effet, les cellules primaires issues de biopsies ont une durée de vie finie et des capacités de prolifération minimale. Ces thérapies cellulaires et tissulaires, dont le cadre est bien établi, sont donc restreintes par la disponibilité du nombre de donneurs humains. La découverte de méthodes de culture soutenant la croissance des cellules souches *in vitro* a permis l'élargissement du champ d'application des thérapies régénératives, en fournissant la possibilité d'établir une réserve homogène de matériel biologique.

Ces nouvelles thérapies cellulaires sont, à ce jour, développées dans le but de traiter un grand nombre de pathologies (cancer, maladie immunitaire et génétique, traumatismes...) et profitent de l'infrastructure et des connaissances existantes au sein des hôpitaux, ce qui a permis une mise en œuvre rapide de protocoles d'essais cliniques. Avec des centaines d'essais en cours, le contexte scientifique international des thérapies régénératives fait donc maintenant face à des problématiques relevant de la biotechnologie et du génie des procédés biologiques afin d'industrialiser ces protocoles et ainsi, de les rendre disponibles au plus grand nombre.

La question abordée par mes travaux se situe donc en amont de l'efficacité thérapeutique, et consiste à obtenir une vision intégrée de la production de cellules humaines. En effet, quels que soient la pathologie visée et le mode d'action supposé de l'injection de cellules, ces dernières doivent d'abord traverser un procédé d'amplification *in vitro* avant d'arriver aux patients.

Cette thèse porte plus particulièrement sur l'étude des procédés d'amplification de cellules souches mésenchymateuses (CSM) humaines et a été réalisée au Laboratoire Réactions et Génie des Procédés

(LRGP) de Nancy (UMR 7274) sous la direction du Dr. Annie Marc (directrice de recherche au CNRS) et du Dr. Éric Olmos (professeur à l'Université de Lorraine). Le procédé d'amplification, en tant qu'objet d'études scientifiques, est au cœur des activités de recherche en cellules animales de l'équipe Bioprocédés-Biomolécules du LRGP. Ceci a permis de porter ce projet grâce à l'expérience accumulée en amplification de lignées cellulaires immortalisées et l'étude des procédés permettant la production de biomolécules thérapeutiques. De plus, ce travail a été précédé par celui de Caroline Ferrari portant sur "l'étude cinétique de procédés d'expansion de cellules-souches mésenchymateuses porcines cultivées sur microporteurs en systèmes agités" (thèse soutenue, en 2012, à l'Université de Lorraine)[1].

De nombreux modèles cellulaires animaux ou humains sont disponibles afin d'étudier le rendement quantitatif et qualitatif d'un procédé d'amplification sur la mise en place d'une thérapie cellulaire. Les voies envisagées, en fonction des pathologies, utilisent aussi bien des cellules primaires, embryonnaires, adultes induites à la pluripotence que des cellules multipotentes adultes. Dans le cadre de collaborations scientifiques, les CSM, qui sont des cellules multipotentes adultes, constituent le modèle d'étude choisi par notre équipe. En effet, grâce au partenariat avec l'école de Chirurgie de Nancy, les travaux précédents ont été réalisés avec des CSM porcines issues de moelle osseuse. Quant aux recherches présentées dans ce manuscrit, elles ont été réalisées avec l'aide du laboratoire d'Ingénierie Moléculaire et Physiopathologie Articulaire (IMoPA, UMR7365, Nancy, France) sur des CSM d'origine humaine.

Les CSM, aussi appelées cellules stromales multipotentes, ont été identifiées pour la première fois dans la moelle osseuse dans les années 70 [2]. Elles peuvent se différencier en cellules adipeuses, ostéocytaires ou de cartilage [3] et possèdent également une fonction dans la régulation immunitaire [4]. Ce modèle cellulaire est un objet d'étude répandu en thérapie régénérative, de par les multiples fonctions physiologiques des CSM et de leur présence ubiquitaire dans le corps humain. *In vitro*, les cultures de CSM sont, pour leur immense majorité, réalisés sur des surfaces plastiques planes en présence de sérum de veau fœtal (SVF), en raison de leur dépendance à l'adhérence et de la présence massive de facteurs de croissance.

L'industrialisation d'un procédé de culture cellulaire nécessite une compréhension approfondie de la relation entre les paramètres opératoires et la réponse cellulaire afin de permettre la montée en échelle du procédé, tout en maintenant sa robustesse. Afin de traduire en application les avancées de la recherche fondamentale, l'objectif global de ces travaux a d'abord été d'identifier les verrous scientifiques et technologiques qui pourraient, dans le futur, empêcher la mise en place de ces thérapies, et

bien sûr essayer d'y apporter des réponses issues du génie des procédés biotechnologiques.

La stratégie scientifique mise en place a pris le parti d'étudier le système de culture de référence en génie biologique, le bioréacteur à cuve agitée, pour intensifier le procédé d'amplification des CSM *in vitro*. Ce système de culture a été développé principalement pour la culture de bactéries, de levures et de lignées cellulaires immortalisées, qui sont des modèles cellulaires dont l'amplification peut s'effectuer en suspension, à partir d'un matériel biologique reproductible et pour lesquels des milieux définis sont disponibles. Cependant, ces trois paramètres restent actuellement limitants pour la culture de CSM en bioréacteurs.

- Les CSM peuvent être isolées à partir de nombreux organes et donneurs. De plus, leur isolement à partir de biopsies ne génère pas un matériel homogène. Il était donc nécessaire, dans un premier temps, *d'évaluer la robustesse de leur croissance selon ces variations* (donneur, source, méthodes de culture).
- Les CSM sont des cellules dépendantes de l'adhérence. Pour les cultiver en suspension, il est indispensable de leur *fournir un support d'accroche* sous forme de billes sphériques (micropor-teurs ou capsules). Cette particularité pose de nombreuses problématiques qui n'ont pas encore été approfondies en génie biotechnologique comme la mise en suspension de ces particules, l'interaction gaz/liquide/solide, ou la fonctionnalisation de leur surface.
- Les CSM sont cultivées dans un milieu non-défini contenant du sérum. Or, ce composé pose un risque sanitaire et peut occasionner des variations dans les performances du procédé au cours du temps. *C'est pourquoi la formulation d'un milieu défini* serait une avancée importante.
- Enfin, tout procédé biotechnologique doit être évalué par la qualité du produit généré. Dans le cas des CSM, de nombreuses techniques d'analyses sont disponibles. Toutefois, les paramètres biologiques critiques pour obtenir une bonne efficacité thérapeutique sont encore mal caractérisés. Au niveau du suivi d'un procédé de culture, il est donc encore indispensable de *mettre en place des méthodes d'analyses fines et multiples* afin de comprendre l'impact de l'amplification *in vitro* sur la qualité de la population cellulaire d'origine.

Ces problématiques ont été identifiées après une analyse approfondie de la littérature scientifique portant sur la culture de CSM. Ce projet a donc été centré sur quatre objectifs :

- l'évaluation de la pertinence du modèle cellulaire choisi et de la robustesse des réponses biologiques (Chapitre 3).

- la comparaison des différentes géométries de bioréacteurs pour la croissance de CSM humaines (Chapitre 4).
- la formulation d'un milieu sans sérum pour la culture de CSM (Chapitre 5).
- l'évaluation de l'impact du procédé d'amplification sur la qualité des CSM produites en vue d'un usage thérapeutique par l'intermédiaire d'analyses biologiques (Chapitre 6).

Le caractère innovant de ces travaux était d'appréhender la complexité des procédés d'amplification en intégrant les facteurs environnementaux (biologiques et physicochimiques) aussi bien que les facteurs industriels (montée en échelle, coût, suivi de la qualité et robustesse du procédé) dans une approche visant une compréhension approfondie de la réponse cellulaire.

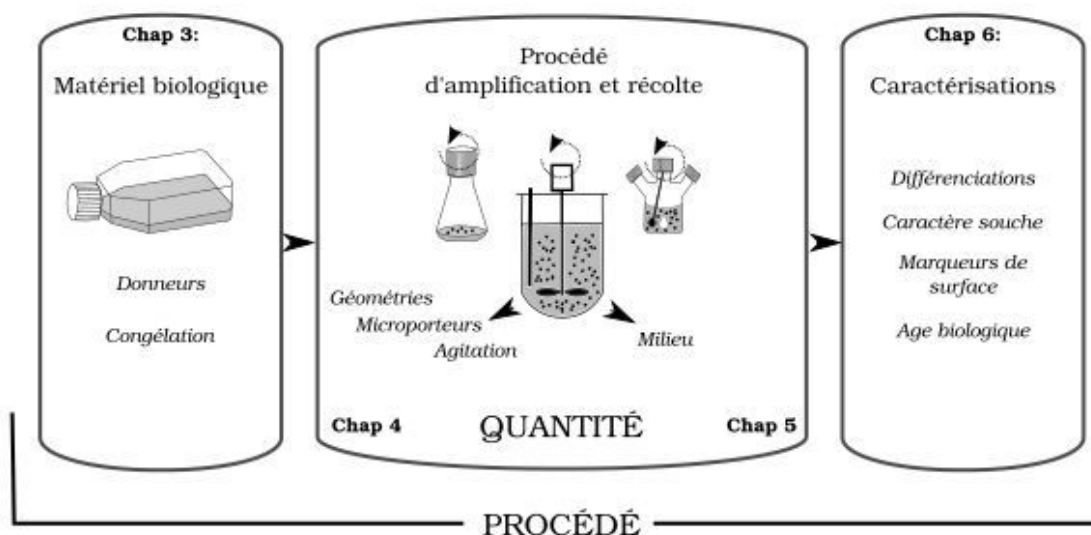


FIGURE 1 – Intégration de nos objectifs de recherche sur un procédé d'amplification de CSM cultivées sur microporteurs au sein du développement d'une thérapie cellulaire à base de CSM

- [1] Caroline FERRARI. *Études cinétiques de procédés d'expansion de cellules souches mésenchymateuses cultivées sur microporteurs en systèmes agités*. Thèse, Université de Lorraine, 2012, pages 1–192.
- [2] A J FRIEDENSTEIN et al. The development of fibroblast colonies in monolayer cultures of guinea-pig bone marrow and spleen cells. *Cell and tissue kinetics*, 3(4) :393–403, 1970.
- [3] M F PITTENGER et al. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science (new york, N.Y.)*, 284(5411) :143–147, 1999.
- [4] M GAZDIC et al. Mesenchymal Stem Cells : A Friend or Foe in Immune-Mediated Diseases. *Stem cell reviews and reports*, 11(2) :280–287, 2015.

Publications

C MARTIN, É OLMOS, M-L COLLIGNON, N DE ISLA, F BLANCHARD, I CHEVALOT, A MARC et E GUEDON. Revisiting MSC expansion from critical quality attributes to critical culture process parameters. *Process biochemistry, In Press*, 2016. DOI : 10.1016/j.procbio.2016.04.017

M-L COLLIGNON, A DELAFOSSE, S CALVO, C MARTIN, A MARC, D TOYE et E OLMOS. Large-Eddy Simulations of microcarrier exposure to potentially damaging eddies inside mini-bioreactors. *Biochemical engineering journal*, 108 :30–43, 2016

E OLMOS, K LOUBIERE, C MARTIN, G DELAPLACE et A MARC. Critical agitation for microcarrier suspension in orbital shaken bioreactors : Experimental study and dimensional analysis. *Chemical engineering science*, 122 :545–554, 2015

C P LAURENT, C VAQUETTE, C MARTIN, E GUEDON, X WU, A DELCONTE, D DUMAS, S HUPONT, N DE ISLA, R RAHOUDJ et X WANG. Towards a Tissue-Engineered Ligament : Design and Preliminary Evaluation of a Dedicated Multi-Chamber Tension-Torsion Bioreactor. *Processes*, 2(1) :167–179, 2014

Congrès - posters scientifiques

Martin C* ; Olmos E ; Loubière K ; Betray S ; Rahouadj R ; Delaplace G ; Marc A. Stem Cells Culture On Microcarriers In Shaking Flasks : 1 – Experimental Determination Of Minimal Shaking Frequency And Dimensional Analysis To Get Microcarriers Into Suspension. ESACT, Lilles 2013

Martin C ; Piccini A, Chevalot, I ; Olmos E ; Guedon E* ; Marc, A. Kinetics of stem cells expansion in 2D and 3D culture systems using various serum-free media. ESBES-IFIBIOP, Lilles 2014

Collignon M-L* ; Martin C ; Toye D ; Marc A ; Olmos E. CFD Large Eddy Simulation of the hydrodynamics of stirred mini-bioreactors operating with stem cell culture mixing conditions. ECI Cell Therapy Manufacturinf, San Diego 2015

Martin C ; Piccini A, Chevalot, I ; Olmos E ; Guedon E* ; Marc, A. Serum-free media for mesenchymal stem cells expansion on microcarriers. ESACT, Barcelone 2015

Chapitre 1

État de l'Art

Identification des verrous scientifiques et technologiques à la mise en œuvre d'une production en masse de CSM à usage thérapeutique

Sommaire

1	Les cellules souches et leur intérêt thérapeutique	9
1.1	Les différents types de cellules souches	9
1.2	Les thérapies cellulaires	17
2	Les Cellules Souches Mésoenchymateuses	26
2.1	Historique	27
2.2	Identités et controverses	30
2.3	Rôles physiologiques	34
3	Procédés d'amplification des CSM	42
3.1	Systèmes de culture de cellules adhérentes	43
3.2	Intensification des procédés d'amplification des CSM	51
3.3	Article de revue : Qualité cellulaire et paramètres opératoires	64
4	Perspectives et limitations des CSM à usage thérapeutique	83
5	Références bibliographiques	85

RÉSUMÉ : Ce chapitre a pour but de positionner le procédé de l'amplification cellulaire dans le cadre du développement des thérapies régénératrices cellulaires et tissulaires. Ces thérapies ont profité des découvertes sur la présence de cellules souches dans les processus physiologiques chez l'embryon et l'adulte. Leur environnement *in vivo* et les études menées quant à leur utilisation en laboratoire ont permis d'établir une description détaillée de leurs principales caractéristiques. L'intérêt de ces recherches a été démontré par les nombreux essais cliniques mettant en place des traitements à base d'injections cellulaires. Le modèle utilisé lors de cette étude, les cellules souches mésenchymateuses, a été détaillé notamment en fonction des organes sources dont elles peuvent être issues, et en prenant en compte les controverses récentes liées aussi bien à leur identité biologique *in vivo* qu'*in vitro*. Finalement, ces problématiques ont été mises en rapport avec les procédés documentés de production de CSM. Ces procédés sont multiples et variés, aussi bien dans leur mise en œuvre que dans leur méthode d'évaluation. En effet, leur performance doit intégrer, non seulement, le nombre de cellules produites, mais aussi le maintien de leurs caractéristiques thérapeutiques au cours du procédé d'amplification.

1 Les cellules souches et leur intérêt thérapeutique

1.1 Les différents types de cellules souches

La notion de cellules souches (CS) a d'abord été conceptualisée à la fin du XIX^{ème} siècle dans l'étude de l'ontogénie* en biologie du développement [1]. Dès cette époque, ce concept recouvre la capacité d'auto-renouvellement des cellules, capacité associée à celle de se différencier en cellules somatiques ou germinales. L'évolution du concept, dans la première partie du XX^e siècle, s'est faite en parallèle de l'avancée des connaissances en hématologie, apportant ainsi la distinction entre cellules souches embryonnaires (CSE) et cellules souches adultes (CSA) avec la découverte des cellules souches hématopoïétiques (CSH) [2]. La définition d'une cellule souche devient dès lors sujette à discussion. Les CS sont alors classées en fonction de leur capacité de différenciation (figure 2) : totipotentes, c'est-à-dire capables de donner naissance à un individu (ex : morula jusqu'à quatre blastomères), pluripotentes, capables de créer tous les tissus d'un organisme (ex : CS embryonnaire), et multipotentes, ayant la capacité de se différencier en cellules issues d'un même feuillet embryonnaire (ex : CSA).

Le contrôle du développement *in vitro* de ces cellules est la pierre angulaire du développement des thérapies cellulaires et tissulaires. Les CS étant disponibles en nombre restreint dans le corps des mammifères (ex : moins de 1% dans la moelle osseuse), elles doivent donc être prélevées puis amplifiées en laboratoire grâce à leur capacité d'auto-renouvellement et de clonogénicité (création d'une lignée à partir d'une cellule isolée). La thérapie cellulaire va utiliser ces cellules afin de régénérer un organe endommagé alors que la thérapie tissulaire vise à reconstruire un organe fonctionnel *in vitro* pour une greffe ultérieure.

À partir de ces trois caractéristiques fondamentales : auto-renouvellement, clonogénicité, et différenciation, le potentiel thérapeutique de ces cellules est considéré comme important, et ce depuis la première transplantation de moelle osseuse en 1968, mais surtout depuis la création de la première lignée cellulaire embryonnaire en 1998 [3].

*. Ensemble des transformations structurelles observées dans un système vivant de son développement embryonnaire jusqu'à son organisation finale.

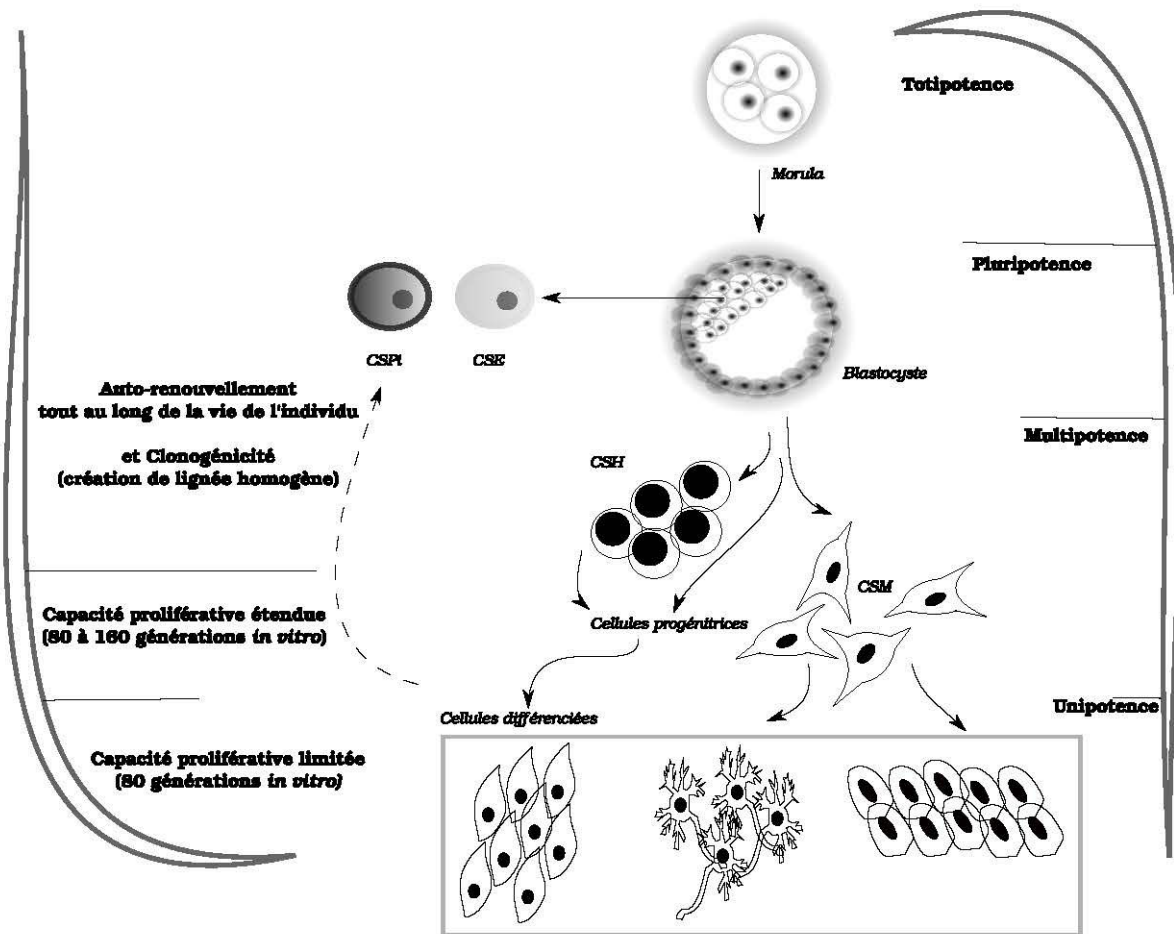


FIGURE 2 – Hiérarchie fonctionnelle et développementale des cellules souches

(CSE : cellule souche embryonnaire, CSPI : cellule souche pluripotente induite, CSH : cellule souche hématopoïétique, CSM : cellule souche mésenchymateuse)

a- Cellules souches embryonnaires

La dérivation de CSE en lignée cellulaire embryonnaire HUES (*HUMAN Embryonic Stem cell*) est réalisée à partir de la masse cellulaire interne d'un blastocyste*. La couche cellulaire externe, le trophoblaste, est éliminée par traitement laser ou par une combinaison d'anticorps et de sérum animal (non traité afin de préserver le système du complément), détruisant ainsi la structure de l'embryon [4]. Il est cependant également possible de dériver des blastomères par une technique non destructive consistant à effectuer une biopsie sous microscope de l'embryon avant le stade blastocyttaire lors de la segmentation (dizaine de cellules) [5]. Les cellules récupérées sont ensuite co-cultivées avec leur embryon d'origine ou sur une couche nourricière de cellules fibroblastiques de souris inactivées (*feeder cells* irradiées ou traitées à la mitomycine C) et peuvent être maintenues en culture quasiment

*. Stade embryonnaire entre le 5 et 7^{ème} jour après la fécondation. Il se compose d'une centaine de cellules.

indéfiniment si les conditions adéquates de culture sont maintenues.

En effet, l'une des caractéristiques principales des CSE est qu'elles conservent la longueur de leurs télomères* de manière prolongée *in vitro*, et ce, même en l'absence de couche nourricière (culture continue de plus d'un an sur 70 passages [6]). Les lignées HUES présentent d'autres marqueurs moléculaires stables (confirmés sur 59 lignées de 17 laboratoires différents) comme la présentation des antigènes glyco-lipidiques SSEA3 et SSEA4 (*stage-specific embryonic antigen*) et l'expression des gènes de régulation *NANOG* et *POU5F1* (aussi appelé *OCT4A*) [7]. La pluripotence de ces cellules est démontrée par xénogreffe ou par la formation de corps embryoïdes†. Ces CSE sont alors capables de produire des cellules différenciées originaires des trois feuillets embryonnaires (endoderme, mésoderme et ectoderme) (figure 3).

Ces spécificités des CSE soulèvent cependant des inquiétudes pour leur utilisation en thérapeutique [8]. En effet, les lignées cellulaires embryonnaires cancérigènes leur sont très similaires et il existe un risque de formation de tératomes *in vivo* si seulement quelques cellules non différenciées sont injectées dans le corps humain. Mais la plus grande réserve émise sur l'utilisation de CSE est d'ordre éthique, la destruction d'embryons étant mal acceptée par une grande partie du public pour des raisons morales ou religieuses. D'ailleurs la plupart des pays ayant accepté leur utilisation n'autorise que la création de lignées obtenues à partir d'embryons surnuméraires issus de fécondation *in vitro*.

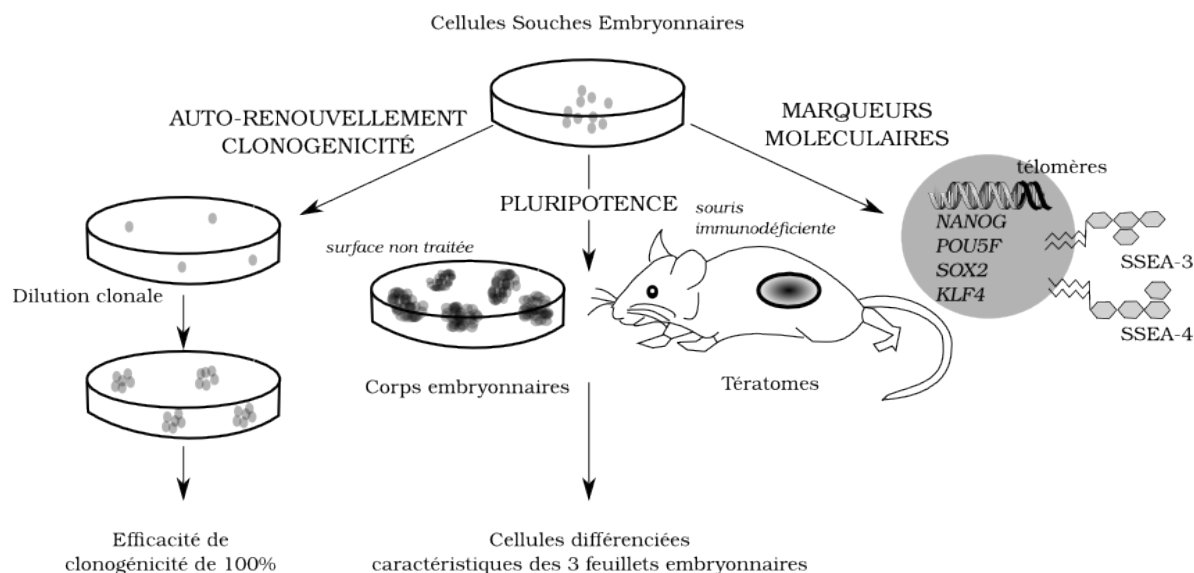


FIGURE 3 – Méthodes de caractérisation des cellules souches embryonnaires

*. Extrémité d'un chromosome intervenant dans sa stabilité et dans les processus cellulaires du vieillissement. Une cellule arrivant à maintenir la longueur de ses télomères est immortalisée.

†. Agrégats de cellules pluripotentes ayant une organisation structurale similaire à celle d'un embryon précoce

b- Cellules souches adultes

Une manière de contourner les réticences quant à l'utilisation de cellules souches embryonnaires (CSE) a été de centrer une grande partie des efforts de recherches sur l'isolement et l'amplification de CSA. Les cellules souches adultes (CSA) primaires sont directement prélevées du corps du donneur après son consentement éclairé. Ces dernières étant multipotentes, le choix de la source se fait principalement en fonction des pathologies visées. Grâce aux travaux du Dr Yamanaka (prix Nobel de médecine 2012), des cellules différenciées peuvent aussi être transformées pour retourner à l'état souche, et présenter ainsi des caractéristiques semblables aux CSE [9].

CSA Primaires. Le terme de cellules souches est employé à profusion en biologie humaine (tableau 1). Le standard scientifique pour déterminer si une population cellulaire peut être considérée comme souche est la transplantation en série (figure 5). Ces cellules peuvent rester quiescentes (bloquées en phase G0 du cycle cellulaire) pour de longues périodes jusqu'à ce qu'un signal leur soit envoyé pour participer au maintien d'un tissu. Une fois activées, elles se divisent pour conserver le réservoir de cellules souches. Ce pool se maintient au cours de la vie de l'individu par un ensemble de divisions asymétriques et symétriques (figure 4). La culture de CS, dans un but d'amplification de la population, consiste donc à trouver les conditions favorables à cette division clonale *in vitro*, en se rapprochant le mieux possible des conditions *in vivo*.

En dehors des considérations éthiques, les CSA peuvent aussi être considérées comme avantageuses car elles nécessitent moins d'intervention *ex vivo* que les CSE pour les engager vers une voie de différenciation. Cependant, se trouvant dans un état non différencié à l'intérieur du corps, la plupart des CSA sont plus difficiles à identifier et donc à purifier en quantité suffisante pour démarrer une amplification *in vitro*. De plus, la définition phénotypique de certaines fait toujours débat ; d'ailleurs, le réservoir de cellules souches est encore obscur pour certains tissus comme dans le cas du pancréas endocrine [12]. Les CSA ont aussi un potentiel d'auto-renouvellement plus limité que les CSE, que ce soit par l'apparition d'un phénomène de sénescence dans le cas des CSM, ou par l'apparition cumulée de cellules progénitrices au cours du temps dans le cas des CS hématopoïétiques [13].

Une source relativement nouvelle de CSA primaires sont les CS fœtales issues de tissus périnataux (fluide amniotique, gelée de Wharton, membrane amniotique et placenta) [20]. Ces cellules ne forment pas de tératomes *in vivo*, prolifèrent rapidement, sont assez aisément isolées et aucune réserve éthique

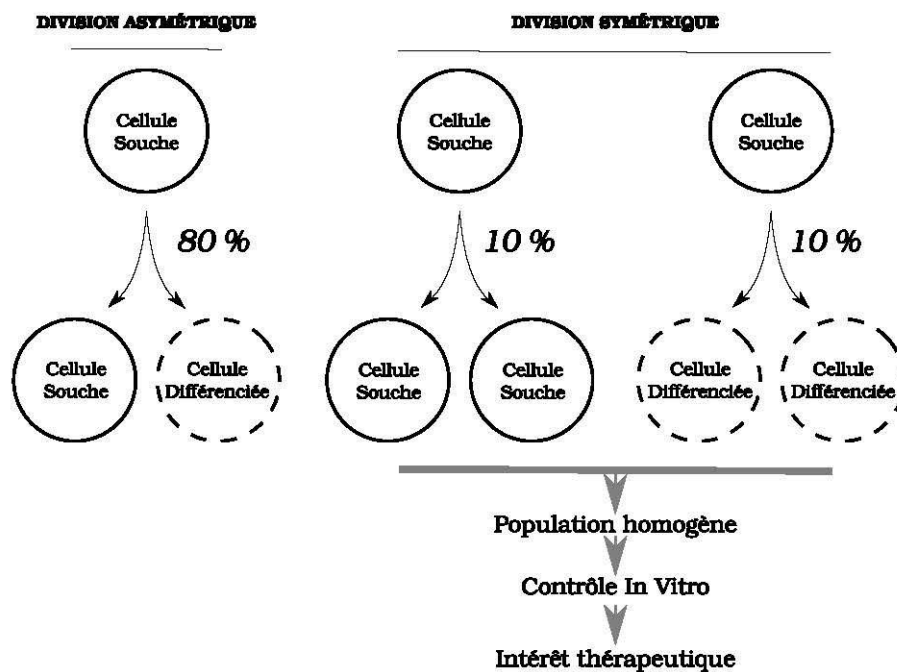


FIGURE 4 – Les différents modes de division des cellules souches adultes contribuant à l’homéostasie des tissus (estimation des pourcentages de contribution établie à partir de CS épithéliales) [10, 11]

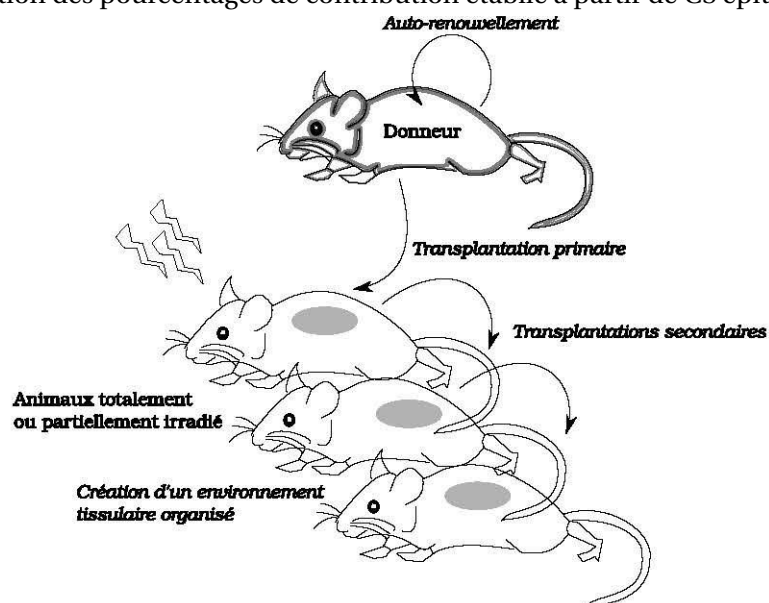


FIGURE 5 – Méthode schématique de transplantation en série

TABLEAU 1 – Exemples de cellules souches adultes et première démonstration *in vivo* de leur potentiel de cellules souches

CS adulte	Source/Niche	Multipotence	Transplantation en série
Hématopoïétique (CSH)	Moelle osseuse	Cellules du système sanguin et immunitaire	Till <i>et al.</i> , 1961 [14]
Épithéliale	Épiderme, intestin, poumon	Cellules épithéliales (intestin, kératinocytes, follicule pileux, poumon)	Stingl <i>et al.</i> , 2006 [15]
Neurale	Certaines régions du cerveau et de la moelle épinière	Neurones, oligodendrocytes et astrocytes	Morshead <i>et al.</i> , 1994 [16]
Fœtale	Tissus périnataux	Cellules épithéliales, hématopoïétiques, neurales et hépatocytaires	Bianchi <i>et al.</i> , 1996 (par microchimérisme) [17]
Mésenchymale (CSM)	Ubiquitaire	Ostéocytes, chondrocytes, tenocytes, adipocytes, etc	Lin <i>et al.</i> , 2014 (seulement avec une population clonale) [18]
Squelettique	Moelle osseuse	Ostéocytes, chondrocytes, tenocytes	Sacchetti <i>et al.</i> , 2007 [19]

ne s'oppose à leur utilisation. Il semblerait donc que les CS fœtales soient un état intermédiaire entre les CSE et adultes, et elles pourraient donc représenter un compromis utilisable en médecine régénérative. Le microchimérisme, c'est à dire la persistance pendant des années de cellules fœtales dans le sang maternel a fait la démonstration formelle de leur potentiel souche. En effet, des CS fœtales différenciées en cellules épithéliales, hématopoïétiques, neurales et hépatocytaires ont été retrouvées dans les tissus maternels et elles peuvent d'ailleurs être mobilisées dans le sang lors d'inflammations [21]. Il serait donc envisageable d'établir une réserve de cellules souches pour chaque individu à la naissance. Certaines entreprises privées américaines proposent déjà ce service. En France, seuls les dons de sang placentaire aux banques publiques sont autorisés et principalement utilisés en recherche. L'utilisation usuelle des CS fœtales fait en effet face à quelques pierres d'achoppement : leur séparation des cellules maternelles est encore difficile [22], elles sont en quantité restreinte, ont une source finie, et leur cryoconservation à très long terme pourrait se révéler difficile à mettre en œuvre.

CSA pluripotente induite. Face aux limites liées à l'utilisation de CSA et de CSE, la troisième voie envisagée par la recherche en thérapie cellulaire concerne les cellules souches pluripotentes induites (CSPi). Ces cellules sont reprogrammées à partir de cellules somatiques adultes (en majorité d'origine fibroblastique) par transfection de 4 facteurs de transcriptions ou leur activation indirecte (figure 6), par exemple avec un cocktail de petites molécules chimiques [23]. Les deux régulateurs transcriptionnels indispensables sont *Oct-4* et *Sox2*. Les deux autres inducteurs favorisant l'efficacité de la reprogrammation nucléaire sont *Klf4* et *c-Myc* (proto-oncogène) [24].

L'obtention de colonies de CSPi nécessite 6 à 8 semaines. Ces cellules sont ensuite cultivées par les mêmes méthodes de culture que celles utilisées pour les CSE. Elles peuvent être maintenues sur une couche nourricière de cellules de souris mitotiquement inactivées avec un milieu contenant du SVF. Les alternatives sans couche nourricière ni sérum sont réalisées avec des surfaces recouvertes de matrice extra-cellulaire (MEC) et l'ajout de suppléments synthétiques, notamment le facteur de croissance fibroblastique 2 (FGF2) à forte concentration, le facteur de croissance transformant β (TGF β), l'activine A, des glycoprotéines Wnt et la protéine morphogénétique de type 4 (BMP4) [25]. Ces cellules se développent en colonies compactes et sont très dépendantes des interactions cellule-cellule et cellule-matrice. C'est pourquoi un inhibiteur du système Rho-kinase peut être ajouté au milieu après le passage des cellules sous forme de suspension uni-cellulaire (Y-27632 est l'inhibiteur le plus courant). Cette ajout diminue fortement l'apoptose induite par la dissociation des cellules, notamment en stimulant les cellules à exprimer un panel d'intégrines variées [26].

La caractérisation des CSPi est donc identique à celle effectuée pour les CSE (figure 3). Il est aussi possible de cultiver les CSPi en suspension sous forme de petits agrégats indifférenciés. Le risque de former des corps embryoïdes * différenciés en cas de culture trop prolongée est également présent. Ces cellules sont donc équivalentes au CSE sur le plan fonctionnel. Cependant, de subtiles différences existent au niveau génétique et épigénétique. Les CSPi montrent en effet une mémoire somatique où, en fonction de l'origine de la cellule adulte, la lignée créée va être plus ou moins apte à se différencier vers un lignage spécifique. De plus, ces cellules gardent les motifs d'expression et de méthylation génique du donneur adulte, et, quand le donneur est une femme, le statut du chromosome X (inactivation ou réactivation) semble être attribué de manière aléatoire aux différentes cellules d'une lignée CSPi [27].

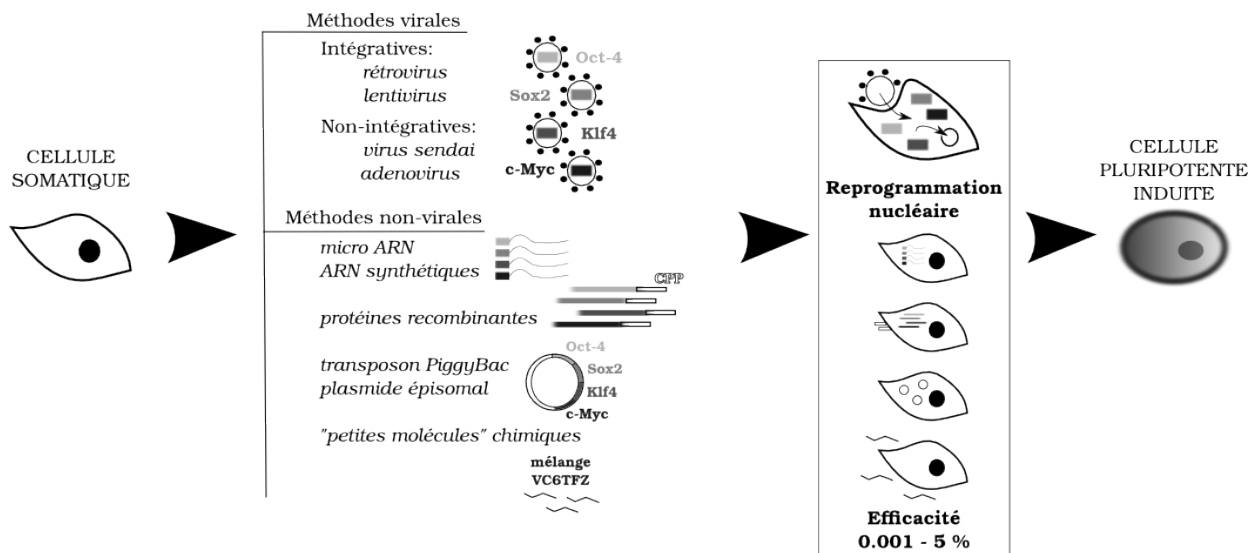


FIGURE 6 – Méthodes de reprogrammation de cellule somatique adulte en CSPi

Les réserves émises à l'encontre de l'utilisation de CSE en thérapie cellulaire (formation de tératome et de tumeur) sont donc tout aussi valides dans le cas des CSPi. Le risque de réaction immunitaire en cas de différence donneur/receveur (thérapie allogénique) est aussi plus élevé, car la lignée maintient l'identité antigénique du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) du donneur. Par contre, leur utilisation en médecine personnalisée semble prometteuse afin de tester *in vitro* des cocktails pharmaceutiques, des nouveaux composés actifs, ou de créer des modèles cellulaires de pathologies, sans être limité par la quantité de tissu prélevé lors des biopsies (ex : maladies neurodégénératives, les neurones étant difficiles à maintenir en culture).

*. Agrégats de cellules pluripotentes ayant une organisation structurale similaire à celle d'un embryon précoce

1.2 Les thérapies cellulaires

Comme abordé précédemment, les CS humaines dans leur ensemble recouvrent un large éventail d'attributs rendant leur utilisation en thérapie cellulaire plus ou moins aisée (tableau 2). Les deux défis qu'ont à surmonter les expérimentateurs sont de contrôler, et ce, de manière standardisée, la différenciation de ces cellules et leur amplification en quantité suffisante pour qu'un traitement soit possible et efficace. Malgré les nombreuses inconnues, particulièrement liées aux risques à long terme de ces thérapies, de nombreux essais cliniques sont en cours pour traiter des pathologies aussi variées que le diabète, l'infarctus, de nombreux types cancers ou les maladies musculo-squelettiques. C'est pourquoi cette demande quantitative en matière première cellulaire a elle-même générée de multiples études sur la montée en échelle des cultures de CS avec l'objectif de passer de l'ère de la boîte de Petri à celle de la production pharmaceutique industrielle.

a- Essais cliniques et traitements approuvés

Face aux limitations des cellules primaires*, notamment en culture, de plus en plus d'efforts sont investis dans la thérapie cellulaire à base de CS (figure 7). Depuis la parution de résultats encourageants au niveau préclinique, résultats obtenus majoritairement à partir de CS murines, le potentiel thérapeutique des CS suscite l'engouement des milieux médicaux et industriels. Ces résultats ont donc été transférés chez l'homme très rapidement et déjà plus de 4000 essais cliniques au niveau mondial (terminés, en cours ou en phase de recrutement) mentionnant le terme "cellule souche" ont été enregistrés par l'Institut National de la santé américain (<https://clinicaltrials.gov>). Malgré cette effervescence, seules trois thérapies ont été acceptées par les agences de santé pour une utilisation commerciale : l'Hemacord® (National Cord Blood Programm, USA), en 2012 aux États-Unis, constitué de CSH de cordon ombilical [29] ; le Prochymal® (Osiris Therapeutics, États-Unis), en 2012 au Canada, constitué de CSM de moelle osseuse [30] ; et l'Holoclar® (Chiesi Farmaceutici S.p.A., Italie), en 2015 en Union Européenne, constitué de CS limbiques† de cornée [31].

Une partie des essais cliniques se consacre à l'évaluation de produits cellulaires issus de CSH (figure 7). Celles-ci sont étudiées depuis les années 60, et le contrôle de leur amplification et de leur différenciation permettrait de résoudre les problèmes liés au manque de donneurs compatibles de moelle osseuse et de sang. La production *ex vivo* d'hématies et leur injection à l'homme a d'ailleurs

*. Cellules fraîchement prélevées d'un organe ayant un temps de vie limité en culture

†. Cellules souches localisées à la périphérie de la cornée dans une zone appelée le limbe.

TABIEAU 2 – Comparaison des différents types de cellules souches envisagées pour l'utilisation thérapeutique ; adapté de Herberts *et al.*, 2011 [28]

CSE		CSA pluripotentes induites		CSA primaires
Dérivées de la masse cellulaire interne d'un blastocyste		Dérivées de cellules somatiques adultes		Isolées d'un tissu postnatal
Pluripotentes Différenciation en cellules des 3 feuillets embryonnaires Formation de chimères Risque de tératome <i>in vivo</i>	Pluripotentes Différenciation en cellules des 3 feuillets embryonnaires Formation de chimères Risque de tératome <i>in vivo</i>	Multipotentes Différenciation limitée aux types cellulaires du tissu d'origine Pas de formation de chimères Pas de risque de tératome <i>in vivo</i>	Auto-renouvellement Multiples étapes pour l'obtention d'une lignée et d'une différenciation spécifique Haut niveau de prolifération Croissance illimitée Raccourcissement de la longueur des chromosomes avec le vieillissement cellulaire	Auto-renouvellement limité Difficiles à maintenir à long terme en culture Facilité d'obtention Croissance finie Raccourcissement de la longueur des chromosomes avec le vieillissement cellulaire
Auto-renouvellement Multiples étapes pour l'obtention d'une différenciation spécifique Haut niveau de prolifération une fois isolées Croissance illimitée Maintien de la longueur des chromosomes	Auto-renouvellement Multiples étapes pour l'obtention d'une lignée et d'une différenciation spécifique Haut niveau de prolifération Croissance illimitée Raccourcissement de la longueur des chromosomes avec le vieillissement cellulaire	Matériel allogénique et autologue Cellules non immunopriviliégées après reprogrammation à partir de cellules adultes (niveau normal de présentation des molécules du CMH-I et II) Moins de risque de rejet après vérification de la compatibilité antigène HLA	Matériel allogénique Cellules immunopriviliégées (niveau bas de présentation des molécules du CMH-I et II) Lignée cellulaire allogénique	Matériel allogénique et autologue Seules les CSM sont démontrées comme peu immunogènes Utilisation autologue avec peu de risques de rejet, possibilité de rejet dans le cas de traitement allogénique La maladie visée peut toujours être présente dans la lignée autologue créée Pas de problèmes d'éthique
Matériel allogénique Cellules immunopriviliégées (niveau bas de présentation des molécules du CMH-I et II) Lignée cellulaire allogénique	Matériel allogénique et autologue Cellules non immunopriviliégées après reprogrammation à partir de cellules adultes (niveau normal de présentation des molécules du CMH-I et II) Moins de risque de rejet après vérification de la compatibilité antigène HLA	Matériel allogénique et autologue Seules les CSM sont démontrées comme peu immunogènes Utilisation autologue avec peu de risques de rejet, possibilité de rejet dans le cas de traitement allogénique La maladie visée peut toujours être présente dans la lignée autologue créée Pas de problèmes d'éthique	Anamnèse* inconnu des donneurs pour les lignées anciennes Problèmes d'éthique	

(* anamnèse : histoire de la maladie, retrace les antécédents médicaux et l'histoire de la plainte actuelle du patient, avec les résultats des différentes explorations déjà faites et les traitements entrepris, CMH : complexe majeur d'histocompatibilité, HLA : antigènes des leucocytes humains)

été obtenue en 2011 avec des CSH CD34(+) isolées à partir de sang de cordon ombilical, mais fait maintenant face à un problème majeur de montée en échelle [32, 33].

Les CSE, moins de 20 ans après la création de la première lignée embryonnaire, ont aussi franchi le cap de l'utilisation sur l'homme. En 2011, Geron Corporation (USA) a obtenu le premier accord réglementaire au niveau mondial pour tester le traitement allogénique GRN-OPC1[®] composé d'oligodendrocytes dérivés de CS embryonnaires afin de traiter des lésions de la moelle épinière. Suite à une réorganisation de portefeuille, cette branche a été vendue à BioTime Incorporated (USA) en 2013, et sa filiale, Asterias Biotherapeutics, a récemment annoncé que le traitement AST-OPC1[®] avait permis à 5 patients tétraplégiques de retrouver une mobilité des membres supérieurs 3 mois après injection du traitement au niveau de la moelle épinière [34]. Ocata Therapeutics est la seconde entreprise à avoir réalisé un essai clinique impliquant des CSE différenciées pour créer des feuillets d'épithélium rétinale pigmentaire pour les indications de dégénérescence maculaire liée à l'âge (DMLA) et de dystrophie maculaire de Stargardt. Dans ce cas, aucune réaction adverse n'a été visible (hyperprolifération cellulaire, rejet immunitaire) et l'acuité visuelle des patients a été augmentée. Il faut cependant noter que

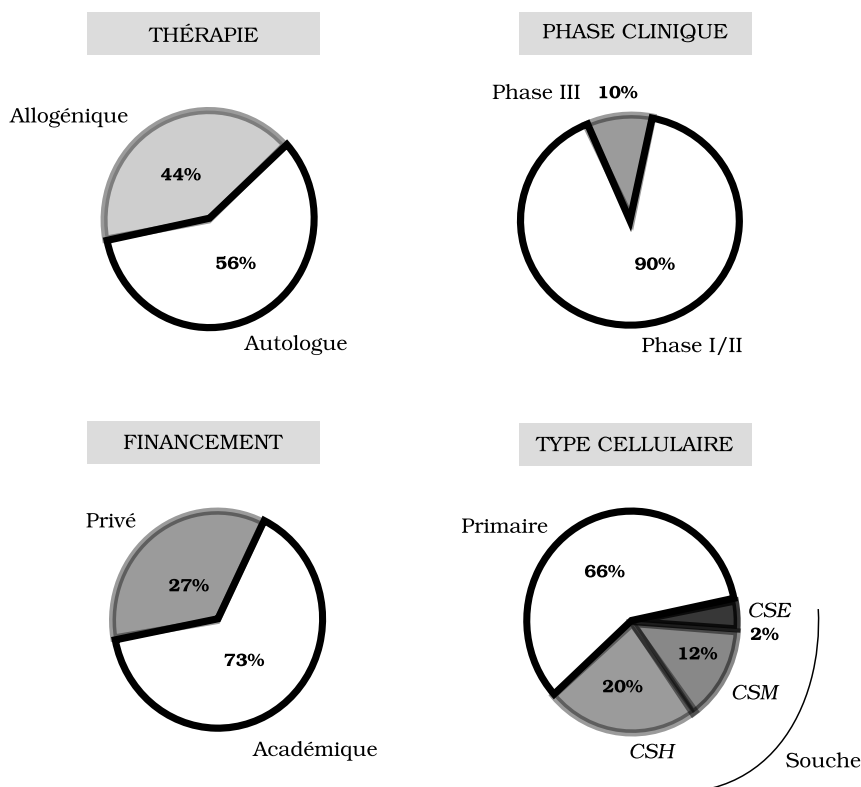


FIGURE 7 – Répartition des essais cliniques en cours en Grande Bretagne (source : initiative Catapult, selon la base de données au 22 avril 2014 <https://ct.catapult.org.uk/>, CSE : cellule souche embryonnaire, CSH : cellule souche hématopoïétique, CSM : cellule souche mésenchymateuse)

seuls deux patients ont été traités, et le suivi médical publié ne l'a été que pour les quatre premiers mois après chirurgie [35]. Le dernier produit récemment autorisé dans le cadre d'essais est le VC-01TM (Viacyte, USA) composé de cellules endodermiques dérivées de CSE puis encapsulées. Le recrutement de cet essai clinique est encore en cours. Ces cellules seront injectées à l'état de cellules progénitrices pancréatiques afin de recréer des îlots pancréatiques complets pour combattre la cause primaire du diabète de type I (<http://viacyte.com>).

Un seul essai clinique utilisant les CSPi a été annoncé en 2013 au Japon par le Centre de Biologie du développement de l'Institut RIKEN et devrait durer 3 ans [36]. Le traitement proposé est autologue et vise à utiliser une biopsie de peau du patient, reverter ces cellules à l'état pluripotent et ensuite créer des feuillets d'épithélium rétinale pigmentaire (durée estimée à 10 mois). Une fois générées, ces cellules seront greffées en dessous de la rétine de 6 patients atteints de DMLA.

Les CSM fournissent la seconde cohorte la plus importante des essais cliniques impliquant des CS (figure 7). Le Prochymal[®] (aussi appelé remestemcel-L, de Osiris Therapeutics, États-Unis) est la plus avancée de ces thérapies et vise à traiter les cas aigus de maladie du greffon contre l'hôte (GvHD) résistante aux stéroïdes. Il est composé de CSM de moelles osseuses de multiples donneurs, transfusées en intraveineuse deux fois par semaine pendant 28 jours (dose de 2 millions de cellules par kilogramme). Pour l'instant, il semblerait que les capacités immuno-modulatoires des cellules infusées permettent d'augmenter le taux de survie des patients de manière significative sans réactions adverses. L'amplification de ces cellules est maîtrisée à grande échelle par Lonza (Suisse) afin de créer jusqu'à 10 000 doses de Prochymal à la fois, avec une cryoconservation des cellules considérée comme sûre pendant 2 ans [37]. En dehors d'Osiris, Celyad (Belgique) a développé le C-CURE[®] composé de CSM de moelle osseuse dérivées en CS cardiopoïétiques pour une indication dans les cas d'infarctus causés par une ischémie myocardique. Six mois après leur injection dans le ventricule gauche des patients, aucun effet secondaire indésirable n'a été observé et les performances cardiaques des patients ont été améliorées [38]. À l'opposé, Vericel (USA) a dû mettre fin à la phase III de l'essai clinique de son traitement autologue phare, l'Ixmyloceel-T[®] (constitué d'un mélange de monocytes, macrophages, CSH et CSM), dans une indication d'ischémie du membre inférieur. L'entreprise a mis en cause un essai clinique mal mis en oeuvre et une réorientation stratégique pour expliquer cet échec. Elle cherche maintenant à démontrer l'efficacité de ce produit cellulaire dans le cadre des cardiopathies [37].

Malgré ces exemples, la découverte des CSM avait initialement surtout suscité des espoirs en ingénierie tissulaire. Ce domaine est toutefois beaucoup plus complexe que celui où les cellules sont

directement infusées, car un tissu doit être organisé à partir d'un mélange de différentes cellules différenciées, et surtout sa vascularisation doit être maîtrisée. À notre connaissance, un seul essai hospitalier chirurgical a été effectué dans ce cadre. La trachée décellularisée d'un donneur d'organe a pu être recolonisée par des cellules épithéliales et des chondrocytes dérivés des CSM. Cette trachée a été greffée à une femme atteinte de bronchomalacie en remplacement de sa bronche principale gauche [39].

b- Production hospitalière et pharmaceutique

Ces exemples de produits cellulaires thérapeutiques, quoique encourageants, sont en grande partie seulement des démonstrations de faisabilité, avec des essais cliniques limités à quelques patients, des résultats cliniques parfois faibles et souvent basés sur des mécanismes thérapeutiques hypothétiques. Une grande partie de la communauté scientifique appelle à la plus grande prudence vis-à-vis du passage chez l'humain des thérapies cellulaires à base de CS (tableau 3) [8, 32]. En effet, l'analogie avec l'engouement créé par les thérapies géniques dans les années 2000 est souvent faite. Alors que le passage à l'humain avait été très précoce, ces thérapies ont connu un ralentissement brutal suite à l'induction de plusieurs cancers thérapeutiques et à la mort d'un patient [40]. L'augmentation des cohortes au sein des essais est aussi un point critique de la réussite des thérapies à base de CS. Cette étape peut marquer l'arrêt du développement d'un traitement, comme le montrent les exemples de Geron Corporation et Vericel. Enfin, fournir aux autorités de santé des garanties suffisantes de qualité, de sécurité et d'efficacité d'un produit cellulaire engendre des coûts importants, non seulement liés à l'implantation d'un procédé d'amplification et de différenciation cellulaire robuste, mais aussi du fait de la mise en place d'un suivi analytique et documentaire rigoureux.

Deux modèles de production de CS se font alors face, l'un *via* la voie industrielle, l'autre *via* la voie hospitalière pour la production des cellules au plus près des patients (figure 8). Ce dernier modèle serait entièrement consacré aux thérapies autologues, pour lesquelles le donneur est le receveur. Ses avantages sont bien sûr la compatibilité immunitaire intrinsèque, mais aussi le fait qu'une culture prolongée de CS n'est pas nécessaire pour en obtenir la quantité suffisante au traitement d'un seul patient. Ce modèle pourrait cependant être mis à mal par le coût prohibitif d'une médecine personnalisée. *A contrario*, la vision des thérapies cellulaires en tant que produit pharmaceutique industriel fournit l'avantage d'une production à grande échelle à un moindre coût, les cellules étant issues de quelques donneurs soigneusement sélectionnés (thérapie allogénique), et amplifiées par des passages

TABLEAU 3 – Récapitulatif des risques liés aux thérapies cellulaires à base de cellules souches ; adapté de Herberts *et al.*, 2011[28]

	Facteurs de risque	Effets secondaires
Facteurs intrinsèques	Origine des cellules	Rejet des cellules
Caractéristiques cellulaires	Niveau de différenciation Potentiel tumoral Capacité de prolifération Sécrétions <i>in vivo</i> (facteurs de croissance, cytokines, chemokines) Viabilité à long terme Durée de vie	Induction de pathologie Effet biologique indésirable Toxicité Formation néoplasique (bénigne ou maligne)
Facteurs extrinsèques	Anamnèse* des donneurs manquant	Transmission de pathologie
liés à la production et à la manutention	Qualité des matières premières Pool de différentes origines allogéniques Contamination par des agents pathogènes Suivi et documentation des manipulations cellulaires Potentiel tumoral (induit lors de la culture ou par élimination incomplète des cellules non différenciées) Présence de composés chimiques Utilisation de dérivés plasmiques Cryopréservation Conditions de stockage et traçabilité Conditions de transport	Réactivation de virus à l'état latent Contamination des cellules (biologique ou chimique) Confusion entre différentes sources pour traitement autologue Formation néoplasique (bénigne ou maligne)
liés aux conditions cliniques	Indication thérapeutique Interaction avec une pathologie sous-jacente Réponse immunitaire Utilisation d'immunosuppresseurs Durée, fréquence d'exposition, et voie d'administration Irréversibilité du traitement	Rejet du traitement Réponse physiologique indésirable Manque d'efficacité Toxicité Grefe des cellules dans un tissu inapproprié Formation néoplasique (bénigne ou maligne)

(* anamnèse : *histoire de la maladie, retrace les antécédents médicaux et l'historique de la plainte actuelle du patient, avec les résultats des différentes explorations déjà faites et les traitements entrepris*)

successifs. Ces aspects pourraient néanmoins réduire l'efficacité de ce modèle et entraîner des rejets immunitaires [41].

Ces deux modèles de production de CS sont toutefois confrontés aux mêmes problématiques techniques et réglementaires. La mise en place d'un système (suivi des bonnes pratiques de fabrication, formation des personnels, enregistrement des procédures et des produits) est une étape maîtrisée aussi bien par l'industrie pharmaceutique que par le système hospitalier. Par contre, les enjeux du développement d'un procédé de production en vue d'une thérapie cellulaire se situent bien plus près de la prise en compte de la nature biologique, et donc dynamique d'un tel produit. Du donneur au

patient, la logistique sort du cadre purement manutentionnaire et pose donc de réelles questions scientifiques :

1. La préservation des cellules (congélation, pause hypothermique, vitrification) permet la création de banques allogéniques et le transport des cellules [42]. Les conditions de préservation (milieu et température) ainsi que le stockage à plus ou moins long terme des cellules peuvent avoir des conséquences notables sur leur viabilité ou leurs capacités (particulièrement en touchant aux fonctions du cytosquelette) [43].
2. La sélection des donneurs dans le cadre des thérapies allogéniques fait écho aux études faites en biologie médicale quant aux paramètres d'âge, de sexe, de pathologies, qui peuvent influencer la quantité et qualité des CS obtenues à partir d'une biopsie. La découverte de biomarqueurs fiables reste aujourd'hui un domaine complexe au regard des variabilités individuelles. De plus, en dehors des CSPi, la plupart des populations de CS ne sont pas couramment isolées de manière clonale. Ainsi, contrairement aux lignées cellulaires immortalisées, les CS présentent une hétérogénéité génétique et phénotypique qui doit être maintenue pour garder l'efficacité thérapeutique du produit. Or, imposer des contraintes environnementales induit le plus souvent une sélection de sous-populations. Ces variabilités, intrinsèques (population cellulaire hétérogène) et extrinsèques (liées aux donneurs), sont le premier défi à relever, le deuxième étant celui du

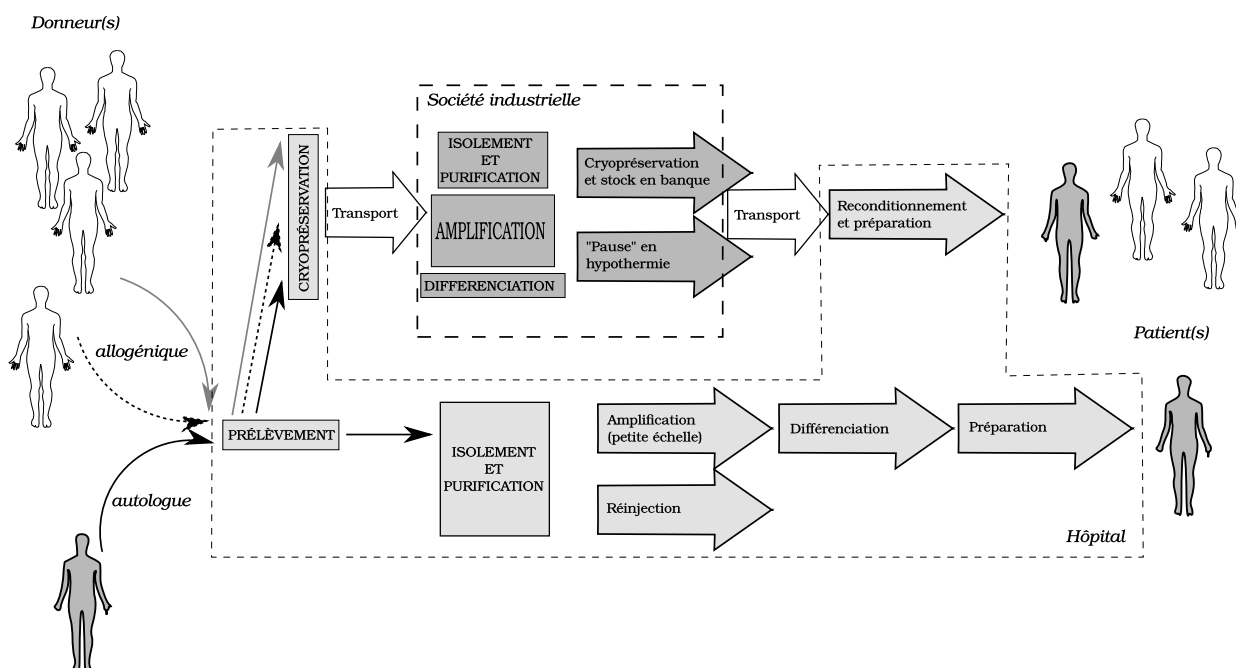


FIGURE 8 – Modèles de développement des thérapies cellulaires

changement d'échelle et de la diminution des coûts.

3. Les procédés d'amplification et de différenciation *in vitro* doivent pouvoir, d'une part, s'adapter à de multiples donneurs-receveurs et, d'autre part, être adaptés à grande échelle et optimisés de manière à fournir des quantités suffisantes de produit, et de qualité pour un coût acceptable. Dans le cas des CSH par exemple, le procédé devrait être cinq fois moins coûteux pour qu'il soit compétitif en comparaison du prix actuel des produits sanguins (sang, plasma, plaquettes) [33].
4. En amplification classique, les CS sont cultivées sur des surfaces planes et requièrent un milieu complexe et coûteux (présence de dérivés sanguins et facteurs de croissance en quantités importantes). Pour améliorer les performances d'amplification, le génie des procédés propose d'optimiser ces conditions de culture, particulièrement en développant des modèles de culture plus intensifs en 3 dimensions, les CS n'étant pas cultivables à l'état de suspension unicellulaire [44]. Cette intensification soulève ainsi de multiples interrogations quant à l'impact du changement : des surfaces d'adhérence (ex : culture en agrégats ou sur microporteurs), de l'environnement hydro- ou biomécanique (ex : culture en suspension ou en perfusion sur colonne), de l'homogénéité de l'environnement (ex : diffusion des gaz et des nutriments) [45]. Ces interrogations ne sont pas nouvelles et sont équivalentes à celles déjà abordées par la culture de lignées cellulaires continues pour la production de biomolécules. Cependant, dans le cas des CS, l'impact des paramètres de culture sur le produit est direct et non-réversible (contrairement aux biomolécules qui peuvent être purifiées en aval sur des critères physico-chimiques précis).
5. Finalement, la dernière étape de toute production de CS à visée thérapeutique concerne les épreuves de libération des lots. La définition des limites d'acceptation d'un produit cellulaire implique une caractérisation fine des cellules mais aussi de contaminants éventuels (agents pathogènes issus de l'utilisation de sérum, contaminants chimiques comme le DMSO). La détection de contaminants chimiques ou biologiques pathogènes est déjà bien documentée (ex : greffe de moelle osseuse). Par contre, la principale difficulté provient de l'évaluation de la population cellulaire obtenue après amplification. Cette dernière doit répondre à certains critères d'efficacité (obtention d'une amélioration de l'état du patient) et de sûreté sanitaire (minimisation des effets secondaires). Cependant les spécifications restent encore floues et les méthodes analytiques peuvent aussi ne pas être adéquates pour la validation d'une thérapie cellulaire, en temps ou quantité de cellules à sacrifier pour la validation d'un lot clinique.

Ces cinq derniers points représentent des obstacles majeurs au développement des thérapies

cellulaires, et c'est pourquoi ce travail s'est proposé de les aborder.

RÉSUMÉ

- Les thérapies cellulaires (injection des cellules à un patient malade) sont en pleine expansion grâce au développement de la recherche sur les cellules souches (CS).
- Ces CS peuvent être des cellules souches embryonnaires (CSE), des cellules souches adultes (CSA) primaires ou pluripotentes induites.
- Au sein des CSA primaires, les cellules souches mésenchymateuses (CSM) sont un modèle d'étude courant.
- L'une des problématiques rencontrées en thérapie cellulaire consiste à produire des cellules en quantité suffisante tout en contrôlant activement leur qualité.

2 Les Cellules Souches Mésenchymateuses

La recherche sur les cellules souches embryonnaires est, en France, réglementée par les lois de bioéthique de 2004 qui imposent un régime d'interdiction avec possibilité de dérogations par le ministère de la recherche. La révision de ces lois, en 2011, a maintenu cette interdiction, les autorisations dérogatoires étant maintenant accordées par l'Agence de la Biomédecine (ABM) en fonction de la pertinence du projet de recherche. Ceci suppose de démontrer qu'un progrès médical majeur pourrait être obtenu, qu'il est impossible d'obtenir ces résultats sans l'utilisation de CSE et bien sûr que le projet respecte les principes éthiques (ex : sans création de gamètes).

L'utilisation de CSA est, quant à elle, plus simple et seulement réglementée par l'article L1243-3 du Code de la Santé Publique qui précise que *"Tout organisme qui en a fait la déclaration préalable auprès du ministre chargé de la recherche peut, pour les besoins de ses propres programmes de recherche, assurer la conservation et la préparation à des fins scientifiques de tissus et de cellules issus du corps humain"*. En outre, compte-tenu du fait que les CSPi sont un modèle cellulaire très récent (découvertes en 2007), elles ne sont disponibles à l'American Type Culture Collection (ATCC) que depuis 2012, et le temps de développement d'une lignée, d'au minimum un an, était difficilement envisageable dans le cadre de ce travail.

Le modèle cellulaire choisi pour ces travaux est donc celui des cellules souches mésenchymateuses (CSM), la deuxième population la plus étudiée de CS après celle des CSH, avec plus de 30 000 articles référencés à ce jour par le NCBI (National Center for Biotechnology Information, USA). Les CSM constituent un modèle de CS très particulier par les débats qu'elles suscitent au sein de la communauté scientifique quant à leur identité, leur caractère souche et leur rôle physiologique. Dès 2007, le LRGP a été impliqué dans leur expansion en réacteur en tant qu'acteur du projet TELiTeR (Tissue Engineering for Ligament and Tendon Regeneration) financé par l'Agence Nationale de la Recherche (ANR) portant sur la réalisation d'un implant ligamentaire porcin. Les travaux présentés dans ce document ont porté sur l'amplification de CSM humaines et ont été réalisés dans le cadre d'une collaboration avec le laboratoire d'Ingénierie Moléculaire et Physiopathologie Articulaire (IMoPA, UMR7365, Nancy, France) et l'Unité de Thérapie Cellulaire et Tissus du CHU de Nancy-Brabois.

2.1 Historique

Les premières observations de la présence de cellules souches non hématopoïétiques ont été réalisées, en 1867, par le pathologiste allemand Julius Friedrich Cohnheim. En étudiant les mécanismes de guérison des plaies sur des modèles animaux, il constata à l'aide de colorants, que les cellules participant au processus de guérison provenaient du flux sanguin, et que certaines présentaient un phénotype fibroblastique (morphologie fuselée). Il émit donc l'hypothèse que la moelle osseuse serait le réservoir naturel des fibroblastes [46]. En science moderne, c'est Alexander Friedenstein, dans les années 70, qui démontra la présence de "cellules fibroblastoïdes formatrices de colonies" (CFU-F) dans la moelle osseuse de cochon d'Inde. Après isolement de celles-ci en boîte de Roux en verre, il obtint une petite proportion de cellules adhérentes fuselées organisées en colonies (figure 9), qui, après quelques jours de culture, commencèrent à se multiplier pour finalement former des dépôts ostéocytaires et cartilagineux [47].

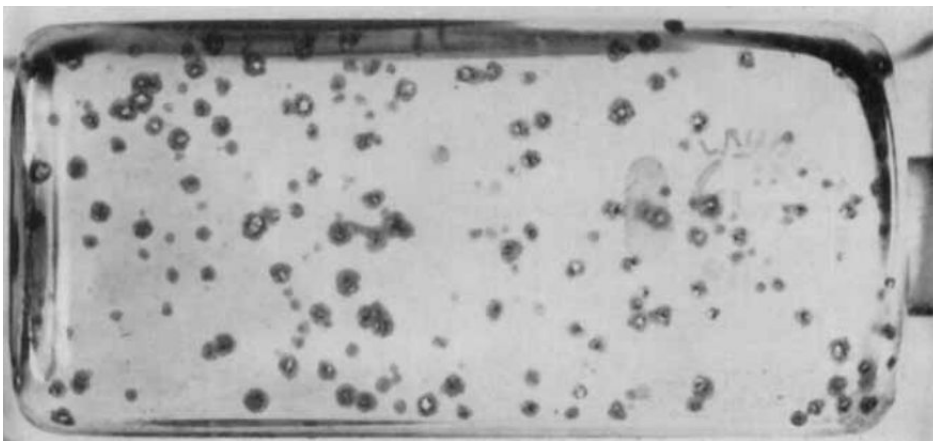


FIGURE 9 – Découverte des CSM en 1970 : Formation de colonies à partir d'un dépôt de moelle osseuse de cochon d'Inde ; tiré de Friedenstein *et al.*, 1970 [47]

Ces études furent poursuivies par l'utilisation de ces colonies adhérentes *in vivo* en chambre sous-cutanée et par la caractérisation de leur caractère multipotent grâce à l'obtention de cellules différenciées en ostéoblastes, chondrocytes, adipocytes, ainsi qu'en stroma hématopoïétique [48, 49]. C'est Maureen Owen qui développa le concept de "cellule souche stromale de la moelle" en 1988 en étudiant les niveaux de multipotence de différentes colonies issues de moelle osseuse de rat ou de lapin et en essayant de contrôler leur différenciation ostéogénique *in vitro* [50]. Finalement, Arnold Caplan popularisa le terme "Cellule Souche Mésenchymateuse" au début des années 90 (figure 10). À partir de ses travaux portant sur la formation des membres chez l'embryon de poulet, il relia ses

résultats en biologie du développement à la présence de CSM dans la moelle osseuse adulte, CSM dont le rôle serait de contribuer au maintien des tissus mésenchymateux au cours de la vie de l'individu (os, cartilage, muscle, ligament, tendon, tissu adipeux et stroma) [51, 52].

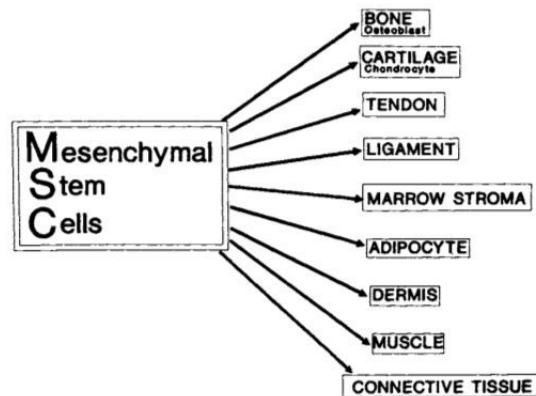


FIGURE 10 – Conceptualisation du terme CSM ; tiré de Caplan *et al.*, 1991 [52]

Cette théorie fut ensuite testée, notamment par Darwin Prockop et son équipe, sur des souris ayant subi une ablation de moelle osseuse, mais seule une proportion mineure de CSM s'est montrée capable de repeupler les tissus lésés (de l'ordre de 10%). Dans ces conditions, ces cellules ont toutefois démontré leur capacité à générer de nouveaux tissus mésenchymateux [46]. Jusqu'alors, l'isolement et la culture de CSM d'origine humaine s'étaient révélés particulièrement difficiles. C'est à la fin des années 2000 seulement que les expériences de Mark Pittenger ont permis, grâce à l'utilisation de la centrifugation par gradient de densité, d'isoler des populations homogènes de CSM, mais aussi de contrôler *in vitro* leur différenciation (figure 11) et leur isolement clonal. Ceci a ainsi confirmé que la moelle osseuse n'était pas un assemblage de cellules progénitrices engagées dans une voie de différenciation mais bien une source de cellules multipotentes [53]. Par la suite, la démonstration de leur statut immuno-privilegié par Le Blanc *et al.* en 2003 les rendit particulièrement attractives en thérapie cellulaire allogénique, ces cellules ne présentant à leur surface que les antigènes du CMH I, et non ceux de classe II [54].

À partir des années 2000, les études sur les CSM humaines ont connu un véritable engouement. De nombreux laboratoires académiques ou hospitaliers ont développé leurs propres protocoles d'isolement et de culture, à partir de moelle osseuse, mais également de nombreux autres tissus. Le terme de CSM a commencé à être utilisé dans un cadre trop vaste pour que les cellules en question soient considérées comme identiques. Afin d'améliorer la comparabilité des résultats, la Société Internationale de Thérapie Cellulaire (ISCT), en 2006, a choisi de recentrer la définition des CSM humaines sur

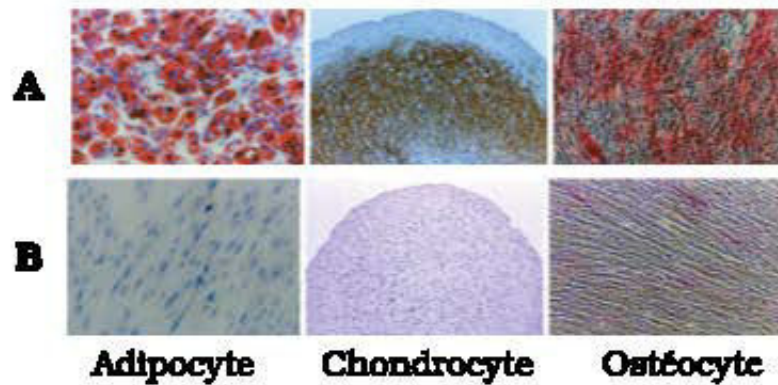


FIGURE 11 – Démonstration des capacités de différenciation de CSM de moelle osseuse humaine *in vitro* : A) CSM (moelle osseuse adulte), B) Fibroblaste (derme de nouveau-né) ; Vésicules lipidiques du tissu adipocytaire coloré en rouge à l'Oil Red O, Collagène de type II du tissu chondrocytaire marqué par immunohistochimie, Déposition calcique du tissu ostéocytaire coloré en rouge à l'alizarine ; tiré de Pittenger *et al.*, 1999 [53]

3 critères précis [55] : l'adhérence, la présence/absence de marqueurs de surface et la multipotence en 3 lignages (tableau 4). Certains critères n'ont pas été inclus dans cette définition, mais sont depuis largement reconnus. Par exemple, au-delà de la multipotence, les CSM doivent être capables de soutenir l'hématopoïèse (culture de CSH), posséder des propriétés immunomodulatrices (inhibition de la prolifération des lymphocytes T) et anti-inflammatoires (sécrétion de cytokines en réponse à une stimulation aux interleukines). L'acronyme de CSM a également été redéfini en 2006 par l'ISCT pour devenir celui de "Cellule Stromale Multipotente" en raison de la confusion que pourrait créer le terme "souche" alors que leurs capacités de pluripotence et de réservoir cellulaire *in vivo* n'avait pas été démontrées formellement [18].

TABLEAU 4 – Critères de définition des CSM par l'ISCT ; adapté de Dominici *et al.*, 2006 [55]

1	Adhérence au plastique en conditions de culture standards	
2	Phénotype	Positif ($\geq 95\%$)
		Négatif ($\leq 2\%$)
		CD 45
		CD 34
		CD 14 ou CD 11B
		CD 79 α ou CD 19
		HLA-DR
3	Différenciation <i>in vitro</i> en ostéoblastes, adipocytes et chondroblastes (démontrée par marquages histochemiques)	

(CD : cluster de différenciation, HLA : antigènes des leucocytes humains)

2.2 Identités et controverses

a- Sources

Les critères définis par l'ISCT sont relatifs à l'identité *in vitro* des CSM humaines. Les connaissances actuelles découlent donc, en grande majorité, d'observations dépendant des conditions de culture choisies. Ceci peut conduire, non seulement, à la multiplication des artefacts, mais aussi, à la remise en cause de l'existence même de cette population cellulaire *in vivo*. Alors que les CSM de moelle osseuse sont le standard historique à partir duquel ces critères ont été définis, des cellules remplissant ces obligations ont pu être isolées à partir de nombreux autres tissus (tableau 5). De ce fait les CSM sont de plus en plus considérées comme ubiquitaires.

Cependant, toutes ces populations de CSM ne peuvent être considérées comme équivalentes. Tout d'abord, elles ne présentent pas le même profil en terme d'antigènes de surface ou d'expression génique [56]. Par exemple, certains considèrent que les CSM dérivées de tissus adipeux sont CD 34-positives [57]. Or, la régulation de la présentation de ces antigènes est un processus dynamique particulièrement lié à la méthode d'isolement et aux conditions de culture, les comparaisons entre laboratoires sont donc complexes [58].

TABEAU 5 – Isolement de CSM à partir de tissus adultes et péri-natals

Source		Quantité de CSM (cellules/unité de tissu)		Ref
Adulte	Moelle osseuse	500 - 50 000	/g	[59]
	Tissus adipeux	350 000 – 1 000 000	/g	[59]
	Pulpe dentaire (dent déciduale*)	5 000	/dent	[60]
	Ligament alvéolo-dentaire	10 000	/dent	[61]
	Membrane synoviale	10 000 – 60 000	/g	[62]
	Muscle	30 000 000	/g	[63]
	Péricyte	fonction de l'organe d'origine		[64]
	Périoste osseux	500	/cm ²	[65]
	Endomètre utérin	1 000 000	/biopsie	[66]
	Thymus	3000-300 000	/g	[67]
	Amygdales	nd		[68]
	Sang périphérique	250 000 – 500 000	/mL	[69]
	Follicule pileux	1 000 000	/follicule	[70]
Péri-natale	Placenta	100 000 000 – 500 000 00	/placenta	[71]
	Membrane amniotique	1 000 000 – 4 000 000	/membrane	[72]
	Sang ombilical	70 000	/mL	[73]
	Gelée de Wharton	85 000 000	/cm	[74]

(*déciduale : dents temporaires de la première des deux séries qu'ont consécutivement la plupart des mammifères, aussi appelées dent de lait chez l'homme.)

En dehors de ces caractérisations, des différences fonctionnelles, en termes de capacité de différenciation et d'immunophénotype, ont aussi été constatées. Il semblerait que les CSM soient "pré-différenciées" en fonction de leur organe d'origine. Ainsi, des cellules issues de la moelle osseuse ou de tissus adipeux seraient respectivement plus orientables en direction d'un lignage ostéo-chondrocytaire ou adipocytaire [75, 76]. Certaines études ont comparé des CSM de différentes origines, isolées à partir d'un même donneur pour éliminer l'hétérogénéité génétique. Elles concluent que les CSM de cordon ombilical présentent des capacités d'immunomodulation plus importantes (sécrétion en grande quantité de cytokines) alors que les CSM isolées de moelle osseuse ou de tissus adipeux seraient plus aisément différenciables [56, 76].

b- Localisation *in vivo* et identité

Trois hypothèses ont été formulées pour expliquer la distribution des CSM au sein de tous les organes du corps humain. La première suppose que les CSM résident de manière permanente au sein de tous les tissus. La seconde stipule qu'elles sont concentrées dans certains organes, mais peuvent circuler dans le sang. La troisième émet l'hypothèse que les CSM sont localisées dans les espaces périvasculaires du corps (adventice* de la paroi des vaisseaux et sous-endothélium[†] vasculaire) [77]. Dans ce cas, il est supposé que les états de pré-différenciation observés sont sous le contrôle des microenvironnements spécifiques à chaque organe (aussi appelé niches).

Il existerait donc éventuellement un type cellulaire progéniteur des CSM. À ce jour, les stades hiérarchiques de l'ontogenèse[‡] des CSM, de la formation de l'embryon jusqu'à l'obtention de CSM plus ou moins engagées vers un lignage spécifique dans les tissus, ne sont pas connus. Cette cascade développementale hypothétique pourrait ainsi être à l'origine de l'hétérogénéité clonale constatée lors de l'isolement de CSM au sein d'une même biopsie. À titre d'exemple, seulement 30 à 50 % des clones isolés au sein d'une population de CSM sont capables, dans les faits, de se différencier en 3 lignages (adipocytaire, chondrocytaire et ostéocytaire) [78].

Toutefois, des théories alternatives existent pour expliquer l'hétérogénéité des CSM. Elles supposent que ces variations peuvent être liées, soit au vieillissement des cellules (biologiques ou en cours de

*. Tunique externe d'organe creux comme les vaisseaux ou l'œsophage, généralement composée de fibroblastes orientés longitudinalement et de fibres de collagène.

†. L'intima est la tunique interne des vaisseaux. L'endothélium est la couche de l'intima en contact avec le sang, le sous-endothélium est la couche extérieure de l'intima.

‡. Ensemble des transformations structurelles observées dans un système vivant de son développement embryonnaire jusqu'à son organisation finale.

culture), soit à l'imprécision des critères de caractérisation des CSM [79]. Les cellules isolées seraient donc, non pas une unique population, mais plutôt un assemblage de plusieurs sous-types cellulaires différents.

La découverte de marqueurs biologiques capable de discriminer une population de CSM plus pure est ainsi un des axes de recherche les plus examinés. Cette ambition a généré ces dernières années la description de huit sous-populations se réclamant composées de CSM primitives (CSM-RS, MIAMI, MUSE, MPC, MAPC, VSEL, USSC, CSP), détaillées ci-dessous.

- Discrimination morphologique : Dès la généralisation de leur culture, l'hétérogénéité des CSM a d'abord été fortement liée à la diversité des morphologies observables au microscope par les expérimentateurs. Beaucoup ont constaté la présence de deux "sous-populations", l'une de cellules larges et fibroblastoïdes, et l'autre de petites cellules rondes à division rapide, appelées CSM-RS (*small Rapidly Self-renewing*) [80]. Il a été démontré depuis, par un suivi en temps réel des cultures, qu'une seule population de CSM existe, et que ces deux descriptions correspondent en fait à l'évolution de la morphologie cellulaire au cours du temps vers un état sénescence [81].
- Discrimination sélective : L'autre stratégie utilisée pour isoler des CSM souches (c'est-à-dire réellement pluripotentes et capables d'auto-renouvellement de manière illimitée) consiste à imposer à une culture de CSM un stress important pour ne sélectionner que les cellules progénitrices. Les cellules appelées MIAMI (*Marrow Isolated Adult Multilineage Inducible*) [82], MUSE (*MULTilineage-differentiating Stress-Enduring*) [83], MPC (*Mesodermal Progenitor Cells*) [84] ou MAPC (*Multipotent Adult Progenitor Cells*) [85] ont d'abord été isolées ainsi. Les premières sont issues de CSM cultivées en hypoxie en présence de seulement 2 % de SVF [82]. Les autres sont obtenues après une incubation de 16 heures en présence de trypsine [83], ou par isolement des cellules sur des surfaces non traitées en présence de sérum humain. Les cellules MIAMI, MPC, et MAPC seraient apparemment capables de se différencier le long des lignages triploblastiques (mésoderme, ectoderme, endoderme). L'inconvénient de ces méthodes est leur action *a posteriori* sur des cellules déjà préalablement isolées, laissant la place au doute quant à l'existence réelle de ces types cellulaires *in vivo*. D'ailleurs, les auteurs de l'article fondateur du concept de MAPC se sont depuis rétractés [85] et une étude indépendante comparant des CSM, des MPC et des MAPC (en suivant les protocoles établis de purification à partir de moelle osseuse) a conclu que ces populations étaient identiques [86].
- Discrimination antigénique : L'équipe à l'origine du concept de cellules MUSE les a ensuite

caractérisées de manière plus approfondie en proposant de les isoler *a priori* par cytométrie utilisant leur double positivité pour les marqueurs SSEA-3 (caractéristique des CSE) et CD 105 (caractéristique des CSM) [83]. Pour les MPC, ce serait la présentation à leur surface de la combinaison Nestin/CD31 qui serait décisive (marqueurs endothéliaux précoces) [84]. De même, les cellules VSEL (*Very Small Embryonic-Like*) ou USSC (*Unrestricted Somatic Stem Cells*) seraient des cellules progénitrices de CSM isolables à partir de sang de cordon ombilical. Les premières seraient constituées d'une population cellulaire rare positive aux antigènes CD 45/Lin 2/CXCR 4 [87], tandis, qu'à l'opposé, les USSC sont sélectionnées après centrifugation différentielle par l'absence de CD 45, mais par la présence des marqueurs de surface standards des CSM [88]. Ces définitions sont à l'évidence contradictoires, et l'incapacité à obtenir systématiquement des cellules adipocytaires et ostéocytaires à partir d'USSC décrédibilise leur existence en tant que cellules pluripotentes [89]. La nature des cellules VSEL est, elle aussi, hautement débattue, certains la ramenant à de simples aberrations caryotypiques [90], quand d'autres équipes mettent en cause les compétences techniques des laboratoires ne réussissant pas à les isoler ou à les maintenir en culture [87].

- Discrimination biologique : La théorie qui remporte le plus d'adhésion de la part de la communauté scientifique à ce jour est l'origine périvasculaire des CSM. En effet, elle relie les connaissances biologiques *in vivo* (organogenèse et histologie) à celles obtenues *in vitro* avec des cellules souches périvasculaires (CSP) et des CSM. Les CSP sont composées de deux sous-types cellulaires, les péricytes (entourant les capillaires) et les cellules réticulées de l'adventice*. Elles peuvent être isolées par cytomètre en flux trieur grâce à la reconnaissance de 3 antigènes de surface : CD 146, NG 2 et PDGF-R β [91, 92]. Ces cellules, après leur mise en culture, correspondent aux critères de l'ISCT définissant les CSM, et ce, même à long terme, quels que soient les clones isolés à partir de différents tissus sources [77]. Inversement, les CSM co-cultivées avec des cellules endothéliales de veine ombilicale humaine (HUVEC) se positionnent à la périphérie des structures tubulaires en forme de capillaire que les HUVEC créent *in vitro* [93]. De plus, sur des coupes histologiques de moelle osseuse, les cellules présentant certains marqueurs typiques des CSM sont localisées autour des capillaires ou au niveau des tissus réticulés [94]. Enfin, sur des modèles animaux de glioblastomes [95] ou d'hétérotopies[†] sous-cutanées médullaire et osseuse [19], les CSM transplantées sont retrouvées au niveau périvasculaire.

*. Tunique externe des vaisseaux.

†. Développement d'une structure anormale dans des tissus mous

En résumé, les débats autour de la définition des CSM restent encore houleux, car peu de ces nouveaux concepts ont réussi à être reproduits par des laboratoires indépendants. Aujourd'hui, seule la caractérisation *a minima* selon les critères de l'ISCT fait consensus. Cependant, connaître l'identité et le rôle de ces cellules *in vivo* n'est pas anecdotique, car cela permettrait de mieux préciser leur intérêt thérapeutique.

2.3 Rôles physiologiques

Initialement, les CSM ont surtout été envisagées comme l'élément actif des thérapies de remplacement (ex : ingénierie tissulaire) pour lesquelles des CSM auraient pu réparer des lésions grâce à leur capacité de différenciation. La démonstration, en co-culture ou sur des modèles animaux, de leur capacité trophique et immunomodulatoire, les désigne maintenant surtout comme des acteurs importants des thérapies de stimulation cellulaire, les CSM étant alors un intermédiaire de l'effet thérapeutique (figure 12).

a- Différenciation

Les capacités de différenciation des CSM *in vitro* sont bien établies, mais cette démonstration n'est pas suffisante pour affirmer que cela fait partie de leur attribut dans un contexte physiologique et non pas d'un caractère artéfactuel induit par les conditions de culture. En effet, la reprogrammation de cellules somatiques en CSPi a remis en cause l'un des dogmes fondateurs du domaine des cellules souches, qui affirmait qu'une fois engagée dans un lignage de différenciation, une cellule ne pouvait revenir à un stade antérieur (dé-différenciation) en dehors des cas pathologiques de tumorigénèse. Or, les lignées CSPi sont obtenues à partir de cellules somatiques adultes, et présentent alors le même caractère pluripotent que les CSE. Comme ces résultats ont été obtenus par manipulation *in vitro* du microenvironnement (figure 6), la définition, en culture, du caractère souche et pluripotent des cellules, est devenue moins stringente.

Un second argument appuie les réserves relatives aux conclusions qu'il est possible de tirer d'expériences réalisées *in vitro*. En effet, la capacité de trans-différenciation des CSM reste sujette à débat. La trans-différenciation se définit comme le mécanisme d'interconversion par lequel une cellule somatique acquiert des caractères d'un autre lignage embryonnaire sans se dé-différencier préalablement. Dans le cas des CSM (issues du lignage mésodermique), plusieurs équipes ont rapporté la possibilité

Homéostasie

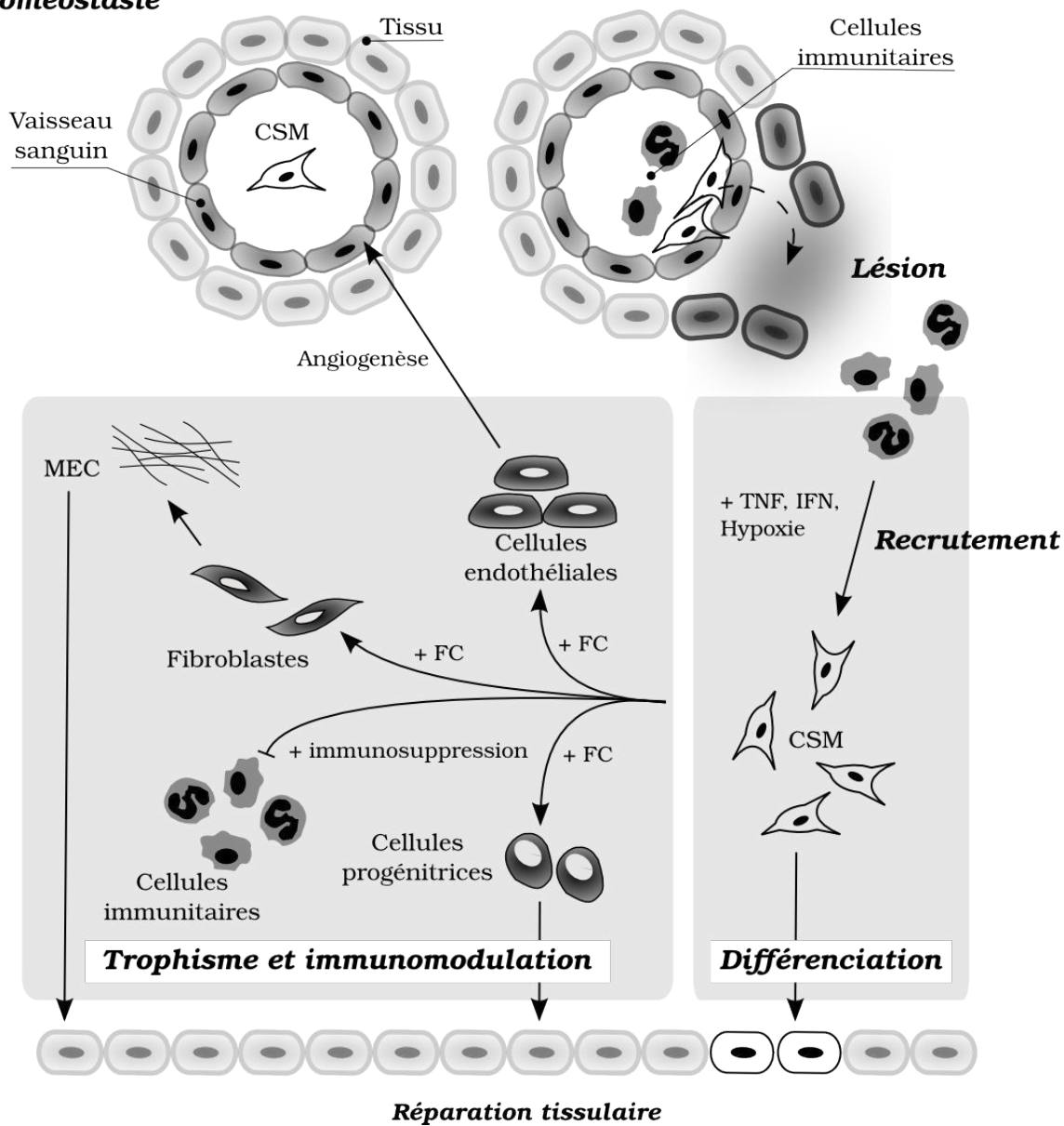


FIGURE 12 – Les différents modes d'action hypothétiques des CSM *in vivo*
(FC : facteur de croissance, MEC : matrice extra-cellulaire)

d'obtenir directement des cellules endothéliales ou neurales sous certaines conditions de culture [96, 97]. Ces phénomènes pourraient impliquer des mécanismes de trans-différenciation stricte [97], de reprogrammation transitoire (dé-différenciation/re-différenciation) [98], ou alors pourraient être le fait de différentes sous-populations de cellules progénitrices au sein de l'hétérogénéité inhérente aux cultures de CSM [99]. Cependant, ces observations n'étant pas systématiques, l'ISCT a décidé de ne pas les inclure dans la définition faite des CSM.

Afin de réconcilier les résultats obtenus en culture avec la physiologie réelle des CSM *in vivo*, des études ont bien sûr été menées sur des modèles animaux. Le défi principal a d'abord été de nature technique, car des marqueurs permettant un suivi des cellules à long terme après implantation *in vivo* n'ont pas toujours été disponibles. À ce jour, les méthodes utilisées sont la bioluminescence (utilisation de CSM transformées pour exprimer la luciférase), la fluorescence (marquage chimique ou expression de la GFP), les marquages aux radionucléides (suivis par scintigraphie, TEP ou TEMP), et l'IRM (cellules marquées avec des nanoparticules super-paramagnétiques d'oxyde de fer) [100]. Le principal avantage des méthodes utilisant des CSM transformées est de pouvoir les suivre au cours de leur division. Cependant, ces modifications peuvent impacter le comportement cellulaire et sont peu résolutive. En général, les conclusions principales doivent être confirmées *ex vivo* par des analyses d'échantillons tissulaires (PCRq, cytométrie, histologie).

L'implantation plus ou moins durable des CSM et leur différenciation en aval ont été constatées sur des modèles animaux après induction d'un phénotype pathologique marqué. Les différents mécanismes de réparation tissulaire observés sont la différenciation des CSM (ex : en adipocytes et fibroblastes chez des souris immunodéficientes [101]), leur trans-différenciation (ex : en myoblastes et cellules endothéliales dans un modèle porcin d'infarctus du myocarde [102], en cellules hépatocytaires dans un modèle de cirrhose fibreuse chez la souris [103]), voire même leur fusion cellulaire hétérotopique (ex : fusion de CSM humaines avec des neurones de Purkinje de rat atteint d'encéphalomyélite auto-immune expérimentale [104]). Ces exemples sont issus de suivi *in vivo* pouvant aller de 22 jours jusqu'à 17 mois après l'injection des CSM.

Cependant, de multiples études montrent que la greffe de CSM est quantitativement très limitée à long terme [105, 106]. Une grande partie des cellules injectées par intraveineuse est d'abord retenue par les poumons [107], puis éliminée au niveau des reins et de la rate [108]. Par ailleurs, les cellules arrivant tout de même au niveau des lésions grâce au chimiotactisme, ou celles injectées par une voie alternative (directement au niveau du site de la lésion, par voie artérielle ou péritonéale), ne

s'implantent pas ou très peu (moins de 1% de chimérisme donneur/receveur, éventuellement dû au rejet immunitaire [109]). Cette faible implantation tend à démontrer que les CSM ne remplacent pas les cellules nécrotiques ou apoptotiques, mais pourraient plutôt avoir un effet thérapeutique grâce à leurs sécrétions de facteurs trophiques et immunomodulateurs (voir ci-dessous). D'ailleurs, certaines expériences ont montré que, après injection sous-cutanée sans matériau de support (ou *scaffold*) de CSM préalablement différenciées en chondrocytes, ces cellules ne persistaient pas dans cet état, mais se différenciaient et reformaient alors un semblant de stroma de la niche hématopoïétique [110].

b- Trophisme et immunomodulation

Bien avant la découverte des capacités de différenciation des CSM, ces dernières ont été utilisées comme cellules nourricières (*feeder cells*) pour la culture de CS hématopoïétiques, dans l'idée de recréer la niche de la moelle osseuse [111, 112]. Il a d'ailleurs été montré depuis qu'une communication complexe existait dans la moelle osseuse, des fibres adrénergiques* vers les CSM et les CSH, afin de maintenir à l'équilibre ces deux populations *in vivo*, validant par la même ce concept de niche [113]. De plus, suite aux constats que les CSM ne s'implantaient pas durablement après injection (voir ci-dessus) et que leur clairance[†] pouvait être extrêmement rapide (ex : disparition complète après 24 h au niveau du cerveau) [114], le concept de CSM en tant que cellules de soutien a repris une place centrale. En effet, alors que l'état de santé de plusieurs modèles animaux et quelques patients s'est amélioré après une ou plusieurs infusions de CSM, un remplacement massif de cellules lésées n'a jamais été observé. Leur rôle physiologique serait donc régulateur et non pas celui d'un réservoir de CS. L'effet des CSM après injection *in vivo* reposerait en fait majoritairement sur leur sécrétome selon 3 grands mécanismes : les facteurs trophiques, l'immunomodulation et l'exocytose (figure 12).

La sécrétion par les CSM de facteurs trophiques serait un élément important de régulation des microenvironnements où elles sont localisées, du fait de la capacité de ceux-ci à recruter des cellules souches ou progénitrices tierces en favorisant leur prolifération et différenciation tout en limitant leur apoptose. Il a été démontré que l'injection de CSM dans un modèle d'ischémie du membre inférieur améliorerait la revascularisation en stimulant la prolifération des cellules endothéliales et musculaires lisses par la sécrétion de facteur de croissance de l'endothélium vasculaire (VEGF) et de FGF2, et ce, sans incorporation des CSM murines dans les vaisseaux [115]. De même, la greffe transitoire de CSM allogéniques au niveau de plaies permet le recrutement de CSM endogènes, qui deviennent alors

*. Fibre nerveuse libérant de l'adrénaline ou une substance apparentée

†. Capacité d'un tissu à débarrasser d'une substance donnée par unité de temps.

les réelles actrices de la fermeture de la lésion cutanée par la sécrétion prolongée de facteurs tels que la protéine Wnt3a, le VEGF et le récepteur au facteur de croissance dérivé des plaquettes (PDGF) [116]. L'injection de CSM n'est d'ailleurs pas nécessairement indispensable à l'obtention d'un effet thérapeutique. En effet la simple infusion de milieu conditionné issu de culture de CSM s'est révélée pouvoir limiter les lésions hépatiques en diminuant de 90 % la proportion d'hépatocytes en apoptose tout en augmentant leur prolifération par trois [117]. Des expériences similaires, dans le cadre de lésions pulmonaires bactériennes, ont comparé l'injection de CSM à celle de milieu conditionné. Ces deux traitements ont provoqué une réduction équivalente de l'œdème induit sur des poumons humains *ex vivo*. Cette amélioration a pu être reliée à une restauration de canaux de transport actif de sodium des cellules épithéliales alvéolaires, restauration induite en partie par la présence de facteur de croissance des kératinocytes (FGF7) issu des CSM [118].

Le secrétome des CSM ne se limite pas aux facteurs trophiques, une grande part a aussi un rôle dans la régulation des réponses immunitaires et inflammatoires. Ces capacités furent tout d'abord établies *in vivo* dans le cadre d'un essai clinique visant à limiter les rejets de greffe de moelle osseuse par injection de CSM. Ces résultats furent considérés comme impressionnants de par la complète suppression de la réaction immunitaire excessive de certains patients atteints de maladie du greffon contre l'hôte (GvHD) [119]. Les mécanismes moléculaires de cette immunosuppression ont été inférés à partir d'expériences *in vitro* en coculture, expériences qui ont souligné aussi bien l'importance des facteurs paracrines (figure 13) que des contacts membranaires de cellule à cellule dans la régulation de la réponse immunitaire par les CSM [120].

Les CSM ont également été caractérisées comme des "gardiens" de l'inflammation. La réaction inflammatoire est un processus aspécifique de protection du corps. Lorsque celle-ci est aiguë, elle entraîne dans la zone touchée une vasodilatation *, un œdème † et déclenche la diapédèse leucocytaire ‡. Lorsque l'inflammation est régulée, elle élimine le symptôme lésionnel et rétablit la fonction tissulaire, alors que, dans le cas contraire d'une inflammation excessive, elle peut endommager les tissus, les remplacer par un tissu cicatriciel fibreux non fonctionnel et générer des douleurs chroniques. Le rôle des CSM au sein de ce processus multicellulaire complexe serait de réguler les macrophages par la sécrétion de prostaglandine E2 (PGE2), de protéine du gène 6 stimulée par le TNF (TSG-6) et de l'IL-1ra (antagoniste du récepteur de l'interleukine 1), inhibant ainsi la cascade de cytokines

*. Augmentation de l'apport sanguin.

†. Dilution des toxines et limitation du foyer inflammatoire.

‡. Recrutement de phagocytes et éventuellement de la réaction immunitaire.

pro-inflammatoires dont sont responsables les macrophages [121]. Cependant, ce phénotype serait dépendant de la concentration dans l'environnement de molécules pro-inflammatoires comme l'IFN- γ , le TNF α et divers ligands TLR. Au contraire, si ces derniers sont à un niveau faible, les CSM favoriseraient alors la réponse inflammatoire par la sécrétion de chemokines* visant à recruter plus de lymphocytes et à protéger les neutrophiles de l'apoptose [120]. Cet équilibre des mécanismes d'activation des CSM (ou *licensing*) pourrait, en partie, expliquer certains résultats contradictoires obtenus *in vivo* quant aux facultés des CSM à promouvoir ou défavoriser les réactions infectieuses et les formations néoplasiques [122, 123]

En dehors des sécrétions de molécules trophiques et immunomodulatoires, la dernière découverte est celle de l'aptitude des CSM au transfert d'exosomes. Ces vésicules peuvent, dans certains cas, contenir des mitochondries et servent à compenser les pertes survenues au sein d'autres cellules lors d'une baisse de l'oxygénation des tissus. En effet, les mitochondries sont en général endommagées par une ischémie prolongée, et, lors de la reperfusion des tissus, elles n'ont alors plus la capacité de réduire l'oxygène, entraînant ainsi une formation importante d'espèces réactives de l'oxygène (ROS ou radicaux libres) [124]. Les CSM peuvent alors transférer une partie de leurs propres mitochondries et ainsi restaurer la fonctionnalité du tissu sur le long terme (45 passages) [125]. Ce mécanisme n'intervient toutefois que lors d'une perte quasi totale des capacités réductrices des cellules, et non dans le cas de maladies mitochondriales génétiques [126]. Le mécanisme d'exocytose des CSM n'est pas uniquement déclenché dans ce cadre et les exosomes peuvent aussi contenir des quantités importantes de protéines, notamment d'enzymes impliquées dans le métabolisme énergétique et plus de 200 protéines régulatrices de l'immunité [127], ainsi que de multiples micro-ARN [128].

Ces nombreux exemples de régulations ont conduit à envisager des traitements sans cellules. L'utilisation de milieux conditionnés dans un premier temps permettrait une compréhension plus poussée des molécules et des phénomènes impliqués pour ensuite obtenir une production de ces facteurs solubles indépendamment des CSM. Cependant, quelques considérations sont à prendre en compte. Tout d'abord, plusieurs de ces molécules ont déjà été caractérisées et ne sont pas attractives en thérapie, soit parce que leur impact, quand elles sont isolées, est très limité (ex : IL-1ra), soit que leur demi-vie est très courte une fois injectées (ex : NO, IDO, PGE2). Par ailleurs, l'action synergique de ces facteurs, notamment ceux trouvés à l'intérieur des exosomes, pourraient expliquer les effets systémiques des CSM, malgré leur peu de persistance dans le corps humain. La balance complexe des

*. Cytokines chimiotactiques qui contrôlent les motifs de migration et le positionnement des cellules immunitaires.

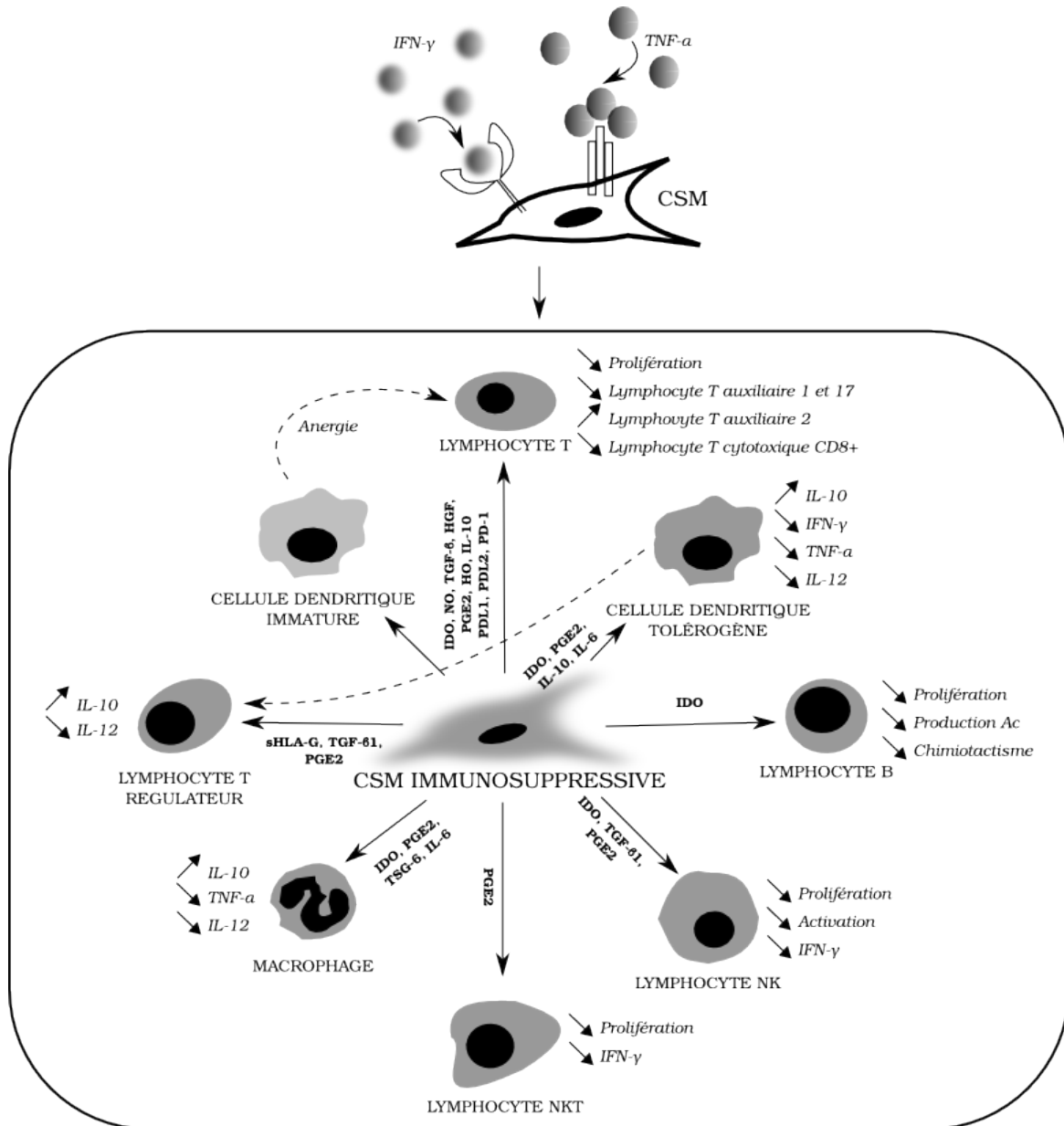


FIGURE 13 – Mécanismes d’immunosuppression par les CSM ; adapté de Gazdic *et al.*, 2015 [120]
 (HGF : facteur de croissance des hépatocytes, HO : hème oxygénase, IDO : indoleamine 2,3-dioxygénase, IFN : interféron, IL : interleukine, NK : natural killer, NKT : natural killer T, NO : monoxyde d’azote, PD-1 : programmed cell death protein 1, PDL : programmed death-ligand, PGE2 : prostaglandine E2, sHLA-G : protéine soluble du complexe majeur d’histocompatibilité-G, TGF : facteur de croissance transformant, TNF : facteur de nécrose tumorale, TSG-6 : protéine du gène 6 stimulée par le TNF)

mécanismes d'activation des CSM *in vivo* et l'éventail important des réponses cellulaires observées poussent donc à envisager ces cellules comme véritables "pharmacies ambulantes" du corps humain, capables de s'adapter à différentes lésions et à leur gravité [129]. Certaines équipes ont même mis en avant la notion de "cartouche magique" concernant les CSM, du fait de leur adaptation à une aussi importante quantité de pathologies. Toutefois, au vu des multiples débats encore en cours, certains chercheurs en ont appelé au contraire à la prudence, en militant pour la limitation des essais cliniques tant que l'identité et les rôles fondamentaux des CSM ne sont pas plus nettement caractérisés.

RÉSUMÉ

- Les CSM sont une population cellulaire mal caractérisée, aussi bien concernant leur identité *in vivo* que leur mode d'action physiologique.
- En conséquent, les CSM *in vitro* constituent des populations cellulaires hétérogènes faiblement comparables entre laboratoires en fonction des méthodes de préparation.
- Obtenir un procédé d'amplification robuste, notamment en matière de quantité et qualité des CSM, sans connaître les caractéristiques d'origine des cellules ni leur utilisation finale, peut s'avérer difficile.
- La recherche sur les CSM à usage thérapeutique en est donc à ses débuts.

3 Procédés d'amplification des CSM

L'identité des CSM *in vivo* et leur mode d'action thérapeutique sont deux problématiques non résolues qui ont pourtant un impact radical sur la chaîne d'étapes unitaires allant du prélèvement initial des cellules, en passant par leur amplification *in vitro*, vers le malade receveur.

En effet, en prenant une approche descendante du malade vers la cellule, le mode d'action thérapeutique va décider de paramètres cliniques comme le lieu, la dose d'injection et sa fréquence éventuelle, ainsi que les caractéristiques cellulaires requises pour avoir une action thérapeutique. À ce jour, les doses utilisées vont de $15 \cdot 10^6$ à $6000 \cdot 10^6$ cellules par patient [45]. Par exemple, les doses utilisées pour les essais cliniques du traitement de la GvHD sont de $2 \cdot 10^6$ cellules par kilogramme avec 8 injections par mois, et ce traitement est répété en cas de réponse positive [130]. Dans le cadre de l'ingénierie tissulaire, des constructions en soie de 1350 mm^3 ont été réalisées en laboratoire avec $4 \cdot 10^6$ CSM afin de réparer des lésions du ligament croisé antérieur sur des modèles porcins [131], ce qui est à mettre en relation avec la taille du ligament humain qui est d'environ 2150 mm^3 [132].

À l'inverse, l'identité des CSM est déterminée par des paramètres tels que la source de prélèvement et la méthode d'isolement des cellules. La source de prélèvement est un facteur clef pour de multiples raisons : les caractéristiques physiologiques du/des donneurs (âge, sexe, pathologie), la facilité d'accès chirurgical à l'organe, la quantité qui peut en être prélevée de manière sûre et la fréquence des CSM dans ce tissu (tableau 5) vont fixer les quantités initiales de matériel biologique. Or, ces cellules sont rares (ex : fréquences moyennes de 0,01 à 0,001 % dans la moelle osseuse [53]), et certaines sources sont limitées dans le temps (ex : tissus périnataux). En dehors de la disponibilité des CSM dans le corps humain, la méthode d'isolement peut encore réduire la quantité de matériel biologique obtenu (ex : 40 à 80% des extractions de CSM à partir de sang de cordon ombilical échouent [133]). Mais surtout, l'isolement des CSM à partir d'une biopsie implique la purification d'une population cellulaire sur des caractères phénotypiques (marqueurs de surface, taille, adhérence) qui vont définir le comportement de cette population cellulaire en aval, notamment en matière de capacité de croissance et d'activité médicamenteuse.

La confrontation de ces deux approches a conclu à la nécessité d'une phase d'amplification *in vitro* des CSM. Bien que le matériel cellulaire initial et sa finalité répondent à des définitions mouvantes, de nombreuses recherches ont été entreprises pour mettre au point des procédés d'amplification des CSM. Ces procédés doivent tenir compte, à la fois des caractéristiques intrinsèques des cellules et des

critères requis pour le développement de thérapies cellulaires (quantité, qualité, sécurité sanitaire, coût). Ils doivent donc répondre à des exigences spécifiques non requises en procédés de culture de lignées cellulaires continues :

- Les CSM sont adhérentes-dépendantes et leur procédure de récolte en fin de procédé doit être non destructive.
- Les CSM ayant une croissance lente et limitée, toute la chaîne de procédés du donneur au receveur doit être intensifiés pour atteindre les doses requises et un coût raisonnable des traitements cellulaires.
- Le procédé d'amplification cellulaire ne doit pas remettre en cause les caractéristiques biologiques des cellules au cours du temps.

3.1 Systèmes de culture de cellules adhérentes

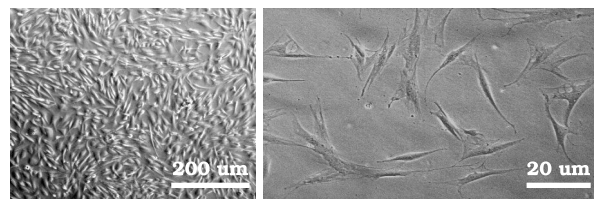
Du fait de leur définition, les CSM sont des cellules adhérentes, comme la plupart des cellules primaires. En effet, afin de préserver leurs caractéristiques, elles requièrent des points d'accrochage semblables à ceux qui sont trouvés dans leur micro-environnement naturel, le mésenchyme*.

Il existe deux systèmes d'adhérence cellulaire : l'un, non spécifique, est principalement occasionné par des interactions électrostatiques [134, 135], l'autre varie selon le type cellulaire, et se fonde sur la présentation d'intégrines au niveau de la membrane (une dizaine ont été identifiées pour les CSM [136]). Ce second système se met en place selon 4 étapes. Tout d'abord, l'attachement cellulaire consiste à former un lien entre quelques intégrines transmembranaires et les molécules de la MEC (collagènes, fibronectine, laminine, vitronectine, etc). Ces contacts vont permettre la phase d'étalement cellulaire durant laquelle la cellule va étendre sa membrane et multiplier ainsi les interactions intégrines-MEC. Ces signaux vont entraîner la réorganisation du cytosquelette (microtubule, filament d'actine, filament intermédiaire), puis la formation d'adhésions focales, qui sont les points d'ancrage de la cellule à la MEC. Les adhésions focales consistent en un regroupement de plus d'une cinquantaine de molécules avec plusieurs intégrines, et de nombreuses autres molécules transmembranaires et cytosolique (tetraspanines, récepteur aux facteurs de croissance, syndécans, lipides, tensine, taline, vinculine, paxilline, et kinase de l'adhésion focale) [137].

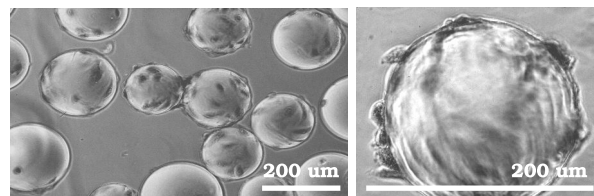
*. tissu dérivé du 3e feuillet embryonnaire (mésoderme) à l'origine des différents tissus conjonctifs, des muscles lisses, du muscle cardiaque, des vaisseaux, des monocytes et des histiocytes.

L'adhérence cellulaire ne se réduit donc pas à un simple système d'ancrage, mais est un point de communication crucial de la cellule avec son environnement, des centaines de voies intracellulaires différentes pouvant être déclenchées. C'est le remodellement continu du cytosquelette en réponse à des facteurs extérieurs qui va permettre de distinguer une cellule morte par anoïkose (apoptose par défaut d'adhérence) d'une vivante, les deux pouvant toujours être physiquement accrochées à un support [138, 139]. Un domaine entier de recherche, la mécanobiologie, se consacre à l'étude de l'effet des surfaces d'adhérence sur la réponse cellulaire, en fonction des propriétés physicochimiques (charge, hydrophobicité) et mécaniques (élasticité, rigidité, porosité) des surfaces [135]. Dans le cadre des CSM, ces études ont comme objectif, pour l'instant, d'orienter les cellules vers une voie de différenciation et sont peu ciblées sur leur amplification [140]. Les systèmes de cultures utilisés sont donc principalement adaptés de systèmes classiques (figure 14). Les systèmes planaires sont les plus répandus, mais divers systèmes 3D sont aussi utilisés.

Culture planaire



Culture sur microporteurs



Culture en agrégats

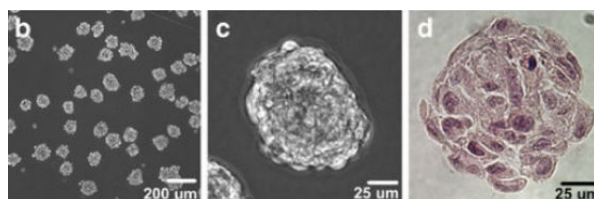


FIGURE 14 – Organisation spatiale des CSM en culture : morphologies en microscopie photonique (les photographies d'agrégats sont tirées de Baraniak *et al.*, 2012 [141])

Système de cultures planaires. Les systèmes de cultures classiques des CSM utilisent des surfaces planes traitées pour l'adhérence. Ces traitements consistent à optimiser la chimie des matériaux utilisés pour favoriser les phases d'adhérence et d'étalement des cellules en vue d'obtenir une meilleure

prolifération. Les cultures de routines sont effectuées en très grande majorité sur des surfaces plastiques à usage unique, et non plus sur des surfaces en verre réutilisables. Le traitement de ces surfaces par plasma (gaz ionisé) permet d'obtenir du polystyrène oxydé [142]. Pendant la phase initiale d'adhérence, les cellules établissent un lien électrostatique non spécifique avec ces surfaces chargées. En vue de permettre un étalement et donc une adhérence covalente forte des cellules, ce sont surtout les protéines de la MEC, contenues dans le sérum, qui doivent se lier au plastique. Ces protéines vont former une couche intermédiaire entre le plastique et la cellule. La force du lien entre la surface, les protéines de la MEC et la cellule est extrêmement importante (figure 15). En effet, ce n'est pas le simple fait que ces protéines soient liées qui détermine la survie cellulaire, mais bien la tension que va ressentir la cellule par l'intermédiaire de ses points focaux d'adhérence (lien intégrines-cytosquelette) [138].

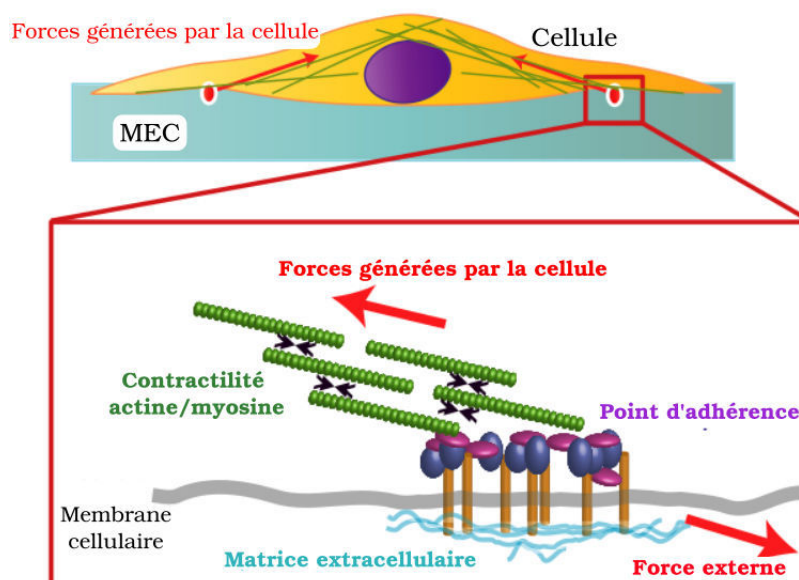


FIGURE 15 – Schéma des forces générées par les cellules et la matrice extra-cellulaire au niveau des points d'adhérence (adapté de Ladoux *et al.*, 2012 [138])

Les variations de rigidité des surfaces d'adhérence influencent aussi grandement la différenciation des CSM, et de nombreuses études ont été entreprises pour développer des biomatériaux adéquats [143]. Toutefois, dans le cadre plus limité de l'amplification de ces cellules, les recherches actuelles se centrent plutôt sur la mise au point de polystyrène fonctionnalisé permettant de favoriser l'adhérence des CSM cultivées en milieux sans sérum. En effet, l'utilisation de milieux sans sérum est un axe de développement important pour la culture de cellules souches afin d'éviter les risques sanitaires de transmission de l'encéphalopathie spongiforme bovine (ESB) et limiter les variabilités de lots [144]. Or,

pour l'instant, les procédures utilisant ces milieux nécessitent de traiter préalablement les surfaces avec des solutions de protéines purifiées de la MEC (extraites à partir de tissus, de produits sanguins ou de productions de protéines recombinantes) [145]. Afin d'éliminer toute source d'origine animale, mais aussi de limiter une étape très coûteuse (en temps, en risques et en matières premières), le recours à des matériaux synthétiques biocompatibles est maintenant envisagé. Par exemple, les polystyrènes sont fonctionnalisés pour présenter aux cellules des motifs d'acides aminés reconnus par les intégrines, le plus courant étant le motif arginine-glycine-acide aspartique (RGD) [146].

Les systèmes planaires n'autorisent qu'une amplification limitée des cellules, car, au delà d'une certaine concentration surfacique, les CSM s'orientent vers une voie de différenciation [147], ou vers une apoptose induite par les inhibitions de contact entre cellules [148]. L'aire de la surface d'adhérence et la densité d'ensemencement doivent donc être prises en compte avec soin afin de limiter le nombre de passages* des cellules. En effet, les traitements, enzymatiques (ex : trypsine) ou mécaniques, permettant ce décrochage, déclenchent un arrêt temporaire de la croissance et diminuent les capacités thérapeutiques des CSM [149]. De plus, chaque passage expose la culture à des risques importants de contaminations. C'est pourquoi divers systèmes de culture tridimensionnels ont été proposés dans le but d'optimiser le rendement cellulaire des CSM, limiter le nombre de passages, limiter le nombre d'étapes de montée en échelle et faciliter les procédures de récolte.

Systèmes de cultures tridimensionnels. Les systèmes de cultures tridimensionnels utilisés pour la culture de CSM sont au nombre de cinq avec, par ordre d'importance dans la littérature : la culture sur microporteurs, au sein d'une matrice, en agrégats cellulaires, avec cellules encapsulées ou au sein d'hydrogel.

- Les microporteurs sont de petites particules, de 100 à 500 μm , en majorité sphérique, utilisées pour la culture de cellules adhérentes au sein de bioréacteurs à cuves agitées (ex : production virale à partir de cellules Vero). L'utilisation de microporteurs pour la culture de cellules adhérentes date des années 70 et a initialement été adaptée à partir de billes de chromatographie Sephadex [150]. La nature chimique des microporteurs et leur biocompatibilité ont depuis été améliorées, et il existe maintenant un certain recul sur les problématiques qui peuvent émerger lors de leur utilisation en bioréacteurs agités (figure 18). Les caractéristiques des microporteurs commerciaux utilisés pour la culture de CSM sont décrites dans le tableau 6.

*. Transfert sur une nouvelle surface après décrochage et dilution.

Le matériau du microporteur détermine sa charge et sa porosité, ces paramètres ayant un impact majeur sur l'adhérence des cellules à la particule. Plusieurs études ont comparé différents microporteurs lors de culture de CSM, avec des résultats contradictoires [151–155]. En effet, les performances observées en terme d'adhérence initiale ou de croissance, peuvent être influencées, d'une part, par le milieu dans lequel les cellules sont cultivées [156], et d'autre part, par l'enrobage du microporteur (ex : gélatine, fibronectine, solution d'enrobage commercial...). Il faut noter que l'enrobage issu de dérivés animaux est maintenant déconseillé en raison des risques sanitaires. De plus, les paramètres de taille, porosité et densité du microporteur, ainsi que ceux d'ensemencement (nombre de cellules par microporteur, nombre de microporteurs par unité de volume), vont avoir des conséquences sur leur comportement en tant que particules lors de l'agitation. En effet, la mise en suspension de ces microporteurs engendre des contraintes hydrodynamiques différentes de celles d'une culture statique, ce qui va avoir un impact sur le cellules (ex : cisaillement, chocs entre microporteurs...) [157, 158].

L'intérêt majeur des microporteurs est de minimiser le ratio volume de milieu au regard de l'aire de la surface d'adhérence. Par exemple, 4 g de microporteurs Cytodex 1 dans 1 L de milieu développent une surface équivalente à 100 boîtes de culture T175 (*i.e.* 3,5 L). Lors du développement de l'étape d'amplification d'une thérapie cellulaire, leur utilisation est donc considérée comme l'option la plus fiable en terme de gestion des coûts [159]. Les microporteurs, développés initialement pour la production de biomolécules n'ont cependant pas été conçus dans l'optique de récolter efficacement les cellules sans les endommager [155, 160, 161]. Pour leur application en culture de CSM, de nouvelles formes de microporteurs ont été proposées, notamment à base de polymères dont l'état physique varie en fonction de la température [162, 163]. En ingénierie tissulaire, l'utilisation de cellules accrochées sur microporteurs est aussi envisagée, grâce à des microporteurs biodégradables [164, 165], ou en tirant avantage des tendances à l'agrégation des cellules entre microporteurs pour construire un tissu [166]. Cependant, pour augmenter la croissance des cellules, l'obtention de ces agrégats est contre-indiquée [167].

- Les matrices (ou *scaffold*) sont utilisées en ingénierie tissulaire, et prennent donc le parti de recréer un environnement tridimensionnel complexe favorisant les contacts cellules-cellules grâce à la construction d'un réseau poreux ou fibreux. Les matériaux utilisés pour créer ces réseaux matriciels peuvent être de la matrice extra-cellulaire (MEC) naturelle, des dérivés de MEC [168] ou des biomatériaux synthétiques [143].

TABLEAU 6 – Caractéristiques des microporteurs commerciaux utilisés pour la culture de GSM

Nom commercial	d_{mp} (μm)	S ($\text{cm}^2/\text{g sec}$)	Nombre par g sec	Caractéristique de la surface	Matériau	Charge électrique	Facteur de gonflement	Densité (g/mL)	Fournisseur
Cytodex 1	147-248	4400	$6,8.10^6$	Micro poreuse	Dextran-DEAE réticulé	Positive	18	1,03 (en NaCl 0,9%)	GE Healthcare
Cytodex 3	141-211	2700	$4,0.10^6$	Micro poreuse enrobé de collagène dénaturé	Dextran-DEAE réticulé	Neutre	14	1,04	GE Healthcare
Collagen	90-150	480	nt	Lisse enrobé de gélatine	Polystyrène modifié	Neutre	0	1,02	Solohill
Fact III	90-150	480	nt	Lisse enrobé de gélatine cationique	Polystyrène modifié	Positive	0	1,02	Solohill
HilleXII	160-200	515	nt	Lisse avec greffage de Triéthylammonium	Polystyrène modifié	Positive	0	1,090-1,150	Solohill
Glass-coated	125-212	360	$4,6.10^5$	Lisse avec greffage de silice	Polystyrène réticulé	Partielle (+/-)	0	1,022-1,030	Solohill
ProNectinF	125-212	360	$4,6.10^5$	Lisse avec greffage de motifs RGD	Polystyrène réticulé	Partielle (+/-)	0	1,022-1,030	Solohill
Plastic	125-212	360	$4,6.10^5$	Lisse	Polystyrène réticulé	Neutre	0	1,022-1,030	Solohill
Plastic +	125-212	360	$4,6.10^5$	Lisse	Polystyrène réticulé	Positive	0	1,022-1,030	Solohill
CultSpher-G	130-380	2500	$3,45.10^4$	Macroporeuse	Gélatine	Neutre	4	1,02	Percell Biolytica AB
CultSpher-S	130-380	7500	nt	Macroporeuse	Gélatine	Neutre	nt	1,02	Percell Biolytica AB

(sources : notice technique des fournisseurs, d_{mp} : distribution des diamètres des microporteurs, S : surface spécifique, nt : non transmis, RGD : Arginine-Glycine-Acide aspartique)

Les matrices naturelles de MEC sont obtenues à partir de tissus cadavériques, humains ou animaux, décellularisés [169]. Les matrices dérivées de produits naturels peuvent être extraites à partir de tissus ou de culture cellulaire pour obtenir du collagène, de la gélatine, de la fibrine, ou des extraits de membrane basale (ex : Matrigel de BD Biosciences). Ceci permet de recréer une matrice aux caractéristiques plus contrôlées, notamment en variant la concentration en collagène et en solutés ioniques [170]. Les matrices dérivées de produits naturels peuvent aussi être obtenues à partir d'algues (alginate) [171], de coquillages (chitosane) [172], et de vers à soie [131]. Cependant, ces dernières doivent être fonctionnalisées (ou traitées avec des biomolécules) car, comme les matrices issues de biomatériaux synthétiques, elles ne présentent pas de motif d'accrochage pour les cellules humaines. Les matériaux biodégradables synthétiques développés pour les matrices d'ingénierie tissulaire peuvent être composés de polyester comme le polycaprolactone (PCL) avec ou sans nanohydroxyapatite (PCL-nHA) [173] ; de matériau cristallin comme le graphène [174] ou la céramique [175] ; de polymères plus ou moins complexes composés d'acide polylactique (PLA) [176], de polygalactin-910/polydioxanone (PGD) [177], de poly-benzyl-L-glutamate (PBLG) [178], d'acide poly(L-lactic-co-glycolic)-poly(L-lactic-co-ε-caprolactone) (PLGA-PLCL) [179], de polypropylène (PP) ou de polyamide comme le nylon-6 [180], etc.

Pour assurer l'homogénéisation du milieu, les bioréacteurs de culture de CSM sur matrice mettent en œuvre, soit une agitation du milieu alors que la matrice est fixée (à petite échelle), soit, une perfusion continue de milieu au travers de la matrice. Influencées par la nature de la matrice et le flux laminaire de la perfusion, les phases d'amplification et de différenciation des CSM sont alors concomitantes. Il existe aussi des bioréacteurs spécialisés permettant la mise en œuvre de traction-torsion, de tension, ou de pression, dans lesquels la phase de différenciation est déclenchée par une application contrôlée de ces stimuli physiques sur la matrice [181].

- Les agrégats, aussi appelés sphéroïdes, sont des amas cellulaires générés par une population très concentrée de CSM (pour favoriser les contacts cellulaires) soumise à des conditions défavorables à l'adhérence surfacique (surface non-adhérente, addition de surfactant, technique de la "goutte suspendue", centrifugation) [182]. La mise en œuvre d'une culture d'agrégats est un procédé dynamique en trois étapes : contacts cellule-cellule initiaux, synthèse de MEC et réorganisation des agrégats. Leur formation initiale est rapide et prend de 12 à 24 h. Les cellules forment entre elles des jonctions adhérentes par l'intermédiaire des molécules d'adhésion cellulaire (CAM) (ex : cadhérine, connexine). Elles vont alors synthétiser leur propre MEC

(particulièrement du collagène de type I) et ainsi participer à la stabilisation et la compaction de l'agrégat via leur système intégrine [183]. Ainsi, le diamètre d'un même agrégat de CSM peut diminuer de 600 à 300 μm sur 21 jours [184]. Ces changements requièrent une grande adaptation du cytosquelette. C'est pourquoi le phénotype des cellules au sein d'un même agrégat ne sont pas homogènes, les cellules internes ne sont pas en tension et présentent une morphologie ronde, alors qu'au contraire les CSM externes sont très étalées.

L'organisation des cellules au sein d'un agrégat est donc totalement différente de celle observée sur des surfaces. En effet, les CSM deviennent plus petites, expriment moins certains marqueurs de surface (mais de manière réversible), et ont une expression génique fortement modifiée de certains transcrits liés à la régulation du cytosquelette et à la synthèse de la MEC [185]. Par ailleurs, la culture de CSM en agrégats a été de multiples fois démontrée plus favorable au maintien de leur viabilité et de leur potentiel thérapeutique. Comparées aux mêmes cellules cultivées sur des surfaces planes, les CSM en agrégats sécrètent plus de facteurs anti-nécrotiques [186, 187] et anti-inflammatoires [188], et augmentent leur potentiel de différenciation [141, 189].

Les procédés de culture de CSM en agrégats sont en majorité identiques à ceux utilisés pour la culture de cellules en suspension (bioréacteur à cuve agitée ou à vague), même si des systèmes de culture à lit tournant ont aussi été mis au point [185, 186]. Le bioréacteur à lit tournant (aussi appelé, en fonction des montages, réacteur à microgravité ou réacteur Couette) est constitué d'un ou de deux cylindres horizontaux tournant et favorisant l'application d'un écoulement laminaire sur les cellules. Ce système fournit un environnement physique propice à l'obtention d'agrégats homogènes [190].

L'un des points limitants de la culture de CSM en agrégats, quel que soit le type de géométrie, est leur initiation à grande échelle sans provoquer l'apoptose d'une majorité des cellules [191]. En dehors de cette phase initiale d'anoïkose, il a aussi été suggéré que des limitations diffusionnelles (oxygène et nutriments) pouvaient apparaître au sein des agrégats et induire l'apoptose [188]. Cependant, il a été démontré depuis que cet impact est limité, l'apoptose des CSM en agrégats étant plus probablement due à un changement de dynamique des filaments d'actines entraînant des altérations des fonctions mitochondriales des cellules [192]. Ces problématiques font que la culture en agrégats est limitée pour l'instant à des volumes restreints. Néanmoins, cette méthode est en voie d'étude et de développement [182, 187, 193], car son avantage majeur réside dans la facilité de récolte des cellules par simple filtration du milieu de culture, les agrégats étant alors

utilisés en l'état (essais effectués sur des modèles murins de blessures [186, 187]).

- L'encapsulation et la culture en hydrogel sont des méthodes de culture adhérente intermédiaire entre les cultures sur microporteurs, sur matrice et en agrégats. Les cellules sont enfermées dans des billes sphériques ou des blocs de gel constitués d'un matériel biocompatible. Elles sont donc cultivées en suspension [194] ou en perfusion [195]. Cette inclusion permet de limiter les contraintes hydrodynamiques sur les cellules tout en respectant une organisation tridimensionnelle favorisant les contacts et l'induction de la différenciation.

Les hydrogels et billes d'encapsulation peuvent être composés des mêmes polymères naturels que les matrices ; seuls les taux de polymérisation et de gélification changent. Les polymères synthétiques utilisés pour les hydrogels peuvent être, parmi d'autres, du polyéthylène glycol (PEG), de l'alcool polyvinylique (PVA), de l'oxyde de polyéthylène (PEO), de l'acide polyacrylique (PAA), ... [196] Pour permettre l'adhérence des CSM, ils doivent, soit être fonctionnalisés, soit être utilisés avec des extraits de MEC, soit être injectés de microporteurs [197]. Les billes d'encapsulation sont le plus souvent constituées d'alginate ou d'agarose [198]. Elles sont souvent minéralisées pour stimuler la différenciation ostéocytaire (ajout d'hydroxyapatite, de phosphatase alcaline, ou de phosphate de calcium) [199–201].

Les contraintes des procédés d'encapsulation des cellules sont les mêmes que celles mentionnées pour les autres systèmes. Le choix du matériau est central pour permettre l'adhérence des CSM et maintenir leur viabilité, et peut influencer leur phénotype, et ce, en dépit des limitations du transport de masse (diffusion au sein de la capsule) [202]. Maintenues dans des conditions adéquates au sein d'un hydrogel ou de billes d'encapsulation, les CSM présentent des caractéristiques thérapeutiques accrues, les matériaux biocompatibles pouvant être directement utilisés *in vivo* sans étape de récolte des cellules [203].

3.2 Intensification des procédés d'amplification des CSM

Il a été démontré précédemment que le développement d'une thérapie cellulaire basée sur les CSM nécessitait l'intensification des procédés de culture afin de produire les doses de CSM requises en clinique. En fonction de l'indication autologue ou hétérologue choisie, cette intensification du procédé de culture pourra être effectuée, soit en parallélisant des systèmes de culture individualisés (max. 10 L), soit en effectuant une montée en échelle importante en bioréacteurs instrumentés et contrôlés (max.2500 L) [204].

Technologie de bioréacteurs. L'intensification du procédé de culture, de l'échelle du laboratoire à celle d'une production industrielle, peut emprunter différentes techniques en fonction du mode d'adhérence des cellules. Le plus souvent, la configuration du support d'adhérence déterminera, soit, un mode opératoire où le milieu reste statique, ce qui nécessite plus d'opérations manuelles, soit, un mode opératoire dynamique sous agitation mécanique ou hydraulique, permettant le suivi en-ligne ainsi que certains contrôles (taux d'oxygénation, pH, température) et des échanges de liquides. Les bioréacteurs qui pourraient permettre d'atteindre les ordres de grandeur nécessaires à la production de CSM à usage thérapeutique sont décrits dans la figure 16. Les principaux types utilisés sont :

- Les bioréacteurs multicouches : Ils sont la plus simple méthode de montée en échelle pour des cellules adhérentes cultivées sur boîtes. Ils sont composés de plusieurs surfaces planes superposées (jusqu'à 235). Les systèmes disponibles sont : les CellFactory (Nunc), les CellStack (Corning), l'HyperStack (Corning), les modules CellCube (Corning) et l'Xpansion (Pall). Les transferts gazeux sont obtenus par diffusion. La hauteur du milieu par rapport à la surface est le facteur critique pour contrôler cette diffusion. Un taux de transfert d'oxygène jusqu'à $0,53 \text{ mM.cm}^{-2}$ peut être atteint dans ces systèmes [205]. Les deux bioréacteurs multicouches permettant le renouvellement en continu du milieu par perfusion sont les modules CellCube et l'Xpansion (pour lesquels le milieu peut également être enrichi en oxygène dans une boucle extérieure). Les inconvénients majeurs de ces systèmes sont leur coût, notamment au moment de la récolte, le risque important de contamination lors des renouvellements du milieu et le contrôle insuffisant des paramètres de culture.
- Les bioréacteurs à cuve agitée : Ils sont les systèmes les plus utilisés en culture de cellules microbiennes et animales. Ces réacteurs mélangés sont composés d'une cuve cylindrique ou rectangulaire munie d'un système d'agitation orbitale ou pendulaire. L'aération peut être seulement surfacique ou obtenue par bullage direct dans le milieu, en général en dessous du mobile d'agitation. Les caractéristiques de l'écoulement et du taux de transfert gazeux au sein de ces réacteurs sont dépendantes de la géométrie de la cuve et de celle du, ou des, mobiles d'agitation. Ils sont d'ailleurs parfois munis de contre-pales. De nombreux modèles de bioréacteurs agités existent. Pour la culture de cellules animales, les systèmes à usage unique, où la cuve est équipée d'une poche plastique contenant le mobile d'agitation, sont préférés : ils peuvent contenir des volumes de 10 mL (Ambr15, TAP Biosystem) jusqu'à 2000 L (FlexFactory XDR, Xcellerex). L'avantage majeur des bioréacteurs à cuve agitée est leur flexibilité vis-à-vis de leur montée en échelle

grâce aux connaissances accumulées sur leur mise en œuvre depuis le milieu des années 50 [206]. Leur mode d'opération peut se faire en mode non-alimenté, alimenté ou perfusé, permettant ainsi un renouvellement du milieu tout en contrôlant le niveau d'oxygénation des cellules et le pH de la culture. Contrairement aux réacteurs multi-couches, le suivi hors- et en ligne de la culture au cours du temps est facilité.

- Les bioréacteurs à vague : Ces bioréacteurs sont les premiers réacteurs à usage unique à avoir vu le jour en 1999 [207]. Ils sont composés d'une poche plastique simple où l'agitation du milieu est obtenue par une plateforme d'agitation par reversement/bercement et où l'aération est entièrement surfacique. Cette agitation par vagues permet une meilleure aération du milieu qu'en bioréacteur multi-couches et cette méthode d'agitation permet *a priori* de diminuer les contraintes hydrodynamiques sur les cellules. Grâce au développement des capteurs optiques, la mesure et le contrôle en ligne du pH et de l'oxygène sont également possibles. Ces systèmes peuvent accommoder des volumes de 300 mL (Xuri, GE Healthcare) à 500 L (WAVE Bioreactor System 500/1000, GE Healthcare) et permettent l'alimentation des cultures grâce aux balances intégrées dans les plateformes d'agitation. Les connaissances en génie des procédés sont cependant limitées pour ces systèmes.
- Les bioréacteurs à lit tournant : Ils ont été développés par la NASA, en 1992 [208], et sont composés d'un ou deux cylindres tournants autour d'un axe central. Ces systèmes sont perfusés, parfois par l'intermédiaire d'un capillaire central, et équipés des contrôles en ligne usuels. Grâce à la rotation des cylindres, les cellules sont maintenues statiques, en état de chute libre permanent ; c'est pourquoi ces systèmes sont aussi appelés réacteurs à micro-gravité. Ces réacteurs favorisent l'agrégation des cellules adhérentes (libres ou sur microporteurs). Afin de maintenir un état constant en suspension, la vitesse de rotation de cylindres doit être augmentée lorsque la taille des agrégats augmente. Ces systèmes n'ont pas encore pu être adaptés à des échelles supérieures à quelques litres [209].
- Les bioréacteurs à lit fixe : Ils sont composés d'une chambre cylindrique emplies de billes poreuses, d'un échangeur de gaz extérieur connecté à un réservoir de milieu et d'une pompe permettant la circulation de ce dernier dans les différents modules du système. Ce système s'opère donc obligatoirement en mode perfusé et développe très peu de contraintes sur les cellules, ces dernières étant immobilisées au sein des billes. Ces systèmes rencontrent cependant fréquemment des phénomènes de colmatage, montrent des performances limitées en matière de transfert d'oxygène et ne permettent pas le suivi hors-ligne des cellules.

- Les bioréacteurs à fibres creuses : Ils ont été développés depuis les années 70 à partir de module d'ultrafiltration [210]. Ces systèmes sont composés d'un cylindre rempli de multiples capillaires semi-perméables. En général les cellules sont immobilisées dans le compartiment extra-capillaire alors que le milieu oxygéné circule dans le compartiment intra-capillaire. Ces capillaires peuvent avoir des seuils de coupure de l'ordre de 10 à 100 kDa ou être microporeux (0,1 à 0,2 mm) et permettent ainsi les échanges de nutriments et d'oxygène vers les cellules en parallèle d'un renouvellement constant du milieu. Les matériaux utilisés pour les membranes des capillaires sont divers : céramique, polycarbonate de silicone, acétate de cellulose, polypropylène, polysulfone. Ces systèmes ont les mêmes avantages et inconvénients que les bioréacteurs à lit fixe. De plus, des gradients se forment fréquemment au cœur du réacteur, ce qui limite les possibilités de montée en échelle directe. La parallélisation des modules est ainsi préférée.

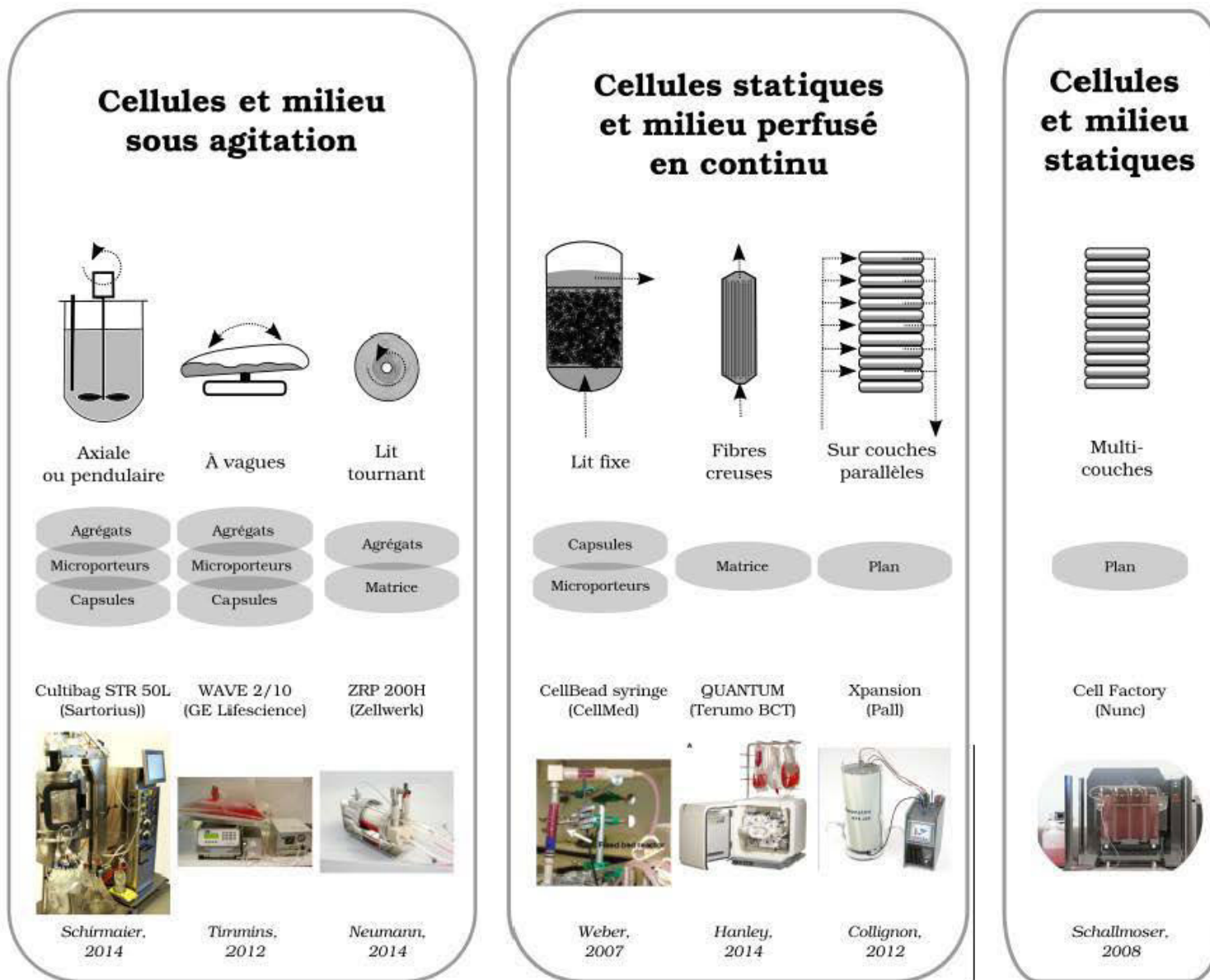


FIGURE 16 – Technologies de bioréacteurs pour l'intensification de l'amplification des CSM en bioréacteurs.

Performances. Quand la culture des CSM est réalisée sur des surfaces planaires à l'échelle du laboratoire, la montée en échelle peut se faire simplement en augmentant de manière linéaire la surface de culture, en utilisant notamment des systèmes multi-couches (ex : Cell Factory de Nunc, Xpansion de Pall). Cependant, ces méthodes, même automatisées avec perfusion de milieu en continu, atteignent leur limite aux alentours de 3-5 millions de cm^2 de surface disponible, correspondant à environ 1 à $4 \cdot 10^{11}$ de cellules par lot [211].

Les réacteurs de culture tridimensionnelle sont de plus en plus étudiés pour dépasser ces seuils. Les performances atteintes à ce jour avec ces procédés, en facteur d'amplification de CSM, sont résumées dans le tableau 7. Il faut cependant noter que ces performances sont difficilement comparables au vu des différences de mise en œuvre : source des cellules, âge biologique (donneur et passage), nature du milieu (avec ou sans sérum), supports d'adhérence, et durée de culture (de 7 à 28 jours). Tous ces paramètres opératoires peuvent avoir un impact majeur sur le taux de croissance des cellules. Les cultures en bioréacteurs à agitation mécanique sont les plus souvent utilisés (tableau 7). En effet, les bioréacteurs à fibres creuses font face aux mêmes limitations de surface que les systèmes planaires, et la montée en échelle des bioréacteurs à lit fixe est limitée [212]. Au contraire, l'extrapolation des bioréacteurs à cuve agitée est plus formalisée par des grandeurs comme le temps de mélange, la vitesse en bout de pale, la puissance dissipée, le transfert d'oxygène, etc. La plus grande échelle de culture atteinte à ce jour est de 35 L, avec des CSM issues de tissu adipeux, le paramètre principal d'extrapolation étant la vitesse minimale de mise en suspension (N_{js}) des microporteurs [213].

Un point commun à ces différentes recherches est la mise en œuvre quasi systématique d'un renouvellement du milieu en cours de culture, rendu aisé grâce à la décantation des microporteurs ou à la fixation des cellules sur une matrice. En général, le milieu de culture est renouvelé ponctuellement tous les 2 à 3 jours de la même façon que pour les systèmes de culture planaires. L'objectif est de maintenir le niveau de glucose, d'éviter l'accumulation de métabolites secondaires et d'apporter des facteurs de croissance. Peu d'études se sont déjà intéressées à la culture de CSM en mode non alimenté [214–217], malgré les informations importantes que peuvent révéler cette mise en œuvre (limitations en carbone, en azote, impact des facteurs de croissance). Quelques essais d'alimentation semi-continue [218, 219] et continue [220] ont aussi vu le jour. Un second point commun, révélateur du fait que la culture de CSM en est à ses prémices, est que la majorité des études sur l'amplification des CSM est restée confinée à des systèmes de culture à petite échelle pour lesquels les régulations peuvent être effectuées en incubateur (pH, aération, température).

TABLEAU 7 – Conditions opératoires et performances quantitatives de l'amplification de CSM en systèmes tridimensionnels (Par : paramètres, Perf : performance en facteur de multiplication des cellules, Alim : alimentation avec ou sans renouvellement du milieu, Réf : référence, en incubateur : *i. e.* réglé à 37° C et 5 % CO₂)

SURFACE D'ADHÉRENCE	RÉACTEUR	ORIGINE DES CSM	PAR. OPÉRATOIRES	PERF.	ALIM.	RÉF.
Synthemax II (Corning) avec rajout à jour 6	STR (VT = 400 mL)	Moelle osseuse	14 jours sans SVF (pH 7,2; 37° C; pO ₂ 20 %)	X 14,5	oui	Cunha <i>et. al.</i> , 2015 [221]
Plastic P-102L (SoloHill) traités à la fibronectine	Spinner (VT = 100 mL)	Moelle osseuse	6 jours sans SVF en incubateur	X 10	oui	Heathman <i>et. al.</i> , 2015 [222]
Cytodex 3 (GE Healthcare)	STR (VT = 0,8 à 2 L)	Moelle osseuse foetale	7 jours à 10 % SVF (pH 7,2-7,3; pO ₂ 30 %)	X 16	oui	Chen <i>et. al.</i> , 2015 [218]
CultiSpher-S (Percell)	Spinner	Gelée de Wharton	16 jours à 10 % SVF en incubateur	X 20	oui	Zhao <i>et. al.</i> , 2015 [223]
Cytodex 1 (GE Healthcare)	STR (VT = 1,5 L)	Cordon ombilical et Membrane amnio- tique	10 jours à 10 % SVF (pH 7,35; pO ₂ 20 %)	X 24 – 32	oui	Hupfeld <i>et. al.</i> , 2014 [224]
PronectinF (SoloHill)	STR (VT = 35 L)	Tissu adipeux	7-9 jours à 5 % SVF (pH 7,2-7,3; 37° C; pO ₂ 20 %)	X 35	oui	Schirmaier <i>et. al.</i> , 2014 [213]
Cytodex 3 (GE Healthcare)	Spinner (VT = 50 mL)	Moelle osseuse	7-10 jours à 15 % SVF en incubateur	X 4	oui	Caruso <i>et. al.</i> , 2014 [225]
Plastic (SoloHill) traités au CellStart CTS®	STR (VT = 0,8 L)	Moelle osseuse et Tissu adipeux	7 jours sans SVF (pH 7,2; pO ₂ 9-20 %)	MO X 7 AD X 3	oui	Dos Santos <i>et. al.</i> , 2014 [220]
CultiSpher-S (Percell)	Spinner (VT = 125 mL)	Moelle osseuse	9 jours à 10 % SVF en incubateur	X 8	non	Yuan <i>et. al.</i> , 2014 [226]
Synthemax II (Corning)	Spinner (VT = 35 mL)	Moelle osseuse	5 jours sans SVF en incubateur	X 7	oui	Hervy <i>et. al.</i> , 2014 [227]
Plastic P-102L (SoloHill)	STR (VT = 2,5 L)	Moelle osseuse	9 jours à 10 % SVF (37° C)	X 6-7	oui	Rafiq <i>et. al.</i> , 2013 [228]
Cytodex 3 (GE Healthcare)	STR (VT = 1 L)	Moelle osseuse foetale	8 jours à 10 % SVF (pH 7,2-7,3; pO ₂ 30 %)	X 12	oui	Goh <i>et. al.</i> , 2013 [151]
CultiSpher-S (Percell)	À vague (VT = 500 mL)	Placenta	7 jours à 20 % SVF (CO ₂ 5 %; O ₂ 5 %)	X 16	non	Timmins <i>et. al.</i> , 2012 [155]
RapidCell glass (MP Biomed.)	STR (VT = 1,68 L)	Lignée MSC-TERT de moelle osseuse	7 jours à 10 % SVF (pH 7,4; 37° C)	X 10	non	Elseberg <i>et. al.</i> , 2012 [214]
Microporteurs poreux à façon formés d'alginate et de DAT	Spinner	Tissu adipeux	14 jours à 10 % SVF en incubateur	nd	oui	Turner <i>et. al.</i> , 2012 [229]
Plastic (SoloHill) traités au CellStart CTS	Spinner (VT = 80 mL)	Moelle osseuse et Tissu adipeux	9 jours sans SVF en incubateur	MO X 18 AD X 14	oui	Dos Santos <i>et. al.</i> , 2011 [152]

Microporteurs

(AD : tissu adipeux; MO : moelle osseuse; nd : non déterminé; SVF : *sérum de veau foetal*; STR : bioréacteur à cuve agitée; TERT : télomerase; VT : volume de travail)

SURFACE D'ADHÉRENCE	RÉACTEUR	ORIGINE DES CSM	PAR. OPÉRATOIRES	PERF.	ALIM.	RÉF.
Cytodex 3 (GE Healthcare)	Spinner (VT = 80-100 mL)	Placenta	9 jours à 20 % SVF en incubateur	X 20	non	Hewitt <i>et al.</i> , 2011 [230]
Cultispher-S (Percell)	Spinner (VT = 250 mL)	Membrane amniotique	8 jours à 10 % SVF en incubateur	X 20	oui	Chen <i>et al.</i> , 2011 [231]
Cultispher-G (Percell)	Spinner (VT = 50 mL)	Moelle osseuse	6 jours à 10 % SVF en incubateur	X 7	oui	Sun <i>et al.</i> , 2010 [232]
Cytodex 1 (GE Healthcare) avec rajout tous les 3 jours	Spinner (VT = 100 mL)	Moelle osseuse	9 jours à 15 % SVF en incubateur	X 23	oui	Schop <i>et al.</i> , 2010 [153]
Cultispher-S (Percell)	Spinner (VT = 50 mL)	Moelle osseuse	8 jours à 2 % SVF en incubateur	X 8,4	oui	Eibes <i>et al.</i> , 2010 [233]
Formation par microgravité	À lit tournant	Tissu adipeux	5 jours à 10 % SVF en incubateur	taille X 2	oui	Zhang <i>et al.</i> , 2015 [186]
Formation à haute densité sur plaque non adhérente	À vague	Cordon ombilical	9 jours sans SVF en incubateur	taille X 5	non	Li <i>et al.</i> , 2015 [187]
Formation en milieu SFM sur plaque non adhérente	Fiole (VT = 25 mL)	Moelle osseuse	7 jours sans sérum en incubateur	X 6	oui	Alimperi <i>et al.</i> , 2014 [193]
Formation à haute densité sur plaque non adhérente	Spinner et À lit tournant	Moelle osseuse	7 jours à 15 % de SVF en incubateur	nd	non	Frith <i>et al.</i> , 2009 [185]
Billes d'alginate	À lit fixe perfusé	Moelle osseuse	21 jours à 10 % de SVF en incubateur	X 2,5	oui	Yeatts <i>et al.</i> , 2012 [234]
CellBeads (CellMed)	À lit fixe perfusé	CellBeads (CellMed)	21 jours à 10 % de SB en incubateur	X 1,3	oui	Weber <i>et al.</i> , 2007 [235]
Fibre creuse traitee à la fibronectine	Quantum perfusé (Terumo BCT)	Moelle osseuse	7 jours à 5 % de LPH (5 % O ₂ ; 5 % CO ₂ ; 90 % N ₂)	X 10	oui	Hanley <i>et al.</i> , 2014 [236]
Plateaux tournant de polycarbonate	ZRP 200H perfusé (Zellwerk)	Cordon ombilical	5 jours à 10 % SH (95 % air ; 5 % CO ₂ ; 37° C)	X 8	oui	Neumann <i>et al.</i> , 2014 [237]
Matrice poreuse de chitine traitees à la fibronectine	Spinner (VT = 25 mL)	Moelle osseuse	14 jours à 10 % de SVF en incubateur	X 6,1	oui	Teixeira <i>et al.</i> , 2014 [238]
Matrice de poly- téréphthalate d'éthylène	Spinner (VT = 25 mL)	Fluide amniotique	28 jours à 15 % de SVF en incubateur	X 155	oui	Liu <i>et al.</i> , 2014 [239]
Disque céramique poreux en hydroxyapatite	U-Cup perfusé (Celtec Biotek)	Moelle osseuse	19 jours à 10 % de SVF en incubateur	X 58	oui	Papadimitropoulos <i>et al.</i> , 2014 [240]
Fibre creuse traitee à la fibronectine	Quantum perfusé (Terumo BCT)	Moelle osseuse	13 jours à 10 % de LPH (nt)	X 10-20	oui	Nold <i>et al.</i> , 2013 [241]
Disque Fibra-Cells (New Brunswick Scientific)	FibraStage (VT = 500 mL)	Sang de cordon	7 jours à 10 % de SVF en incubateur	X 7	oui	Mizukami <i>et al.</i> , 2013 [242]

(DAT : tissu adipeux décellularisé, LPH : lysat de plaquettes humain; nt : non déterminé; SB : sérum bovin; SFM : milieu sans sérum; SH : sérum humain; SVF : sérum de veau foetal; VT : volume de travail)

Cas particulier des procédés d'amplification de CSM sur microporteurs en bioréacteur agité. La stratégie d'intensification la plus répandue dans la littérature est donc celui de la culture sur microporteurs en bioréacteurs à agitation mécanique. Par ailleurs, l'équipe Bioprocédés-Biomolécules du LRGP possède plus de 25 ans d'expérience sur les procédés de culture utilisant des microporteurs, avec divers types cellulaires : cellules tumorales humaines [243], CHO [244], Vero [245], CSM porcines [167]. Dans cette continuité, l'un des objectifs principaux de ce travail était la culture de CSM humaines sur microporteurs. Or, le rendement global de ces procédés dépend de 3 étapes : l'efficacité d'adhérence initiale des cellules après ensemencement, leur taux de croissance en cours de procédé et l'efficacité de la récolte finale en CSM. La nature du microporteur et les conditions opératoires d'agitation peuvent avoir des effets indépendants ou liés sur ces 3 étapes.

- L'ensemencement, c'est-à-dire la phase d'adhérence initiale sur les microporteurs dans les premières heures ou jours de culture, a été particulièrement bien étudiée. L'efficacité d'adhérence en milieu contenant du sérum sépare clairement les microporteurs commerciaux en deux groupes : ceux très performants sur lesquels plus de 80-90 % des cellulesensemencées adhèrent (Cytodex 1, Cytodex 3, Cultispher S), et ceux sur lesquels l'adhérence oscille entre 10 et 75 % (Pronectin F, Fact, Plastic +, Collagene, Plastic, HyQSphere P120-L, Glass, Hillex II) [151, 153–155]. De plus, selon la source de CSM, l'adhérence peut être préférentielle sur un type de microporteurs. Par exemple, alors que des CSM de moelle osseuse adhèrent de manière similaire, avec un milieu appauvri en sérum, sur des microporteurs Cultispher S et Plastic, l'efficacité d'adhérence pour des CSM de tissu adipeux est plus basse sur des microporteurs Plastic [152].

Bien que le sérum soit essentiel à l'adhérence et à la survie des CSM, plusieurs études ont montré que l'efficacité de la phase d'adhérence pouvait être grandement augmentée si la concentration de ce dernier était réduit à 5% v/v, voire s'il était supprimé du milieu pendant les premières heures de culture [153, 226]. Cela pourrait favoriser la primo-adhérence électrostatique des cellules et éviter l'apoptose cellulaire entraînée par la saturation des intégrines par des ligands non immobilisés [146]. D'ailleurs, en fonction de la chimie du microporteur choisi, un ajustement préalable du pH favoriserait ces interactions faibles (pH de 8 pour le Cultispher S et de 7,2 pour le Cytodex 1) [226, 246]. L'importance des forces électrostatiques semblent toutefois assez mineures, des microporteurs pré-traités par du sérum, des extraits de MEC humaine (ex : solution CTS, Life Technologies), ou de la fibronectine, étant capables de soutenir l'adhérence des cellules en milieu sans sérum ou à sérum réduit [152, 156]. Les microporteurs recouverts par ces traitements

ne sont plus chargés *per se*. La liaison des intégrines membranaires est donc déterminante dans l'efficacité d'adhérence sur les microporteurs et c'est pourquoi les protéines libres du sérum les saturant auraient un effet défavorable.

La densité cellulaire d'ensemencement requise par microporteur va dépendre de la surface réelle que les microporteurs présentent. Par exemple, des microporteurs macroporeux comme le Cultipsher S peuvent supporter des densités initiales de 5 à 60 cellules par microporteur sans effet sur la croissance cellulaire ultérieure [226]. Cependant, rapporté en nombre de cellules par cm^2 , l'ensemencement surfacique des microporteurs doit être maintenu à basse densité, car il a été constaté que cela stimulait la croissance des CSM (allongement de la phase de croissance exponentielle) [247, 248]. De fait, il a été démontré que l'ensemencement de microporteurs lisses ou microporeux était optimal aux alentours de 5 cellules par microporteur [155, 230].

Finalement, l'homogénéisation de la suspension de CSM unicellulaires avec les microporteurs frais est le dernier paramètre à devoir être pris en compte. La phase d'adhérence se déroule toujours dans un volume plus faible que le volume de culture final afin de favoriser les contacts cellules-microporteurs. Les conditions d'agitation favorisant ces rencontres de manière pérennes doivent être optimisées ; avec une agitation nulle [230] ou trop importante [246], la proportion de microporteurs vides augmente. Une agitation intermittente est donc souvent privilégiée (ex : 3 min d'agitation par demi-heure) pour obtenir une distribution homogène des cellules sur les microporteurs [214, 226], mais le choix des paramètres d'agitation n'est pas rationalisé.

- Le taux de croissance des CSM en cours de culture n'est pas forcément déterminé par les performances de la phase d'adhérence initiale. En effet, des croissances cellulaires équivalentes ont été obtenues avec des Cytodex 1, Cytodex 3 ou HyQSphere P102-L [151] ; des Plastic ou CultiSpher S [152] ; des performances décevantes ont même été obtenues avec des microporteurs Cytodex, et ce en dépit d'un ensemencement maximal [155].

Le principal avantage de la culture sur microporteurs en réacteur agité est de maintenir les microporteurs en suspension, favorisant ainsi l'homogénéisation de la culture et son contrôle en ligne. Son inconvénient est la génération de contraintes mécaniques sur les cellules, décrites par des paramètres hydrodynamiques comme : le seuil de cisaillement critique défini par la taille de l'échelle de Kolmogorov, la fréquence de passage des cellules dans les zones de taux de dissipation énergétique maximale, et la fréquence des collisions entre microporteurs (proportionnelle au carré de la concentration en microporteurs) [157, 158, 249, 250]. Il a d'ailleurs été

démontré que doubler la quantité de microporteurs dans un même volume pouvait diminuer la quantité totale de CSM obtenues en fin de culture sans augmentation de la mortalité apparente. Ces collisions auraient donc surtout un impact sur la croissance cellulaire [230]. Cette étude a également exploré deux types de mobiles d'agitation à aubes verticales de diamètres différents, l'un développant à N_{js} un taux de dissipation moyen ε_t de $8,8 \cdot 10^{-4} \text{ W.kg}^{-1}$ et l'autre de $32 \cdot 10^{-4} \text{ W.kg}^{-1}$. Les résultats tendent à démontrer une meilleure croissance des cellules à faible ε_t [230]. Une seconde étude, associant le calcul des paramètres hydrodynamiques moyens à une simulation en mécanique des fluides numériques (CFD), n'a trouvé aucune différence en terme de croissance de CSM adipeuses sur une gamme de ε_t allant de $6 \cdot 10^{-4}$ à $41 \cdot 10^{-4} \text{ W.kg}^{-1}$ [251]. À fin de comparaison, la réponse d'une lignée cellulaire telle que la CHO se traduit, pour des cellules adhérentes sur microporteurs et en canal microfluidique, par une augmentation de la mortalité cellulaire (nécrose et/ou apoptose) à partir d'un seuil de $\varepsilon_t = 1 \text{ W.kg}^{-1}$, soit près de 1000 fois supérieur aux travaux pré-cités avec les CSM [252]. En fait, les études actuelles sur la culture de CSM sur microporteurs ne se sont jamais approchées de ces ordres de grandeur, ce qui expliquerait le manque d'effet sur la mortalité cellulaire, bien que ces cellules soient supposées très sensibles aux contraintes hydrodynamiques.

- La récolte finale des cellules peut être considérée comme l'opération la plus délicate du procédé d'amplification de CSM sur microporteurs. Les cellules étant le produit d'intérêt thérapeutique, cette récolte doit permettre un rendement élevé tout en préservant la viabilité cellulaire. Dès les années 80, l'incompatibilité de certains microporteurs (Collagen, Cytodex 1, et Cytodex 3) avec une récolte satisfaisante de cellules primaires a été identifiée (rendement de 20% après traitement à la trypsine) [160]. Plusieurs équipes, malgré de meilleurs résultats atteints pendant les phases d'adhérence initiale et de croissance, ont d'ailleurs abandonné la culture de CSM sur Cytodex pour cette raison [155, 235]. Dans le cas de l'utilisation de Cytodex 3 (recouvert de gélatine), le traitement enzymatique a été optimisé en allongeant la durée du traitement à la collagénase [151]. Cependant, malgré l'obtention de rendements supérieurs à 90 %, cette méthode a été estimée trop aléatoire [155].

En plus de la mise au point du décrochage des cellules par voie enzymatique, la résistance mécanique des microporteurs doit aussi être contrôlée. Certains microporteurs, comme les Microhex (Nunc), présentant une tendance à la fragmentation, ne sont pas appropriés pour la thérapie cellulaire car ils seraient difficiles à séparer des CSM par filtration [155]. D'autres microporteurs commerciaux, comme les Hillex CT, sont quant à eux validés BPF en tant que

microporteurs ne relarguant pas de particules.

Il est également souhaitable de mettre en œuvre un procédé de récolte directement au sein des bioréacteurs à cuve agitée pour éviter des transferts inutiles une fois l'amplification des CSM réalisée. Idéalement le système de filtration des microporteurs pourrait alors être monté en-ligne sur les bioréacteurs. Des recherches ont donc été entreprises dans ce sens. Dans un cas, il a d'abord été démontré qu'il était possible de limiter le temps de récolte en agitant fortement la culture pendant le traitement enzymatique (7 min de traitement à la trypsine-EDTA pour des CSM sur microporteurs Plastic), et ce, sans endommager les cellules [253]. Dans un autre cas, l'attention a été focalisée sur les étapes de filtration après traitement avec du TrypLE (Life Technologies) de microporteurs Synthemax II (Corning) [254]. Cette équipe a associé une première étape de clarification des microporteurs en filtration frontale à une seconde étape de concentration et diafiltration cellulaire par filtration tangentielle afin d'obtenir des CSM adaptées à une utilisation clinique. Ils ont déterminé qu'un rendement maximal était obtenu avec un filtre dont les pores étaient de grande taille (supérieurs à 75 μm), pour limiter les risques de colmatage, et que l'étape de concentration cellulaire avant diafiltration est indispensable afin d'éviter une adsorption importante des CSM sur les membrane des fibres creuses [221]. Dans ces deux exemples de procédés de récolte, les rendements atteints sont supérieurs à 90% avec une bonne viabilité des cellules. Cependant, cette étape reste limitante pour le traitement de gros volumes, car, dans les deux cas cités, les cellules sur microporteurs devaient d'abord être manuellement séparées en aliquotes, du bioréacteur vers des spinners de plus petite taille, pour réaliser le traitement enzymatique.

L'amplification de CSM sur microporteurs, quoique très étudiée, reste donc encore très empirique dans sa mise en œuvre. Les études mentionnées précédemment ont visé essentiellement à l'identification des paramètres opératoires clés pour maximiser les rendements cellulaires, en caractérisant seulement les cellules selon les recommandations de l'ISCT. Or, une partie des informations contradictoires de la littérature peut être attribuée au vaste panel de méthodes de culture et d'analyses utilisés. C'est pourquoi, en dehors des problématiques quantitatives liées au rendement cellulaire, l'intensification des procédés d'amplification des CSM requiert aussi la compréhension des effets des paramètres opératoires sur la qualité des CSM. Les données connues à ce jour sur cette problématique ont été rassemblées dans la revue présentée ci-après.

RÉSUMÉ

- Les CSM sont des cellules adhérentes dont l'amplification est pour l'instant réalisée en système planaire dont les possibilités d'intensification sont limitées.
- De multiples systèmes de culture en adhérence (types de surface tridimensionnelle et bioréacteurs) existent pour augmenter les rendements de culture des CSM.
- La croissance des cellules sur microporteurs en bioréacteurs agités est considérée comme l'option la plus viable pour intensifier la culture de CSM. Ce système a donc été choisi pour mener ce travail de thèse.
- Les paramètres spécifiques à contrôler lors de cultures sur microporteurs sont ceux régissant l'adhérence des cellules sur les microporteurs, mais aussi ceux définissant les conditions physiques d'un système agité bi-phasique particules/liquide.

3.3 Article de revue : Qualité cellulaire et paramètres opératoires

TITRE DE LA REVUE :

**ANALYSE DES PROCÉDÉS D'AMPLIFICATION DES CSM *ex vivo* :
REPENSER CES PROCÉDÉS EN PARTANT DES FACTEURS CELLULAIRES CLÉS POUR LA QUALITÉ
AFIN DE DÉTERMINER LES PARAMÈTRES OPÉRATOIRES CRITIQUES
POUR LA RÉUSSITE DE L'AMPLIFICATION.**

RÉSUMÉ :

Avec plus de 300 essais cliniques enregistrés en 2013 et plus de 20000 articles référencés sur la base de données NCBI, les cellules stromales multipotentes humaines (CSMh) sont considérées comme un modèle de référence en ingénierie tissulaire et en médecine régénérative. Cette revue a pour but de fournir une mise à jour des dernières avancées concernant la caractérisation des CSMh et leur utilisation en bioprocédés. Cette analyse de la littérature récente démontre encore une fois la relation intrinsèque entre les caractéristiques qualitatives critiques (CQC) des CSMh utilisées en thérapie cellulaire et les paramètres critiques des procédés (PCP) utilisés pour leur amplification. Ce lien direct démontre que la mise au point d'un procédé et que la validation des lots de CSM produits devront intégrer les outils de la biologie cellulaire, et non seulement ceux de la protéomique, afin de répondre aux exigences des autorités de santé tout en augmentant la robustesse des procédés de culture. Le besoin pour une seconde initiative consensuelle de rationalisation des CQC est ici souligné afin de faciliter la comparaison entre différentes études, mais surtout pour répondre à la problématique centrale de la thérapie cellulaire fondée sur les CSMh : en quoi leur efficacité clinique est-elle influencée par la source des cellules, leur hétérogénéité au sein d'une population et leurs conditions en culture ou lors de leur formulation ?

Référence : C MARTIN, Éric OLMOS, Marie-Laure COLLIGNON, Natalia De ISLA, Fabrice BLANCHARD, Isabelle CHEVALOT, Annie MARC et Emmanuel GUEDON. Revisiting MSC expansion from critical quality attributes to critical culture process parameters. *Process biochemistry*, In Press, 2016. DOI : 10.1016/j.procbio.2016.04.017

REVISITING MSC *ex vivo* EXPANSION FROM CRITICAL QUALITY ATTRIBUTES TO CRITICAL PROCESS PARAMETERS.

Céline Martin, Éric Olmos, Marie-Laure Collignon, Natalia De Isla, Fabrice Blanchard, Isabelle Chevalot, Annie Marc, Emmanuel Guedon

Abstract :

With over 300 clinical trials registered in 2013 and more than 20,000 hits on the NCBI database, human multipotent stromal cells (hMSC) are widely used and studied as a model for tissue engineering and regenerative medicine. This review aims to provide a general update on the latest advances regarding hMSC characterization and bioprocessing. This analysis of the recent literature shows once again the intrinsic relationship between critical quality attributes (CQA) of hMSC expanded for cell therapy and critical process parameters (CQP) used during their expansion. It hence demonstrates that process design and bulk validation will need to integrate not only proteomic but also cellular biology tools to meet regulatory authorities requirements and limit process variability. The necessity for another streamlining effort is underlined, not only to facilitate study comparison, but mostly to settle the problematic that hinder hMSC therapeutic use the most, which consist in sorting out the influences of cell sources, population heterogeneity and culture conditions on the final *in vivo* outcome.

Published as : C MARTIN, Éric OLMOS, Marie-Laure COLLIGNON, Natalia De ISLA, Fabrice BLANCHARD, Isabelle CHEVALOT, Annie MARC et Emmanuel GUEDON. Revisiting MSC expansion from critical quality attributes to critical culture process parameters. *Process biochemistry, In Press, 2016*. DOI : 10.1016/j.procbio.2016.04.017

a- Introduction

Multipotent stromal cells (MSC), also called mesenchymal stem cells, have first been isolated by Alexander Friedenstein [47, 48], and then conceptualized as "MSCs" by Maureen Owen and Arnold Caplan [50, 52]. These cells have first attracted attention due to their ability to differentiate *in vitro* in osteocytes, chondrocytes and adipocytes [53]. They are since considered as a potential source for musculoskeletal tissue regeneration when differentiated *in vitro* associated with a biomaterial scaffold [256]. They are also more and more seen as a good candidate to stand alone undifferentiated as a pharmaceutical product [129] due to their finely regulated secretion of trophic and immunomodulatory

factors [257]. Thanks to the latter characteristic, human MSC (hMSC) are currently being tested in clinical trials for allogeneic as well as autologous therapies [109].

These applications will require an amount of cells that can not be provided by tissue aspiration, raising the need for an *ex vivo* expansion step [258, 259]. The cell properties and numbers in demand are likely to vary depending on the therapeutic usage targeted and on the hMSC source chosen (bone marrow, adipose tissue, Wharton jelly...), but the lack of a proper identity for hMSC makes it difficult to assess manufacturing processes beyond cell numbers. Even though the consensus obtained by the International Society for Cellular Therapy (ISCT) to characterize hMSC was a vital step to streamline the vast amount of research done on hMSC [55], it is also admitted that these minimal criteria won't suffice for it to be translated into clinic [260].

An overview of characteristics that have been suggested to evaluate hMSC integrity for therapeutic use is proposed here in regards to their adequacy with the development of a manufacturing process. This review hence first considers the technical compatibility of assays currently defining hMSC attributes with process validation and lot release agendas, and secondly it describes the influence of process parameters onto these characteristics, especially in microcarrier cultures.

b- Product Quality : a new paradigm for upstream processing

hMSC attributes in terms of fundamental biology, *i.e.* molecular identity, mode of actions (MOA) or *in vivo* physiological role, are highly debated and not yet well understood [79, 261–264]. Opposite concepts have emerged, one where MSC is referring to a clearly defined *in vivo* entity limited to the bone, and the other where MSC consist in an heterogeneous and ubiquitous population of different cells, population that is solely defined by a combination of *in vitro* assays [265]. Logically, MSC as a product finds its roots in the latter, and the whole challenge of *ex vivo* expansion is to maintain the quality attributes that are critical to their *in vivo* potency into a circumscribed area, and this over the course of their collection, isolation, amplification and possibly banking.

hMSC identity and heterogeneity. Monitoring hMSC identity and heterogeneity implies simply testing, by a quantitative method, for the presence of the desirable cell population and the absence of unintended ones. As per FDA guidance, the aim is to avoid a drift in the hMSC properties and set acceptable limits for culture composition.

Discrimination of positive and negative CD antigen surface markers is one of the standards regarding hMSC characterization as defined by the ISCT. hMSC must express CD73, CD90 and CD105 ($\geq 95\%$) and lack expression of CD34, CD45, CD14 or 11b, CD79 α or 19, and HLA-DR ($\leq 2\%$) [55].

However expression of surface antigens is a dynamic process and can vary depending on tissue sources, for instance standards for adipose-derived MSC include the expression of CD44 and possibly CD34 [266]. It has also been proven that this standards sets of markers are not able to differentiate hMSC from non-stem mesenchymal cells or fibroblasts, when the expression of CD24, CD108 and the lack of CD40 did [267]. Looking for surface markers expression *in vivo* on the whole bone marrow CD10, CD140b, CD146, CD271, and ganglioside GD2 appears as promising candidates to be more discriminating, but this result also highlight the mixed population composing a biopsy sample [94]. The specific lookout for CD146 expression has raised whole new concepts in the hMSC field. It is thought to be a marker for true hMSC in the bone marrow, here defined as skeletal stem cell, because only this population has the ability to recreate ossicles in heterotopic transplantation and keep their phenotype on a subsequent passage in culture (considered as the gold standard for stemness functional assay) [110]. Pericytes also express CD146 in various fetal and adult tissues while being positive for the usual hMSC CD markers and showing multipotency ability [77], which consequently might explain the ubiquitous nature of hMSC by a perivascular origin.

Overall, because no unique marker has been discovered for now to characterize hMSC, multiple surface antigens markers have to be chosen wisely and probably beyond the ISCT recommendations in order to be able, first to follow eventual deviations in the population, and secondly to determine how it could actually impact the targeted biological functions.

hMSC as therapeutic entity. Characterizing hMSC as therapeutic entity, *i.e.* their potency, is defined as "*the specific ability or capacity of the product to effect a given result and must be determined by a quantitative biological assay*" [268]. Potency is logically closely linked to clinical efficacy, but it is also a key to manufacturing consistency and batch release, key that should be implemented early on in process development [269]. Two aspects can be investigated for hMSC depending on the targeted use : tissue engineering needs the cells to be able to properly differentiate while MSCs infusion needs them to secrete the adequate immunomodulatory and growth factors.

Differentiation. The differentiation ability of hMSC has not truly been demonstrated *in vivo* as hMSC engraftment does not occur when they are injected undifferentiated [106, 270], giving rise to the discussion on their actual physiological role as progenitors.

Their capacity to differentiate *in vitro* was initially the main element that drew research to study this cell population and it is still one of the fundamental criteria to define cells as MSC. This key element is tested *in vitro* using well-known induction assays where differentiation is induced through cell density and media supplements where MSC have to be able to acquire the adipocyte, chondrocyte and osteocyte phenotypes in 14 to 21 days. The acquisition of these three specific cell morphologies is then confirmed via histochemical staining [55]. This standard procedure is however both qualitative and time-consuming.

Nonetheless it is possible to use short term induction assay (3-7 days) and detect quantitative variations in either mRNA or protein expression correlated with differentiation [271, 272]. The same methods can be used to follow specific unwanted induction events caused by the process. Indeed hMSC undifferentiated state, if they are aimed to be used as a native population, has to be confirmed, and process parameters such as mechanical stimulations or fetal calf serum (FCS) use can induce the cells towards a differentiated lineage [273, 274]. In regards to the P.A.T (process analytical technology) initiative, it can be noted that preliminary evidence suggests that Raman spectroscopy could be used to follow the osteogenic and adipogenic differentiation [275, 276].

For the specificities of musculoskeletal tissue engineering, an induction assay is obviously performed while the cells are going through differentiation into the scaffolds, it is in this case useful to have prospective data linking hMSC features to their ability to differentiate. Predictive models have already been developed, one based on type I collagen and osteoprotegerin expression [277], the others on biophysical markers [278–280].

Secretome. When hMSC are maintained undifferentiated, their secretome is considered as principal effector in their therapeutic efficacy. Under appropriate licensing, these cells can produce immunomodulatory, anti-inflammatory, mitotic, anti-apoptotic, anti-oxidant, anti-microbial or even angiogenic factors. This includes the secretion of cytokines (ex : CCL-2, CCL-5, IL-6, IL-8, IL-10), growth factors (ex : VEGF, TGF β 1, PDGF, bFGF, HGF), enzyme (Indoleamine 2,3-dioxygenase), prostaglandine (PGE2), as well as exosomes (membrane microvesicles containing protein and RNA) [127, 281]. It led to the view of hMSC as a natural body "drugstore" [129].

These secretions can be detected with well-known proteomic physicochemical techniques (ELISA, mass spectrometry etc) [282], but are not automatically correlated to *in vivo* efficacy depending on the pathology targeted [283, 284]. Bioassays in animal models or *in vitro* cell cultures also exist. hMSC have been widely studied in Transwell or co-culture experiments since the demonstration of their capacity to suppress T-lymphocytes proliferation *in vitro* [285]. *In vivo* testing on the other hand has the advantage, by definition, to strongly link cell potency to *in vivo* efficacy, even though it can not always be translated into clinical results in human. For instance concerning GvHD (Graft versus Host Disease), a lifespan increase of GVHD mice model has been linked to a decrease of T cells proliferation and IFN γ secretion from both mouse and human sources and then used to discriminate potencies between different MSC clones [286]. Regrettably for process evaluation, bioassays are demanding in term of validation, costs and length, it has hence been hypothesized, in a murine wound healing model, that a matrix assay could help predict hMSC potency based on the evaluations of the cells growth rate, viability and proliferation [287]. Lastly, an industrial example of hMSC potency testing methodology has been disclosed : the manufacturing runs of MultiStem (manufactured by Athersys) go through a pass/fail criteria for conditioned medium based on validated ELISA assays against VEGF, CXCL5 and IL-8 while the minimal concentrations required had been previously determined using an human umbilical vein endothelial cell tube formation assay [269].

It is evident that establishing manufactured hMSC as therapeutic entity is a difficult task and lots of potency testing have to be based on hypothesized MOA obtained from *in vitro* results. Based on present-day knowledge, hMSC can be considered as a multifaceted cell population with several roles *in vivo* leading to the multiplication of assays. Renewed standardization efforts have been proposed focusing on biomarkers such as chemokines or growth factors receptors [288, 289]. Conversely an interesting simplified procedure has been developed by the NIH clinical center using microarray global gene expression analysis [290]. They measured the replicative age of hMSC using a 24 gene set and compared these results to their lot release criteria (involving a mouse transplant model, CD surface markers, *in vitro* lymphocytes reactions and cytokines production [291]). Further data are needed, but in this case, hMSC that did not meet their standards were either contaminated or considered as "aged" by the 24 gene set, that thus could become after extensive validation a single-shot predictive assay for hMSC potency. It also underlines how biological age and the duration of a manufacturing process might impact cell quality attributes.

hMSC aging. When manufacturing recombinant proteins, a cell line goes through a stability study covering the time from thawing of a master cell bank vial to its last scale-up step. The aim is to evaluate possible product deviation due to increasing population numbers. For cellular therapies, stemness, senescence and malignancy make up this fragile equilibrium which could be disturbed by a manufacturing process that might artificially stimulate biological aging. Genetic stability at a molecular level can be followed in order to pursue an *in vitro* expansion step within a safe time-frame [292].

Stemness. Definition of stemness has become more or less stringent depending on the studies, particularly due to common use of the term adult stem cell, MSC including, and creation of iPS cell lines (induced pluripotent stem cells). The gold standard assay actually consists of cells *in vivo* transplantation (see above), but it is not adequate for bioprocessing.

Extant characteristics of stemness are self-renewal, multipotency, clonogenicity, and expression of pluripotent markers. For hMSC, clonogenicity does not have to be proven anymore, it is indeed the oldest method to isolate hMSC from bone marrow [47]. The colony forming units-fibroblastic efficiency assay (CFU-F or CFE) is a simple method using clonal seeding densities and its comparison to the number of colonies obtained 14 to 21 days later. Initial results from a tissue fraction are highly dependent on culture conditions and donor (age and health) [56, 293], but these previous parameters maintained, comparing CFE evolution over time can be informative regarding the proportion of cells that are actively dividing in an hMSC population [216] and help determined adequate culture conditions [294].

More controversial is the expression by hMSC of embryonic pluripotent markers, *i.e.* stemness-related transcriptional factors like Oct-4, Nanog, Sox2, Rex-1, or glycolipid antigens like SSEA-3 and SSEA-4 [7]. SSEA antigens being surface markers, they are detected via flow cytometry and mainly used for prospective isolation of hMSC subsets showing better self-renewal and pluripotency abilities [295, 296]. For the transcription factors, low or no levels of Oct-4, Nanog, Sox2 and Rex-1 are detected in hMSC when compared to embryonic stem cells [297, 298]. When detected, observations are in agreement on a general decrease of these markers over passaging [299–301]. Expression of these transcription factors are at the center of a complex balance, and conflicting data might be explained by epigenetic tuning such as histone acetylation [301–303] or microRNA silencing [304].

Senescence. Alongside the loss of pluripotent markers expression over time, hMSC acquire *in vitro* a senescent phenotype, just as somatic primary cells do. Their cell cycle is irreversibly blocked, cells become unresponsive to apoptosis and unproliferative, but can be metabolically active for months. It has been shown that senescence impaired hMSC immunomodulatory properties and multipotency [305, 306]. A late senescent state is commonly detected visualizing morphological changes such as size increase, cell flattening and lysosomal β -galactosidase staining [307].

However, earlier senescent states can be detected and quantitatively measured by molecular changes well before [290]. The continuous telomere shortening by replicative senescence (RS) can be monitored in hMSC by Southern Blot, qPCR or flow cytometry [216, 308, 309] and stress-induced premature senescence (SIPS) is time-correlated with increased genomic DNA damages [306]. These two senescence processes involve the cyclin dependent kinase inhibitors p16^{INK4A}, p53, and p21^{WAF1} that drive the cell cycle arrest. In extensive hMSC cultures, some found that only p16^{INK4A} mRNA expression was increased [310] or that p53 was down-regulated [311] while others found all three transcripts were up-regulated [312, 313]. It is thereby indicating that depending on cultures, donors and time of sampling, different senescence systems might be involved, or detected.

The TERT (telomerase reverse transcriptase) has been proposed as crucial to delay replicative senescence, but, as for the pluripotency markers, its activity in hMSC is at the level of primary cells and barely detected compared to pluripotent or cancerous cells [314, 315]. Monitoring of hTERT might hence not be of interest to assess hMSC replicative senescence, but it might be targeted to induce its over-expression, as it seems to also have a role in oxidative stress protection by mitochondrial regulation, thereby protecting cells from senescence induced by oxidative stress [316, 317]. For hMSC cultures *in vitro*, several results showed that hypoxic environments (see below) or antioxidant chemical compounds might stabilize telomere lengths by up-regulating hTERT [318, 319].

Aside from these traditional senescence markers, others have also been explored where morphology and decreased cytoskeleton dynamic [279, 320] or senescence-associated DNA methylation (SA-DNAM) [321] could be used to track early on aging of an hMSC population for quality control. Senescence state may indeed become one of the most important quality attributes to look for over the course of hMSC expansion. Compared to stemness markers, they are more consensual and robust, and thus can more systematically detect an important population deviation. Senescence is also the principal safeguard against malignant transformation *in vivo* [322], and even if a major onset is to be avoided during manufacturing, tracking the cells gradual aging may also insure the safe release of a cellular

product [323].

Malignance. One of the principal risk that cellular therapies in general have to address is tumorigenicity. Cancerous transformation of hMSC is considered a very rare event as no such adverse reaction have been detected in clinical trials for over 20 years [324]. Cases of *in vitro* immortalization were reported, but have since been attributed to cross-contamination of cell lines [325], except for one [326]. This study based its first detection on growth abnormalities, as others have already advised [327], and have then striven to find specific genes expression correlated with the transformation events [326].

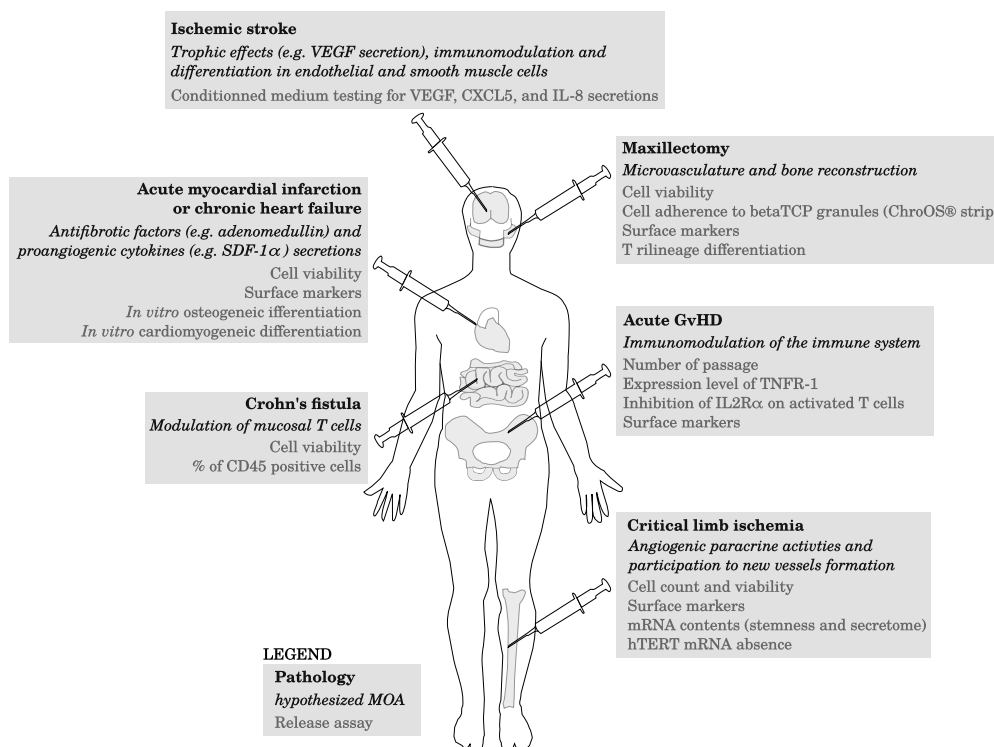


FIGURE 17 – Prospective therapeutic use and hypothesized mode of actions (MOA) of hMSC defining current potency assays

Clinical trials targeting various organs diseases such as, acute GvHD during bone marrow transplantation [130, 328], heart diseases [329, 330], leg [331] and brain ischemia [332], intestine fistula [333] and maxillary bone reconstruction [334]. (VEGF : vascular endothelial growth factor, CXCL5 : C-X-C motif chemokine 5, IL8 : interleukine 8, betaTCP : beta-tricalcium phosphate composite, GvHD : graft versus host disease, TNFR-1 : tumor necrosis factor receptor 1, IL2R α : interleukine 2 receptor α , hTERT : human telomerase reverse transcriptase, MOA : mode of action, SDF1 α : stromal cell derived factor 1 α)

Regulatory advices from the scientific communities in preclinical settings are for now still limited to the systematic detection of cytogenetic abnormalities using G-banding karyotyping and fluorescence *in situ* hybridization (FISH)[335] because the accumulation of chromosomal instabilities in extended

hMSC cultures is indeed common [336, 337]. It is however not sufficient as it has not been clearly linked to increased tumorigenesis [338] and can be quite frequent in normal non-cancerous cell population as well [322].

While the overall agreement is that hMSC expansion should be limited to the minimum amount of population doubling for safety reason, a limited time-frame is also one of the main obstacle to reaching sufficient cell numbers. Some have suggested that induction of the cells to a malignant phenotype could be studied in order to better understand the phenomenon [339], and it has been achieved, for instance, by modulating the cells biochemical environment with heavy metal salt and hypoxia [340].

Regulatory agencies, in agreement with the scientific literature, have determined that hMSC are "*more than minimally manipulated cells*", which is why careful process and analytics validations will have to be implemented to widen the hMSC use beyond clinical trials [341–343]. All hMSC quality attributes listed above will probably not be necessary and will be identified as critical depending on therapeutic use (see figure 17). However the consensus is that manufacturing based on more quality attributes assessment will highly benefit the hMSC field [269, 335], and even more essentially, a broadly used reference material would improve comparability [260]. Process standardization could be improved at the same time [344, 345], as some clinical trials failures might be imputed to differences in hMSC manufacturing (large scale industrial expansion vs. limited expansion in academic settings) [346].

c- Expansion Process parameters : what has been achieved ?

The classical culture conditions for hMSC involve the use of tissue culture flasks, FCS and standard humidified incubators regulated at 37° C and 5 % CO₂ (pH range from 7.2-7.4). Intensification and optimization of these culture conditions are the main objectives for manufacturing hMSC with a reduced cost of goods per dose. Two view points have been envisaged to achieve the most efficient expansion process. One focuses on cell quality by recreating the cell micro-environment and mimicking *in vitro* the *in vivo* niche. Explant [347], aggregate [186, 348], hydrogel cultures [203, 349], or *in vivo* chambers [350] and tissue bioreactors [351] are following this philosophy. The other path explored is to consider hMSC in cultures as *in vitro* artifact *per se*. It focuses on cell quantity by adapting well-known bioreactor designs and culture strategies initially developed for biomolecule production with immortalized cell lines [258]. Given the difficulties created by quality testing, many of these studies

however have been devoted to increase cell numbers while complying only with the ISCT minimal criteria. Confronting both viewpoints and our knowledge of hMSC biology could help redefine what are the critical process parameters for the specificities of adult stem cells therapy.

Biochemical inputs.

Nutrients. A basal medium provides cells with vital nutrients including carbohydrates, amino acids, and vitamins. In association with human platelet lysate (hPL) or FCS, hMSC are commonly grown in DMEM, DMEM/F-12, or α MEM [352].

The only source of carbohydrate in these media is glucose, either at physiological level around 1 g/L (α MEM, DMEM-LG) or hyperglycemia at 4.5 g/L (DMEM). This high level of glucose have been reported to be detrimental to hMSC [353], but also as having no effect on their proliferation and differentiation [354]. Discrepancies between various studies can be explained by hMSC heterogeneity [355] and frequency of medium refreshment.

Even though not essential, some amino acids might be preferentially metabolised by hMSC [215], notably asparagine or tyrosine. Medium like GMEM for instance is used supplemented with non-essential amino acids [356]. Glutamine is usually considered an essential alternative source of energy in cell culture and most media used for hMSC are supplemented with 2 mM Glutamine. As for glucose, reports on glutamine consumption are contradictory [215, 352, 357], and while L-alanyl-L-glutamin (Glutamax) show consistently better result compared to glutamin, it might only be through a decreased ammonium release compared to the one made via spontaneous glutamine degradation [358].

Ascorbic acid is present in DMEM/F12 and α MEM, contrary to DMEM alone, and this supplement might actually be a very important vitamin addition for hMSC [359–361]. Ascorbic acid is indeed known for its antioxidant properties and might help delay MSC senescence in culture [362], as others such as Trolox (Vitamin E analog) can [363].

Ultimately, nutrients might not impact a lot the cells phenotype outside of a transient metabolic adaptation, but studies did detect some changes in cell surface markers expression [364, 365]. There is also no reports of a tailored basal media for hMSC, another interesting approach however has been to recreate DMEM from fluids accepted in the pharmacopoeia, on the premise that it would be more easily accepted in the context of a human implantation [366].

Growth factors. Every hMSC expansion medium supplements its basal formulation with an important amount of growth factors by adding FCS or hPL (10-20 % of the final volume), with or without purified growth factors. FCS is ill-defined, it is however the most common support of hMSC cell proliferation, as it is for many primary cells, and with the growth of regenerative medicine, demand for large and reliable volume of FCS will very likely not be met in the future [367]. FCS validation to GMP-grade requires expensive procedures that cannot guarantee future performance of different lots, nor the absolute absence of transmissible spongiform encephalopathy agents. Clinically, serum can be also the cause of immunological reactions [368], and most importantly, can influence hMSC growth and phenotype without an effector agents being clearly identified [369–371].

Logically alternatives to FCS supplementation have been a major subject of interest. It includes the use of human blood derivatives (serum, platelet lysate, platelet rich plasma) or the creation of an entirely defined serum-free medium (SFM) by heavily combining growth and adhesion factors [144]. The formers have consistently demonstrated better performances in culture than FCS [372–375]. Still, comparable deprecating critics can be found due to variations in sources and preparation methods [376, 377] that might impact cells characteristics [369, 372, 378]. Multiple studies have demonstrated the feasibility of hMSC expansion in SFM medium as well [220, 222, 379, 380], but a majority used undisclosed medium formulation.

A full understanding of the impact of growth factors is wished to improve hMSC expansion, and obtaining an optimal defined medium formulation will be a great step forward [359, 371]. Addition of purified growth factors are already critical to maintain the cells viability and induce proliferation, even in the presence of FCS or blood derivatives [381], but their effect can greatly vary depending on their concentrations and interactions (see table 8).

TABLEAU 8 – Principal growth factors used for hMSC expansion and their effects on hMSC critical quality attributes (CQA)

Growth factors	MSC Proliferation	CQA	Ref.
FGF2	+++	Synergistic effect with Wnt-3a to preserve hMSC chondrogenic potential	[382]
		Synergistic effect with ascorbic acid to increase hMSC differentiation potential via PI3K/AKT and MEK/ERK activation	[361]
		Induction of HLA-DR	[383]
TGFβ1	++	Decrease of the amount of senescent cells during long-term cultures via AKT and ERK activation	[384]
		Change in surface markers expression and promotion of chondrogenic differentiation	[385]
		Generation of mitochondrial reactive oxygen species and senescence induction	[386]
		Inhibition of adipogenesis and senescence due to increased proliferation	[387]
		Promotion of hBMSC chondrogenesis	[388, 389]
PDGF family	++	Secretion induced by high glucose environment via PI3K/AKT and PKC pathways	[390]
		Induction of growth factor expression and generation of mitochondrial reactive oxygen species	[391]
		Stimulation of exosome secretion and enhancement of hMSC angiogenic potential	[392]
EGF	+	Inhibition of hMSC osteogenesis	[393]
		No effect on multipotency	[394, 395]
IGF-1	+/-	Overexpression of hTERT mRNA	[396]
		Effect on surface and stemness markers depending on MSC sources	[397]
HGF	+/-	Induction of proliferation and osteogenic gene expression only in the absence of FCS	[398]
		Maintenance on multipotency in long term culture	[361, 384]

(FGF2 : fibroblast growth factor 2, PDGF : platelet derived growth factor, TGF-β1 : transforming growth factor beta 1, EGF : epithelial growth factor, IGF-1 : insulin-like growth factor 1, HGF : hepatic growth factor)

Feeding strategies. It has to be outlined that these levels of nutrients or growth factors are not usually actively maintained over the course of a static culture but rather replenished every 2 to 3 days by a full medium exchange. This method can be very simply adapted to microcarrier cultivation system by letting them settle down before carefully withdrawing spent medium. Results that have been obtained for hMSC expansion factor when comparing cultivation in batch mode with medium refreshment logically shows the latter leading to better performances [399], except when the culture does not reach nutrient limitations or lactate/ammonia inhibition levels [153, 226].

Exploration of continuous perfusion system is investigated as well for hMSCs expansion, in stirred-tank bioreactor [220] and hollow-fiber bioreactor [236]. The first system chose to maintain a constant flow rate of fresh medium throughout the culture when the other decided to adapt it depending on lactate measurements. These approaches have the advantage to be closed system and the outcome yield might be slightly higher compared to a medium refreshment strategy [221].

May it be medium renewal or continuous perfusion, the previous examples have only investigated fresh complete medium feed without trying to tailor it. Alternatives considered using either a concentrated nutritional medium feed [220] (undisclosed formulation), an increased glucose feed within a medium refreshment [218], or supplementing fresh medium with added serum or growth factors [219]. To circumvent the vast amount of medium being used by these methods, MSC expansion was also enhanced with glucose released over-time by alginate microspheres [400] or FGF2-loaded microcarriers [401].

Compared to cell line processes, hMSC feeding strategies are in their infancy, and conflicting results are obtained on whether to focus on nutrient limitation, growth factor stimulation or secondary metabolites inhibition for increased efficiency. Most of the confusion can unfortunately be linked back to undefined media and donor variations, nevertheless none of these studies found that changing feeding regimen impacted hMSC characteristics.

Physico-chemical environment.

Adhesion surface. As hMSC are, *per definition*, adherent-dependent cells, the surface provided and its structure are vital to any kind of culture. It has already been demonstrated that these cells could not differentiate without cell-cell interaction [402], or that surface stiffness could greatly influence their future lineage [403, 404].

With the progression towards a serum-free expansion, tissue-culture treated plastics cannot sustain hMSC growth. Coating of surfaces with extracellular matrix (ECM) proteins [405] (usually purified fibronectin) is then the norm. When true xeno-free conditions are required though, the creation of equivalent synthetic RGD containing proteins [406, 407] or functionalized polymer plastic [408] are examined in order to mimic ECM.

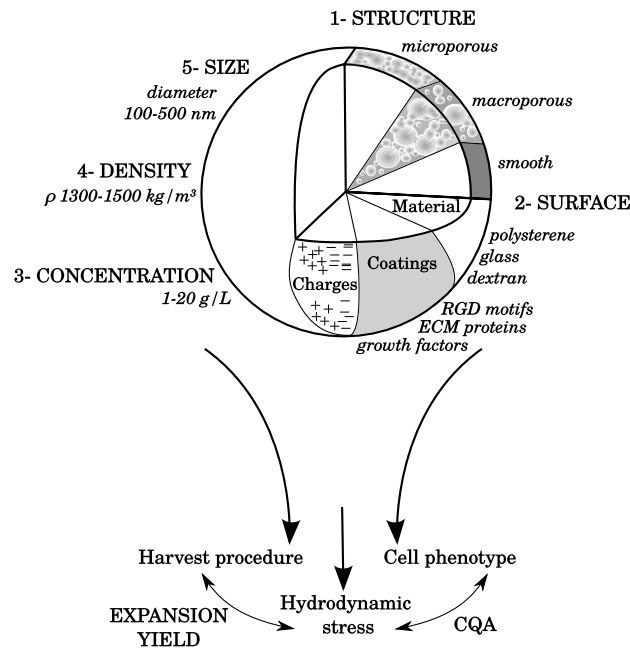


FIGURE 18 – Microcarrier choice impact hMSC expansion depending on 5 parameters. Studies focusing on hMSC expansion yield depending on microcarrier choice and process parameters [153, 226, 227, 232], including microcarrier feeding [153, 167] and harvesting methods [161, 162, 253]; and on hMSC quality like spontaneous differentiation [409–411] or surface markers and immunomodulation [224] (RGD : Arg-Gly-Asp tripeptide, ECM : extracellular matrix, CQA : critical quality attribute)

Tissue engineering has long been using 3D (scaffold or hydrogel) rather than planar environment to grow hMSC. It has been proven to enhance hMSC growth as well as differentiation capabilities [239], and clonogenicity [240]. Aggregate cultures, where cells supports themselves, might be more limited in term of proliferation but can ameliorate the cells potency [182], even in serum-free environment [187, 193]. Usage of microcarriers has also been extensively studied (see detailed references on figure 18) as they seem to be the most promising system for intensification and reduction of cost of goods per dose [159].

Finally, any surfaces used for hMSC expansion has to be compatible with soft harvesting techniques. The common procedures are performed with enzymatic treatment that do not preserve the cells

surface receptors [149], nor their differentiation potential [151], and efforts are being made to develop thermodegradable alternatives [163].

Fluid forces. As 3D cultures favor a more physiological cell organization, and with bioreactor scale-up in mind, the subject of homogenizing medium to allow for better nutrient delivery has naturally already been addressed. The fluid forces applied in order to do so by stirring, shaking or perfusion, might induce hMSC mechanotransduction pathways (reviewed elsewhere [412]). It has to be noted that changing the surface of adherence is more prone to impact hMSC gene expression pattern than shifting from a static to a dynamic environment [413]. However, as for most mammalian cell lines *in vitro*, stress tests in flow chambers have demonstrated that shear forces could inhibit hMSC viability and proliferation [414].

Two phases can be singled out in regards to medium agitation, seeding (around 24 h) and expansion phase (7 to 14 days). The seeding conditions for a cell suspension to adhere onto a surface depends on its nature. Compared to a static seeding phase, cells spread more homogeneously into a scaffold under perfusion, which actually led to a better outcome *in vivo* [415]. When microcarriers were used, it is intermittent stirring that favored adherence yield, with an higher mixing intensity leading to a decreased aggregate formation, without any of the tested parameters changing cells quality attributes [226]. On the opposite, fluid forces applied during expansion seemed to direct hMSC toward an osteogenic phenotype, whether it was by compression [416], orbital flow [417], or stirring with cells in a scaffold [418] or on microcarriers [151].

Microcarrier expansion process have a specificity where studies focused on applying to the culture a minimum speed to reach a *just-suspended* state of the particles, and it has indeed been demonstrated as an acceptable scale-up factor [213]. Within this frame, the importance of choosing the appropriate impeller design to increase the Kolmogorov microscale of turbulence has been underlined in order to promote cell growth [230]. Both studies however pointed out that increasing microcarrier density while stirring might be deleterious, probably due to particle collisions. When these two parameters are properly set, increasing stirrer speed does not seem to have a deleterious effect on expansion factor [251] other than reducing aggregation [214]. This model has also been put into practice to design an enzymatic harvesting method combined with elevated mixing speed. [253].

pH, temperature and oxygen saturation. For pH and temperature, data have to be deduced mainly from cultures of rodent MSC. Two studies are in contradiction concerning the effect of temperature on rat MSC, one detected a lower cell proliferation rate at 32 compared to 37° C [419], when the other showed an increase at 33° C [420]. Regardless, the former did find that a temperature reduction led to diminished stress levels (nitric oxid, reactive oxygen species and apoptosis measures) [419], and hence could be a way to limit SIPS.

Regulating pH in mouse and human MSC would apparently consist in limiting an alkaline rise of the medium, as it cannot sustain their growth under atmospheric condition if the buffer is bicarbonate based (equilibrium around pH 9) [421, 422]. The precise range for hMSC expansion has been determined to be between pH 7.47 and 8.27 actually [423]. However depending on the species, alkalinity showed opposite effects on differentiation, it seemed to induce chondro- and osteogenesis in rat MSC [424], while a pH over 7.9 inhibited this potential in hMSC [423].

Oxygen saturation level in culture has been explored the most focusing on standard incubation conditions (21% O₂) *vs.* hypoxia (5 to 1% O₂). Results have been controversial due to the duality of cell response facing either short- (also called preconditioning) or long term exposure to hypoxia [425]. For both, oxygen reduction has an important impact on hMSC metabolism. In normoxia they appeared to be only marginally relying on oxidation for ATP production [426], but when placed under hypoxia, hMSC switch their metabolic pathway to anaerobic glycolysis even more via the expression of hypoxia-inducible factor-1a (HIF1a) [427–429]. It has hence been demonstrated that hMSC could withstand severe hypoxia as long as the cells do not face glucose depletion [430] and that it could even significantly improve cell survival [431]. Cells would then remain in an undifferentiated multipotent state, where "stemness" genes are upregulated and differentiation inhibited [302, 355, 427, 432, 433]. For cultures in bioreactor, these findings point toward a simplified process where surface aeration and low stirring can be used to maintain a low oxygen level [220, 228], process that would avoid damages created by bubble bursting or shear stresses.

d- Conclusion : New concept for classic designs

Mammalian cell bioprocessing has more than 50 years of experience using hybridoma and CHO cells. The development of the regenerative medicine field has raised several challenges to its postulates simply because hMSC appears to share very little characteristics with immortalized cell lines (clonal heterogeneity, senescence, anaerobic metabolism, dependence to growth factors). As reviewed here,

the research on hMSC has been prolific this recent years, and it pictures a complex relationship between these cells characteristics, their mode of propagation and their final therapeutic use (see figure 19). It appears however that the criteria defined by the ISCT are almost never impacted by the expansion process parameters, except for the occasional induction toward a differentiated lineage. The general viewpoint is hence now to systematically combine process development to multiple cellular assays that would ensure the robustness of the *ex vivo* expansion and ultimately lead to a therapeutic use of hMSC.

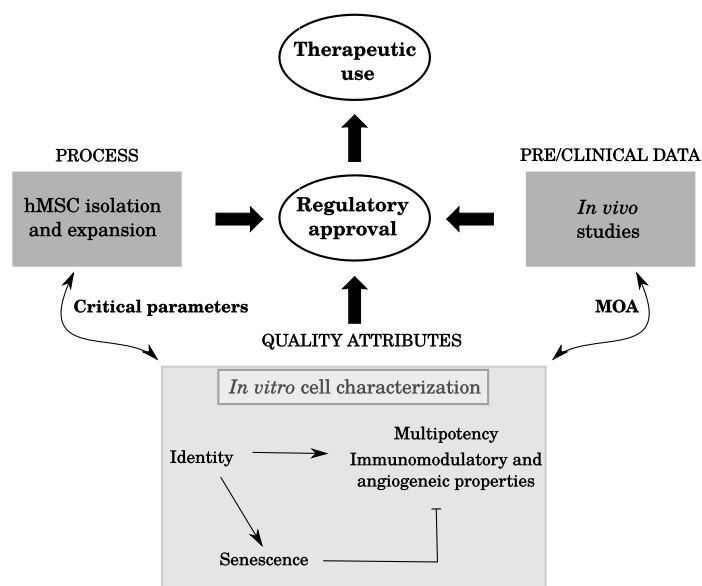


FIGURE 19 – Development overview of a regenerative medicine applied to hMSC therapy (MOA : *mode of action*)

CONCLUSION DE LA REVUE :

Les procédés de culture de cellules animales sont développés depuis plus de 50 ans avec des lignées d'hybridomes et de CHO. Les avancées en médecine régénérative ont mises au jour de nouvelles problématiques en bioprocédés car les CSM semblent partager peu de caractéristiques avec ces lignées immortalisées (hétérogénéité clonale, sénescence, métabolisme anaérobie, dépendance au facteurs de croissance). Comme le montre cette revue, de très nombreuses études ont été menées sur le CSM dans les dernières années, et cette analyse de la littérature met en évidence les relations complexes entre les caractéristiques cellulaires, la méthode d'amplification des cellules et leur utilité thérapeutique finale (figure 19). Il semblerait que les critères retenus par l'ISCT ne sont toutefois que très rarement affectés par les paramètres du procédé d'amplification, en dehors d'une orientation occasionnelle vers un lignage pré-différencié. Le consensus se dirige donc vers une mise en oeuvre systématique, en parallèle du développement d'un procédé, de multiples techniques d'analyses biologiques. En effet, cela permettrait d'assurer la robustesse de l'amplification *ex vivo* des CSM et ainsi mener à leur utilisation plus généralisée en thérapeutique humaine.

4 Perspectives et limitations des CSM à usage thérapeutique

Les avancées en thérapie cellulaire ont engendré de nombreux espoirs quant au renouvellement de l'arsenal thérapeutique en santé humaine. Toutefois, leur mode d'action *in vivo* n'est pas bien compris pour l'instant, ce qui empêche leur généralisation au plus grand nombre de par le manque de preuve d'efficacité et répétabilité en essais cliniques de grande échelle. Les indications thérapeutiques des CSM sont à ce jour extrêmement vastes, et leurs perspectives à long terme peuvent être pour l'instant considérées comme prometteuses. L'utilisation de ces cellules fait cependant face à deux limitations majeures constituées par la définition de leur identité (ou qualité) et leur production en masse *in vitro*. Ce modèle spécifique soulève donc des questions scientifiques nouvelles et pertinentes en procédés biotechnologiques ; certaines seront abordées dans ce travail (figure 20) :

1. Le premier axe de recherche se propose d'évaluer la pertinence du modèle cellulaire choisi et la robustesse des réponses biologiques. En effet, contrairement aux lignées cellulaires continues, les CSM présentent une variabilité intrinsèque aussi vaste que celle exprimée par les différents phénotypes humains. Or, un procédé de production biotechnologique à visée thérapeutique doit opérer dans un cadre extrêmement réglementé. Il est donc nécessaire de délimiter l'étendue des réponses cellulaires naturelles en amont du procédé d'amplification. Dans ce travail, la variabilité biologique des CSM sera étudiée en prenant en compte différentes méthodes de cryoconservation, différents donneurs, et l'âge des cellules *in vitro*.
2. La rareté des CSM rend nécessaire la mise en place d'un procédé d'amplification *in vitro*. Les systèmes planaires étant sujets à des limitations logistiques importantes, la culture de CSM sur microporteurs sera étudiée. Différentes géométries de système de culture seront testées pour déterminer leur capacité à soutenir la croissance cellulaire et la montée en échelle du procédé de production. Cette thèse s'est tout particulièrement centrée sur les méthodes de culture de CSM sur microporteurs et l'élucidation des effets de l'agitation sur ces cultures.
3. En dehors des paramètres physiques, l'environnement biochimique des CSM détermine une grande partie des performances atteintes en matière de croissance cellulaire. Or, l'utilisation de sérum en culture ne permet pas d'éclaircir complètement le rôle du milieu sur la croissance, l'adhérence, ou le métabolisme des CSM (notamment en mode non-alimenté). Le développement d'un milieu sans sérum sera donc entrepris.
4. Finalement, l'obtention d'une croissance cellulaire ne peut se faire au détriment des caractéris-

tiques constitutives de l'intérêt thérapeutique des CSM. La mise au point des suivis analytiques de la qualité cellulaire sera réalisée. Elle aura pour objectif d'appréhender l'impact du procédé de production sur la qualité des CSM et d'être à même de valider leur utilisation pour un usage thérapeutique.

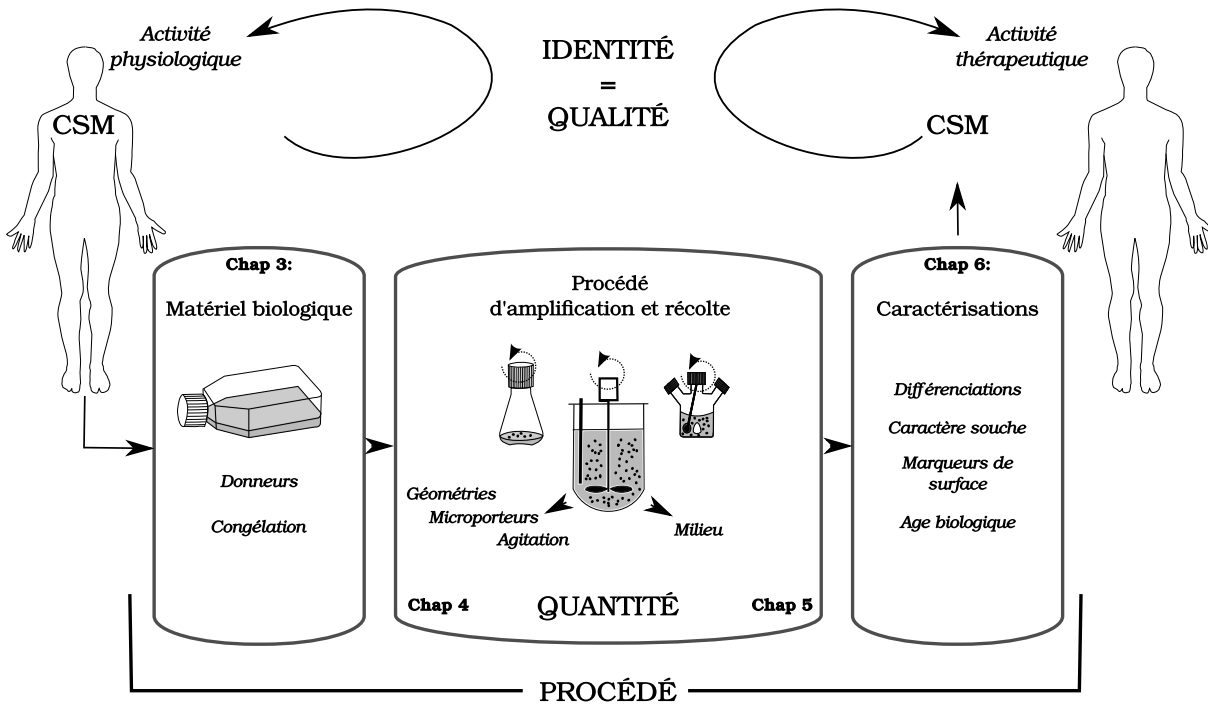


FIGURE 20 – Intégration de nos objectifs de recherche sur un procédé d'amplification de CSM cultivées sur microporteurs au sein du développement d'une thérapie cellulaire à base de CSM

PROBLÉMATIQUES

- Chapitre 3 : Quel est l'impact du matériel biologique de départ sur la croissance des CSM ?
- Chapitre 4 : Quel système de culture choisir pour l'amplification de CSM sur microporteurs et comment les caractériser ?
- Chapitre 5 : Comment stimuler la croissance des CSM dans un milieu sans sérum pour favoriser la compréhension de leur environnement biochimique ?
- Chapitre 6 : Quelles caractéristiques cellulaires doivent être suivies afin d'obtenir des CSM avec une capacité thérapeutique maintenue ?

5 Références bibliographiques

- [1] A MAEHLE. Ambiguous Cells : The Emergence of the Stem Cell Concept in the Nineteenth and Twentieth Centuries. *Notes and records of the royal society of london*, 65(4) :359–378, 2011.
- [2] A J BECKER et al. Cytological demonstration of the clonal nature of spleen colonies derived from transplanted mouse marrow cells. *Nature*, 197 :452–454, 1963.
- [3] J A THOMSON et al. Embryonic Stem Cell Lines Derived from Human Blastocysts. *Science*, 282(5391) :1145–1147, 1998.
- [4] C A COWAN et al. Derivation of Embryonic Stem-Cell Lines from Human Blastocysts. *New england journal of medicine*, 350(13) :1353–1356, 2004.
- [5] Y CHUNG et al. Human Embryonic Stem Cell Lines Generated without Embryo Destruction. *Cell stem cell*, 2(2) :113–117, 2008.
- [6] E S ROSLER et al. Long-term culture of human embryonic stem cells in feeder-free conditions. *Developmental dynamics*, 229(2) :259–274, 2004.
- [7] THE INTERNATIONAL STEM CELL INITIATIVE. Characterization of human embryonic stem cell lines by the international stem cell initiative. *Nature biotechnology*, 25(7) :803–816, 2007.
- [8] H LIN et al. Stem cell therapy : an exercise in patience and prudence. *Philosophical transactions of the royal society of london. series b, biological sciences*, 368(1609) :20110334, 2013.
- [9] K TAKAHASHI et al. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell*, 126(4) :663–676, 2006.
- [10] G MASCRÉ et al. Distinct contribution of stem and progenitor cells to epidermal maintenance. *Nature*, 489(7415) :257–262, 2012.
- [11] L SHAHRIYARI et al. Symmetric vs. Asymmetric Stem Cell Divisions : An Adaptation against Cancer? *Plos one*, 8(10) :e76195, 2013.
- [12] A LECHNER et al. Stem/progenitor cells derived from adult tissues : potential for the treatment of diabetes mellitus. *American journal of physiology - endocrinology and metabolism*, 284(2) :E259–E266, 2003.
- [13] M A WALASEK et al. Hematopoietic stem cell expansion : challenges and opportunities. *Annals of the new york academy of sciences*, 1266(1) :138–150, 2012.
- [14] J E TILL et al. A direct measurement of the radiation sensitivity of normal mouse bone marrow cells. *Radiation research*, 14 :213–222, 1961.
- [15] J STINGL et al. Purification and unique properties of mammary epithelial stem cells. *Nature*, 439(7079) :993–997, 2006.
- [16] C M MORSHEAD et al. Neural stem cells in the adult mammalian forebrain : A relatively quiescent subpopulation of subependymal cells. *Neuron*, 13(5) :1071–1082, 1994.
- [17] D W BIANCHI et al. Male fetal progenitor cells persist in maternal blood for as long as 27 years postpartum. *Proceedings of the national academy of sciences of the united states of america*, 93(2) :705–708, 1996.

- [18] P LIN et al. Serial Transplantation and Long-term Engraftment of Intra-arterially Delivered Clonally Derived Mesenchymal Stem Cells to Injured Bone Marrow. *Molecular therapy*, 22(1) :160–168, 2014.
- [19] B SACCHETTI et al. Self-renewing osteoprogenitors in bone marrow sinusoids can organize a hematopoietic microenvironment. *Cell*, 131(2) :324–336, 2007.
- [20] K I PAPPAS et al. Novel sources of fetal stem cells : where do they fit on the developmental continuum ? *Regenerative medicine*, 4(3) :423–433, 2009.
- [21] A SHAFIEE et al. Fetal Endothelial and Mesenchymal Progenitors From the Human Term Placenta : Potency and Clinical Potential. *Stem cells translational medicine*, 4(5) :419–423, 2015.
- [22] J PATEL et al. Novel isolation strategy to deliver pure fetal-origin and maternal-origin mesenchymal stem cell (MSC) populations from human term placenta. *Placenta*, 35(11) :969–971, 2014.
- [23] P HOU et al. Pluripotent Stem Cells Induced from Mouse Somatic Cells by Small-Molecule Compounds. *Science*, 341(6146) :651–654, 2013.
- [24] E V NOVOSADOVA et al. Induced pluripotent stem cells : from derivation to application in biochemical and biomedical research. *Biochemistry. biokhimiia*, 79(13) :1425–1441, 2014.
- [25] J BEERS et al. Passaging and colony expansion of human pluripotent stem cells by enzyme-free dissociation in chemically defined culture conditions. *Nature protocols*, 7(11) :2029–2040, 2012.
- [26] W LAI et al. ROCK Inhibition Facilitates the Generation of Human-Induced Pluripotent Stem Cells in a Defined, Feeder-, and Serum-Free System. *Cellular reprogramming*, 12(6) :641–653, 2010.
- [27] D A ROBINSON et al. The promise of induced pluripotent stem cells in research and therapy. *Nature*, 481(7381) :295–305, 2012.
- [28] C A HERBERTS et al. Risk factors in the development of stem cell therapy. *Journal of translational medicine*, 9(1) :29, 2011.
- [29] M ALLISON. Hemacord approval may foreshadow regulatory creep for HSC therapies. *Nature biotechnology*, 30(4) :304–304, 2012.
- [30] M R LAW. The characteristics and fulfillment of conditional prescription drug approvals in Canada. *Health policy*, 116(2–3) :154–161, 2014.
- [31] E DOLGIN. Next-generation stem cell therapy poised to enter EU market. *Nature biotechnology*, 33(3) :224–225, 2015.
- [32] G Q DALEY. The promise and perils of stem cell therapeutics. *Cell stem cell*, 10(6) :740–749, 2012.
- [33] G F ROUSSEAU et al. Large-scale production of red blood cells from stem cells : what are the technical challenges ahead ? *Biotechnology journal*, 9(1) :28–38, 2014.
- [34] *Initial clinical trials of hesc-derived oligodendrocyte progenitor cells in subacute spinal cord injury*. Annual Scientific Meeting of the International Spinal Cord Society. Vienne, Austria, 2016.
- [35] S D SCHWARTZ et al. Embryonic stem cell trials for macular degeneration : a preliminary report. *The lancet*, 379(9817) :713–720, 2012.

- [36] M NAKANO-OKUNO et al. Ethics of iPSC-Based Clinical Research for Age-Related Macular Degeneration : Patient-Centered Risk-Benefit Analysis. *Stem cell reviews and reports*, 10(6) :743–752, 2014.
- [37] E RATCLIFFE et al. Current status and perspectives on stem cell-based therapies undergoing clinical trials for regenerative medicine : case studies. *British medical bulletin*, 108(1) :73–94, 2013.
- [38] J BARTUNEK et al. Cardiopoietic Stem Cell Therapy in Heart FailureThe C-CURE (Cardiopoietic stem Cell therapy in heart failURE) Multicenter Randomized Trial With Lineage-Specified Biologics. *Journal of the american college of cardiology*, 61(23) :2329–2338, 2013.
- [39] P MACCHIARINI et al. Clinical transplantation of a tissue-engineered airway. *The lancet*, 372(9655) :2023–2030, 2008.
- [40] J M WILSON. A History Lesson for Stem Cells. *Science*, 324(5928) :727–728, 2009.
- [41] N TRAINOR et al. Rethinking clinical delivery of adult stem cell therapies. *Nature biotechnology*, 32(8) :729–735, 2014.
- [42] K COOPMAN. From production to patient : challenges and approaches for delivering cell therapies. *Stembook*, 2014. DOI : 10.3824/stembook.1.97.1.
- [43] W ASGHAR et al. Preserving human cells for regenerative, reproductive, and transfusion medicine. *Biotechnology journal*, 9(7) :895–903, 2014.
- [44] K G CHEN et al. Human pluripotent stem cell culture : considerations for maintenance, expansion, and therapeutics. *Cell stem cell*, 14(1) :13–26, 2014.
- [45] A K CHEN et al. Application of human mesenchymal and pluripotent stem cell microcarrier cultures in cellular therapy : achievements and future direction. *Biotechnology advances*, 31(7) :1032–1046, 2013.
- [46] D J PROCKOP. Marrow stromal cells as stem cells for nonhematopoietic tissues. *Science (new york, n.y.)*, 276(5309) :71–74, 1997.
- [47] A J FRIEDENSTEIN et al. The development of fibroblast colonies in monolayer cultures of guinea-pig bone marrow and spleen cells. *Cell and tissue kinetics*, 3(4) :393–403, 1970.
- [48] A J FRIEDENSTEIN. Precursor cells of mechanocytes. *International review of cytology*, 47 :327–359, 1976.
- [49] B V AFANASYEV et al. AJ Friedenstein, founder of the mesenchymal stem cell concept. *Cellular therapy and transplantation*, 1(3) :35–38, 2009.
- [50] M OWEN. Marrow stromal stem cells. *Journal of cell science*, 1988(Supplement 10) :63–76, 1988.
- [51] A I CAPLAN. Cell delivery and tissue regeneration. *J control release* :157–165, 1989.
- [52] A I CAPLAN. Mesenchymal stem cells. *Journal of orthopaedic research : official publication of the orthopaedic research society*, 9(5) :641–650, 1991.
- [53] M F PITTENGER et al. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science (new york, N.Y.)*, 284(5411) :143–147, 1999.
- [54] K LE BLANC et al. Mesenchymal stem cells inhibit and stimulate mixed lymphocyte cultures and mitogenic responses independently of the major histocompatibility complex. *Scandinavian journal of immunology*, 57(1) :11–20, 2003.
- [55] M DOMINICI et al. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. the international society for cellular therapy position statement. *Cytotherapy*, 8(4) :315–317, 2006.

- [56] H WEGMEYER et al. Mesenchymal Stromal Cell Characteristics Vary Depending on Their Origin. *Stem cells and development* :2606–2618, juin 2013.
- [57] M STRIOGA et al. Same or not the same? Comparison of adipose tissue-derived versus bone marrow-derived mesenchymal stem and stromal cells. *Stem cells and development*, 21(14) :2724–2752, 2012.
- [58] AA NERY et al. Human mesenchymal stem cells : from immunophenotyping by flow cytometry to clinical applications. *Cytometry. part a : the journal of the international society for analytical cytology*, 83(1) :48–61, 2013.
- [59] DA DE UGARTE et al. Comparison of Multi-Lineage Cells from Human Adipose Tissue and Bone Marrow. *Cells tissues organs*, 174(3) :101–109, 2003.
- [60] NF LIZIER et al. Scaling-up of dental pulp stem cells isolated from multiple niches. *Plos one*, 7(6) :e39885, 2012.
- [61] T IWATA et al. Validation of human periodontal ligament-derived cells as a reliable source for cytotherapeutic use. *Journal of clinical periodontology*, 37(12) :1088–1099, 2010.
- [62] T MOCHIZUKI et al. Higher chondrogenic potential of fibrous synovium– and adipose synovium–derived cells compared with subcutaneous fat–derived cells : Distinguishing properties of mesenchymal stem cells in humans. *Arthritis & rheumatism*, 54(3) :843–853, 2006.
- [63] WM JACKSON et al. Mesenchymal progenitor cells derived from traumatized human muscle. *Journal of tissue engineering and regenerative medicine*, 3(2) :129–138, 2009.
- [64] M CRISAN et al. Perivascular multipotent progenitor cells in human organs. *Annals of the new york academy of sciences*, 1176 :118–123, 2009.
- [65] J RINGE et al. Human mastoid periosteum-derived stem cells : promising candidates for skeletal tissue engineering. *Journal of tissue engineering and regenerative medicine*, 2(2-3) :136–146, 2008.
- [66] D ULRICH et al. Toward the use of endometrial and menstrual blood mesenchymal stem cells for cell-based therapies. *Expert opinion on biological therapy*, 13(10) :1387–1400, 2013.
- [67] M MOUISEDDINE et al. Characterization and Histological Localization of Multipotent Mesenchymal Stromal Cells in the Human Postnatal Thymus. *Stem cells and development*, 17(6) :1165–1174, 2008.
- [68] K RYU et al. Tonsil-derived mesenchymal stromal cells : evaluation of biologic, immunologic and genetic factors for successful banking. *Cytotherapy*, 14(10) :1193–1202, 2012.
- [69] P CHONG et al. Human peripheral blood derived mesenchymal stem cells demonstrate similar characteristics and chondrogenic differentiation potential to bone marrow derived mesenchymal stem cells. *Journal of orthopaedic research*, 30(4) :634–642, 2012.
- [70] JY LIU et al. Derivation of Functional Smooth Muscle Cells from Multipotent Human Hair Follicle Mesenchymal Stem Cells. *Tissue engineering. part a*, 16(8) :2553–2564, 2010.
- [71] G BROOKE et al. Manufacturing of human placenta-derived mesenchymal stem cells for clinical trials. *British journal of haematology*, 144(4) :571–579, 2009.
- [72] S ILANCHERAN et al. Human Fetal Membranes : A Source of Stem Cells for Tissue Regeneration and Repair? *Placenta*, 30(1) :2–10, 2009.

- [73] I HUSSAIN et al. New approach to isolate mesenchymal stem cell (MSC) from human umbilical cord blood. *Cell biology international*, 36(7) :595–600, 2012.
- [74] C K TONG et al. Generation of mesenchymal stem cell from human umbilical cord tissue using a combination enzymatic and mechanical disassociation method. *Cell biology international*, 35(3) :221–226, 2011.
- [75] A MURAGLIA et al. Clonal mesenchymal progenitors from human bone marrow differentiate in vitro according to a hierarchical model. *Journal of cell science*, 113(7) :1161–1166, 2000.
- [76] L HU et al. Side-by-Side Comparison of the Biological Characteristics of Human Umbilical Cord and Adipose Tissue-Derived Mesenchymal Stem Cells. *Biomed research international*, 2013 :438243, 2013.
- [77] M CRISAN et al. A perivascular origin for mesenchymal stem cells in multiple human organs. *Cell stem cell*, 3(3) :301–313, 2008.
- [78] K C RUSSELL et al. In vitro high-capacity assay to quantify the clonal heterogeneity in trilineage potential of mesenchymal stem cells reveals a complex hierarchy of lineage commitment. *Stem cells*, 28(4) :788–798, 2010.
- [79] P BIANCO et al. The meaning, the sense and the significance : translating the science of mesenchymal stem cells into medicine. *Nature medicine*, 19(1) :35–42, 2013.
- [80] D C COLTER et al. Identification of a subpopulation of rapidly self-renewing and multipotential adult stem cells in colonies of human marrow stromal cells. *Proceedings of the national academy of sciences of the united states of america*, 98(14) :7841–7845, 2001.
- [81] M J WHITFIELD et al. Onset of heterogeneity in culture-expanded bone marrow stromal cells. *Stem cell research*, 11(3) :1365–1377, 2013.
- [82] G D'IPPOLITO et al. Marrow-isolated adult multilineage inducible (MIAMI) cells, a unique population of post-natal young and old human cells with extensive expansion and differentiation potential. *Journal of cell science*, 117(14) :2971–2981, 2004.
- [83] Y KURODA et al. Unique multipotent cells in adult human mesenchymal cell populations. *Proceedings of the national academy of sciences of the united states of america*, 107(19) :8639–8643, 2010.
- [84] S PACINI et al. Are MSCs angiogenic cells? New insights on human nestin-positive bone marrow-derived multipotent cells. *Stem cell research*, 2 :20, 2014.
- [85] M REYES et al. Purification and ex vivo expansion of postnatal human marrow mesodermal progenitor cells. *Blood*, 98(9) :2615–2625, 2001.
- [86] T A LODIE et al. Systematic analysis of reportedly distinct populations of multipotent bone marrow-derived stem cells reveals a lack of distinction. *Tissue engineering*, 8(5) :739–751, 2002.
- [87] M SUSZYNSKA et al. The Proper Criteria for Identification and Sorting of Very Small Embryonic-Like Stem Cells, and Some Nomenclature Issues. *Stem cells and development*, 23(7) :702–713, 2014.
- [88] G KÖGLER et al. A new human somatic stem cell from placental cord blood with intrinsic pluripotent differentiation potential. *The journal of experimental medicine*, 200(2) :123–135, 2004.
- [89] M ZEDDOU et al. Umbilical cord fibroblasts : Could they be considered as mesenchymal stem cells? *World journal of stem cells*, 6(3) :367–370, 2014.

- [90] R DANOVA-ALT et al. Very small embryonic-like stem cells purified from umbilical cord blood lack stem cell characteristics. *Plos one*, 7(4) :e34899, 2012.
- [91] J FENG et al. Dual origin of mesenchymal stem cells contributing to organ growth and repair. *Proceedings of the national academy of sciences*, 108(16) :6503–6508, 2011.
- [92] I R MURRAY et al. Natural history of mesenchymal stem cells, from vessel walls to culture vessels. *Cellular and molecular life sciences* :1–22, 2013.
- [93] J M SORRELL et al. Influence of Adult Mesenchymal Stem Cells on In Vitro Vascular Formation. *Tissue engineering part a*, 15(7) :1751–1761, 2009.
- [94] V RASINI et al. Mesenchymal stromal/stem cells markers in the human bone marrow. *Cytotherapy*, 15(3) :292–306, 2013.
- [95] D BEXELL et al. Bone Marrow Multipotent Mesenchymal Stroma Cells Act as Pericyte-like Migratory Vehicles in Experimental Gliomas. *Molecular therapy*, 17(1) :183–190, 2008.
- [96] A BRONCKAERS et al. Mesenchymal stem/stromal cells as a pharmacological and therapeutic approach to accelerate angiogenesis. *Pharmacology & therapeutics*, 143(2) :181–196, 2014.
- [97] A R ALEXANIAN et al. Enhancing the efficiency of direct reprogramming of human mesenchymal stem cells into mature neuronal-like cells with the combination of small molecule modulators of chromatin modifying enzymes, SMAD signaling and cyclic adenosine monophosphate levels. *The international journal of biochemistry & cell biology*, 45(8) :1633–1638, 2013.
- [98] M ULLAH et al. Transdifferentiation of mesenchymal stem cells-derived adipogenic-differentiated cells into osteogenic- or chondrogenic-differentiated cells proceeds via dedifferentiation and have a correlation with cell cycle arresting and driving genes. *Differentiation*, 85(3) :78–90, 2013.
- [99] D G PHINNEY et al. Concise review : mesenchymal stem/multipotent stromal cells : the state of transdifferentiation and modes of tissue repair–current views. *Stem cells (dayton, ohio)*, 25(11) :2896–2902, 2007.
- [100] M R REAGAN et al. Concise Review : Mesenchymal Stem Cell Tumor-Homing : Detection Methods in Disease Model Systems. *Stem cells*, 29(6) :920–927, 2011.
- [101] P LOPEZ-IGLESIAS et al. Short and long term fate of human AMSC subcutaneously injected in mice. *World journal of stem cells*, 3(6) :53–62, 2011.
- [102] E C PERIN et al. Imaging Long-Term Fate of Intramyocardially Implanted Mesenchymal Stem Cells in a Porcine Myocardial Infarction Model. *Plos one*, 6(9) :e22949, 2011.
- [103] S HWANG et al. Hepatogenic differentiation of mesenchymal stem cells in a rat model of thioacetamide-induced liver cirrhosis. *Cell biology international*, 36(3) :279–288, 2012.
- [104] K KEMP et al. Fusion between human mesenchymal stem cells and rodent cerebellar Purkinje cells. *Neuropathology and applied neurobiology*, 37(2) :166–178, 2011.
- [105] Y WU et al. Mesenchymal Stem Cells Enhance Wound Healing Through Differentiation and Angiogenesis. *Stem cells*, 25(10) :2648–2659, 2007.

- [106] L von BAHN et al. Analysis of tissues following mesenchymal stromal cell therapy in humans indicates limited long-term engraftment and no ectopic tissue formation. *Stem cells*, 30(7) :1575–1578, 2012.
- [107] U M FISCHER et al. Pulmonary Passage is a Major Obstacle for Intravenous Stem Cell Delivery : The Pulmonary First-Pass Effect. *Stem cells and development*, 18(5) :683–692, 2008.
- [108] S KIDD et al. Direct Evidence of Mesenchymal Stem Cell Tropism for Tumor and Wounding Microenvironments Using In Vivo Bioluminescent Imaging. *Stem cells*, 27(10) :2614–2623, 2009.
- [109] S M MILLARD et al. Mesenchymal stem cells for systemic therapy : shotgun approach or magic bullets? *BioEssays : news and reviews in molecular, cellular and developmental biology*, 35(3) :173–182, 2013.
- [110] M SERAFINI et al. Establishment of bone marrow and hematopoietic niches in vivo by reversion of chondrocyte differentiation of human bone marrow stromal cells. *Stem cell research*, 12(3) :659–672, 2014.
- [111] M K MAJUMDAR et al. Phenotypic and functional comparison of cultures of marrow-derived mesenchymal stem cells (MSCs) and stromal cells. *Journal of cellular physiology*, 176(1) :57–66, 1998.
- [112] Y MUGURUMA et al. Reconstitution of the functional human hematopoietic microenvironment derived from human mesenchymal stem cells in the murine bone marrow compartment. *Blood*, 107(5) :1878–1887, 2006.
- [113] S MÉNDEZ-FERRER et al. Mesenchymal and haematopoietic stem cells form a unique bone marrow niche. *Nature*, 466(7308) :829–834, 2010.
- [114] J KHABBAL et al. Differential Clearance of Rat and Human Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stem Cells From the Brain After Intra-arterial Infusion in Rats. *Cell transplantation*, 24(5) :819–828, 2015.
- [115] T KINNAIRD et al. Local Delivery of Marrow-Derived Stromal Cells Augments Collateral Perfusion Through Paracrine Mechanisms. *Circulation*, 109(12) :1543–1549, 2004.
- [116] L SHIN et al. Human mesenchymal stem cell grafts enhance normal and impaired wound healing by recruiting existing endogenous tissue stem/progenitor cells. *Stem cells transl med*, 2(1) :33–42, 2013.
- [117] D van POLL et al. Mesenchymal stem cell-derived molecules directly modulate hepatocellular death and regeneration in vitro and in vivo. *Hepatology*, 47(5) :1634–1643, 2008.
- [118] J W LEE et al. Allogeneic human mesenchymal stem cells for treatment of E. coli endotoxin-induced acute lung injury in the ex vivo perfused human lung. *Proceedings of the national academy of sciences*, 106(38) :16357–16362, 2009.
- [119] K LE BLANC et al. Treatment of severe acute graft-versus-host disease with third party haploidentical mesenchymal stem cells. *The lancet*, 363(9419) :1439–1441, 2004.
- [120] M GAZDIC et al. Mesenchymal Stem Cells : A Friend or Foe in Immune-Mediated Diseases. *Stem cell reviews and reports*, 11(2) :280–287, 2015.
- [121] D J PROCKOP et al. Mesenchymal stem/stromal cells (MSCs) : role as guardians of inflammation. *Molecular therapy : the journal of the american society of gene therapy*, 20(1) :14–20, 2012.
- [122] M KRAMPERA. Mesenchymal stromal cell 'licensing' : a multistep process. *Leukemia*, 25(9) :1408–1414, 2011.
- [123] M L ARANGO-RODRIGUEZ et al. Could cancer and infection be adverse effects of mesenchymal stromal cell therapy? *World journal of stem cells*, 7(2) :408–417, 2015.

- [124] J L SPEES et al. Mitochondrial transfer between cells can rescue aerobic respiration. *Proceedings of the national academy of sciences*, 103(5) :1283–1288, 2006.
- [125] H LIN et al. Mitochondrial transfer from Wharton's jelly-derived mesenchymal stem cells to mitochondria-defective cells recaptures impaired mitochondrial function. *Mitochondrion*, 22 :31–44, 2015.
- [126] Y M CHO et al. Mesenchymal Stem Cells Transfer Mitochondria to the Cells with Virtually No Mitochondrial Function but Not with Pathogenic mtDNA Mutations. *Plos one*, 7(3) :e32778, 2012.
- [127] R C LAI et al. Mesenchymal stem cell exosomes. *Seminars in cell & developmental biology*, 40 :82–88, 2015.
- [128] H XIN et al. Exosomes/miRNAs as mediating cell-based therapy of stroke. *Frontiers in cellular neuroscience*, 8, 2014.
- [129] A I CAPLAN et al. The MSC : an injury drugstore. *Cell stem cell*, 9(1) :11–15, 2011.
- [130] J KURTZBERG et al. Allogeneic Human Mesenchymal Stem Cell Therapy (Remestemcel-L, Prochymal) as a Rescue Agent for Severe Refractory Acute Graft-versus-Host Disease in Pediatric Patients. *Biology of blood and marrow transplantation*, 20(2) :229–235, 2014.
- [131] H FAN et al. Anterior cruciate ligament regeneration using mesenchymal stem cells and silk scaffold in large animal model. *Biomaterials*, 30(28) :4967–4977, 2009.
- [132] A M W CHAUDHARI et al. Anterior Cruciate Ligament–Injured Subjects Have Smaller Anterior Cruciate Ligaments Than Matched Controls A Magnetic Resonance Imaging Study. *The american journal of sports medicine*, 37(7) :1282–1287, 2009.
- [133] M ZEDDOU et al. The umbilical cord matrix is a better source of mesenchymal stem cells (MSC) than the umbilical cord blood. *Cell biology international*, 34(7) :693–701, 2010.
- [134] X Q BROWN et al. Evaluation of polydimethylsiloxane scaffolds with physiologically-relevant elastic moduli : interplay of substrate mechanics and surface chemistry effects on vascular smooth muscle cell response. *Biomaterials*, 26(16) :3123–3129, 2005.
- [135] M H LEE et al. The effect of non-specific interactions on cellular adhesion using model surfaces. *Biomaterials*, 26(14) :1721–1730, 2005.
- [136] D DOCHEVA et al. Human mesenchymal stem cells in contact with their environment : surface characteristics and the integrin system. *Journal of cellular and molecular medicine*, 11(1) :21–38, 2007.
- [137] L MACQUEEN et al. Mesenchymal stem cell mechanobiology and emerging experimental platforms. *Journal of the royal society interface*, 10(84) :20130179, 2013.
- [138] B LADOUX et al. Physically based principles of cell adhesion mechanosensitivity in tissues. *Reports on progress in physics*, 75(11) :116601, 2012.
- [139] S LEE et al. Cell Adhesion and Long-Term Survival of Transplanted Mesenchymal Stem Cells : A Prerequisite for Cell Therapy. *Oxidative medicine and cellular longevity*, 2015 :e632902, 2015.
- [140] Y WANG et al. Cell adhesion and mechanical stimulation in the regulation of mesenchymal stem cell differentiation. *Journal of cellular and molecular medicine*, 17(7) :823–832, 2013.

- [141] P R BARANIAK et al. Scaffold-free culture of mesenchymal stem cell spheroids in suspension preserves multilineage potential. *Cell and tissue research*, 347(3) :701–711, 2012.
- [142] T G van KOOTEN et al. Plasma-treated polystyrene surfaces : model surfaces for studying cell–biomaterial interactions. *Biomaterials*, 25(10) :1735–1747, 2004.
- [143] L GHASEMI-MOBARAKEH et al. Structural properties of scaffolds : Crucial parameters towards stem cells differentiation. *World journal of stem cells*, 7(4) :728–744, 2015.
- [144] S GOTTIPAMULA et al. Serum-free media for the production of human mesenchymal stromal cells : a review. *Cell proliferation*, 46(6) :608–627, 2013.
- [145] M T LAM et al. Comparison of several attachment methods for human iPS, embryonic and adipose-derived stem cells for tissue engineering. *Journal of tissue engineering and regenerative medicine*, 6(3) :s80–s86, 2012.
- [146] U HERSEL et al. RGD modified polymers : biomaterials for stimulated cell adhesion and beyond. *Biomaterials*, 24(24) :4385–4415, 2003.
- [147] S H MCBRIDE et al. Modulation of Stem Cell Shape and Fate A : The Role of Density and Seeding Protocol on Nucleus Shape and Gene Expression. *Tissue engineering part a*, 14(9) :1561–1572, 2008.
- [148] I-H SONG et al. Dexamethasone inhibition of confluence-induced apoptosis in human mesenchymal stem cells. *Journal of orthopaedic research*, 27(2) :216–221, 2009.
- [149] A GARG et al. Non-enzymatic dissociation of human mesenchymal stromal cells improves chemokine-dependent migration and maintains immunosuppressive function. *Cytotherapy*, 16(4) :545–559, 2014.
- [150] A L van WEZEL. Growth of cell-strains and primary cells on micro-carriers in homogeneous culture. *Nature*, 216(5110) :64–65, 1967.
- [151] T K GOH et al. Microcarrier Culture for Efficient Expansion and Osteogenic Differentiation of Human Fetal Mesenchymal Stem Cells. *BioResearch open access*, 2(2) :84–97, 2013.
- [152] F dos SANTOS et al. Toward a Clinical-Grade Expansion of Mesenchymal Stem Cells from Human Sources : A Microcarrier-Based Culture System Under Xeno-Free Conditions. *Tissue engineering. part c, methods*, 17(12) :1201–1210, 2011.
- [153] D SCHOP et al. Expansion of human mesenchymal stromal cells on microcarriers : growth and metabolism. *Journal of tissue engineering and regenerative medicine*, 4(2) :131–140, 2010.
- [154] S FRAUENSCHUH et al. A microcarrier-based cultivation system for expansion of primary mesenchymal stem cells. *Biotechnology progress*, 23(1) :187–193, 2007.
- [155] N E TIMMINS et al. Closed system isolation and scalable expansion of human placental mesenchymal stem cells. *Biotechnology and bioengineering*, 109(7) :1817–1826, 2012.
- [156] K Y TAN et al. Serum-free media formulations are cell line-specific and require optimization for microcarrier culture. *Cytotherapy*, 17(8) :1152–1165, 2015.
- [157] M S CROUGHAN et al. Effects of microcarrier concentration in animal cell culture. *Biotechnology and bioengineering*, 32(8) :975–982, 1988.

- [158] R S CHERRY et al. Physical mechanisms of cell damage in microcarrier cell culture bioreactors. *Biotechnology and bioengineering*, 32(8) :1001–1014, 1988.
- [159] A S SIMARIA et al. Allogeneic cell therapy bioprocess economics and optimization : single-use cell expansion technologies. *Biotechnology and bioengineering*, 111(1) :69–83, 2014.
- [160] J VARANI et al. Cell growth on microcarriers : comparison of proliferation on and recovery from various substrates. *Journal of biological standardization*, 14(4) :331–336, 1986.
- [161] C WEBER et al. Expansion and Harvesting of hMSC-TERT. *The open biomedical engineering journal*, 1 :38–46, 2007.
- [162] H S YANG et al. Suspension culture of mammalian cells using thermosensitive microcarrier that allows cell detachment without proteolytic enzyme treatment. *Cell transplantation*, 19(9) :1123–1132, 2010.
- [163] C R E DUFFY et al. Long term mesenchymal stem cell culture on a defined synthetic substrate with enzyme free passaging. *Biomaterials*, 35(23) :5998–6005, 2014.
- [164] J C GUEDES et al. Tio₂-doped phosphate glass microcarriers : a stable bioactive substrate for expansion of adherent mammalian cells. *Journal of biomaterials applications*, 28(1) :3–11, 2013.
- [165] A BERTOLO et al. Injectable Microcarriers as Human Mesenchymal Stem Cell Support and their Application for Cartilage and Degenerated Intervertebral Disc Repair. *European cells & materials*, 29 :70–81, 2015.
- [166] Xiu WANG et al. Perfusion culture-induced template-assisted assembling of cell-laden microcarriers is a promising route for fabricating macrotissues. *Biotechnology journal*, 9(11) :1425–1434, 2014.
- [167] C FERRARI et al. Limiting cell aggregation during mesenchymal stem cell expansion on microcarriers. *Biotechnology progress*, 28(3) :780–787, 2012.
- [168] K E M. BENDERS et al. Extracellular matrix scaffolds for cartilage and bone regeneration. *Trends in biotechnology*, 31(3) :169–176, 2013.
- [169] Nayeli RODRÍGUEZ-FUENTES et al. Nukbone® promotes proliferation and osteoblastic differentiation of mesenchymal stem cells from human amniotic membrane. *Biochemical and biophysical research communications*, 434(3) :676–680, 2013.
- [170] K M PAWELEC et al. Ionic solutes impact collagen scaffold bioactivity. *Journal of materials science : materials in medicine*, 26(2) :1–5, 2015.
- [171] Y LUO et al. Alginate/Nanohydroxyapatite Scaffolds with Designed Core/Shell Structures Fabricated by 3d Plotting and in Situ Mineralization for Bone Tissue Engineering. *Acs applied materials & interfaces*, 7(12) :6541–6549, 2015.
- [172] B A LINDBORG et al. A chitosan-hyaluronan based hydrogel-hydrocolloid supports in vitro culture and differentiation of human mesenchymal stem/stromal cells (MSCs). *Tissue engineering. part a*, 21(11-12) :1952–1962, 2015.
- [173] M C PHIPPS et al. Mesenchymal Stem Cell Responses to Bone-Mimetic Electrospun Matrices Composed of Polycaprolactone, Collagen I and Nanoparticulate Hydroxyapatite. *Plos one*, 6(2) :e16813, 2011.
- [174] W C LEE et al. Origin of Enhanced Stem Cell Growth and Differentiation on Graphene and Graphene Oxide. *Acs nano*, 5(9) :7334–7341, 2011.

- [175] B WEYAND et al. A Differential Pressure Laminar Flow Reactor Supports Osteogenic Differentiation and Extracellular Matrix Formation from Adipose Mesenchymal Stem Cells in a Macroporous Ceramic Scaffold. *BioResearch open access*, 1(3) :145–156, 2012.
- [176] K UEMATSU et al. Cartilage regeneration using mesenchymal stem cells and a three-dimensional poly-lactic-glycolic acid (PLGA) scaffold. *Biomaterials*, 26(20) :4273–4279, 2005.
- [177] M JÄGER et al. Proliferation and Osteogenic Differentiation of Mesenchymal Stem Cells Cultured onto Three Different Polymers In Vitro. *Annals of biomedical engineering*, 33(10) :1319–1332, 2005.
- [178] R RAVICHANDRAN et al. Precipitation of nanohydroxyapatite on PLLA/PBLG/Collagen nanofibrous structures for the differentiation of adipose derived stem cells to osteogenic lineage. *Biomaterials*, 33(3) :846–855, 2012.
- [179] C J F KAHN et al. Mechanical properties evolution of a PLGA-PLCL composite scaffold for ligament tissue engineering under static and cyclic traction-torsion in vitro culture conditions. *Journal of biomaterials science. polymer edition*, 24(8) :899–911, 2013.
- [180] F MWALE et al. The effect of glow discharge plasma surface modification of polymers on the osteogenic differentiation of committed human mesenchymal stem cells. *Biomaterials*, 27(10) :2258–2264, 2006.
- [181] C P LAURENT et al. Towards a Tissue-Engineered Ligament : Design and Preliminary Evaluation of a Dedicated Multi-Chamber Tension-Torsion Bioreactor. *Processes*, 2(1) :167–179, 2014.
- [182] S SART et al. Three-Dimensional Aggregates of Mesenchymal Stem Cells : Cellular Mechanisms, Biological Properties, and Applications. *Tissue engineering part b : reviews*, 20(5) :365–380, 2013.
- [183] M A KINNEY et al. Engineering three-dimensional stem cell morphogenesis for the development of tissue models and scalable regenerative therapeutics. *Annals of biomedical engineering*, 42(2) :352–367, 2014.
- [184] C HILDEBRANDT et al. A scaffold-free in vitro model for osteogenesis of human mesenchymal stem cells. *Tissue and cell*, 43(2) :91–100, 2011.
- [185] J E FRITH et al. Dynamic Three-Dimensional Culture Methods Enhance Mesenchymal Stem Cell Properties and Increase Therapeutic Potential. *Tissue engineering part c : methods*, 16(4) :735–749, 2009.
- [186] S ZHANG et al. The effects of spheroid formation of adipose-derived stem cells in a microgravity bioreactor on stemness properties and therapeutic potential. *Biomaterials*, 41 :15–25, 2015.
- [187] Y LI et al. Three-dimensional spheroid culture of human umbilical cord mesenchymal stem cells promotes cell yield and stemness maintenance. *Cell and tissue research, In Press*, 2015. DOI : 10.1007/s00441-014-2055-x.
- [188] T J BARTOSH et al. Aggregation of human mesenchymal stromal cells (MSCs) into 3d spheroids enhances their anti-inflammatory properties. *Proceedings of the national academy of sciences of the united states of america*, 107(31) :13724–13729, 2010.
- [189] Y-H WANG et al. Characterization and evaluation of the differentiation ability of human adipose-derived stem cells growing in scaffold-free suspension culture. *Cytotherapy*, 16(4) :485–495, 2014.
- [190] Y OHYABU et al. Cartilaginous tissue formation from bone marrow cells using rotating wall vessel (RWV) bioreactor. *Biotechnology and bioengineering*, 95(5) :1003–1008, 2006.

- [191] N SHIMONY et al. A 3d rotary renal and mesenchymal stem cell culture model unveils cell death mechanisms induced by matrix deficiency and low shear stress. *Nephrology dialysis transplantation*, 23(6) :2071–2080, 2008.
- [192] A-C TSAI et al. Compaction, fusion, and functional activation of three-dimensional human mesenchymal stem cell aggregate. *Tissue engineering part a*, 21(9-10) :1705–1719, 2015.
- [193] S ALIMPERTI et al. Serum-free spheroid suspension culture maintains mesenchymal stem cell proliferation and differentiation potential. *Biotechnology progress*, 30(4) :974–983, 2014.
- [194] R VECCHIATINI et al. Effect of dynamic three-dimensional culture on osteogenic potential of human periodontal ligament-derived mesenchymal stem cells entrapped in alginate microbeads. *Journal of periodontal research*, 50(4) :544–553, 2014.
- [195] H-S YU et al. Construction of Mesenchymal Stem Cell-Containing Collagen Gel with a Macrochanneled Polycaprolactone Scaffold and the Flow Perfusion Culturing for Bone Tissue Engineering. *Bioresearch open access*, 1(3) :124–136, 2012.
- [196] F RUEDINGER et al. Hydrogels for 3d mammalian cell culture : a starting guide for laboratory practice. *Applied microbiology and biotechnology*, 99(2) :623–636, 2014.
- [197] C WANG et al. The control of anchorage-dependent cell behavior within a hydrogel/microcarrier system in an osteogenic model. *Biomaterials*, 30(12) :2259–2269, 2009.
- [198] J L WILSON et al. Stem cell microencapsulation for phenotypic control, bioprocessing, and transplantation. *Biotechnology and bioengineering*, 110(3) :667–682, 2013.
- [199] B M WATSON et al. Biodegradable, In Situ-Forming Cell-Laden Hydrogel Composites of Hydroxyapatite Nanoparticles for Bone Regeneration. *Industrial & engineering chemistry research*, In Press, 2015. DOI : 10 . 1021 / acs . iecr . 5b01388.
- [200] M WESTHRIN et al. Osteogenic differentiation of human mesenchymal stem cells in mineralized alginate matrices. *Plos one*, 10(3) :e0120374, 2015.
- [201] M D WEIR et al. Human bone marrow stem cell-encapsulating calcium phosphate scaffolds for bone repair. *Acta biomaterialia*, 6(10) :4118–4126, 2010.
- [202] I MARTIN et al. The role of bioreactors in tissue engineering. *Trends in biotechnology*, 22(2) :80–86, 2004.
- [203] K C RUSTAD et al. Enhancement of mesenchymal stem cell angiogenic capacity and stemness by a biomimetic hydrogel scaffold. *Biomaterials*, 33(1) :80–90, 2012.
- [204] Q A RAFIQ et al. Cell therapies : why scale matters. *Pharmaceutical bioprocessing*, 3(2) :97–99, 2015.
- [205] R SPIER et al. An examination of the data and concepts germane to the oxygenation of cultured animal cells. *Developments in biological standardization*, 55 :81–92, 1982.
- [206] C FENGE et al. Cell culture bioreactors. *Biotechnology and bioprocessing*, 30 :155–224, 2005.
- [207] V SINGH. Disposable bioreactor for cell culture using wave-induced agitation. *Cytotechnology*, 30(1-3) :149–158, 1999.
- [208] R P SCHWARZ et al. Cell culture for three-dimensional modeling in rotating-wall vessels : an application of simulated microgravity. *Journal of tissue culture methods*, 14(2) :51–57, 1992.

- [209] Y MARTIN et al. Bioreactors for tissue mass culture : Design, characterization, and recent advances. *Biomaterials*, 26(35) :7481–7503, 2005.
- [210] R A KNAZEK et al. Cell culture on artificial capillaries : an approach to tissue growth in vitro. *Science*, 178(4056) :65–66, 1972.
- [211] J ROWLEY et al. Meeting Lot-Size Challenges of Manufacturing Adherent Cells for Therapy. *Bioprocess international*, 10(S3) :16–22, 2012.
- [212] F MEUWLY et al. Packed-bed bioreactors for mammalian cell culture : Bioprocess and biomedical applications. *Biotechnology advances*, 25(1) :45–56, 2007.
- [213] C SCHIRMAIER et al. Scale-up of adipose tissue-derived mesenchymal stem cell production in stirred single-use bioreactors under low-serum conditions. *Engineering in life sciences*, 14(3) :292–303, 2014.
- [214] C L ELSEBERG et al. Microcarrier-based expansion process for hMSCs with high vitality and undifferentiated characteristics. *The international journal of artificial organs*, 35(2) :93–107, 2012.
- [215] G A HIGUERA et al. Patterns of amino acid metabolism by proliferating human mesenchymal stem cells. *Tissue engineering. part a*, 18(5-6) :654–664, 2012.
- [216] F DOS SANTOS et al. Ex vivo expansion of human mesenchymal stem cells : a more effective cell proliferation kinetics and metabolism under hypoxia. *Journal of cellular physiology*, 223(1) :27–35, 2010.
- [217] G HIGUERA et al. Quantifying in vitro growth and metabolism kinetics of human mesenchymal stem cells using a mathematical model. *Tissue engineering. part a*, 15(9) :2653–2663, 2009.
- [218] A K CHEN et al. Increasing efficiency of human mesenchymal stromal cell culture by optimization of microcarrier concentration and design of medium feed. *Cytotherapy*, 17(2) :163–173, 2015.
- [219] S SART et al. Influence of culture parameters on ear mesenchymal stem cells expanded on microcarriers. *Journal of biotechnology*, 150(1) :149–160, 2010.
- [220] F DOS SANTOS et al. A xenogeneic-free bioreactor system for the clinical-scale expansion of human mesenchymal stem/stromal cells. *Biotechnology and bioengineering*, 111(6) :1116–1127, 2014.
- [221] B CUNHA et al. Exploring continuous and integrated strategies for the up- and downstream processing of human mesenchymal stem cells. *Journal of biotechnology, In Press*, 2015. DOI : 10.1016/j.jbiotec.2015.02.023.
- [222] T R J HEATHMAN et al. Expansion, harvest and cryopreservation of human mesenchymal stem cells in a serum-free microcarrier process. *Biotechnology and bioengineering, In Press*, 2015. DOI : 10.1002/bit.25582.
- [223] G ZHAO et al. Large-scale expansion of Wharton's jelly-derived mesenchymal stem cells on gelatin microbeads, with retention of self-renewal and multipotency characteristics and the capacity for enhancing skin wound healing. *Stem cell research & therapy*, 6(1) :38, 2015.
- [224] J HUPFELD et al. Modulation of mesenchymal stromal cell characteristics by microcarrier culture in bioreactors. *Biotechnology and bioengineering*, 111(11) :2290–2302, 2014.
- [225] S R CARUSO et al. Growth and functional harvesting of human mesenchymal stromal cells cultured on a microcarrier-based system. *Biotechnology progress*, 30(4) :889–895, 2014.

- [226] Y YUAN et al. Improved expansion of human bone marrow-derived mesenchymal stem cells in microcarrier-based suspension culture. *Journal of tissue engineering and regenerative medicine*, 8(3) :210–225, 2014.
- [227] M HERVY et al. Long term expansion of bone marrow-derived hMSCs on novel synthetic microcarriers in xeno-free, defined conditions. *Plos one*, 9(3) :e92120, 2014.
- [228] Q A RAFIQ et al. Culture of human mesenchymal stem cells on microcarriers in a 5 l stirred-tank bioreactor. *Biotechnology letters*, 35(8) :1233–1245, 2013.
- [229] A E B TURNER et al. The performance of decellularized adipose tissue microcarriers as an inductive substrate for human adipose-derived stem cells. *Biomaterials*, 33(18) :4490–4499, 2012.
- [230] C J HEWITT et al. Expansion of human mesenchymal stem cells on microcarriers. *Biotechnology letters*, 33(11) :2325–2335, 2011.
- [231] M CHEN et al. A modular approach to the engineering of a centimeter-sized bone tissue construct with human amniotic mesenchymal stem cells-laden microcarriers. *Biomaterials*, 32(30) :7532–7542, 2011.
- [232] L SUN et al. Cell proliferation of human bone marrow mesenchymal stem cells on biodegradable microcarriers enhances in vitro differentiation potential. *Cell proliferation*, 43(5) :445–456, 2010.
- [233] G EIBES et al. Maximizing the ex vivo expansion of human mesenchymal stem cells using a microcarrier-based stirred culture system. *Journal of biotechnology*, 146(4) :194–197, 2010.
- [234] A B YEATTS et al. Human mesenchymal stem cell position within scaffolds influences cell fate during dynamic culture. *Biotechnology and bioengineering*, 109(9) :2381–2391, 2012.
- [235] C WEBER et al. Cultivation and Differentiation of Encapsulated hMSC-TERT in a Disposable Small-Scale Syringe-Like Fixed Bed Reactor. *The open biomedical engineering journal*, 1 :64–70, 2007.
- [236] P J HANLEY et al. Efficient manufacturing of therapeutic mesenchymal stromal cells with the use of the Quantum Cell Expansion System. *Cytotherapy*, 16(8) :1048–1058, 2014.
- [237] A NEUMANN et al. Characterization and Application of a Disposable Rotating Bed Bioreactor for Mesenchymal Stem Cell Expansion. *Bioengineering*, 1(4) :231–245, 2014.
- [238] G Q TEIXEIRA et al. A Multicompartment Holder for Spinner Flasks Improves Expansion and Osteogenic Differentiation of Mesenchymal Stem Cells in Three-Dimensional Scaffolds. *Tissue engineering. part c, methods*, 20(12) :984–993, 2014.
- [239] M LIU et al. Expansion of human amniotic fluid stem cells in 3-dimensional fibrous scaffolds in a stirred bioreactor. *Biochemical engineering journal*, 82 :71–80, 2014.
- [240] A PAPADIMITROPOULOS et al. Expansion of human mesenchymal stromal cells from fresh bone marrow in a 3d scaffold-based system under direct perfusion. *Plos one*, 9(7) :e102359, 2014.
- [241] P NOLD et al. Good manufacturing practice-compliant animal-free expansion of human bone marrow derived mesenchymal stroma cells in a closed hollow-fiber-based bioreactor. *Biochemical and biophysical research communications*, 430(1) :325–330, 2013.
- [242] A MIZUKAMI et al. Efficient expansion of mesenchymal stromal cells in a disposable fixed bed culture system. *Biotechnology progress*, 29(2) :568–572, 2013.

- [243] M N PONS et al. Application of quantitative image analysis to a mammalian cell line grown on microcarriers. *Biotechnology and bioengineering*, 40(1) :187–193, 1992.
- [244] I CHEVALOT et al. Production of a membrane-bound protein, the human gamma-glutamyl transferase, by CHO cells cultivated on microcarriers, in aggregates and in suspension. *Cytotechnology*, 16(2) :121–129, 1994.
- [245] E PETIOT et al. Real-time monitoring of adherent Vero cell density and apoptosis in bioreactor processes. *Cytotechnology*, 64(4) :429–441, 2012.
- [246] S P FORESTELL et al. Development of the optimal inoculation conditions for microcarrier cultures. *Biotechnology and bioengineering*, 39(3) :305–313, 1992.
- [247] S K BOTH et al. A rapid and efficient method for expansion of human mesenchymal stem cells. *Tissue engineering*, 13(1) :3–9, 2007.
- [248] C BARTMANN et al. Two steps to functional mesenchymal stromal cells for clinical application. *Transfusion*, 47(8) :1426–1435, 2007.
- [249] W S HU et al. A mechanistic analysis of the inoculum requirement for the cultivation of mammalian cells on microcarriers. *Biotechnology and bioengineering*, 27(5) :585–595, 1985.
- [250] M-L COLLIGNON et al. Axial impeller selection for anchorage dependent animal cell culture in stirred bioreactors : Methodology based on the impeller comparison at just-suspended speed of rotation. *Chemical engineering science*, 65(22) :5929–5941, 2010.
- [251] S KAISER et al. Fluid Flow and Cell Proliferation of Mesenchymal Adipose-Derived Stem Cells in Small-Scale, Stirred, Single-Use Bioreactors. *Chemie ingénieur technique*, 85(1-2) :95–102, 2013.
- [252] J B SIECK et al. Development of a Scale-Down Model of hydrodynamic stress to study the performance of an industrial CHO cell line under simulated production scale bioreactor conditions. *Journal of biotechnology*, 164(1) :41–49, 2013.
- [253] A W NIENOW et al. A potentially scalable method for the harvesting of hMSCs from microcarriers. *Biochemical engineering journal*, 85 :79–88, 2014.
- [254] B CUNHA et al. Filtration methodologies for the clarification and concentration of human mesenchymal stem cells. *Journal of membrane science*, 478 :117–129, 2015.
- [255] C MARTIN et al. Revisiting MSC expansion from critical quality attributes to critical culture process parameters. *Process biochemistry*, In Press, 2016. DOI : 10.1016/j.procbio.2016.04.017.
- [256] Z GAMIE et al. Skeletal tissue engineering using mesenchymal or embryonic stem cells : clinical and experimental data. *Expert opinion on biological therapy*, 14(11) :1611–1639, 2014.
- [257] J R LAVOIE et al. Uncovering the secrets of mesenchymal stem cells. *Biochimie*, 95(12) :2212–2221, 2013.
- [258] C van den BOS et al. Therapeutic human cells : manufacture for cell therapy/regenerative medicine. *Advances in biochemical engineering/biotechnology*, 138 :61–97, 2014.
- [259] R R SHARMA et al. Mesenchymal stem or stromal cells : a review of clinical applications and manufacturing practices. *Transfusion*, 54(5) :1418–1437, 2014.

- [260] S VISWANATHAN et al. Soliciting strategies for developing cell-based reference materials to advance mesenchymal stromal cell research and clinical translation. *Stem cells and development*, 23(11) :1157–1167, 2014.
- [261] D G PHINNEY et al. MSCs : science and trials. *Nature medicine*, 19(7) :812, 2013.
- [262] M F PITTENGER. MSCs : science and trials. *Nature medicine*, 19(7) :811, 2013.
- [263] W E FIBBE et al. MSCs : science and trials. *Nature medicine*, 19(7) :812–813, 2013.
- [264] P BIANCO. Reply to MSCs : science and trials. *Nature medicine*, 19(7) :813–814, 2013.
- [265] P BIANCO. "mesenchymal" stem cells. *Annual review of cell and developmental biology*, 30 :677–704, 2014.
- [266] P BOURIN et al. Stromal cells from the adipose tissue-derived stromal vascular fraction and culture expanded adipose tissue-derived stromal/stem cells : a joint statement of the international federation for adipose therapeutics and science (ifats) and the international society for cellular therapy (isct). *Cytotherapy*, 15(6) :641–648, 2013.
- [267] A WETZIG et al. Differential marker expression by cultures rich in mesenchymal stem cells. *BMC cell biology*, 14 :54, 2013.
- [268] FOOD AND DRUG ADMINISTRATION, CENTER FOR BIOLOGICS EVALUATION AND RESEARCH. Cellular and Gene Therapy Guidances - Draft Guidance for Industry : Potency Tests for Cellular and Gene Therapy Products. Last updated 2015-01-27.
- [269] C A BRAVERY et al. Potency assay development for cellular therapy products : an isct review of the requirements and experiences in the industry. *Cytotherapy*, 15(1) :9–19, 2013.
- [270] N MA et al. Magnetic Resonance Imaging with Superparamagnetic Iron Oxide Fails to Track the Long-term Fate of Mesenchymal Stem Cells Transplanted into Heart. *Scientific reports*, 5 :9058, 2015.
- [271] A ZHANG et al. Proteomic identification of differently expressed proteins responsible for osteoblast differentiation from human mesenchymal stem cells. *Molecular and cellular biochemistry*, 304(1-2) :167–179, 2007.
- [272] A ALDRIDGE et al. Assay validation for the assessment of adipogenesis of multipotential stromal cells-a direct comparison of four different methods. *Cytotherapy*, 15(1) :89–101, 2013.
- [273] A SHAHDADFAR et al. In vitro expansion of human mesenchymal stem cells : choice of serum is a determinant of cell proliferation, differentiation, gene expression, and transcriptome stability. *Stem cells (dayton, ohio)*, 23(9) :1357–1366, 2005.
- [274] R M DELAINE-SMITH et al. Matrix production and collagen structure are enhanced in two types of osteogenic progenitor cells by a simple fluid shear stress stimulus. *European cells and materials*, 24 :162–174, 2012.
- [275] Y J LEE et al. Quantitative, Label-Free Characterization of Stem Cell Differentiation at the Single-Cell Level by Broadband Coherent Anti-Stokes Raman Scattering Microscopy. *Tissue engineering part c : methods*, 20(7) :562–569, 2013.
- [276] T ICHIMURA et al. Visualizing cell state transition using raman spectroscopy. *PLoS ONE*, 9(1) :e84478, 2014.
- [277] C DE BARI et al. A biomarker-based mathematical model to predict bone-forming potency of human synovial and periosteal mesenchymal stem cells. *Arthritis and rheumatism*, 58(1) :240–250, 2008.

- [278] A BERTOLO et al. In Vitro Cell Motility as a Potential Mesenchymal Stem Cell Marker for Multipotency. *Stem cells translational medicine*, 4(1) :84–90, 2015.
- [279] H SASAKI et al. Label-free morphology-based prediction of multiple differentiation potentials of human mesenchymal stem cells for early evaluation of intact cells. *Plos one*, 9(4) :e93952, 2014.
- [280] W C LEE et al. Multivariate biophysical markers predictive of mesenchymal stromal cell multipotency. *Proceedings of the national academy of sciences of the united states of america*, 111(42) :E4409–4418, 2014.
- [281] M B MURPHY et al. Mesenchymal stem cells : environmentally responsive therapeutics for regenerative medicine. *Experimental and molecular medicine*, 45 :e54, 2013.
- [282] H KUPCOVA SKALNIKOVA. Proteomic techniques for characterisation of mesenchymal stem cell secretome. *Biochimie*, 95(12) :2196–2211, 2013.
- [283] H Y KIM et al. Biological markers of mesenchymal stromal cells as predictors of response to autologous stem cell transplantation in patients with amyotrophic lateral sclerosis : an investigator-initiated trial and in vivo study. *Stem cells*, 32(10) :2724–2731, 2014.
- [284] E COLLINS et al. Differential Efficacy of Human Mesenchymal Stem Cells Based on Source of Origin. *The journal of immunology*, 193(9) :4381–4390, 2014.
- [285] M DI NICOLA et al. Human bone marrow stromal cells suppress t-lymphocyte proliferation induced by cellular or nonspecific mitogenic stimuli. *Blood*, 99(10) :3838–3843, 2002.
- [286] H S YOO et al. Mesenchymal stem cell lines isolated by different isolation methods show variations in the regulation of graft-versus-host disease. *Immune network*, 13(4) :133, 2013.
- [287] D L DESKINS et al. Human mesenchymal stromal cells : identifying assays to predict potency for therapeutic selection. *Stem cells translational medicine*, 2(2) :151–158, 2013.
- [288] M KRAMPERA et al. Immunological characterization of multipotent mesenchymal stromal cells—the international society for cellular therapy (isct) working proposal. *Cytotherapy*, 15(9) :1054–1061, 2013.
- [289] R M SAMSONRAJ et al. Establishing criteria for human mesenchymal stem cell potency. *Stem cells, In Press*, 2015. DOI : 10.1002/stem.1982.
- [290] J REN et al. Intra-subject variability in human bone marrow stromal cell (BMSC) replicative senescence : molecular changes associated with BMSC senescence. *Stem cell research*, 11(3) :1060–1073, 2013.
- [291] D F STRONCEK et al. Establishing a bone marrow stromal cell transplant program at the national institutes of health clinical center. *Tissue engineering. part b, reviews*, 20(3) :200–205, 2014.
- [292] W WAGNER et al. Different facets of aging in human mesenchymal stem cells. *Tissue engineering. part b, reviews*, 16(4) :445–453, 2010.
- [293] S A KUZNETSOV et al. Enumeration of the colony-forming units-fibroblast from mouse and human bone marrow in normal and pathological conditions. *Stem cell research*, 2(1) :83–94, 2009.
- [294] C LANGE et al. Accelerated and safe expansion of human mesenchymal stromal cells in animal serum-free medium for transplantation and regenerative medicine. *Journal of cellular physiology*, 213(1) :18–26, 2007.

- [295] E J GANG et al. SSEA-4 identifies mesenchymal stem cells from bone marrow. *Blood*, 109(4) :1743–1751, 2007.
- [296] Y KURODA et al. Mesenchymal stem cells and their subpopulation, pluripotent muse cells, in basic research and regenerative medicine. *Anatomical record (hoboken, N.J. : 2007)*, 297(1) :98–110, 2014.
- [297] G SIEGEL et al. Phenotype, donor age and gender affect function of human bone marrow-derived mesenchymal stromal cells. *Bmc medicine*, 11 :146, 2013.
- [298] B ROSON-BURGO et al. Transcriptomic portrait of human Mesenchymal Stromal/Stem cells isolated from bone marrow and placenta. *Bmc genomics*, 15(1) :910, 2014.
- [299] E PIERANTOZZI et al. Pluripotency regulators in human mesenchymal stem cells : expression of NANOG but not of OCT-4 and SOX-2. *Stem cells and development*, 20(5) :915–923, 2011.
- [300] S S FATIMAH et al. Stemness and angiogenic gene expression changes of serial-passage human amnion mesenchymal cells. *Microvascular research*, 86 :21–29, 2013.
- [301] Y ZHU et al. Alteration of Histone Acetylation Pattern during Long-Term Serum-Free Culture Conditions of Human Fetal Placental Mesenchymal Stem Cells. *Plos one*, 10(2) :e0117068, 2015.
- [302] K DRELA et al. Low oxygen atmosphere facilitates proliferation and maintains undifferentiated state of umbilical cord mesenchymal stem cells in an hypoxia inducible factor-dependent manner. *Cytotherapy*, 16(7) :881–892, 2014.
- [303] Z LI et al. Epigenetic Dysregulation in Mesenchymal Stem Cell Aging and Spontaneous Differentiation. *Plos one*, 6(6) :e20526, 2011.
- [304] O TROHATOU et al. Sox2 suppression by miR-21 governs human mesenchymal stem cell properties. *Stem cells translational medicine*, 3(1) :54–68, 2014.
- [305] C CHEN et al. Telomerase governs immunomodulatory properties of mesenchymal stem cells by regulating FAS ligand expression. *Embo molecular medicine*, 6(3) :322–334, 2014.
- [306] H ALVES et al. A link between the accumulation of DNA damage and loss of multi-potency of human mesenchymal stromal cells. *Journal of cellular and molecular medicine*, 14(12) :2729–2738, 2010.
- [307] D J KURZ et al. Senescence-associated (beta)-galactosidase reflects an increase in lysosomal mass during replicative ageing of human endothelial cells. *Journal of cell science*, 113 (Pt 20) :3613–3622, 2000.
- [308] L KILPINEN et al. Aging bone marrow mesenchymal stromal cells have altered membrane glycerophospholipid composition and functionality. *Journal of lipid research*, 54(3) :622–635, 2013.
- [309] R M SAMSONRAJ et al. Telomere length analysis of human mesenchymal stem cells by quantitative PCR. *Gene*, 519(2) :348–355, 2013.
- [310] K TARTE et al. Clinical-grade production of human mesenchymal stromal cells : occurrence of aneuploidy without transformation. *Blood*, 115(8) :1549–1553, 2010.
- [311] P H OLIVEIRA et al. Impact of hypoxia and long-term cultivation on the genomic stability and mitochondrial performance of ex vivo expanded human stem/stromal cells. *Stem cell research*, 9(3) :225–236, 2012.
- [312] A STOLZING et al. Age-related changes in human bone marrow-derived mesenchymal stem cells : consequences for cell therapies. *Mechanisms of ageing and development*, 129(3) :163–173, 2008.

- [313] H J JIN et al. Comparative Analysis of Human Mesenchymal Stem Cells from Bone Marrow, Adipose Tissue, and Umbilical Cord Blood as Sources of Cell Therapy. *International journal of molecular sciences*, 14(9) :17986–18001, 2013.
- [314] S ZIMMERMANN et al. Lack of telomerase activity in human mesenchymal stem cells. *Leukemia*, 17(6) :1146–1149, 2003.
- [315] Y ZHOU et al. Trend of telomerase activity change during human iPSC self-renewal and differentiation revealed by a quartz crystal microbalance based assay. *Scientific reports*, 4, 2014.
- [316] J C ESTRADA et al. Human mesenchymal stem cell-replicative senescence and oxidative stress are closely linked to aneuploidy. *Cell death and disease*, 4 :e691, 2013.
- [317] A BORODKINA et al. Interaction between ROS dependent DNA damage, mitochondria and p38 MAPK underlies senescence of human adult stem cells. *Aging*, 6(6) :481–495, 2014.
- [318] C TSAI et al. Hypoxia inhibits senescence and maintains mesenchymal stem cell properties through down-regulation of E2a-p21 by HIF-TWIST. *Blood*, 117(2) :459–469, 2011.
- [319] A TICHON et al. Oxidative stress protection by novel telomerase activators in mesenchymal stem cells derived from healthy and diseased individuals. *Current molecular medicine*, 13(6) :1010–1022, 2013.
- [320] D J MCGRAIL et al. Biomechanical analysis predicts decreased human mesenchymal stem cell function before molecular differences. *Experimental cell research*, 319(5) :684–696, 2013.
- [321] A SCHELLENBERG et al. Proof of principle : quality control of therapeutic cell preparations using senescence-associated DNA-methylation changes. *Bmc research notes*, 7 :254, 2014.
- [322] D J PROCKOP et al. Relearning the lessons of genomic stability of human cells during expansion in culture : implications for clinical research. *Stem cells (dayton, ohio)*, 30(6) :1051–1052, 2012.
- [323] L HE et al. A shorter telomere is the key factor in preventing cultured human mesenchymal stem cells from senescence escape. *Histochemistry and cell biology*, 142(3) :257–267, 2014.
- [324] D J PROCKOP et al. Defining the risks of mesenchymal stromal cell therapy. *Cytotherapy*, 12(5) :576–578, 2010.
- [325] A TORSVIK et al. Spontaneous Malignant Transformation of Human Mesenchymal Stem Cells Reflects Cross-Contamination : Putting the Research Field on Track – Letter. *Cancer research*, 70(15) :6393–6396, 2010.
- [326] Q PAN et al. Detection of spontaneous tumorigenic transformation during culture expansion of human mesenchymal stromal cells. *Experimental biology and medicine (maywood, n.j.)*, 239(1) :105–115, 2014.
- [327] K KONO et al. Characterization of the cell growth analysis for detection of immortal cellular impurities in human mesenchymal stem cells. *Biologicals*, 43(2) :146–149, 2015.
- [328] G L CHEN et al. Remestemcel-L for acute graft-versus-host disease therapy. *Expert opinion on biological therapy*, 14(2) :261–269, 2014.
- [329] B STRAUER et al. The acute and long-term effects of intracoronary Stem cell Transplantation in 191 patients with chronic heart failure : the STAR-heart study. *European journal of heart failure*, 12(7) :721–729, 2010.

- [330] J LEE et al. A randomized, open-label, multicenter trial for the safety and efficacy of adult mesenchymal stem cells after acute myocardial infarction. *Journal of Korean medical science*, 29(1) :23–31, 2014.
- [331] A BURA et al. Phase I trial : the use of autologous cultured adipose-derived stroma/stem cells to treat patients with non-revascularizable critical limb ischemia. *Cytotherapy*, 16(2) :245–257, 2014.
- [332] D C HESS et al. A double-blind placebo-controlled clinical evaluation of MultiStem for the treatment of ischemic stroke. *International journal of stroke : official journal of the international stroke society*, 9(3) :381–386, 2014.
- [333] Y B CHO et al. Long-Term Results of Adipose-Derived Stem Cell Therapy for the Treatment of Crohn's Fistula. *Stem cells translational medicine* :199, 2015.
- [334] K MESIMAKI et al. Novel maxillary reconstruction with ectopic bone formation by GMP adipose stem cells. *International journal of oral and maxillofacial surgery*, 38(3) :201–209, 2009.
- [335] L BARKHOLT et al. Risk of tumorigenicity in mesenchymal stromal cell-based therapies—bridging scientific observations and regulatory viewpoints. *Cytotherapy*, 15(7) :753–759, 2013.
- [336] K FROELICH et al. Chromosomal aberrations and deoxyribonucleic acid single-strand breaks in adipose-derived stem cells during long-term expansion in vitro. *Cytotherapy*, 15(7) :767–781, 2013.
- [337] S Y KIM et al. Asymmetric Aneuploidy in Mesenchymal Stromal Cells Detected by In Situ Karyotyping and Fluorescence In Situ Hybridization : Suggestions for Reference Values for Stem Cells. *Stem cells and development*, 24(1) :77–92, 2014.
- [338] Y WANG et al. Long-term cultured mesenchymal stem cells frequently develop genomic mutations but do not undergo malignant transformation. *Cell death and disease*, 4 :e950, 2013.
- [339] L SENSEBÉ. Beyond genetic stability of mesenchymal stromal cells. *Cytotherapy*, 15(11) :1307–1308, 2013.
- [340] S W CROWDER et al. Passage-dependent cancerous transformation of human mesenchymal stem cells under carcinogenic hypoxia. *Faseb journal*, 27(7) :2788–2798, 2013.
- [341] K GUTHRIE et al. Potency evaluation of tissue engineered and regenerative medicine products. *Trends in biotechnology*, 31(9) :505–514, 2013.
- [342] R H AICHER. Is the FDA Regulating the Practice of Medicine ? *Aesthetic surgery journal*, 33(3) :452–455, 2013.
- [343] J P MARTINS et al. Towards an advanced therapy medicinal product based on mesenchymal stromal cells isolated from the umbilical cord tissue : quality and safety data. *Stem cell research and therapy*, 5(1) :9, 2014.
- [344] P WUCHTER et al. Standardization of Good Manufacturing Practice-compliant production of bone marrow-derived human mesenchymal stromal cells for immunotherapeutic applications. *Cytotherapy*, 17(2) :128–139, 2015.
- [345] R L REGER et al. Should publications on mesenchymal stem/progenitor cells include in-process data on the preparation of the cells ? *Stem cells translational medicine*, 3(5) :632–635, 2014.
- [346] J GALIPEAU. The mesenchymal stromal cells dilemma—does a negative phase III trial of random donor mesenchymal stromal cells in steroid-resistant graft-versus-host disease represent a death knell or a bump in the road ? *Cytotherapy*, 15(1) :2–8, 2013.

- [347] A OTTE et al. Mesenchymal stem cells maintain long-term in vitro stemness during explant culture. *Tissue engineering. part c, methods*, 19(12) :937–948, 2013.
- [348] M KITTAKA et al. Clumps of a mesenchymal stromal cell/extracellular matrix complex can be a novel tissue engineering therapy for bone regeneration. *Cytotherapy, In Press*, 2015. DOI : 10.1016/j.jcyt.2015.01.007.
- [349] R LEVATO et al. Biofabrication of tissue constructs by 3d bioprinting of cell-laden microcarriers. *Biofabrication*, 6(3) :035020, 2014.
- [350] S WANG et al. The utilization of perforated bioinert chambers to generate an in vivo isolated space for tissue engineering involving chondrocytes, mesenchymal stem cells, and fibroblasts. *Tissue engineering. part c, methods*, 19(5) :352–362, 2013.
- [351] Z ZHANG et al. A comparison of bioreactors for culture of fetal mesenchymal stem cells for bone tissue engineering. *Biomaterials*, 31(33) :8684–8695, 2010.
- [352] N FEKETE et al. Essential Components for Ex Vivo Proliferation of Mesenchymal Stromal Cells. *Tissue engineering part c : methods*, 20(2) :129–139, 2013.
- [353] C CRAMER et al. Persistent High Glucose Concentrations Alter the Regenerative Potential of Mesenchymal Stem Cells. *Stem cells and development*, 19(12) :1875–1884, 2010.
- [354] M DHANASEKARAN et al. Effect of high glucose on extensive culturing of mesenchymal stem cells derived from subcutaneous fat, omentum fat and bone marrow. *Cell biochemistry and function*, 31(1) :20–29, 2013.
- [355] M J FARRELL et al. Functional consequences of glucose and oxygen deprivation on engineered mesenchymal stem cell-based cartilage constructs. *Osteoarthritis and cartilage*, 23(1) :134–142, 2015.
- [356] C DROMARD et al. Human adipose derived stroma/stem cells grow in serum-free medium as floating spheres. *Experimental cell research*, 317(6) :770–780, 2011.
- [357] D SCHOP et al. Growth, metabolism, and growth inhibitors of mesenchymal stem cells. *Tissue engineering. part a*, 15(8) :1877–1886, 2009.
- [358] P A SOTIROPOULOU et al. Characterization of the optimal culture conditions for clinical scale production of human mesenchymal stem cells. *Stem cells (dayton, ohio)*, 24(2) :462–471, 2006.
- [359] S JUNG et al. Identification of growth and attachment factors for the serum-free isolation and expansion of human mesenchymal stromal cells. *Cytotherapy*, 12(5) :637–657, 2010.
- [360] B GHARIBI et al. Effects of medium supplements on proliferation, differentiation potential, and in vitro expansion of mesenchymal stem cells. *Stem cells translational medicine*, 1(11) :771–782, 2012.
- [361] S H BAE et al. L-Ascorbic acid 2-phosphate and fibroblast growth factor-2 treatment maintains differentiation potential in bone marrow-derived mesenchymal stem cells through expression of hepatocyte growth factor. *Growth factors (chur, switzerland)* :1–8, 2015.
- [362] C WEI et al. Effects of vitamin C on characteristics retaining of in vitro-cultured mouse adipose-derived stem cells. *In vitro cellular & developmental biology. animal*, 50(1) :75–86, 2014.
- [363] H ALVES et al. Effect of antioxidant supplementation on the total yield, oxidative stress levels, and multipotency of bone marrow-derived human mesenchymal stromal cells. *Tissue engineering. part a*, 19(7-8) :928–937, 2013.

- [364] S HAGMANN et al. Different culture media affect growth characteristics, surface marker distribution and chondrogenic differentiation of human bone marrow-derived mesenchymal stromal cells. *Bmc musculoskeletal disorders*, 14 :223, 2013.
- [365] I SOMASUNDARAM et al. Human adult stem cells maintain a constant phenotype profile irrespective of their origin, Basal media, and long term cultures. *Stem cells international*, 2015 :146051, 2015.
- [366] S LEE et al. New Culture Medium Concepts for Cell Transplantation. *Transplantation proceedings*, 45(8) :3108–3112, 2013.
- [367] D A BRINDLEY et al. Peak serum : implications of serum supply for cell therapy manufacturing. *Regenerative medicine*, 7(1) :7–13, 2012.
- [368] M SUNDIN et al. No alloantibodies against mesenchymal stromal cells, but presence of anti-fetal calf serum antibodies, after transplantation in allogeneic hematopoietic stem cell recipients. *Haematologica*, 92(9) :1208–1215, 2007.
- [369] C MENARD et al. Clinical-grade mesenchymal stromal cells produced under various good manufacturing practice processes differ in their immunomodulatory properties : standardization of immune quality controls. *Stem cells and development*, 22(12) :1789–1801, 2013.
- [370] P SWAMYNATHAN et al. Are serum-free and xeno-free culture conditions ideal for large scale clinical grade expansion of Wharton's jelly derived mesenchymal stem cells ? A comparative study. *Stem cell research and therapy*, 5(4) :88, 2014.
- [371] J H YLOSTALO et al. Unique characteristics of human mesenchymal stromal/progenitor cells pre-activated in 3-dimensional cultures under different conditions. *Cytotherapy*, 16(11) :1486–1500, 2014.
- [372] P R AMABLE et al. Mesenchymal stromal cell proliferation, gene expression and protein production in human platelet-rich plasma-supplemented media. *Plos one*, 9(8) :e104662, 2014.
- [373] F ATASHI et al. Autologous Platelet-Rich Plasma : A Biological Supplement to Enhance Adipose-Derived Mesenchymal Stem Cell Expansion. *Tissue engineering part c : methods*, 21(3) :253–262, 2014.
- [374] S CASTIGLIA et al. Inactivated human platelet lysate with psoralen : a new perspective for mesenchymal stromal cell production in Good Manufacturing Practice conditions. *Cytotherapy*, 16(6) :750–763, 2014.
- [375] S GRIFFITHS et al. Human platelet lysate stimulates high-passage and senescent human multipotent mesenchymal stromal cell growth and rejuvenation in vitro. *Cytotherapy*, 15(12) :1469–1483, 2013.
- [376] F PERUT et al. Preparation method and growth factor content of platelet concentrate influence the osteogenic differentiation of bone marrow stromal cells. *Cytotherapy*, 15(7) :830–839, 2013.
- [377] D T SHIH et al. Preparation, quality criteria, and properties of human blood platelet lysate supplements for ex vivo stem cell expansion. *New biotechnology*, 32(1) :199–211, 2015.
- [378] A LAITINEN et al. A robust and reproducible animal serum-free culture method for clinical-grade bone marrow-derived mesenchymal stromal cells. *Cytotechnology* :1–16, 2015.

- [379] K SATO et al. Serum-free isolation and culture system to enhance the proliferation and bone regeneration of adipose tissue-derived mesenchymal stem cells. *In vitro cellular and developmental biology. animal, In Press*, 2015. DOI : 10.1007/s11626-014-9860-0.
- [380] Y WANG et al. Human mesenchymal stem cells possess different biological characteristics but do not change their therapeutic potential when cultured in serum free medium. *Stem cell research and therapy*, 5(6) :132, 2014.
- [381] D STEHLÍK et al. Xenogeneic protein-free cultivation of mesenchymal stromal cells - towards clinical applications. *Folia biologica*, 58(3) :106–114, 2012.
- [382] R NARCISI et al. Long-Term Expansion, Enhanced Chondrogenic Potential, and Suppression of Endochondral Ossification of Adult Human MSCs via WNT Signaling Modulation. *Stem cell reports*, 4(3) :459–472, 2015.
- [383] C BOCELLI-TYNDALL et al. FGF2 induces RANKL gene expression as well as IL1beta regulated MHC class II in human bone marrow-derived mesenchymal progenitor stromal cells. *Annals of the rheumatic diseases*, 74(1) :260–266, 2015.
- [384] Y W EOM et al. The role of growth factors in maintenance of stemness in bone marrow-derived mesenchymal stem cells. *Biochemical and biophysical research communications*, 445(1) :16–22, 2014.
- [385] S HAGMANN et al. FGF-2 addition during expansion of human bone marrow-derived stromal cells alters MSC surface marker distribution and chondrogenic differentiation potential. *Cell proliferation*, 46(4) :396–407, 2013.
- [386] J WU et al. TGF-beta1 induces senescence of bone marrow mesenchymal stem cells via increase of mitochondrial ROS production. *Bmc developmental biology*, 14 :21, 2014.
- [387] X ZHOU et al. Roles of FGF-2 and TGF-beta/FGF-2 on differentiation of human mesenchymal stem cells towards nucleus pulposus-like phenotype. *Growth factors (chur, switzerland)* :1–8, 2014.
- [388] G WALENDA et al. TGF-beta1 does not induce senescence of multipotent mesenchymal stromal cells and has similar effects in early and late passages. *Plos one*, 8(10) :e77656, 2013.
- [389] A REY-RICO et al. Adapted chondrogenic differentiation of human mesenchymal stem cells via controlled release of TGF-beta1 from poly(ethylene oxide)-terephthalate/poly(butylene terephthalate) multiblock scaffolds. *Journal of biomedical materials research part a*, 103(1) :371–383, 2015.
- [390] J M RYU et al. High glucose regulates cyclin D1/E of human mesenchymal stem cells through TGF-beta1 expression via Ca2+/PKC/MAPKs and PI3k/Akt/mTOR signal pathways. *Journal of cellular physiology*, 224(1) :59–70, 2010.
- [391] W KIM et al. The pivotal role of PDGF and its receptor isoforms in adipose-derived stem cells. *Histology and histopathology* :11598, 2015.
- [392] T LOPATINA et al. Platelet-derived growth factor regulates the secretion of extracellular vesicles by adipose mesenchymal stem cells and enhances their angiogenic potential. *Cell communication and signaling : ccs*, 12 :26, 2014.
- [393] B QU et al. PDGF-regulated miRNA-138 inhibits the osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells. *Biochemical and biophysical research communications*, 448(3) :241–247, 2014.
- [394] H TIAN et al. Enhanced proliferation of bone marrow mesenchymal stem cells by co-culture with TM4 mouse Sertoli cells : involvement of the EGF/PI3k/AKT pathway. *Molecular and cellular biochemistry*, 393(1-2) :155–164, 2014.

- [395] X ZHANG et al. Maintenance of high proliferation and multipotent potential of human hair follicle-derived mesenchymal stem cells by growth factors. *International journal of molecular medicine*, 31(4) :913–921, 2013.
- [396] P SALEHINEJAD et al. Effect of EGF and FGF on the expansion properties of human umbilical cord mesenchymal cells. *In vitro cellular and developmental biology. animal*, 49(7) :515–523, 2013.
- [397] C FERRETTI et al. Role of IGF1 and IGF1/VEGF on Human Mesenchymal Stromal Cells in Bone Healing : Two Sources and Two Fates. *Tissue engineering. part a*, 20(17-18) :2473–2482, 2014.
- [398] J DOORN et al. Insulin-like growth factor-I enhances proliferation and differentiation of human mesenchymal stromal cells in vitro. *Tissue engineering. part a*, 19(15-16) :1817–1828, 2013.
- [399] L ZHOU et al. Ex vivo expansion of bone marrow mesenchymal stem cells using microcarrier beads in a stirred bioreactor. *Biotechnology and bioprocess engineering*, 18(1) :173–184, 2013.
- [400] P GÁLVEZ et al. Enhancing Effect of Glucose Microspheres in the Viability of Human Mesenchymal Stem Cell Suspensions for Clinical Administration. *Pharmaceutical research*, 31(12) :3515–3528, 2014.
- [401] R A PEREZ et al. Therapeutic bioactive microcarriers : Co-delivery of growth factors and stem cells for bone tissue engineering. *Acta biomaterialia*, 10 :520–530, 2014.
- [402] X WANG et al. The osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells by controlled cell–cell interaction on micropatterned surfaces. *Journal of biomedical materials research part a*, 101(12) :3388–3395, 2013.
- [403] J LEE et al. Rewiring mesenchymal stem cell lineage specification by switching the biophysical microenvironment. *Scientific reports*, 4 :5188, 2014.
- [404] S GOBAA et al. Substrate elasticity modulates the responsiveness of mesenchymal stem cells to commitment cues. *Integrative biology : quantitative biosciences from nano to macro*, In Press, 2015. DOI : 10.1039/c4ib00176a.
- [405] E H SCHWAB et al. Distinct effects of RGD-glycoproteins on Integrin-mediated adhesion and osteogenic differentiation of human mesenchymal stem cells. *International journal of medical sciences*, 10(13) :1846–1859, 2013.
- [406] P TÁTRAI et al. A novel cyclic RGD-containing peptide polymer improves serum-free adhesion of adipose tissue-derived mesenchymal stem cells to bone implant surfaces. *Journal of materials science. materials in medicine*, 24(2) :479–488, 2013.
- [407] F CAO et al. Evaluating the Effects of Charged Oligopeptide Motifs Coupled with RGD on Osteogenic Differentiation of Mesenchymal Stem Cells. *Acs applied materials and interfaces*, In Press, 2015. DOI : 10.1021/acsami.5b00064.
- [408] P J DOLLEY-SONNEVILLE et al. Synthetic surface for expansion of human mesenchymal stem cells in xeno-free, chemically defined culture conditions. *Plos one*, 8(8) :e70263, 2013.
- [409] G JIN et al. Dynamic cell culture on porous biopolymer microcarriers in a spinner flask for bone tissue engineering : a feasibility study. *Biotechnology letters*, 36(7) :1539–1548, 2014.
- [410] J FENG et al. A scalable approach to obtain mesenchymal stem cells with osteogenic potency on apatite microcarriers. *Journal of biomaterials applications*, 29(1) :93–103, 2013.
- [411] P TSENG et al. Spontaneous osteogenesis of MSCs cultured on 3d microcarriers through alteration of cytoskeletal tension. *Biomaterials*, 33(2) :556–564, 2012.

- [412] A B YEATTS et al. Bioreactors to influence stem cell fate : augmentation of mesenchymal stem cell signaling pathways via dynamic culture systems. *Biochimica et biophysica acta*, 1830(2) :2470–2480, 2013.
- [413] K CIERPKA et al. hMSC Production in Disposable Bioreactors with Regards to GMP and PAT. *Chemie ingénieur techniek*, 85(1-2) :67–75, 2013.
- [414] Y LV et al. Pretreatment with mechano-growth factor E peptide protects bone marrow mesenchymal cells against damage by fluid shear stress. *Biotechnology letters*, 36(12) :2559–2569, 2014.
- [415] S HAYKAL et al. Double-chamber rotating bioreactor for dynamic perfusion cell seeding of large-segment tracheal allografts : comparison to conventional static methods. *Tissue engineering. part c, methods*, 20(8) :681–692, 2014.
- [416] S PARK et al. Chip-based comparison of the osteogenesis of human bone marrow- and adipose tissue-derived mesenchymal stem cells under mechanical stimulation. *Plos one*, 7(9) :e46689, 2012.
- [417] K Taek LIM et al. Synergistic effects of orbital shear stress on in vitro growth and osteogenic differentiation of human alveolar bone-derived mesenchymal stem cells. *Biomed research international*, 2014 :316803, 2014.
- [418] W WU et al. Osteogenic performance of donor matched human adipose and bone marrow mesenchymal cells under dynamic culture. *Tissue engineering. part a, In Press*, 2015. DOI : 10 . 1089/ten . TEA . 2014 . 0115.
- [419] A STOLZING et al. Effect of reduced culture temperature on antioxidant defences of mesenchymal stem cells. *Free radical biology and medicine*, 41(2) :326–338, 2006.
- [420] J CHANG et al. Optimization of culture of mesenchymal stem cells : a comparison of conventional plate and micro-carrier cultures. *Cell proliferation*, 45(5) :430–437, 2012.
- [421] A N BRODSKY et al. Expansion of mesenchymal stem cells under atmospheric carbon dioxide. *Biotechnology progress*, 29(5) :1298–1306, 2013.
- [422] J CHEN et al. Studies on culture and osteogenic induction of human mesenchymal stem cells under CO₂-independent conditions. *Astrobiology*, 13(4) :370–379, 2013.
- [423] L MONFOULET et al. The pH in the microenvironment of human mesenchymal stem cells is a critical factor for optimal osteogenesis in tissue engineered constructs. *Tissue engineering. part a*, 20(13-14) :1827–1840, 2014.
- [424] F H MOGHADAM et al. Differentiation of bone marrow mesenchymal stem cells into chondrocytes after short term culture in alkaline medium. *International journal of hematology-oncology and stem cell research*, 8(4) :12–19, 2014.
- [425] L B BURAVKOVA et al. Mesenchymal stem cells and hypoxia : where are we? *Mitochondrion*, 19 Pt A :105–112, 2014.
- [426] N FILLMORE et al. Effect of Fatty acids on human bone marrow mesenchymal stem cell energy metabolism and survival. *Plos one*, 10(3) :e0120257, 2015.
- [427] I PARK et al. Constitutive stabilization of hypoxia-inducible factor alpha selectively promotes the self-renewal of mesenchymal progenitors and maintains mesenchymal stromal cells in an undifferentiated state. *Experimental and molecular medicine*, 45(9) :e44, 2013.
- [428] N MUÑOZ et al. Gas chromatography-mass spectrometry analysis of human mesenchymal stem cell metabolism during proliferation and osteogenic differentiation under different oxygen tensions. *Journal of biotechnology*, 169 :95–102, 2014.

- [429] J BEEGLE et al. Hypoxic Preconditioning of Mesenchymal Stromal Cells Induces Metabolic Changes, Enhances Survival and Promotes Cell Retention in Vivo. *Stem cells, In Press*, 2015. DOI : 10.1002/stem.1976.
- [430] M DESCHEPPER et al. Survival and function of mesenchymal stem cells (MSCs) depend on glucose to overcome exposure to long-term, severe and continuous hypoxia. *Journal of cellular and molecular medicine*, 15(7) :1505–1514, 2011.
- [431] J LIU et al. Hypoxia Regulates the Therapeutic Potential of Mesenchymal Stem Cells Through Enhanced Autophagy. *The international journal of lower extremity wounds, In Press*, 2015. DOI : 10.1177/1534734615573660.
- [432] L B BOYETTE et al. Human bone marrow-derived mesenchymal stem cells display enhanced clonogenicity but impaired differentiation with hypoxic preconditioning. *Stem cells translational medicine*, 3(2) :241–254, 2014.
- [433] C FOTIA et al. Hypoxia enhances proliferation and stemness of human adipose-derived mesenchymal stem cells. *Cytotechnology*, 67(6) :1073–1084, 2015.

Chapitre 2

Matériels et Méthodes

Sommaire

1	Banques cellulaires et croissance planaire	112
1.1	Banques cellulaires	112
1.2	Culture statique	114
1.3	Comptage cellulaire	115
1.4	Observations morphologiques par microscopie photonique	116
1.5	Paramètres cinétiques	116
2	Culture de CSM sur microporteurs	116
2.1	Dosages métaboliques : Glucose, Lactate, LDH et ions ammoniums	116
2.2	Protocole de culture sur microporteurs	117
2.3	Observations morphologiques des cellules sur microporteurs	123
2.4	Plan d'expériences sous Modde 7	124
3	Milieux de culture sans sérum	124
3.1	Milieux et suppléments	124
3.2	Cultures sur plaque 96-puits	127
3.3	Cultures sur plaque 6-puits	127
3.4	Suivis et analyses des cultures en microplaques	128
4	Analyses biologiques	134
4.1	Analyse des CSM par observations microscopiques	134
4.2	Analyses moléculaires : ARNm, télomères et ADN génomique	137
4.3	Analyse des antigènes de surface par cytométrie	144
5	Références bibliographiques	146

1 Banques cellulaires et croissance planaire : *chapitre 3*

1.1 Banques cellulaires

a- Sources des cellules

Les CSM humaines de moelle osseuse utilisées dans cette étude ont été fournies par le laboratoire d'Ingénierie Moléculaire et Physiopathologie Articulaire (IMoPA, UMR7365, Nancy, France). Ces cellules sont issues de prélèvements de donneurs adultes sains (tableau 9), et ce, avec leur consentement éclairé, suivant les directives du comité d'éthique de l'Université de Lorraine (France). Le nombre de cellules mononucléaires contenues dans le prélèvement a été déterminé et ces dernières ont étéensemencées à $5,0 \cdot 10^4$ cellules/cm² en culture statique pendant 21 jours. Elles ont été cultivées en milieu essentiel minimum de modification α (α -MEM), supplémenté de 10% (v/v) de SVF, de glutamine 2 mM et de pénicilline, dans un incubateur humidifié et régulé à 37° C et 5% dioxyde de carbone (CO₂). Le milieu a été renouvelé deux fois par semaine et les CSM ont donc été isolées par adhérence. Après 21 jours, ces cellules au passage (P) 0 ont été trypsinées et comptées avec la méthode au Bleu Trypan avant d'être réensemencées à une densité de 1000 cellules/cm² et cultivées dans les mêmes conditions que précédemment. Les passages suivants ont été effectués tous les 14 jours jusqu'à la congélation des cellules et leur stockage en congélateur à -150° C. Les CSM obtenues auprès du laboratoire IMoPA par cette méthode ont toutes été préalablement caractérisées quant à la présence/absence des marqueurs spécifiques des CSM.

Les CSM humaines de tissus adipeux ont été acquises auprès de l'ATCC (ATCC-PCS-500-011) et sont issues de liposuccions. Après prélèvement, les cellules ont été maintenues en milieu MSCG (ATCC) avec 2% (v/v) de SVF pendant 2 passages avant cryoconservation et stockage. Les CSM reçues ont toutes été préalablement caractérisées par l'ATCC, quant à la présence/absence de marqueurs spécifiques (cellules positives pour CD29, CD44, CD73, CD90, CD105, CD166, et négatives pour CD14, CD31, CD34, CD45), et quant à l'absence de contaminations bactériologiques et virales. Après réception, les cellules ont été mises en culture à 2000 cellules/cm² en boîte de 75 cm² dans un incubateur humidifié et régulé à 37° C et 5% CO₂ (Jouan). Le milieu de culture utilisé est détaillé ci-après. Les passages ont été effectués tous les 5 jours avec un renouvellement de 50% du volume de milieu au second ou troisième jour jusqu'à la congélation des cellules à -196° C en azote liquide.

Les CSM porcines de moelle osseuse proviennent de porcelets âgés d'environ trois mois. Les

prélèvements ont été réalisés par Caroline Ferrari (LRGP, 2012) à l'École de chirurgie de Nancy. Les porcs ont été anesthésiés avant d'insérer un trocart au niveau de leur crête iliaque pour recueillir une centaine de millilitres de moelle osseuse dans une seringue contenant de l'héparine et du tampon phosphate. Les prélèvements sur plusieurs porcelets ont été mis en commun et déposés sur des boîtes de culture en plastique traité pour l'adhérence (Corning), pendant 2 à 3 semaines, dans un incubateur humidifié et régulé à 37° C et 5% CO₂, avec un changement régulier du milieu de culture pour éliminer les cellules hématopoïétiques. Le milieu utilisé est composé de milieu de Dulbecco modifié selon Iscove (IMDM) (Sigma-Aldrich, États-Unis) supplémenté de 10% (v/v) de SVF (Life Technology, États-Unis), de 1% (v/v) d'antibiotiques (10000 unités de pénicilline G, 10 mg de streptomycine et 25 µg d'amphotéricine B, Life Technology, États-Unis), et de 0,1 mM de β-mercaptoéthanol (Sigma-Aldrich, États-Unis). Le détail de la composition de l'IMDM est précisé dans l'annexe A.2. Une fois la confluence des cellules adhérentes atteintes, celles-ci ont été trypsinées avec de la trypsine-éthylène diamine tétra acétique (EDTA) 0,25% (m/v) (Life Technology, États-Unis) avant d'être réensemencées à P1 à une densité de 5000 cellules/cm² et cultivées dans les mêmes conditions que précédemment jusqu'à la congélation des cellules en azote liquide à -196° C à P4.

TABLEAU 9 – Caractéristiques des banques cellulaires utilisées

ORIGINE	BANQUE						
	Source	Âge	Genre	R.	C.	Milieu	Rampe
Moelle osseuse humaine	70 ans	Masculin	P0	P2	20% SVF	Rapide	MO70
	36 ans	Masculin	P1	P3	90% SVF	Lente	MO36
	32 ans	Masculin	P3	P4	20% SVF	Rapide	MO32
				P6	20% SVF	Rapide	
	24 ans	Féminin	P1	P3	90% SVF	Lente	MO24
15 ans	Masculin	P1	P3	90% SVF	Lente	MO15	
Tissus adipeux humains	40 ans	Féminin	P2	P4	90% SVF	Lente	AD40
	38 ans	Féminin	P2	P5	90% SVF	Lente	AD38
Moelle osseuse porcine	3 mois	Mélange	P0	P4	20% SVF	Rapide	Porc

(P : passage, R. : passage à la réception des cellules, C. : passage à la cryoconservation des cellules,

Milieu : milieu de cryoconservation en v/v à 10% DMSO avec ou sans α-MEM supplémenté,

Rampe : rampe de température de 25 à -196° C, rapide de 35 min et lente de 4 h)

b- Cryoconservation

Après trypsination des CSM adhérentes au fond des boîtes de culture et leur comptage au cytomètre capillaire, les cellules ont été concentrées à 1, 2, ou 5.10⁶ cellules dans 1 mL de milieu de cryoconser-

vation et séparées en aliquotes dans des tubes cryogéniques. Plusieurs milieux de cryoconservation ont été testés, tous contenant 10% (v/v) de di-méthyl sulfoxyde (DMSO) comme agent cryoprotecteur. Le complément de volume était constitué soit de 90% (v/v) de SVF ; soit de 70% (v/v) d' α -MEM et 20% de SVF ; soit de 0,5% (v/v) d'albumine de sérum bovin (BSA), de tréhalose 0,25 M complété d' α -MEM.

Deux méthodes de cryoconservation ont été utilisées, l'une avec une rampe de température rapide (35 ou 60 min), l'autre lente (4 h). La méthode rapide correspondait à un refroidissement manuel par paliers au moyen d'un Nicoool LM 10 (CFPO, France). Les tubes cryogéniques ont été placés au-dessus d'un conteneur rempli d'azote liquide, un ventilateur au niveau supérieur distribuant les vapeurs d'azote liquide à une vitesse de congélation variant de $-0,5^{\circ}\text{C}/\text{min}$ à $-10^{\circ}\text{C}/\text{min}$. Les programmes utilisés comportaient 2 plateaux (vitesse 3 et 10). Le premier programme, d'une durée complète de 35 min, incluait une première descente en température de 25 min jusqu'à -15°C suivie d'une seconde descente de 10 min jusqu'à -50°C puis d'une immersion d'une minute en azote liquide à -196°C . L'autre programme, d'une durée de 60 min, incluait un premier plateau de 40 min pour atteindre la température de -20°C suivi d'un second de 20 min pour atteindre -70°C avant la minute d'immersion dans l'azote liquide. Les tubes cryogéniques ont été stockés dans l'azote liquide jusqu'à utilisation. La méthode de cryoconservation lente consistait à placer les tubes cryogéniques à -80°C dans une boîte de cryoconservation Nalgene à l'isopropanol (Mr Frosty, Thermo Scientific, États-Unis) permettant d'effectuer une rampe de température progressive, allant de la température ambiante à -80°C en 4 heures. Les tubes cryogéniques ont alors été transférés dans l'azote liquide après 12 à 54 h pour le stockage de longue durée (> 3 mois) ou gardés au congélateur à -80°C pour des durées inférieures.

1.2 Culture statique

a- Culture en boîtes ventilées

Les CSM ont été décongelées (90 sec dans un bain-marie à 37°C), centrifugées afin d'éliminer le DMSO, avant d'être reprises dans le milieu et comptées au cytomètre capillaire. L'ensemencement a été effectué à une densité de $1,0 \cdot 10^4$ cellules viables/mL dans un ratio volume/surface de $0,2\text{ mL}/\text{cm}^2$ (c'est-à-dire 2000 cellules viables/ cm^2). Les boîtes en plastique traité utilisées en majorité pour l'amplification des cellules avant expérience étaient des flacons T175 cm^2 (Corning, États-Unis). Le milieu a été entièrement renouvelé 2 jours après décongélation, puis à 50% tous les 3 jours. Les passages ont été effectués tous les 5 jours par trypsination avec de la trypsine-EDTA 0,25% (m/v)

(Life Technology, États-Unis) ou du TryPLE (Life Technology, États-Unis) bien avant que les cellules ne soient à confluence (estimation définie autour de 20000 cellules/cm²). Les cellules sont maintenues en normoxie dans un incubateur humidifié régulé à 37° C et 5% de CO₂ (Sanyo, Japon). Les études de croissance réalisées en condition statique ont été faites en T25 cm² (Corning, États-Unis). Aucun changement de milieu n'a été effectué. Trois boîtes ont été sacrifiées par jour pour le suivi cinétique et métabolique.

b- Milieu de culture

Le milieu de culture utilisé a été développé au laboratoire par Caroline Ferrari lors de sa thèse [1]. Il est composé d' α -MEM (Sigma-Aldrich, États-Unis, composition en annexe A.1), supplémenté par 1 μ g/L de FGF2 (Millipore, États-Unis), 0,1 mM de β -mercaptoéthanol (Sigma-Aldrich, États-Unis), et 1% (v/v) d'antibiotiques-antimycotiques (Life Technology, États-Unis). La glutamine a été remplacée par du Glutamax 2 mM (Life Technology, États-Unis) en raison de sa meilleure stabilité en solution. Ce milieu de base est enrichi par 10% (v/v) de SVF (Eurobio, France, lot 545410-0170) préalablement décomplémenté au bain-marie (20 min, 56° C) puis stocké en aliquotes à -20° C. Ce milieu est appelé α -MEM-10% SVF tout au long de ces travaux.

1.3 Comptage cellulaire

Les CSM sont comptées à l'aide d'un cytomètre capillaire Guava (Millipore, États-Unis) via l'utilisation du réactif Guava Viacount (composé de deux marqueurs fluorescents intercalant de l'acide désoxyribonucléique (ADN), l'un étant perméable aux membranes cellulaires, l'autre non, sauf lorsque l'intégrité de la membrane plasmique est compromise). Le comptage est automatisé sur plaque 96-puits. Un même échantillon a systématiquement été compté 3 fois afin de réduire la variabilité technique de l'appareil. Les paramètres d'acquisition du cytomètre ont été fixés pour les CSM humaines à une amplification $\times 8$ et un réglage des canaux 1 et 2 à 500 mV (chacun correspondant à la longueur d'onde d'émission des deux marqueurs fluorescents). À partir de la solution cellulaire obtenue après trypsination, les échantillons ont été marqués avec le réactif et passés directement au cytomètre. La densité cellulaire totale ainsi que la mesure de viabilité fondée sur l'intégrité membranaire des cellules ont alors été obtenues.

1.4 Observations morphologiques par microscopie photonique

Toutes les observations morphologiques ont été faites à partir d'un microscope inversé à contraste de phase (Axiovert-10, Zeiss, Allemagne), en phase 1, avec des objectifs LD Achrostatigmat (Zeiss) à grossissement $\times 10$ ou $\times 20$, en lumière blanche avec filtre correcteur bleu. Les photographies ont été prises avec un appareil numérique (Canon 400D Digital, Canon, Japon).

1.5 Paramètres cinétiques

a- Nombre de générations g

Le nombre de générations g a été calculé à partir des résultats de comptage cellulaire selon l'équation basé sur un bilan de matière en modes batch :

$$g = \frac{\ln N - \ln N_0}{\ln 2}$$

avec N_0 nombre de cellulesensemencées et N le nombre de cellules vivantes obtenues avant passage.

b- Statistique descriptive

Sauf mention contraire, les moyennes \bar{x} , et écarts-types σ , ont été effectués à partir de n répliquats biologiques et calculés avec le logiciel Libre Office Calc.

Les coefficients de variation (écart type relatif) ont été calculés par la formule : $CV = \frac{\sigma}{\bar{x}} \times 100$.

2 Culture de CSM sur microporteurs : *chapitre 4*

Les banques cellulaires décrites précédemment, ainsi que les méthodes d'amplification et d'analyse des CSM en boîtes de cultures, ont été utilisées dans toutes les études suivantes afin d'obtenir le matériel biologique nécessaire à la réalisation des expériences.

2.1 Dosages métaboliques : Glucose, Lactate, LDH et ions ammoniums

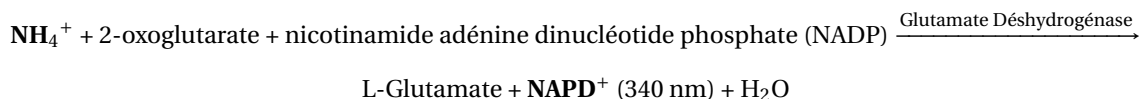
Le suivi des concentrations en glucose, lactate et lactate déshydrogénase (LDH) a été effectué, dans les surnageants de culture, extemporanément à la prise d'échantillon, par un analyseur automatique

(Selectra, Vitalab, France). La détermination de ces concentrations est basée sur le couplage d'une ou plusieurs réactions enzymatiques et le suivi spectrophotométrique d'un produit issu de ces réactions (tableau 10). Les kits utilisés suivent la méthode de Trinder pour le dosage du glucose (kit Glucose PAP, Elitech, France) et du lactate (kit Lactate PAP, Biomérieux, France). Le dosage de la LDH correspondait à une mesure d'activité enzymatique (kit LDH-SL, Elitech, France). La conversion en concentration a été déterminée grâce à la calibration régulière de l'analyseur à l'Elical-2 (Elitech, France).

TABLEAU 10 – Principes des dosages effectués à l'analyseur automatique (les substrats et produits suivis sont en gras, longueur d'onde d'acquisition au spectrophotomètre entre parenthèses).

Dosage	Réactions enzymatiques
Glucose	$\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6 + \text{O}_2 \xrightarrow{\text{Glucose Oxydase}} \text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_7 + \text{H}_2\text{O}_2$ $\text{H}_2\text{O}_2 + \text{C}_6\text{H}_5\text{ClO}_6 + \text{C}_{11}\text{H}_{13}\text{N}_3\text{O} \xrightarrow{\text{Glucose Peroxydase}} \text{Quino-imine rouge (500 nm)} + \text{H}_2\text{O}$
Lactate	$\text{C}_3\text{H}_6\text{O}_6 + \text{O}_2 \xrightarrow{\text{Lactate Oxydase}} \text{C}_3\text{H}_4\text{O}_3 + \text{H}_2\text{O}_2$ $\text{H}_2\text{O}_2 + \text{C}_6\text{H}_5\text{ClO}_6 + \text{C}_{11}\text{H}_{13}\text{N}_3\text{O} \xrightarrow{\text{Lactate Peroxydase}} \text{Quino-imine rouge (500 nm)} + \text{H}_2\text{O}$
LDH	$\text{C}_3\text{H}_6\text{O}_6 + \text{NAD}^+ \xrightarrow{\text{Lactate Déshydrogénase}} \text{C}_3\text{H}_4\text{O}_3 + \text{NADH (340 nm)} + \text{H}^+$

La quantité d'ion ammonium (NH_4) dans les surnageants de culture a été mesurée par spectrophotométrie (Multiskan, Thermo Fisher Scientific, États-Unis) au moyen d'un dosage enzymatique manuel suivant la réaction :



Le protocole suivait les recommandations du fournisseur (K-GLNAM, Megazyme, Irlande) et les concentrations ont été calculées à partir d'une gamme de standards.

2.2 Protocole de culture sur microporteurs

a- Ensemencement et préculture

Microporteurs Le microporteur modèle utilisé tout au long de ce travail est le Cytodex 1 (GE Healthcare, États-Unis) composé d'une matrice de dextran-diéthylaminoéthyl (DEAE) réticulé, et chargé positivement à pH physiologique. D'autres microporteurs ont également été évalués : Cytodex 3 (GE Healthcare, États-Unis), Plastic, Plastic+, HillexII, ProNectinF et Glass-Coated (SoloHill, Luxembourg). Les caractéristiques de ces porteurs sont résumées dans le tableau 6. Dans chaque cas, des solutions mères concentrées de microporteurs ont été préparées dans du tampon phosphate salin de Dulbecco (DPBS) pour le Cytodex 1, ou dans de l'eau ultrapure (microporteurs SoloHill) suivant les

indications données par les fournisseurs puis autoclavées avant d'être stockées à 4° C. Les solutions mères de Cytodex 1 ont été préparées à 20 ou 40 g de microporteurs secs.L⁻¹, celles de microporteurs Solohill à une concentration équivalente à celles de Cytodex 1, non en terme de masse sèche, mais de surface en cm².L⁻¹. La surface spécifique développée par chaque type de microporteur est résumée dans le tableau 6.

Conditionnement CSM/Cytodex 1 Avant de mettre en contact les microporteurs et les CSM, chaque solution doit préalablement être reconditionnée. Les CSM étaient initialement cultivées sur boîtes statiques pendant 5 à 7 jours, elles ont d'abord été trypsinées (Trypsine 0,25% EDTA) pendant 5 à 15 min à 37° C. Une fois les CSM décrochées, la trypsinase a été neutralisée par le double de volume de milieu α -MEM supplémenté + 10% (v/v) SVF puis éliminée après centrifugation des cellules. Ces dernières ont alors été reprises dans 10 mL de milieu α -MEM supplémenté et un échantillon a été prélevé pour un comptage au cytomètre capillaire.

En parallèle, le volume adéquat de solution mère de microporteurs a été mis à décanter, le volume de DPBS surnageant étant alors remplacé par du milieu α -MEM supplémenté. Cette étape a été renouvelée une seconde fois.

La suspension cellulaire de CSM et la solution de microporteurs ont alors été mélangées pour obtenir une solution finale de 8 g/L de Cytodex 1, 1.10^5 cellules viables/mL en milieu α -MEM supplémenté et 0,25% (v/v) de SVF décomplémenté dans une fiole d'Erlenmeyer ventilée remplie au 1/5^{ème} de son volume total (seconde étape de la phase d'adhérence), ce qui correspondait à la moitié du volume final de culture pour une concentration finale en microporteurs de 4 g/L. Ces ratios ont été maintenus lorsque la concentration finale en microporteur a été modifiée.

Phase d'adhérence La phase d'adhérence des cellules sur les microporteurs se déroule en deux étapes [2]. La première étape d'une heure, à faible concentration de sérum (0,25% v/v), favorise l'interaction de charges entre les cellules et les microporteurs, mais aussi leur probabilité de rencontre grâce à un volume correspondant au tiers du volume final de l'expérience. La solution cellulaire a d'abord été homogénéisée 10 min à vitesse minimale de mise en suspension (N_{js}) [3] sur une plateforme d'agitation orbitale (Heidolph Unimax 2010, Allemagne) placée dans un incubateur humidifié régulé à 37°C et 5 % de CO₂ (Jouan, France) puis maintenue sans agitation pendant 50 min.

La deuxième étape favorise l'interaction forte des CSM aux microporteurs par l'intermédiaire des

protéines d'adhérence fournies par l'ajout de SVF décomplémenté. Le volume de solution cellulaire est rapporté à la moitié du volume total final de travail par l'ajout d' α -MEM supplémenté et de 10% (v/v) de SVF décomplémenté. La solution cellulaire est alors mise sous agitation intermittente pendant 18 h sur la même plate-forme d'agitation orbitale. Le cycle d'agitation est de 30 min à N_{js} suivies de 2 h sans agitation. Les valeurs de N_{js} sont récapitulées dans le tableau 11.

TABLEAU 11 – Valeurs de N_{js} couramment utilisées pendant la phase d'adhérence des CSM au microporteurs selon le modèle développé par E. Olmos au sein du laboratoire [3].

Fioles d'Erlenmeyer			Plate-forme orbitale	Paramètres				N_{js}	
V_{max} (mL)	V_{utile} (mL)	d (m)	d_{orb} (m)	α	ρ^*	d_{mp} (m)	g ($m^2 \cdot s^{-1}$)	(rps)	(rpm)
125	8	0,0658	0,02	0,064	1,037	0,00025	9,81	0,834	50
125	12,5	0,0658		0,1				1,006	60
125	25	0,0658		0,2				1,346	81
250	16	0,0833		0,064				0,799	48
250	25	0,0833		0,1				0,964	58
250	50	0,0833		0,2				1,290	77
500	33	0,1013		0,066				0,782	47
500	50	0,1013		0,1				0,931	56
500	100	0,1013		0,2				1,245	75
1000	150	0,128		0,15				1,058	63
1000	225	0,128		0,225				1,254	75

(V_{max} : volume maximal, V_{utile} : volume utile, d : diamètre des fioles d'Erlenmeyer, d_{orb} : diamètre orbitale de la plateforme d'agitation, α : ratio de remplissage, ρ^* : rapport de la densité des microporteurs sur la densité du liquide, d_{mp} : diamètre des microporteurs, g : constante de gravité, rps : rotations par secondes, rpm : rotations par minute)

b- Cultures en plaque 24-puits.

La préculture de CSM sur microporteurs a été diluée d'un facteur 2 par de l' α -MEM supplémenté + 10% (v/v) SVF pour atteindre le volume final nécessaire. Un volume de 2 mL de cette solution a alors été distribué dans chaque puits de plaques 24-puits non adhésives Nunc ULA (Thermo Fisher Scientific, États-Unis), à l'exception des puits situés aux coins de la plaque qui sont eux remplis par du DPBS stérile. De même, afin de limiter l'évaporation, deux membranes semi-perméables Breathe-Easy (Sigma, État-Unis) ont été placées sur chaque plaque en remplacement de leur couvercle. Les plaques ont alors été mises sous agitation orbitale à 150 rotations par minute (rpm) (plate-forme d_{orb} = 22,5 mm \pm 2,5) dans un incubateur humidifié régulé à 37° C et 5% de CO₂ (Jouan, France). Le suivi des cultures a été réalisé quotidiennement à partir de 2 puits par condition opératoire étudiée. À cette échelle, aucune récolte des cellules n'a été effectuée.

c- Cultures en fioles d'Erlenmeyer.

La préculture de CSM sur microporteurs a été diluée d'un facteur 2 par de l' α -MEM supplémenté + 10% (v/v) SVF pour atteindre le volume final nécessaire. Cette solution a alors été distribuée dans des fioles d'Erlenmeyer ventilées de 125 ou 250 mL (Thermo Fisher, États-Unis). Le volume de travail correspondait au 1/5^{ème} de leur volume total respectif. Sauf indications contraires, l'agitation orbitale a été fixée à 70 rpm pour une plate-forme de diamètre orbitale $d_{orb}=50$ mm dans un incubateur humidifié, régulé à 37° C et 5% de CO₂ (Kühner, Allemagne). Le suivi des cultures a été réalisé quotidiennement par le prélèvement d'1 mL par fiole d'Erlenmeyer. Aucune récolte des cellules n'a été effectuée à cette échelle.

d- Cultures en bioréacteurs à agitation axiale.

Système et paramètres opératoires Six bioréacteurs mécaniquement agités ont été utilisés en parallèle (Global Process Concept, France). Chaque réacteur est composé d'une cuve en verre de 200 mL (volume de travail maximal) avec 3 piquages latéraux (figure 21). Deux de ces ports ont été utilisés pour les suivis physico-chimiques des cultures par une sonde pH/RH (modèle Ag/KCl) et une sonde à dioxygène (O₂) (modèle de Clark) de Mettler-Toledo (Suisse). Le troisième port a été conservé libre pour les ajouts et retraits de milieu sous hotte à flux laminaire. Les cuves en verre ont été siliconées au Sigmacote (Sigma, États-Unis) avant chaque utilisation.

La platine des bioréacteurs est équipée d'un doigt de gant pour recevoir un sonde de température de platine et de ports permettant : la régulation du taux d'oxygène dissous par ajout d'air, d'O₂ et/ou de diazote (N₂) ; la régulation du pH par ajout de gaz CO₂ et de solution d'hydroxyde de sodium (NaOH) 0,5 M ; l'ajout de milieu d'alimentation ; le prélèvement d'échantillons stériles. La régulation de température est réalisée en fond de cuve à l'aide d'une résistance chauffante et d'un système de circulation d'eau froide (régulée à 10° C par un groupe froid).

Le système d'automatisation des régulations et de suivi des paramètres en ligne est composé d'une tour de contrôle par paire de bioréacteurs. Toutes les régulations ont été effectuées automatiquement par boucles de rétro-contrôle à régulateur à action Proportionnelle - Intégrale - Dérivée (PID) par le logiciel de gestion global C-Bio (GPC, France). Les paramètres opératoires ont été fixés à : T°= 36,5° C, pH non régulé, taux d'oxygène dissous non régulé.

Cinq géométries de mobile étaient disponibles : un turbine Rushton (R) (pompage radial) de

diamètre $d=2$ cm ; un mobile en oreille d'éléphant (EE) (pompage haut/ *Up* et bas/ *Down*), $d=2,7$ cm ; et un mobile en hélice marine (HM) (pompage haut/ *Up* et bas/ *Down*), $d=2$ cm (figure 22). Les fréquences d'agitation étaient variables en fonction des conditions expérimentales choisies.



FIGURE 21 – Bioréacteurs à cuve agitée de 200 mL (GPC, France).

Démarrage de la culture Une fois entièrement équipées, les cuves des bioréacteurs ont été autoclavées remplies de DPBS, 20 min à 120° C et 1 Bar (autoclave de 100 L, Lequeux, France) puis scellées hermétiquement. Les sondes à O₂ ont été équilibrées sous aération toute une nuit et calibrées à 100% le lendemain. Le DPBS a alors été retiré de la cuve par surpression sous une hotte à flux laminaire. En parallèle, la préculture de CSM sur microporteurs préparée précédemment a été diluée d'un facteur 2 par de l' α -MEM supplémenté + 10% (v/v) SVF pour atteindre le volume final de 200 mL. Cette solution a ensuite été distribuée manuellement dans chaque cuve à la pipette. Les cuves ont alors été positionnées sur leur plate-forme respective et les régulations ont été démarrées à partir du logiciel C-Bio.



FIGURE 22 – Exemples de mobiles d’agitation utilisés.

Suivi de la culture Le suivi des cultures a été effectué par des prélèvements stériles de 1 à 3 fois par jour au niveau du port d’échantillonnage dédié. Le volume prélevé a été mesuré manuellement à la pipette afin d’obtenir le volume restant dans la cuve. L’échantillonnage a été synchronisé avec une homogénéisation des microporteurs, l’agitation étant systématiquement réglée à une puissance moyenne de $5,9 \cdot 10^5$ W pendant 2 min avant le prélèvement (équivalence en rpm selon les mobiles : (R) 107 rpm, (EE) 92 rpm, (HM) 189 rpm). Une fois les différentes analyses biologiques effectuées, la concentration en glucose était maintenue entre $0,5$ et 1 g.L^{-1} par l’ajout dosé d’une solution concentrée de D-Glucose à 200 g.L^{-1} à l’aide d’une seringue au niveau d’un bouchon septum placé sur la platine.

Récolte des cellules Une fois la culture terminée (5 à 7 jours en mode non-alimenté), les cuves ont été déconnectées du système de régulation et transférées sous une hotte à flux laminaire. Un volume de 50 mL a alors été prélevé après homogénéisation des microporteurs, ce prélèvement étant mis à décanté dans un tube. Le milieu conditionné a été remplacé par du milieu frais. Cette solution a alors été distribuée dans 5 boîtes de culture T175 contenant du milieu α -MEM supplémenté + 10% (v/v) SVF. Ces boîtes ont été placées dans un incubateur humidifié régulé à 37° C et 5% de CO_2 (Sanyo, Japon) afin de permettre aux CSM de passer de la surface des microporteurs à celle des boîtes. Le milieu a été entièrement renouvelé après 2 jours. Après cinq jours en culture statique, les cellules ont été récoltées par trypsination. Les microporteurs vides ont été filtrés sur membrane de nylon stérile après l’étape de neutralisation de la trypsine. La suspension cellulaire obtenue a été dénombrée et utilisée pour diverses analyses biologiques. Le calcul du rendement de récolte correspond à la quantité de cellules totales viables obtenues après trypsination des boîtes de culture normalisée par rapport à la quantité de microporteurs mis en culture statique.

2.3 Observations morphologiques des cellules sur microporteurs

a- Microscopie photonique.

L'obtention de photographies de cellules sur microporteurs a nécessité une augmentation du contraste. Celui-ci a été réalisé par un marquage d'au moins 15 min à température ambiante au bleu de méthylène 0,05% (m/v) en DPBS avec une incubation. Après un lavage au DPBS, les microporteurs ont été déposés sur lame de verre.

b- Microscopie à fluorescence.

Le réactif Live/Dead pour cellules mammaliennes (Life Technology, États-Unis), littéralement Vivant/Mort, est un composé de deux marqueurs cellulaires fluorescents, l'acéto-methoxy-ester calcéine (Calcéine AM) et l'ethidium homodimer-1 (EthD1). La Calcéine AM est un marqueur de viabilité métabolique des cellules. Elle diffuse librement au travers des membranes plasmiques sous sa forme non-fluorescente, et n'est retenue à l'intérieur d'une cellule que lors de sa transformation en polycation calcéine par l'activité estérasique intracellulaire. Elle émet alors une lumière verte à 517 nm à une longueur d'excitation de 494 nm. L'EthD1 est un marqueur de mortalité cellulaire. Il ne diffuse qu'à l'intérieur d'une cellule dont la membrane est endommagée. Il s'intercale dans les molécules d'ADN et émet alors une lumière rouge à 617 nm lorsqu'il est soumis à une longueur d'excitation de 528 nm.

À partir d'un prélèvement de cellules sur microporteurs, 100 μ L de l'échantillon ont été lavés par 10 mL de DPBS non stérile afin d'éliminer le sérum. Ce DPBS a été éliminé par centrifugation (150 g, 5 min, Jouan, France) et le culot de cellules et Cytodex 1 a été repris dans 200 μ L de réactif Live/Dead (EthD1 à 2 μ M/Calcéine AM à 2 μ M). Après 30 min d'incubation dans le noir à 37° C, l'échantillon a été déposé sur lame de verre et 10 images ont été prises au hasard avec un microscope à fluorescence muni d'une lampe au mercure (Leitz DMRB, Leica, Allemagne). Sa longueur d'onde d'excitation est de 480 ± 40 nm, les filtres d'arrêt étant respectivement à 527 ± 30 nm pour la visualisation de la Calcéine AM et à 600 ± 40 nm pour l'EthD1. Le microscope à fluorescence était muni d'une lentille HCX PI Fluostar (grossissement $\times 5$) couplée à une caméra Leica DFC450C et au logiciel LASV4.3 (réglage de l'exposition automatique à partir de paramètres de luminosité réglés à 5%, de gamma à 1 et de saturation à 1,01). La prise d'images n'a pas dépassé 10 min par échantillon, et le délai d'attente au noir à température ambiante n'a jamais dépassé 1 heure.

2.4 Plan d'expériences sous Modde 7

Le logiciel Modde7 (Umetrics, Suède) a été utilisé pour le plan d'expériences (DOE). Le plan d'expériences a été réalisé en *D-optimal design* en prenant l'option de criblage (*screening*) avec un point central en duplicat par bloc d'expériences. Parmi les différents plans obtenus, seul a été retenu celui ayant la plus haute efficacité G (*G-efficiency*, c'est-à-dire le pourcentage d'efficacité comparant ce plan à un plan factoriel fractionnaire). Les expériences ont été randomisées avant d'être mises en place.

Une fois réalisées, les réponses ont été analysées indépendamment, les termes du modèle étant calculés par régression des moindres carrés partiels (PLS) et les facteurs de validité du modèle (supérieure à 0,25 pour chaque réponse) et de reproductibilité (supérieure à 0,8 pour chaque réponse) ont été évalués. Les coefficients des facteurs ont été pris en compte lorsque leur valeur-*p* était statistiquement significative ($< 0,1$). Dans les autres cas, seules des tendances ont pu être supposées.

3 Milieux de culture sans sérum : *chapitre 5*

Les méthodes précédemment présentées pour la création de banques cellulaires et les analyses biologiques ont également été utilisées pour l'étude des milieux de culture sans sérum.

3.1 Milieux et suppléments

a- Milieux de base

Deux milieux de base ont été utilisés pour répondre aux besoins nutritionnels primaires des CSM (source de carbone, acides aminés, sels, vitamines, etc) : l' α -MEM (Sigma, États-Unis) et le milieu F12 de Ham (Life Technologies, États-Unis). Leurs compositions respectives sont détaillées en annexe A.1 et A.3.

b- Milieux sans sérum commerciaux

Trois milieux sans sérum commerciaux ont été utilisés : le milieu StemPro[®] MSC SFM CTS[™] (Life Technologies, États-Unis), le milieu MSC NutriStem[®] XF (Biological Industries, Israël), et le milieu TheraPEAK[™]MSCGM-CD[™] (Lonza, Suisse). Leur composition détaillée n'est pas connue et seuls

les milieux MSCGM et Nutristem sont chimiquement définis. Le Nutristem est le seul des trois à ne contenir aucun composant d'origine animale, mais seul le MSCGM ne requiert pas l'utilisation d'une solution d'attachement.

c- Suppléments

Tous les milieux de base ou sans sérum commerciaux ont été supplémentés par 1% (v/v) d'antibiotiques-antimycotiques (Life Technology, États-Unis). La glutamine, quand son ajout faisait partie des recommandations du fournisseur, a été remplacée par du Glutamax à 2 mM (Life Technology, États-Unis).

Différents hydrolysats ont aussi été évalués (Sheffield Bio-science, États-Unis) : deux hydrolysats végétaux supplémentés de composés recombinants humains, le Shef Vax ACF (Kerry, 5X006420) et le Shef Vax ACF Plus (Kerry, 5X006512) et un hydrolysats composé de peptones de plusieurs céréales, le HyPeP 5603 (Kerry, 5Z106477).

Les autres suppléments étudiés sont listés ci-dessous :

ANTI-OXYDANT

β -mercaptoéthanol (M7522, Sigma)

VITAMINES

Acide ascorbique/Vitamine C (A4403, Sigma)

α -Tocophérol/Vitamine E (T1157, Sigma)

Acide folique/Vitamine B₉ (F8758, Sigma)

FACTEURS DE CROISSANCE

Facteur de croissance fibroblastique 2 (FGF2) (GF003, Merck-Millipore)

Facteur de croissance transformant β 1 (TGF β 1) (8915LE, Cell Signal)

Somatomédine C (IGF1) (II1271, Sigma)

Facteur de croissance dérivé des plaquettes (homodimère de sous-unité B, PDGFbb) (SRP3138, Sigma)

Facteur de croissance des cellules souches (SCF) (S7901, Sigma)

Facteur de croissance épidermique (EGF) (E9644, Sigma)

HORMONES

Hydrocortisone/Cortisol (H0888, Sigma)

Œstradiol	(E2758, Sigma)
Progestérone	(P8783, Sigma)
Insuline bovine	(I6634, Sigma)
Insuline recombinante humaine	(I3536, Sigma)
Érythropoïétine (EPO) recombinante humaine	(E5627, Sigma)
Épinephrine/Adrénaline	(E4250, Sigma)
Leptine	(L4146, Sigma)

COMPLÉMENTS LIPIDIQUES

Concentré défini de lipides	(11905-031, Gibco)
Synthechol	(S5442, Sigma)
Lipoprotéines de basse densité (LDL)	(L7914, Sigma)

FACTEURS D'ADHÉRENCE

Fibronectine	(F1141, Sigma)
Gélatine	(G1393, Sigma)
Laminine	(L4544, Sigma)

PROTÉINES DE TRANSPORT

Fétuine	(F2379, Sigma)
Holo-transferrine	(T8158, Sigma)
Apo-transferrine humaine	(T1147, Sigma)
Albumine de sérum bovin (BSA)	(A9418, Sigma)
Albumine recombinante humaine	(rAlbumin ACE, Sheffield)

GLYCOPROTÉINES ET GAG

Sulfate d'héparane bovin	(H7640, Sigma)
Lectine (de <i>Phytolacca americana</i>)	(L8777, Sigma)

PETITES MOLÉCULES

Glutamax	(35050-061, Life Tech.)
Glutamine	(25030-081, Life Tech.)
Adénosine-5'-triphosphate (ATP)	(A2383, Sigma)
Putrescine	(P6024, Sigma)
Sérotonine	(H9523, Sigma)

TAMPON

Acide 4-(2-hydroxyéthyl)-1-pipérazine éthane sulfonique (HEPES) (H4034, Sigma)

MÉLANGE DE SUPPLÉMENTS

B27 (annexe A.4) (A17504-044, Life Tech.)

La démarche de formulation d'un milieu sans sérum et les concentrations des suppléments sont décrites dans le chapitre 5.

Trois solutions d'attachement ont également été utilisées dans ce cadre : la solution CELLstart™-CTS™ (Gibco, États-Unis) développée initialement pour les CSE et CSPi, de composition inconnue mais d'origine humaine ; celle développée pour les CSM par Biological Industries (Israël) contenant de la fibronectine purifiée à partir de plasma humain, et le Geltrex® (Gibco, États-Unis), également développée pour les CSE et CSPi, composé d'extrait de membrane basale et de facteurs de croissance purifiés à partir de tumeur murine. Ces solutions ont été utilisées selon les recommandations des fournisseurs pour traiter la surface de culture et ne sont donc pas incluses dans le milieu *per se*, contrairement aux suppléments listés ci-dessus.

3.2 Cultures sur plaque 96-puits

Les plaques utilisées étaient des plaques Costar ayant subi un traitement de surface pour favoriser l'adhérence cellulaire (Corning, États-Unis). Les puits ont étéensemencés avec 200 μL de solution cellulaire à $1,0 \cdot 10^4$ cellules viables/mL (c'est à dire 6250 cellules / cm^2). Aucun puits externe de la plaque n'a été utilisé pour éviter les artefacts dus à l'évaporation accélérée du milieu. Les cellules ont été maintenues en normoxie dans un incubateur humidifié régulé à 37° C et 5 % de CO_2 (Sanyo, Japon).

3.3 Cultures sur plaque 6-puits

Les plaques utilisées sont des plaques Costar ayant subi un traitement de surface pour favoriser l'adhérence cellulaire (Corning, États-Unis). Les puits sontensemencés avec 2 mL de solution cellulaire à $1,0 \cdot 10^4$ cellules viables/mL (c'est à dire 2000 cellules / cm^2). Les cellules sont maintenues en normoxie dans un incubateur humidifié régulé à 37° C et 5 % de CO_2 (Sanyo, Japon). Chaque expérience est réalisée en triplicat, un puits est sacrifié par jour afin de réaliser les cinétiques de cultures avec comptage au Guava Viacount, le surnageant de culture est gardé pour analyse.

3.4 Suivis et analyses des cultures en microplaques

a- Microscopie automatisée

Les suivis de cultures adhérentes sur microplaque 96-puits ont été réalisés par microscopie automatisée grâce à l'utilisation du Cellscreen (Innovatis-Roche, Allemagne). Cet appareil détermine, pour chaque puits, le pourcentage de surface occupée par les cellules à partir de quatre images prises au centre du puits. Les contours cellulaires sont détectés par l'analyse des différents niveaux de gris. Les images sont obtenues par le couplage d'une caméra et d'un microscope inversé à plate-forme mobile (Olympus IX50, lentille UPlanFI, grossissement $\times 4$, en contraste de phase 1). La corrélation linéaire entre le pourcentage de surface occupée et le nombre de CSM a été préalablement déterminée (gamme testée entre 6250 et 31250 cellules/cm²). Cependant, cette mesure est dépendante des changements morphologiques des cellules en cours de culture, en particulier de l'évolution de leur granularité et de leur taille moyenne.

b- Activité métabolique oxydative des cellules

La résazurine est un indicateur redox de l'activité métabolique oxydative des cellules. Fournie aux cellules sous forme oxydée, elle va être absorbée puis réduite majoritairement par la chaîne respiratoire mitochondriale (tableau 12) mais aussi par des enzymes cytoplasmiques (certaines quinone-oxydoréductases et flavoprotéines). Contrairement aux tests utilisant le sel de tétrazolium (MTT), la résazurine n'est pas toxique pour les cellules car elle n'interrompt pas la chaîne respiratoire (tableau 12), ce qui rend possible son utilisation en cours de culture. La mesure de la quantité de résazurine réduite ou oxydée est réalisée par fluorescence ou spectrophotométrie. La résazurine oxydée présente un pic d'absorbance à 600 nm et la forme réduite un pic à 570 nm (figure 23). Grâce à ces mesures, il est possible de calculer un pourcentage de réduction de la résazurine qui peut être corrélé au pourcentage de cellules métaboliquement actives en culture, si une gamme a préalablement été réalisée et si l'échantillon se situe dans la partie linéaire de cette dernière.

Comme la résazurine colore les cultures d'une teinte bleutée à rose en fonction de son degré d'oxydation ou de réduction, il n'est pas possible de quantifier avec les mêmes cultures sur plaque la surface recouverte par les cellules (au Cellscreen) et leur activité oxydative. Deux microplaques 96-puits identiques (cellules, conditions, et plan de dépôt) ont donc étéensemencées en parallèle. Chaque puits de la microplaque servant au suivi de l'activité oxydative est donc supplémenté par 20% (v/v) de

TABLEAU 12 – Potentiels d'oxydoréduction E_0 de la chaîne respiratoire mitochondriale. Un couple redox réducteur ne peut oxyder un autre que si le potentiel E_0 de ce dernier est plus négatif que le précédent.

RÉACTIONS	E_0 (pH 7, 25°C)
$O_2 + 4H^+ + 4e^- \longrightarrow 2H_2O$	+820 mV
Résazurine _{ox} + $2H^+ + 2e^- \longrightarrow$ Résazurine _{red}	+380 mV
Cytochromes _{ox} + $1e^- \longrightarrow$ Cytochromes _{red}	+290 à +80 mV
MTT _{ox} + $2H^+ + 2e^- \longrightarrow$ MTT _{red}	-110 mV
FMN + $2H^+ + 2e^- \longrightarrow$ FMNH ₂	-210 mV
FAD + $2H^+ + 2e^- \longrightarrow$ FADH ₂	-220 mV
NAD + $2H^+ + 2e^- \longrightarrow$ NADH + $1H^+$	-320 mV
NADP + $2H^+ + 2e^- \longrightarrow$ NADPH + $1H^+$	-320 mV

(FMN : flavine mononucléotide ; FAD : flavine adénine dinucléotide ; NAD : nicotinamide adénine dinucléotide ; NADP : nicotinamide adénine dinucléotide phosphate ; MTT : sel de tétrazolium)

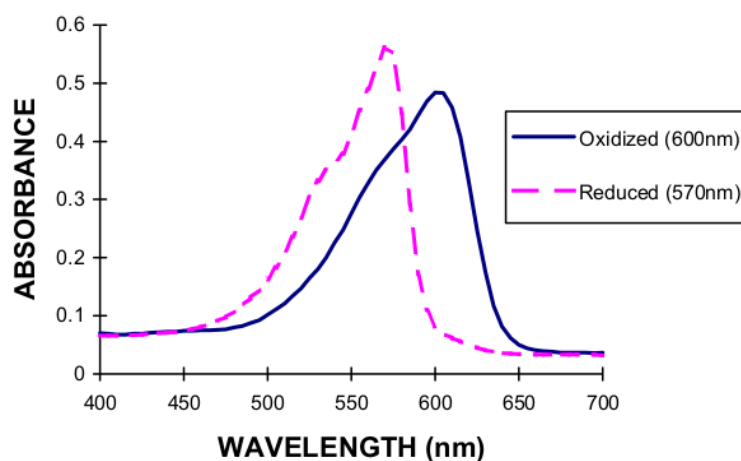


FIGURE 23 – Spectres d'absorbance de la résazurine oxydée et réduite, *wavelength* : longueur d'onde en nm, *oxidized* : résazurine oxydée, *reduced* : résazurine réduite, source : notice technique alamarBlue® (Invitrogen).

résazurine stérile (Tox8, Sigma, États-Unis). Les absorbances des puits de la plaque sont respectivement mesurées à 570 et 600 nm au spectrophotomètre (Multiskan, Thermo Fisher Scientific, États-Unis) pour déterminer quotidiennement : $A_{éch, 570\text{ nm}}$ et $A_{éch, 600\text{ nm}}$ (moyenne minimum de $n=3$ réplicats techniques). L'utilisation de la spectrophotométrie nécessite le calcul d'un facteur de correction R afin de compenser la superposition des spectres d'absorbance de la résazurine réduite et oxydée (figure 23). Des mesures avec puits témoins ne contenant que du milieu α -MEM supplémenté + 10% SVF ont également été effectuées. Ces derniers ont d'abord été mesurés pour déterminer les absorbances à 570 et 600 nm du milieu sans résazurine : $A_{blanc, 570\text{ nm}}$ et $A_{blanc, 600\text{ nm}}$. La solution de résazurine (Tox8, Sigma, États-Unis) est alors ajoutée stérilement à chaque puits à hauteur de 20% (v/v). Six puits ont

été suivis quotidiennement pour chaque milieu pour déterminer les absorbances : $A_{\text{milieu}, 570 \text{ nm}}$ et $A_{\text{milieu}, 600 \text{ nm}}$.

Une approximation robuste du % de réduction de la résazurine par les cellules à l'instant t peut être obtenue grâce à un calcul simplifié ne nécessitant pas l'utilisation de coefficients d'extinctions molaires [4] :

1. Calcul du facteur de correction R à l'instant t :

$$R = \frac{(A_{\text{milieu}} - A_{\text{blanc}})_{570}}{(A_{\text{milieu}} - A_{\text{blanc}})_{600}}$$

2. Calcul du % de réduction de la résazurine par les cellules à l'instant t :

$$\% \text{Réduction}_{\text{Résazurine}} = [(A_{\text{éch}} - A_{\text{blanc}})_{570} - ((A_{\text{éch}} - A_{\text{blanc}})_{600} \times R) \times 100]$$

3. Calcul du Ratio de cellules métaboliquement actives à l'instant t (normalisé selon l'activité métabolique de la préculture à t_0 par le facteur k , c'est à dire la pente calculée au niveau de la gamme de concentrations cellulaires) :

$$\begin{aligned} R_{\text{Cellules métaboliquement actives}} &= \frac{\text{Densité de cellules viables}_{\text{Résazurine}}}{\text{Densité de cellules totales}} \\ &= \frac{\% \text{Réduction}_{\text{Résazurine}} / k_{\% \text{Red}} / \text{Cellules viables}}{\text{Densité de cellules totales}} \end{aligned}$$

c- Analyse du Glutamax et des acides aminés totaux

L'analyse du Glutamax et des acide aminé (AA) totaux a été réalisée par chromatographie liquide haute performance (HPLC) selon la méthode développée par Shimadzu (Japon) [5]. Les AA libres dans l'échantillon ont d'abord été automatiquement dérivés à l'*o*-phtalaldéhyde (OPA) (figure 24) avant leur injection (volume de 3 μL) dans la pré-colonne. La séparation a été réalisée à 45 ° C par le passage de l'échantillon dérivé sur une colonne de chromatographie C18 (phase stationnaire (RP)-18 Alltech, États-Unis). Le partage différentiel des AA dérivés a été obtenu par le passage d'une phase mobile d'acétonitrile selon un gradient croissant dans un tampon phosphate (exemples de chromatogramme figure 25). Les produits de dérivation ont été mesurés par détection fluorimétrique à 450 nm. Cette méthode ne permet que le dosage des AA primaires. La L-proline présente dans le milieu n'a donc pas été analysée car elle nécessite une détection particulière à 530 nm. Deux couples d'AA n'ont pas pu être efficacement séparés avec cette méthode : le couple ASN/SER et le couple THR/PHE. De plus, le dosage de la cystéine et de la cystine ne peut être considéré comme fiable à cause de l'oxydation non contrôlée de la cystéine en cystine dans les conditions alcalines du traitement de dérivation.

Les temps de rétention et les gammes de concentrations ont été déterminés sur deux points pour chaque AA grâce à un standard de 20 acides aminés (Sigma, États-Unis) supplémenté en Glutamax (Life Technology, États-Unis) et/ou en Glutamine (Life Technology, États-Unis). Les contrôles internes ont été effectués avec de l' α -MEM, dont les concentrations en AA sont connues (tableau 13). Au vu des résultats, les valeurs issues du dosage des AA totaux par cette méthode ne peuvent être interprétées de manière absolue mais par comparaisons entre les échantillons.

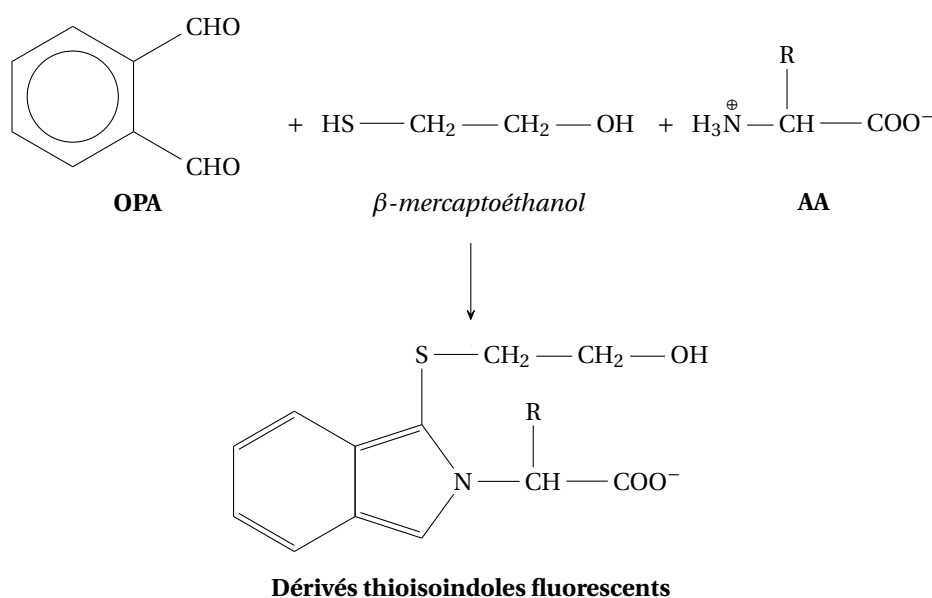


FIGURE 24 – Schéma de dérivation des AA à l'OPA, les produits thioindoles sont fluorescents à une longueur d'onde émission de 450 nm pour une excitation à 350 nm.

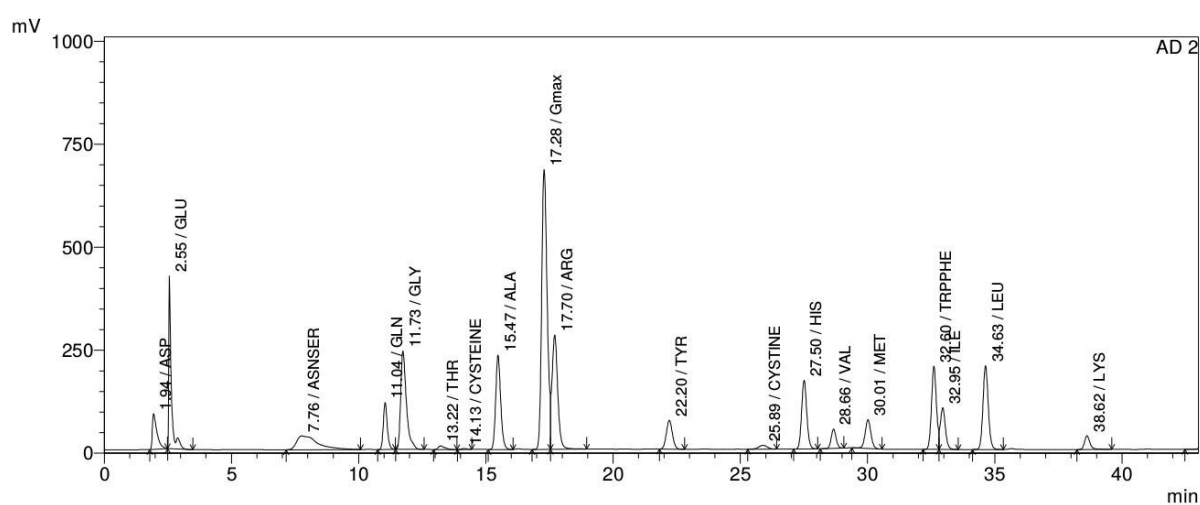


FIGURE 25 – Dosage des AA totaux primaires et du Glutamax par HPLC : Exemple de chromatogramme pour l' α -MEM + Glutamax 2 mM.

TABLEAU 13 – Dosage des AA totaux primaires et du Glutamax par HPLC : Temps de rétention ($n=40$, moyenne \pm écart-type), Concentrations d'AA dans le milieu α -MEM ($n=3$, moyenne \pm écart-type).

AA	Temps de rétention en min	Concentrations (mM)		
		Standard	α -MEM	Concentration théorique
ASP	1,9 (\pm 0,006)	0,250/0,500	0,217 (\pm 0,009)	0,225
GLU	2,5 (\pm 0,170)	0,250/0,500	0,632 (\pm 0,188)	0,510
ASN/SER	7,6 (\pm 0,138)	0,500/1,000	0,754 (\pm 0,101)	0,566
GLN	11,1 (\pm 0,069)	1,000/2,000	nd	0
GLY	11,7 (\pm 0,036)	0,250/0,500	0,553 (\pm 0,135)	0,660
THR	13,2 (\pm 0,055)	0,250/0,500	0,198 (\pm 0,019)	0,403
Cystéine	14,2 (\pm 0,040)	0,000	0,000	0,569
ALA	15,5 (\pm 0,133)	0,250/0,500	0,354 (\pm 0,029)	0,281
Glutamax	17,5 (\pm 0,656)	1,000/2,000	nd	0
ARG	17,8 (\pm 0,424)	0,250/0,500	0,555 (\pm 0,055)	0,598
TYR	22,3 (\pm 0,526)	0,250/0,500	0,205 (\pm 0,009)	0,231
Cystine	26,1 (\pm 0,243)	0,125/0,250	0,509 (\pm 0,007)	0,100
HIS	27,7 (\pm 0,145)	0,250/0,500	0,378 (\pm 0,023)	0,248
VAL	28,8 (\pm 0,101)	0,250/0,500	0,094 (\pm 0,009)	0,393
MET	30,2 (\pm 0,124)	0,250/0,500	0,168 (\pm 0,012)	0,100
TRP/PHE	32,8 (\pm 0,140)	0,500/1,000	0,456 (\pm 0,044)	0,243
ILE	33,1 (\pm 0,127)	0,250/0,500	0,204 (\pm 0,013)	0,396
LEU	34,9 (\pm 0,165)	0,250/0,500	0,450 (\pm 0,041)	0,396
LYS	38,9 (\pm 0,223)	0,250/0,500	0,435 (\pm 0,043)	0,397

d- Lissage

Les données de croissance au cours du temps ont toutes été lissées sous le logiciel QtiPlot par l'utilisation de l'algorithme de Savitzky-Golay [6] avec pour paramètre un polynôme de degré 2 et une fenêtre glissante de 5 points. Ces données lissées ont servi aux calculs des paramètres cinétiques. L'interpolation des données de lissage selon un ajustement polynomial n'a été utilisée que pour faciliter la lecture des graphiques.

e- Calcul du taux de croissance maximum apparent $\mu_{\max, \text{app}}$

Le taux de croissance maximal a été calculé à partir de la mesure lissée du nombre de cellules totales par cm^2 , appelée X_t , à partir de la régression linéaire du logarithme népérien du nombre de cellules totales :

$$\mu_{\max, \text{app}} \times t = \ln (X_t \cdot A_t)$$

avec $\mu_{\max, \text{app}}$ en heure^{-1} , et A la surface de culture en cm^2 .

f- Calcul des vitesses métaboliques spécifiques et rendement

Consommation q_{Sgluc} La vitesse de consommation spécifique de glucose a été calculée à partir du dosage du glucose dans le surnageant $S_{Gluc,t}$ (voir 2.2.1) et de la mesure lissée du nombre de cellules totales par cm^2 X_t :

$$q_{Sgluc} = -\frac{\Delta S}{\Delta t} \times \frac{1}{(X_t \cdot A_t)} = -\left(\frac{S_{gluc,t+1} - S_{gluc,t-1}}{t_{i+1} - t_{i-1}} \times \frac{1}{(X_t \cdot A_t)} \right)$$

(mmol.cellule⁻¹.heure⁻¹)

où A est la surface de culture en cm^2 . La vitesse de consommation moyenne a été calculée pour chaque culture à partir de ces résultats.

Productions q_P Les vitesses de consommation spécifique de lactate et d' NH_4 ont été calculées à partir du dosage du lactate dans le surnageant $P_{Lac,t}$ (voir 2.2.1) ou du dosage de l'ammonium dans le surnageant $P_{NH_4,t}$, et de la mesure lissée du nombre de cellules totales par cm^2 X_t :

$$q_P = \frac{\Delta P}{\Delta t} \times \frac{1}{(X_t \cdot A_t)} = \frac{P_{t+1} - P_{t-1}}{t_{i+1} - t_{i-1}} \times \frac{1}{(X_t \cdot A_t)}$$

(mmol.cellule⁻¹.heure⁻¹)

où A est la surface de culture en cm^2 . Les vitesses de production moyennes ont été calculées pour chaque culture à partir de ces résultats.

Rendement Le rendement $Y_{Lactate/Glucose}$ est le ratio de la quantité de lactate produit sur la quantité de glucose totale consommée par les cellules :

$$Y_{Lac/Gluc} = \frac{\Delta P_{Lactate}}{\Delta S_{Glucose}} = \frac{P_{Lac,finale} - P_{Lac,Milieu}}{S_{Gluc,finale} - S_{Gluc,Milieu} - S_{Gluc,Alimentation}}$$

Ce rendement est révélateur de l'activité métabolique de la culture, sa valeur maximale est de 2 pour un métabolisme théorique de la population purement orienté vers la glycolyse anaérobie et de 0 pour un métabolisme théorique convertissant totalement le glucose par la phosphorylation oxydative (les apports dus aux acides aminés, notamment à la glutamine, étant considérés négligeables). Les valeurs généralement rencontrées en culture cellulaire varient autour de 1,6-1,7 [7].

g- Calcul de l'intégrale de la densité cellulaire totale

À partir des courbes de croissance lissées, le logiciel QtiPplot a été utilisé pour déterminer l'intégrale de la densité cellulaire totale (ITCD) ou l'intégrale de l'aire totale occupée par les CSM pour les résultats obtenus au Cellscreen.

h- Plan d'expérience sous Modde 7

Le logiciel Modde7 (Umetrics, Suède) a été utilisé pour les analyses par DOE. Les plans d'expérience ont été réalisés en prenant l'option de formulation avec un point central en triplicat (plan factoriel fractionnaire de niveau IV). Les expériences ont été randomisées avant d'être mises en place. La réponse analysée était l'intégrale au cours du temps des surfaces recouvertes par les cellules et/ou l'intégrale au cours du temps du pourcentage de réductions de la résazurine. Les facteurs de validité du modèle (supérieure à 0,25 pour chaque réponse) et de reproductibilité (supérieure à 0,8 pour chaque réponse) ont été évalués. Les coefficients des facteurs ont été pris en compte lorsque leur valeur- p était statistiquement significative ($< 0,1$), dans les autres cas seules des tendances ont pu être supposées.

4 Analyses biologiques : *chapitre 6*

Les CSM obtenues au cours de diverses cultures d'amplification ont été partiellement analysées par des méthodes plus fines d'analyses cellulaires décrites ci-dessous.

4.1 Analyse des CSM par observations microscopiques

a- Clonogénicité

La clonogénicité est la capacité des cellules souches à se développer à partir de cellules isolées, c'est à dire à former des clones, démontrant ainsi la capacité d'auto-renouvellement les définissant. Afin d'évaluer la quantité de cellules répondant à ce critère au sein d'une population de CSM, un test du nombre de CFU a été utilisé.

Une dilution limite d'une suspension cellulaire de CSM a d'abord été effectuée afin d'ensemencer les cellules sur trois plaques 6-puits Costar (Corning, États-Unis) dans un volume de 2,5 mL par puits. Le taux d'ensemencement a été fixé à 100 cellules par puits en α -MEM supplémenté + 10% SVF. Le

temps d'incubation nécessaire au test CFU était de 21 jours dans un incubateur humidifié régulé à 37° C et 5% de CO₂ (Sanyo, Japon). Aucun changement de milieu n'a été effectué.

Après 21 jours, les puits ont été lavés au DPBS et les colonies ont été marquées au crystal violet 5% (m/v) en éthanol (EtOH) 10% (v/v) à température ambiante pendant 5 min. Après trois lavages à l'eau distillée, le nombre de colonies obtenu par puits a été compté et l'efficacité clonale calculée par :

$$\bar{E} = \frac{\text{Nombre de colonies par puits}}{100} \% (\bar{x} \text{ sur } n=18)$$

b- Différenciation des CSM en ostéocytes, adipocytes et chondrocytes

Les CSM doivent être caractérisées quant à leur capacité de différenciation pour pouvoir être qualifiées comme multipotentes. L'environnement de différenciation est influencé par deux paramètres : le taux d'ensemencement et le milieu de différenciation. Les milieux de différenciation utilisés étaient les milieux prêts à l'usage de Stempro (Life Technologies, États-Unis).

Induction.

- Ostéocytes et adipocytes. Selon les recommandations, les cellules ont d'abord été mises en culture dans du milieu α -MEM supplémenté + 10% (v/v) SVF à une densité d'ensemencement de 5000 cellules/cm² pour la différenciation ostéocytaire et de 10000 cellules/cm² pour la différenciation adipocytaire. Après 24 h, le milieu de culture a été remplacé par le milieu de différenciation correspondant. En parallèle, une condition témoin ensemencée à 2000 cellules/cm² a été maintenue en α -MEM supplémenté + 10% (v/v) SVF. Les cellules ont été conservées dans un incubateur humidifié régulé à 37° C et 5% de CO₂ (Sanyo, Japon) pendant 14 jours, les milieux étant entièrement renouvelés tous les 3 jours. Ces tests de différenciation ont été réalisés à deux échelles de culture en fonction de leur analyse ultérieure. Cinq puits d'une plaque 96-puits ont été cultivés par condition pour permettre des marquages histochimiques ultérieurs. Une boîte de 25 cm² a été mise en culture pour obtenir le matériel biologique nécessaire à l'extraction d'acide ribonucléique (ARN).
- Chondrocytes. Après trypsination des CSM sur boîtes de culture, un culot de 7,5.10⁵ cellules viables a été lavé avec du milieu de différenciation chondrocytaire non supplémenté. Après centrifugation (150 g, 5 min, Jouan, France), les CSM ont été reprises dans du milieu de différenciation supplémenté et séparées en 3 aliquotes en tubes Falcon (Corning, États-Unis). Ces

suspensions cellulaires ont été concentrées en culots de $2,5 \cdot 10^5$ cellules par centrifugation (150 g, 5 min) puis mises en culture dans un incubateur humidifié régulé à 37° C et 5% de CO₂ (Sanyo, Japon). Les culots cellulaires ont été agrégés pendant 24 h avant un changement du milieu de différenciation. Les agrégats flottant obtenus ont été cultivés pendant 14 jours en tubes avec un changement de milieu complet tous les 3 jours. Deux de ces agrégats ont ensuite été utilisés pour l'extraction d'ARN, le troisième servant au marquage histochimique des chondrocytes.

Marquages histochimiques. Après 14 jours d'induction de différenciation, les cellules ont été rincées au DPBS.

Les cellules issues de différenciation ostéocytaire ont été fixées pendant 30 min par du formaldéhyde 4% (m/v). Après deux rinçages à l'eau distillée, elles ont été marquées par de l'alizarine 2% (m/v) à pH 4,2 pendant 2 min (Sigma, États-Unis). L'alizarine devient rouge intense en cas de réaction avec le calcium des précipités d'hydroxyapatite formés autour des cellules différenciées en ostéoblastes.

Concernant les différenciations adipocytaires, la fixation a été réalisée pendant 2 min à l'isopropanol 60% (m/v) afin d'équilibrer la culture pour le futur marquage. L'isopropanol a alors été remplacé par de l'Oil Red O (Sigma, États-Unis) 0,05% (m/v) en isopropanol pendant 5 min. Ce colorant étant plus soluble dans les lipides que dans l'isopropanol, il s'accumule dans les vésicules lipidiques des CSM différenciées en adipocytes en leur donnant une coloration rouge. Les cultures ont été rincées trois fois à l'eau distillée avant d'être visualisées en microscopie photonique.

Les culots cellulaires obtenus après induction à la différenciation chondrocytaire ont été fixés pendant 30 min par du formaldéhyde 4% (m/v). Après deux rinçages à l'eau distillée, ils ont été marqués par du bleu alcian 1% (m/v) en acide chlorhydrique (HCl) 0,1 M pendant 30 min (Sigma, États-Unis). Ce colorant se lie à la matrice d'agrécanes sulfatés produits par des chondrocytes, donnant ainsi sa coloration bleue à l'extérieur de l'agrégat différencié. Après trois rinçages à l'HCl 0,1 M et un à l'eau distillée, chaque culot cellulaire a été monté sur lame puis visualisé en microscopie photonique.

c- Marquage histochimique de la sénescence

Il est possible d'évaluer qualitativement le niveau de sénescence des CSM à partir d'un marquage de la β -galactosidase lysosomale (Cell Signaling, États-Unis). En effet, au cours du vieillissement cellulaire, la masse lysosomale totale des cellules est augmentée [8], et la β -galactosidase qui y est accumulée

peut être détectée par l'hydrolyse de X-Gal révélée par une coloration bleue/vert de la culture. Les CSM ont d'abord été mises en culture statique en plaque 6-puits adhésives Costar (Corning, États-Unis) à 5000 cellules par puits. Une fois adhésives (après 4 à 12 h), les cellules ont été fixées par une solution à 2% (m/v) de formaldéhyde et 0,2% (m/v) de glutaraldéhyde pendant 15 min à température ambiante. Après deux lavages au DPBS, les cellules ont été incubées une nuit avec une solution de marquage à pH 5,9 (contenant du X-Gal à 20 g.L⁻¹ en DMF) dans un incubateur à 37° C non régulé en CO₂. Il faut noter que ce marquage est extrêmement dépendant du pH de la solution de marquage et du taux d'ensemencement local qui peut créer des artefacts de coloration importants.

4.2 Analyses moléculaires : ARNm, télomères et ADN génomique

a- Dosage des ARNm par RT-PCRq

Extraction des ARN totaux. Les CSM obtenues en boîtes de culture T25 ou en culot ont été broyées avec des billes en oxyde de zirconium (Retsch, Allemagne) dans du Tryzol (Life Technology, États-Unis) avant d'être conservées à -80° C jusqu'à purification des ARN totaux. Après décongélation à 4° C, la séparation des ARN a été réalisée par l'ajout de chloroforme/alcool isoamyl 24 :1 à l'échantillon (Fluka, Allemagne) et un passage sur gel MaXtract (Qiagen, Pays-Bas). La précipitation des ARN a été effectuée à l'isopropanol froid et à l'acétate de sodium 3 M. Le culot d'ARN a ensuite été lavé plusieurs fois à l'éthanol, séché, puis repris dans de l'eau de qualité biologie moléculaire pour une incubation de 15 min à 56° C.

La quantité d'ARN totaux obtenue a été mesurée au Nanodrop 9000c (Thermo Fisher Scientific, États-Unis) à 260 nm (coefficient d'extinction $\epsilon = 40 \text{ ng}\cdot\text{cm}\cdot\mu\text{L}^{-1}$). La pureté des ARN a été évaluée par les ratios d'absorbance 260/280 nm (contamination protéique) et 260/230 nm (contaminations par les réactifs). Seuls les échantillons avec des ratios supérieurs à 1,80 ont été utilisés ultérieurement. La non-dégradation des ARN par cette méthode a aussi été évaluée par électrophorèse sur gel d'agarose 1% (m/v)-Formaldéhyde 18% (m/v) en condition dénaturante.

Transcription inverse. La transcription inverse a été réalisée avec un kit *Maxima First Strand cDNA Synthesis* selon les recommandations du fournisseur (K1641, Thermo Scientific, États-Unis). Les ARN ont d'abord été normalisés à 15,625 ng. μL^{-1} puis traités à la DNase double brin avant de subir l'étape de transcription inverse. L'enzyme du kit étant une transcriptase inverse (RT) dérivée de la RT du

virus M-MuLV (virus Moloney de la leucémie murine). Les amorces étaient constituées d'un mélange d'oligonucléotides polydT (de 18 deoxy thymines) et d'amorces aléatoires hexamériques.

Une fois l'étape de transcription inverse réalisée, les échantillons ont été dilués pour obtenir une concentration d'acide désoxyribonucléique complémentaire (ADNc) équivalente à $1,56 \text{ ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ d'ARN total (en supposant une efficacité de transcription inverse de 100%). Un contrôle négatif, appelé (RT-), a aussi été établi à partir d'un duplicat de chaque échantillon traité en parallèle mais sans l'ajout de l'enzyme, des amorces et des dNTPs.

PCR quantitative.

— Réactifs et Équipement

L'amplification quantitative en chaîne par polymérase (PCRq) a été réalisée avec un kit *Maxima SYBR Green qPCR Master Mix* selon les recommandations du fournisseur (K0251, Thermo Scientific, États-Unis). Le thermocycleur était un PikoREAL (Thermo Scientific, États-Unis) utilisé avec ses microplaques et leur film de PCRq (96-puits en plastique transparent).

— Amorces

Les oligonucléotides utilisés comme amorces de PCRq provenaient d'Eurogentech (Belgique) où ils ont été synthétisés chimiquement et purifiés par HPLC sur colonne Hypersil GOLD (Thermo Scientific, États-Unis). Les solutions de travail ont été conservées en aliquotes à $1,5 \mu\text{M}$ à -20°C . La concentration finale d'amorces pour chaque réaction de PCRq était de 150 nM pour une quantité d'ADNc de $3,12 \text{ ng}$ (en équivalence d'ARN total). Les séquences et protocoles utilisés pour chaque amorce sont détaillés dans le tableau 14.

— Méthodes

Avant toute expérience, les étapes d'extraction et de transcription inverse ont été vérifiées sur une microplaque spécifique où seuls les contrôles RT- des échantillons ont été dosés par PCRq avec le couple d'amorces de la GAPDH, et ce, afin de vérifier l'absence de contamination par de l'ADN génomique. Un échantillon a été considéré comme non contaminé si aucun signal n'était détecté après le cycle 35 ou si la différence entre le cycle de quantification (C_q)^{*} et celui de l'échantillon du contrôle positif était supérieur à 10.

Ensuite, chaque couple d'amorces a été utilisé indépendamment sur une microplaque dédiée.

L'efficacité de la réaction de PCRq a systématiquement été calculée à partir d'une gamme basée

*. nombre de cycles de PCR nécessaire à la synthèse d'une quantité d'ADN suffisante pour que les sondes fluorescentes dépassent une valeur seuil déterminée par l'appareil

sur un contrôle positif (confirmé préalablement visuellement par histochimie). Cette gamme a été effectuée de 3,12 ng à 9,75 pg d'ADNc par des dilutions 2. Chaque échantillon et point de la gamme ont été effectués en triplicat. Plusieurs contrôles négatifs NTC (sans matrice) ont été réalisés en parallèle afin de vérifier que les réactifs n'étaient pas pollués.

Tous les protocoles de PCRq ont commencé par une étape de dénaturation initiale à 95° C de 7 min durant laquelle l'ADN polymérase (ou Taq polymérase car elle est dérivée de la bactérie thermophile *Thermus aquaticus*) était activée par la suppression de son inhibiteur *Hot Start*.

Les cycles de PCR classiques se sont alors succédés : dénaturation de l'ADN double brin, hybridation des amorces, élongation de ces amorces par l'intégration de désoxynucléotide triphosphate (dNTP) par la Taq polymérase. À chaque cycle, des molécules de *SYBR Green* ont été intégrées au sein des double brins formés, envoyant un signal fluorescent mesuré par le thermocycleur en RFU. Le détail des cycles de PCR est dépendant des amorces utilisées, particulièrement pour la température d'hybridation qui varie en fonction de leur séquence. Ils sont présentés pour chaque couple d'amorces dans le tableau 14.

Une fois les cycles terminés, une rampe de température de 60 à 95° C (à 1° C par minute) a été appliquée aux échantillons pour obtenir leur courbe de fusion. La disparition du signal fluorescent du *SYBR Green* avec la dénaturation des doubles brins formés a été suivie. Les courbes $dRFU/dt$ permettent de déterminer la spécificité des amorces si un seul pic est visible au niveau de la température de fusion T_m du produit d'amplification.

Les courbes de fluorescence obtenues par cette méthode ont été analysées automatiquement par le logiciel PikoReal Software 2.1 (Thermo Scientific, États-Unis), la ligne de base étant déterminé par l'algorithme propriétaire *Trend* et le seuil de coupure étant déterminé sur l'ensemble des courbes d'une plaque par la méthode *Threshold*. On a ainsi obtenu trois valeurs de C_q par échantillon. Ces valeurs ont été considérées comme pertinentes si elles ne différaient pas de plus de 0,5.

— Analyse

L'analyse des données obtenues par PCRq a été effectuée par la méthode $\Delta\Delta C_q$ [9] avec le logiciel REST2009 [10]. Trois gènes de référence (tableau 14) ont été utilisés comme contrôle endogène et les valeurs de la préculture non-différenciée ont servi de calibrateur.

Le logiciel REST2009 utilise la moyenne géométrique des valeurs de C_q obtenues pour les trois gènes de référence et corrige les valeurs de C_q par rapport à l'efficacité de l'amplification

$E_{amorces}$ afin de déterminer le ratio d'expression relative R du gène de l'échantillon par rapport au calibrateur. Ce calcul est détaillé ci-dessous (C_q correspondant à la moyenne arithmétique des 3 valeurs obtenues pour un couple échantillon/amorce) :

$$\begin{aligned}\{\Delta C_q\}_{Cible} &= C_q^{\text{Échantillon}} - C_q^{\text{Calibrateur}} \\ \{\Delta C_q\}_{\text{Référence 1}} &= C_q^{\text{Échantillon}} - C_q^{\text{Calibrateur}} \\ R &= \frac{E_{Cible}^{\{\Delta C_q\}_{Cible}}}{\left[E_{\text{Réf 1}}^{\{\Delta C_q\}_{\text{Réf 1}}} \times E_{\text{Réf 2}}^{\{\Delta C_q\}_{\text{Réf 2}}} \times E_{\text{Réf 3}}^{\{\Delta C_q\}_{\text{Réf 3}}} \right]^{1/3}}\end{aligned}$$

De plus, REST2009 détermine la validité statistique des résultats en calculant une valeur p correspondant à la probabilité d'obtenir ces mêmes résultats au hasard (les statistiques conventionnelles paramétriques ne pouvant s'appliquer à des valeurs augmentant exponentiellement). Seuls les résultats dont les valeurs p étaient inférieures à $< 0,1$ ont été considérés.

TABLEAU 14 – Récapitulatif des amorces de RT-PCRq utilisées (Numéro d'accèsion sur NCBI, Prot : protéine, nd : non déterminé).

Gène		Rôle		Amorces			
Numéro d'accèsion	Nom	Prot.	Marqueur	Séquences		Efficacité mesurée	
NM 001442.2	<i>fabp4</i>	FABP4	Adipocyte précoce	Sens	TGGCCAGGAATTTGACGAAG	(95° C-10 sec ; 50° C-1 min ; 68° C-30 sec) × 50	90-110%
				Anti-sens	TCAACGTCCTTGGCTTATGC		
NM 000237.2	<i>lpl</i>	MPM	Adipocyte tardif	Sens	GAGATTTCTCTGTATGGCACC	(95° C-10 sec ; 57° C-1 min ; 68° C-30 sec) × 50	90-110%
				Anti-sens	CTGCAAATGAGACACTTTCTCC		
NM 001844.4	<i>col2a1</i>	COM2A1	Chondrocyte précoce	Sens	GAAGAGTGGAGACTACTGGATTGAC	(95° C-5 sec ; 53° C-30 sec ; 72° C-20 sec) × 50	90-110%
				Anti-sens	AGTCTCCATGTTGCAGAAAACCTTC		
NM 001135.3	<i>acan</i>	ACAN	Chondrocyte tardif	Sens	GGGTCAACAGTGCCTATCAG	(95° C-5 sec ; 52° C-30 sec ; 72° C-20 sec) × 50	90-110%
				Anti-sens	GGGTGTAGCGTGTAGAGATG		
NM 000478.4	<i>alpl</i>	AMPM	Ostéocyte précoce	Sens	GAGCTTCAGAAGCTCAACAC	(95° C-10 sec ; 60° C-1 min ; 68° C-30 sec) × 50	90-110%
				Anti-sens	GAGACACCCATCCCATCTC		
NM 199173.4	<i>bglap</i>	BGMAP	Ostéocyte tardif	Sens	GTGCAGCCTTGTGTCCAAG	(95° C-5 sec ; 51° C-30 sec ; 72° C-20 sec) × 50	90-110%
				Anti-sens	CTCCAGCCATTGATACAGG		
NM 024865.2	<i>nanog</i>	NANOG	Cellule souche embryonnaire	Sens	AATACCTCAGCCTCCAGCAGATG	(95° C-5 sec ; 58° C-30 sec ; 72° C-20 sec) × 50	nd
				Anti-sens	TGCGTCACACCATTGCTATTCTTC		
NM 000389.4	<i>cdkn1a</i>	P21	Sénescence	Sens	GCATGACAGATTCTACCACTCC	(95° C-5 sec ; 52° C-30 sec ; 72° C-20 sec) × 50	80-100%
				Anti-sens	GACTAAGGCAGAAGATGTAGAGC		
NM 000077.4	<i>cdkn2a</i>	P16 ^{INK4} et P14 ^{ARF}	Sénescence	Sens	CATAGATGCCCGGAAGGT	(95° C-5 sec ; 60° C-30 sec ; 72° C-20 sec) × 50	90-110%
				Anti-sens	CTAAGTTTCCCGAGGTTTCTCAGA		
NM 001402.5	<i>eef1a1</i>	EEF1A1	Gène de référence	Sens	ACACGGCTCACATTGCATGC	(95° C-5 sec ; 52° C-30 sec ; 60° C-20 sec) × 50	90-110%
				Anti-sens	ACAGCAAAGCGACCCAAAGG		
NM 002046.4	<i>gapdh</i>	GAPDH	Gène de référence	Sens	TGCACCACCAACTGCTTAGC	(95° C-5 sec ; 57° C-30 sec ; 72° C-20 sec) × 50	90-110%
				Anti-sens	GGCATGGACTGTGGTCATGAG		
NM 012423.3	<i>rpl13a</i>	RPM13A	Gène de référence	Sens	CATAGGAAGCTGGGAGCAAG	(95° C-5 sec ; 52° C-30 sec ; 72° C-20 sec) × 50	90-110%
				Anti-sens	GCCCTCCAATCAGTCTTCTG		

TABLEAU 15 – Amorces et protocole de PCRq (les concentrations par puits de chaque amorce sont indiquées entre parenthèses).

Amorces	Séquence		Cycle
Telo	Sens (100 nM)	GGTTTT (GAGGGT) ₅	(95° C-1 sec; 54° C-30 sec) × 45
	Antisens (900 nM)	TCCCCGACTA (TCCCTA) ₅	
β-globine	Sens (700 nM)	GCTTCTGACACAACCTGTGTTCACTAGC	(95° C-15 sec; 58° C-1 sec; 72° C-20 sec) × 8 (95° C-1 sec; 58° C-1 sec; 72° C-20 sec; 83° C-5 sec) × 35
	Antisens (700 nM)	ACCAACTTCATCCACGTTTACC	
36B4	Sens (300 nM)	CAGCAAGTGGGAAGGTGTAATCC	(95° C-15 sec; 58° C-60 sec) × 45
	Antisens (500 nM)	CCCATTCTATCATCAACGGGTACAA	

Suivant la méthode $\Delta\Delta C_q$, l'ADN de référence des cellules HUVEC a été utilisé comme calibrateur alors que les gènes à copie unique sont pris comme gènes de référence. Le ratio télomère/gène à copie unique, appelé T/S, a été calculé pour chaque échantillon de CSM et le calibrateur HUVEC :

$$\frac{T}{S} = \left[\frac{2^{C_q^{(telo)}}}{2^{C_q^{(36B4, \beta Globin)}}} \right]^{-1} = 2^{-\Delta C_q}$$

Le ratio T/S relatif a été calculé afin de comparer les échantillons entre eux pour un même donneur de CSM [13] :

$$\left[\frac{T}{S} \right]_{relatif} = 2^{-(\Delta C_q^{CSM} - \Delta C_q^{HUVEC})} = 2^{-\Delta\Delta C_q}$$

c- Stress Oxydant.

L'analyse du stress oxydant a été réalisée sur de l'ADN génomique extrait préalablement par l'intermédiaire du kit OxiSelect de quantification des sites apuriques-apyrimidiques (AP) (Cell Biolabs, Inc; États-Unis). En effet, l'un des dommages causés à l'ADN génomique par les ROS ou radicaux libres est la perte de bases (figure 27, A) [14]. La quantification de ces sites a été effectuée sur plaques 96-puits liant l'ADN. La liaison d'une sonde aldéhyde-biotine, appelée ARP, aux groupes abasiques ouverts a ensuite été quantifiée par l'intermédiaire d'un dosage enzymatique (figure 27, B) où la streptavidine-peroxydase de raifort (HRP) catalysait la tétraméthylbenzidine (TMB) donnant ainsi une coloration jaune à la réaction (suivi au spectrophotomètre à 450 nm). Le nombre de sites AP, proportionnel au nombre de liaisons de sonde ARP à l'ADN, a été déterminé au moyen d'une gamme prédéterminée d'ADN standard prêt à l'emploi.

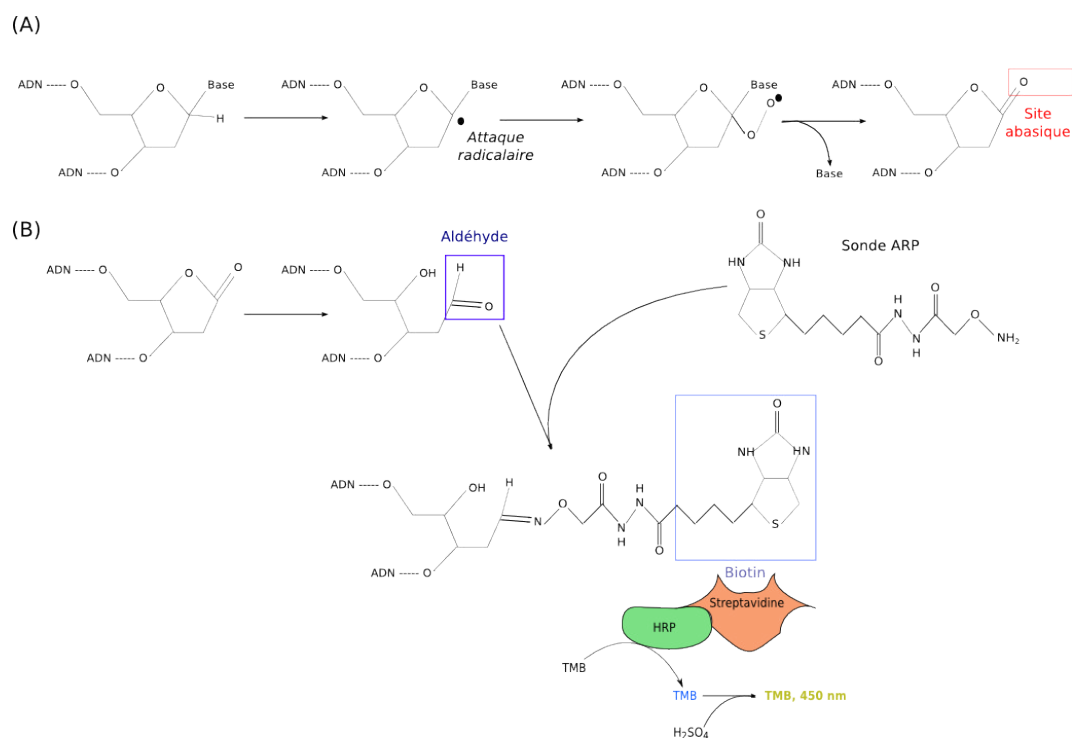


FIGURE 27 – Principe du suivi du stress oxydant par quantification des sites AP : (A) Mécanisme de dépurination/dépyrimidation de l'ADN par attaque radicalaire, (B) Dosage du nombre de sites AP par liaisons de sondes ARP (acide désoxyribonucléique (ADN) ; sonde aldéhyde-biotine (ARP) ; peroxydase de raifort (HRP) ; tétraméthylbenzidine (TMB)).

4.3 Analyse des antigènes de surface par cytométrie

Le protocole de détection des marqueurs de surface, appelés clusters de différenciation (CD), a été fourni par le laboratoire IMoPA [15]. Un immunomarquage a été réalisé (liste détaillée des anticorps (Ac) dans le tableau 16) avant analyse par le cytomètre capillaire Guava (Millipore, États-Unis) doté du module Express Plus (canaux de détection jaune à 583 nm et vert à 525 nm). Les Ac choisis suivaient les recommandations de l'ISCT quant à la définition des CSM [16].

Cinq marquages doubles ont été effectués en parallèle, chacun avec un Ac couplé à la phycoérythrine (PE) (émission à 573 nm) et l'autre à l'isothiocyanate de fluorescéine (FITC) (émission à 519 nm) : CD34/90, CD45/166, CD44/105, CD73/HLA-DR, un contrôle isotypique pour chaque sonde (fixation aspécifique d'anticorps murins), et un contrôle négatif sans marquage (autofluorescence des cellules). Un exemple est présenté dans la figure 28.

TABLEAU 16 – Suivi des antigènes de surface caractérisant les CSM par cytométrie.

PE : phycoérythrine; FITC : isothiocyanate de fluorescéine; Ig : immunoglobuline; BD : BD Biosciences; D : Dako; BC : Beckman Coulter

Antigène	Fluorochrome	Isotype de l'anticorps	Fournisseur	CSM [Références]
CD34	PE	IgG1, souris	BD (555822)	≤ 2% [16]
CD45	FITC	IgG1, souris	D (F0861)	≤ 2% [16]
CD105	PE	IgG3, souris	BC (A07414)	≥ 95% [16]
CD166	PE	IgG1, souris	BC (A22361)	≥ 95% [17]
CD90	FITC	IgG1, souris	BC (IM1839U)	≥ 95% [16]
CD73	PE	IgG1, souris	BD (550257)	≥ 95% [16]
CD44	FITC	IgG1, souris	BC (IM1219U)	≥ 95% [16]
HLA-DR	FITC	IgG2b, souris	BC (IM0463U)	≤ 2% [16]
Contrôles isotypiques	FITC	IgG1, souris	D (X0927)	Négatif
	PE	IgG1, souris	D (X0928)	Négatif

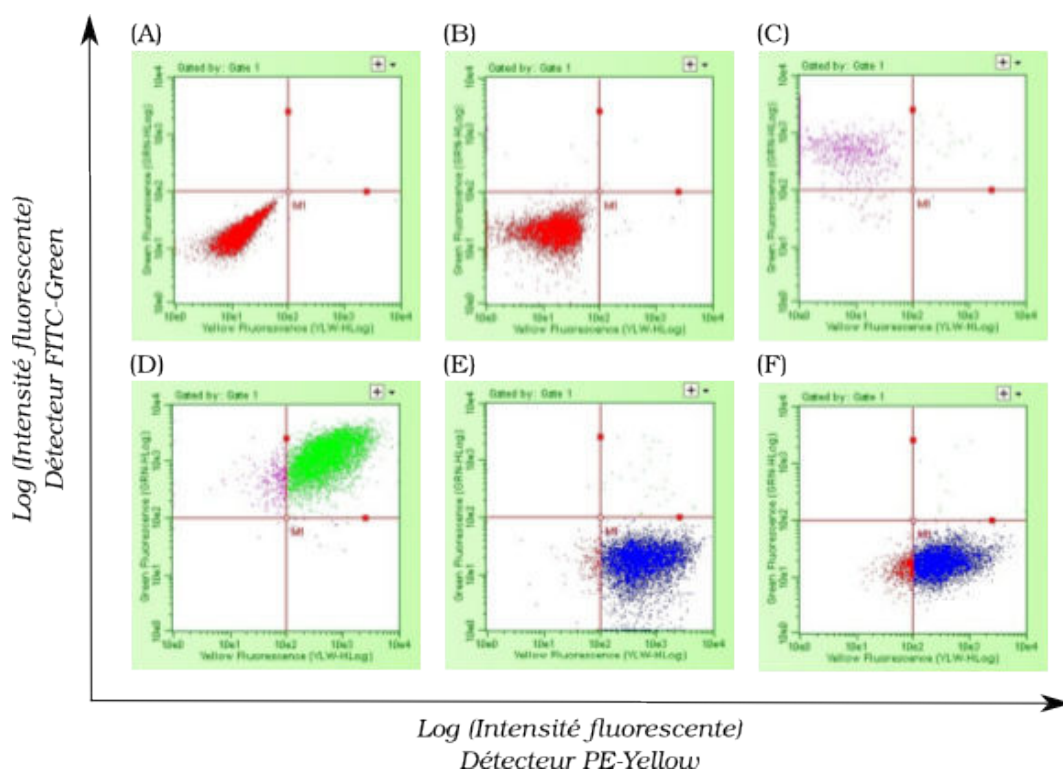


FIGURE 28 – Graphique à points des doubles marquages des antigènes de surface obtenu par cytométrie capillaire Guava (Millipore, États-Unis). Exemple avec des CSMs de moelle osseuse : (A) Contrôle négatif, (B) Contrôles isotypiques, (C) CD34_{PE}/CD90_{FITC}, (D) CD105_{PE}/CD44_{FITC}, (E) CD166_{PE}/CD45_{FITC}, (F) CD73_{PE}/HLA-DR_{FITC}.

5 Références bibliographiques

- [1] C FERRARI et al. Investigation of growth conditions for the expansion of porcine mesenchymal stem cells on microcarriers in stirred cultures. *Applied biochemistry and biotechnology*, 172(2) :1004–1017, 2014.
- [2] S P FORESTELL et al. Development of the optimal inoculation conditions for microcarrier cultures. *Biotechnology and bioengineering*, 39(3) :305–313, 1992.
- [3] E OLMOS et al. Critical agitation for microcarrier suspension in orbital shaken bioreactors : Experimental study and dimensional analysis. *Chemical engineering science*, 122 :545–554, 2015.
- [4] P GOEGAN et al. Effects of serum protein and colloid on the alamarBlue assay in cell cultures. *Toxicology in vitro*, 9(3) :257–266, 1995.
- [5] Y ISHIDA et al. Method of amino acid analysis. Brevet. EP Patent 0,138,092. 1990.
- [6] A SAVITZKY et al. Smoothing and Differentiation of Data by Simplified Least Squares Procedures. *Analytical chemistry*, 36(8) :1627–1639, 1964.
- [7] A P ZENG et al. Variation of stoichiometric ratios and their correlation for monitoring and control of animal cell cultures. *Biotechnology progress*, 14(3) :434–441, 1998.
- [8] D J KURZ et al. Senescence-associated (beta)-galactosidase reflects an increase in lysosomal mass during replicative ageing of human endothelial cells. *Journal of cell science*, 113 (Pt 20) :3613–3622, 2000.
- [9] K J LIVAK et al. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2⁻(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods (san diego, calif.)*, 25(4) :402–408, 2001.
- [10] M W PFAFFL et al. Relative expression software tool (REST©) for group-wise comparison and statistical analysis of relative expression results in real-time PCR. *Nucleic acids research*, 30(9) :e36–e36, 2002.
- [11] R M CAWTHON. Telomere measurement by quantitative PCR. *Nucleic acids research*, 30(10) :e47, 2002.
- [12] R M SAMSONRAJ et al. Telomere length analysis of human mesenchymal stem cells by quantitative PCR. *Gene*, 519(2) :348–355, 2013.
- [13] A AVIV et al. Impartial comparative analysis of measurement of leukocyte telomere length/DNA content by Southern blots and qPCR. *Nucleic acids research*, 39(20) :e134, 2011.
- [14] J NAKAMURA et al. 5'-nicked apurinic/apyrimidinic sites are resistant to beta-elimination by beta-polymerase and are persistent in human cultured cells after oxidative stress. *The journal of biological chemistry*, 275(8) :5323–5328, 2000.
- [15] L BASCIANO et al. Long term culture of mesenchymal stem cells in hypoxia promotes a genetic program maintaining their undifferentiated and multipotent status. *Bmc cell biology*, 12(1) :12, 2011.
- [16] M DOMINICI et al. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. the international society for cellular therapy position statement. *Cytotherapy*, 8(4) :315–317, 2006.
- [17] F ARAI et al. Mesenchymal Stem Cells in Perichondrium Express Activated Leukocyte Cell Adhesion Molecule and Participate in Bone Marrow Formation. *The journal of experimental medicine*, 195(12) :1549–1563, 2002.

Chapitre 3

Pertinence du modèle cellulaire choisi et robustesse des réponses biologiques

Sommaire

1	Introduction	149
2	Impact de la cryoconservation sur la croissance et la différenciation des CSM	151
2.1	Méthodes de congélation	152
2.2	Stabilité des banques cellulaires au cours du temps de stockage	155
3	Variabilités biologiques des CSM	161
3.1	Donneurs et sources tissulaires de CSM	162
3.2	Variabilité intrinsèque des cultures de CSM	165
4	Synthèse	168
5	Références bibliographiques	171

RÉSUMÉ : Les cellules souches mésenchymateuses (CSM) sont devenues un modèle cellulaire de choix à visée des thérapies cellulaires, non seulement grâce à leurs propriétés thérapeutiques, mais aussi grâce à la simplicité de leur prélèvement. Ces cellules ont également une durée de vie prolongée *in vitro* comparée aux cellules primaires adultes et les banques cellulaires de CSM sont plus faciles à générer que celles de CSE ou CSPi. Afin de pouvoir en produire en grande quantité, les technologies de culture cellulaire à grande échelle doivent être adaptées à leur amplification. En effet, les CSM présentent des caractéristiques particulières les éloignant fortement des lignées cellulaires immortalisées, notamment en terme de variabilité de croissance. Afin d'envisager le développement de procédés de culture innovants, il a donc été entrepris de caractériser les banques de CSM à notre disposition en conditions standards de culture. Cette caractérisation comprenait la procédure de cryoconservation et la croissance des cellules en système planaire. Grâce à ce travail préliminaire, la croissance des CSM a été comparée selon les attributs des donneurs, la source tissulaire, et de leur vieillissement en culture. L'amélioration de la méthode de cryoconservation a en particulier été entreprise et les conditions expérimentales pour obtenir des données de croissance répétables ont été déterminées.

1 Introduction

Tout procédé de culture utilisant des cellules animales se décompose classiquement en 4 phases : la cryoconservation, la phase d'amplification cellulaire, la phase de récolte, suivie de la phase de caractérisation du produit (figure 20). Aborder la culture de CSM selon une perspective biotechnologique, et non physiologique ou médicale, consiste à contrôler ces étapes, et donc comprendre les mécanismes biologiques ou d'ingénierie les sous-tendant. Or, l'étude d'un procédé d'amplification de cellules ne peut être informative sans tenir compte de la variabilité biologique. Il est donc apparu comme essentiel de caractériser l'amplification des CSM lors de cultures classiques (planaire, avec adjonction de SVF) préalablement à toute étude d'extrapolation. En effet, l'étude de la culture à grande échelle de cellules souches porte souvent l'accent sur leur croissance prolongée *in vitro*, les rapprochant ainsi de la culture d'une lignée immortalisée. En développement de procédé, l'accent est plus rarement mis sur le caractère primaire de ces cellules. Or cette dernière caractéristique a un impact majeur sur la mise en œuvre d'un procédé d'amplification, car leur source d'approvisionnement est une source finie. Cela se traduit notamment par la possibilité de n'établir qu'une seule banque cellulaire (seul un tiers des essais cliniques répertoriés déclare utiliser un système de banque à deux niveaux) [1]. L'établissement d'un jeu de données de référence fiable est donc particulièrement limité par la quantité du matériel biologique disponible.

L'identification des facteurs de variation, et si possible leur cantonnement, est d'ailleurs non seulement une démarche scientifique, mais est aussi un parcours imposé par les autorités de réglementation sanitaire lors du développement d'une thérapie à visée humaine. Dans le cadre des Conférences Internationales sur l'Harmonisation de l'enregistrement des médicaments à usage humain (CIH), il est clairement formulé que *"le but de tout développement [...] doit être d'établir un procédé capable de fournir, de manière systématique, une substance médicamenteuse d'une qualité déterminée à l'avance"* [2]. Au travers de l'expérience globale acquise en production de protéines recombinantes sur les 50 dernières années, trois facteurs généraux d'instabilité ont été identifiés en culture de cellules animales : la variation de lot, la dérive du procédé au cours du temps, et le changement du procédé de production [3].

- Les variations de lot-à-lot (*i.e. batch to batch*) : Dans le cadre de la culture de CSM, ces variations peuvent être causées par le changement de source de matière première biologique, d'une expérience ou d'une production à l'autre. Les performances de croissance peuvent différer

par exemple lors d'un changement de lots de SVF ou de lysat humain de plaquettes (LPH), n'apportant pas la même combinaison de facteurs de croissance et d'adhérence [4–6]. La matière première la plus critique reste toutefois les cellules elles-mêmes. Trois paramètres peuvent entraîner des variations de lots lors de l'amplification cellulaire des CSM :

- un paramètre technique, tel que l'uniformité de la banque cellulaire [7] ;
- et deux paramètres intrinsèques, que sont la nature polyclonale des CSM ;
- et la variabilité inter-donneur (mise en commun de différents donneurs dans une même banque ou la mise en œuvre d'un même procédé pour plusieurs donneurs différents) [8].

Grâce à des banques de CSM issues de plusieurs sources et à la réalisation répétée de cultures, la variabilité biologique attendue lors de leur amplification a ainsi pu être évaluée.

- La dérive du procédé : Même dans le cadre de limites opérationnelles très précises, l'évolution des populations cellulaires au cours du temps ne peut être entièrement évitée. La dérive du procédé, dans le cadre des lignées cellulaires continues, concerne principalement la stabilité de l'insert dans le génome, la cellule-hôte étant immortalisée. De plus, les lignées cellulaires sont validées sur plus de 80 passages quant à la stabilité de leur croissance [3]. *A contrario*, les CSM présentent une croissance finie, et les cellules vont donc dériver vers un état sénescence tout au long de leur amplification et perdre ainsi progressivement leur capacité à se diviser [9]. Il était donc important d'apprécier dans quelle mesure le nombre de générations accumulées au sein des banques de CSM utilisées modifiait leur cinétique de croissance.
- Les modifications du procédé (concernant les paramètres qui sont contrôlables, par le génie des procédés, tout au long du développement) : Dans le cadre de ce travail, nous avons donc évalué certains de ces facteurs, comme le passage d'un procédé planaire à celui sur microporteurs (chapitre 3) ou le remplacement du sérum par des alternatives (chapitre 4). Cependant, avant d'aborder ces problématiques, il a été essentiel de fixer un cadre précis concernant la phase qui précède l'amplification des cellules, *i.e.* la cryoconservation. La cryoconservation de cellules consiste à les conserver à basse température afin d'arrêter ou ralentir les réactions biologiques. Une "pause" hypothermique à des températures infra physiologiques (0-35° C) peut ainsi être effectuée pour, par exemple, transporter les cellules [10]. Lorsque l'objectif est de les conserver cependant, il devient nécessaire de les congeler à très basse température (-80 à -196° C) en présence d'agents cryoprotecteurs comme le DMSO. Ce processus, mal maîtrisé, peut conduire à une surmortalité cellulaire (due aux cristaux de glace, à un choc osmotique ou aux effets

toxiques de l'agent cryoprotecteur) [11]. En dehors de la perte des cellules, la cryoconservation peut également diminuer leurs capacités thérapeutiques (ex : atteintes du cytosquelette, réponse réfractaire à l'IDO), leur croissance, voire sélectionner des sous-populations cellulaires [12–14]. Certains paramètres de cryoconservation (milieu, rampe de température, densité cellulaire) ont donc été étudiés, et leurs impacts en aval sur la croissance et la qualité des CSM ont été évalués.

Avec cette grille d'analyse, il est aisé de comprendre que les performances d'un procédé d'amplification de CSM sont dépendantes d'un nombre conséquent d'étapes effectuées en amont :

- le prélèvement de cellules sur un donneur humain (méthode, organe, caractéristiques du donneur),
- la sélection des CSM au sein de cette population,
- leur transport et la création d'une banque cellulaire [15].

Afin de mieux appréhender la pertinence des CSM en tant que modèle d'étude en thérapie cellulaire, la robustesse de leur réponse biologique a donc été caractérisée, d'abord par l'étude de leur cryoconservation, puis par celle de leur croissance en conditions classiques, et ce avec les banques cellulaires à notre disposition.

2 Impact de la cryoconservation sur la croissance et la différenciation des CSM

Depuis la toute première cryoconservation de cellules mammaliennes [16], trois paramètres sont considérés comme centraux pour atteindre une revivification correcte : la rampe de température à laquelle les cellules sont refroidies, le milieu de cryoconservation (nature et concentration des agents cryoprotecteurs ou additifs), ainsi que la vitesse de réchauffement des cellules à décongélation [17]. Ces paramètres sont à adapter en fonction du type cellulaire utilisé et de l'échelle à laquelle se déroule la cryoconservation. Au sein du laboratoire, la procédure de référence pour les lignées cellulaires et les CSM porcines consistaient à effectuer une descente rapide en température dans des vapeurs d'azote liquide (35 min, en 3 étapes) dans un milieu composé de 10% (v/v) de DMSO, 20% (v/v) de SVF et 70% (v/v) d' α -MEM supplémenté. Afin d'adapter ces conditions aux CSM d'origine humaine, différents essais ont été menés.

2.1 Méthodes de congélation

Rampe de température. Trois rampes de température ont dans un premier temps été mises en œuvre pour congeler des CSM issues de la banque MO32 en milieu de cryoconservation standard : 35 min, 60 min (système Nicool LM) et 4 h (dispositif Mr Frosty). Comme le montre la figure 29-A, la viabilité des cellules après décongélation était supérieure à 80% dans les trois cas. Le rendement de décongélation (quantité de cellules récupérées après décongélation comparée à celle placées initialement en tubes cryogéniques) était également supérieur à 90% dans toutes les conditions étudiées. Les effets de ces différentes rampes sont apparus comme bien plus drastiques après la mise en culture des CSM sur boîtes de cultures. En effet, dans le cas des congélations rapides effectuées avec le dispositif Nicool LM, on obtient un pourcentage de cellules survivantes à J5 inférieur à 100% (figure 29-B), traduisant ainsi une perte importante de cellules. De plus ces résultats sont extrêmement variables (CV de 70%), les banques ainsi réalisées ne peuvent donc être considérées comme homogènes. Au contraire, la rampe de température la plus lente avec le Mr Frosty, où les CSM sont progressivement congelées de la température ambiante à -80° C, a démontré son efficacité de par sa meilleure répétabilité (CV de 40%) et du fait que les cellules ne soient pas arrêtées dans leur croissance. Cette méthode a donc été utilisée ultérieurement.

La congélation des cellules avec une rampe de température contrôlée est la méthode la plus répandue de cryoconservation des cellules mammaliennes. Cette rampe doit se situer à un optimum : assez lente pour permettre une déshydratation partielle mais suffisante des cellules et ainsi éviter la formation de cristaux d'eau intracellulaire, mais aussi assez rapide pour éviter aux cellules un choc osmotique hypertonique pouvant conduire à l'apoptose des cellules et/ou à la diffusion intracellulaire de l'agent cryoprotecteur [18]. Cette rampe va donc être directement liée à la perméabilité membranaire d'un type cellulaire, et à sa capacité à rétablir plus ou moins rapidement son équilibre osmotique. Dans notre expérience, il est apparu que les rampes de températures rapides étaient non-optimales pour les CSM humaines. Il avait d'ailleurs déjà été démontré que les CSM humaines, comparées à des CSM d'origine murine ou bovine, se montraient plus sensibles au processus de cryoconservation, hypothétiquement à cause de leur plus grande taille [19]. Ces résultats ne sont pas en opposition avec les rendements de décongélation et viabilités élevés observés juste après la décongélation. Les quantités très faibles de cellules obtenues à jour 5 avec les protocoles de congélation rapide peuvent être aisément expliquées par le processus de mort cellulaire différée (apoptose et nécrose) généralement observé entre 24 et 72 h après décongélation [20, 21]. L'homogénéité faible des banques établies

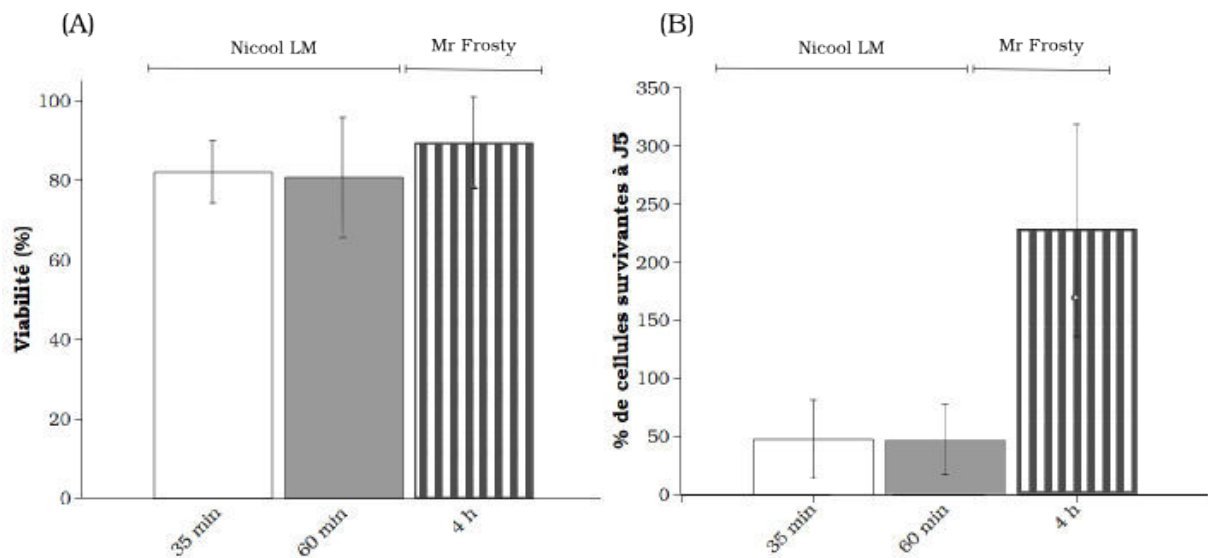


FIGURE 29 – Effets des rampes de température de congélation, en congélations rapides par le dispositif Nicoool LM en 35 min (n=5) ou 60 min (n=6), et en congélation lente par le dispositif Mr Frosty en 4 h (n=12) : (A), viabilités obtenues après décongélation en cytométrie capillaire avec le réactif Guava Viacount ; (B), pourcentage de cellules survivantes au premier passage des CSM à jour 5 (J5) par rapport à la quantité de cellulesensemencées. La banque utilisée est la MO32 à P4. Les barres d'erreur sont exprimées en écarts-types.

avec le dispositif Nicoool LM pourrait éventuellement être liée à un défaut de conception en terme de distribution des vapeurs d'azote dans l'appareil aboutissant à ce que tous les tubes cryogéniques d'une même banque ne soient pas congelés selon la même rampe de température.

Milieu de cryoconservation. Les cellules mammaliennes sont couramment congelées à haute densité dans un milieu de cryoconservation consistant en un mélange d'un ou plusieurs agents cryoprotecteurs et d'additifs. Comme précisé précédemment, le milieu de cryoconservation standard des CSM porcines (notre précédent modèle de référence) était composé de 10% (v/v) de DMSO, 20% (v/v) de SVF et 70% (v/v) d' α -MEM supplémenté. Le di-méthyl sulfoxyde (DMSO), qui est l'agent cryoprotecteur le plus utilisé, est un agent apolaire pénétrant les cellules, limitant ainsi la formation de cristaux d'eau et l'augmentation de leur concentration saline. Le DMSO est cependant toxique pour ces dernières à température ambiante (induction d'une dénaturation des protéines). Une expérience a donc été menée sur des CSM humaines (banque MO32 à P8) à différents ratios cellules/DMSO. Le milieu de cryoconservation a été maintenu à 10% (v/v) de DMSO, mais les congélations ont été effectuées à des densités cellulaires variables de $1 \cdot 10^6$, $2 \cdot 10^6$, et $5 \cdot 10^6$ cellules vivantes/mL. Aucune différence n'a pu être observée sur cette gamme de concentrations concernant la viabilité des cellules à décongélation

ou leur croissance ultérieure, validant par la même la création de banques avec des quantités de cellules adaptées pour divers usages (tout particulièrement à différentes échelles).

Le choix des paramètres de cryoconservation de cellules étant encore fortement empirique, une fois la méthode de congélation et les ratios cellules/DMSO déterminés, divers cryoaditifs ont également été évalués sur des CSM humaines de la banque MO32 à P9 (figure 30). La comparaison a été effectuée entre trois milieux de cryoconservation avec, pour une quantité de DMSO constante (10% v/v) et différentes quantités d'additifs : 20% (v/v) de SVF et 70% (v/v) d' α -MEM supplémenté ; 90% (v/v) de SVF ; ou 0,5% (v/v) de BSA et 0,25 M de tréhalose en α -MEM supplémenté. Les viabilités obtenues à décongélation étaient aux alentours de 60% pour toutes les conditions (figure 30, A). Ces résultats peuvent être liés au passage tardif (P9) auquel ces cellules ont été stockées [22]. L'effet de ces milieux de cryoconservation sur la croissance des CSM après décongélation est plus probant (figure 30, B) ; il y a en effet une division un peu plus marquée entre les milieux de cryoconservation très aqueux, contenant un volume important d' α -MEM, et celui composé uniquement de SVF, donc plus chargé en macromolécules (ayant un rôle dans la stabilisation des membranes et l'atténuation des chocs osmotiques).

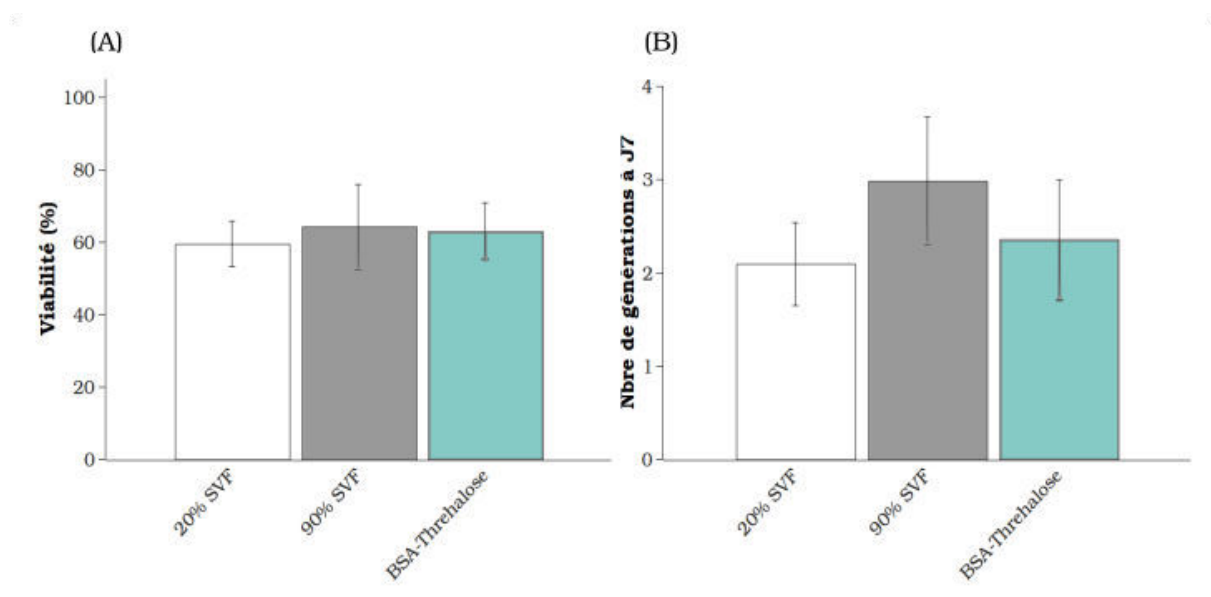


FIGURE 30 – Effets des additifs du milieu de cryoconservation, en congélation lente par le dispositif Mr Frosty en 4 h (n=4) : (A), viabilités obtenues après décongélation en cytométrie capillaire avec le réactif Guava Viacount ; (B), nombre de générations obtenues au premier passage des CSM à jour 7 (J7). La banque utilisée est la MO32 à P9. Les barres d'erreur sont exprimées en écarts-types.

Ces résultats ont contribué à définir de nouvelles conditions standard de cryoconservation des CSM humaines pour nos expériences. La méthode la plus performante était donc celle avec un milieu

de cryoconservation contenant 10% (v/v) de DMSO et 90% (v/v) de SVF et une rampe de température lente. Cette méthode est d'ailleurs celle la plus couramment utilisée dans la littérature [18]. Cependant, il faut noter que la substitution du SVF par un mélange de BSA (macromolécule) et de tréhalose (agent cryoprotecteur non pénétrant), reste une alternative viable lors du développement d'un procédé de culture entièrement sans sérum. L'adjonction à forte concentration de tréhalose (2 M) a d'ailleurs déjà permis la conservation de CSM d'origine adipeuse tout en diminuant la concentration de DMSO à 4% (v/v), et celle de SVF à 10% (v/v) [23]. L'effet cryoprotecteur des agents non pénétrants comme le tréhalose (mais aussi le sucrose ou de l'hydroxyéthylamidon), est principalement attribué à leur effet osmotique permettant une déshydratation progressive. De plus, ils sont plus aisément éliminés lors de la décongélation, cependant ils ne peuvent être utilisés seuls [23–25]. De plus, bien que l'utilisation de sérum reste une solution simple et directe pour maintenir les cellules à très basse température, des alternatives ont déjà été évaluées avec succès pour les CSM humaines. La BSA seule [26], des milieux commerciaux sans sérum (Stem-Cellbanker de AMSbio, Royaume-Uni ; Biofreeze de Biochrom, Allemagne) [27, 28], ou le sucrose [24], sont tous des additifs permettant d'éliminer le SVF des milieux de cryoconservation. L'utilisation conjointe d'acides aminés, un mélange d'ectoïne (un dérivé de tétrahydropyrimidine) et de proline, a même permis de n'utiliser ni SVF ni DMSO pour la congélation de CSM humaines immortalisées [28]. Au vu de ces résultats la méthode utilisée ultérieurement a donc été celle avec un milieu de cryoconservation contenant 10% (v/v) de DMSO et 90% (v/v) de SVF et une rampe de température lente.

2.2 Stabilité des banques cellulaires au cours du temps de stockage

L'intérêt majeur de la cryoconservation est de maintenir les cellules dans un état de stase où elles ne présentent aucune demande métabolique et n'accumulent pas de mutations génétiques, contrairement au maintien continu en culture, qui n'est d'ailleurs pas envisageable pour des cellules primaires comme les CSM. Cette préservation peut perdurer des dizaines d'années avec un approvisionnement régulier des conteneurs en azote liquide. D'ailleurs certains ont réussi à isoler des CSM à partir de moelle osseuse conservée à -196° C pendant 25 ans, bien que l'efficacité d'adhérence de ces dernières soit fortement diminuée [29]. Afin de valider la méthode développée précédemment, deux banques de CSM issues de moelle osseuse ont été testées quant à leur stabilité sur une période étendue.

Impact sur la croissance des CSM. Deux banques de CSM de moelle osseuse ont été étudiées. L'une a été conservée dans un congélateur à -80°C pour un stockage à moyen terme quand l'autre l'a été en azote liquide pour un stockage de longue durée. La banque MO24 a été utilisée après conservation à -80°C , pendant 2, 4, 6 et 27 semaines. Aucune différence significative en matière de viabilité ou croissance n'a été observée. La banque MO15, quant à elle, a été stockée dans la phase liquide d'un conteneur d'azote, pendant plus d'un an. Les résultats obtenus lors des décongélations régulières de ces CSM sont visibles sur la figure 31. On note que les viabilités à décongélation sont restées stables à 80% de cellules vivantes recouvrées, traduisant ainsi que les membranes plasmiques n'ont pas été perturbées lors du cycle de congélation/stockage/décongélation. Toutefois, une légère diminution de la croissance des cellules semble s'amorcer après 64 semaines de stockage à -196°C , ce qui pourrait être lié à la moins bonne efficacité d'adhérence citée précédemment (éventuellement due à une atteinte des protéines transmembranaires ou du cytosquelette) [12, 29].

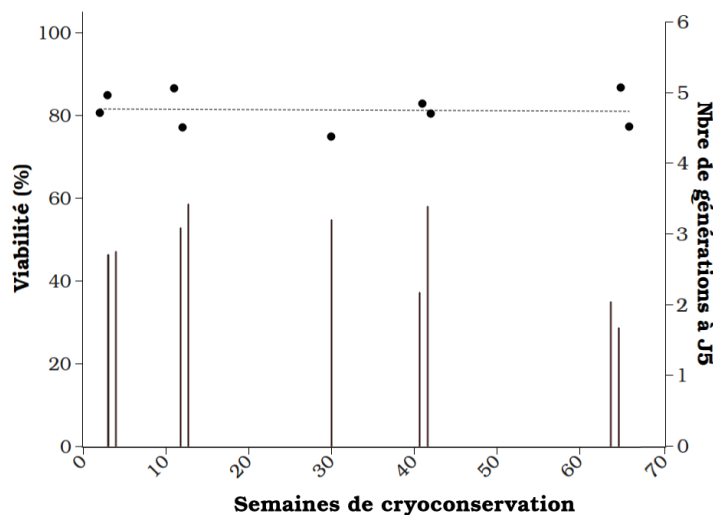


FIGURE 31 – Effets de la cryoconservation de CSM à long terme en azote liquide, maintien jusqu'à 65 semaines à partir d'une congélation lente en SVF à 10% (v/v) de DMSO : viabilités à décongélation (●), nombres de générations à jour 5 (J5) sur le diagramme avec barres. La banque utilisée est la MO15 à P3.

Il a déjà été démontré qu'à -80°C , au sein d'un milieu de cryoconservation complexe avec parfois une répartition inhomogène des solutés, des molécules d'eau peuvent être mobiles et certaines protéines encore actives, amenant ainsi à la dégradation des cellules conservées [30]. Plusieurs comparaisons de stockage à -80 ou -170°C (température dans les vapeurs d'azote liquide) ont déjà été effectuées. Le premier mode de stockage a l'intérêt majeur de limiter les coûts de maintenance, tandis

que le second présente celui de ne pas être dépendant d'une source d'électricité. Les résultats de ces comparaisons variaient en fonction des types cellulaires. Par exemple, dans le cas de cellules hépatiques, il a été démontré qu'un stockage à -80°C de plus d'un mois dégradait fortement la quantité de cellules viables récupérées après décongélation, alors qu'à -170°C , ces cellules pouvaient être conservées plus d'un an [31]. Les recherches montrent également que les CSM issues de tissus adipeux résistent mieux à la cryoconservation que celles de moelle osseuse [14, 32], ce qui, avec leur meilleure capacité de croissance, en fait une source très attractive de cellules pour les thérapies allogéniques. Pour les thérapies autologues, le cas du stockage des tissus périnataux durant la vie de l'individu reste encore problématique, les tissus de cordon, notamment, se conservant mal sur une période supérieure à 5 ans [13]. La stabilité des banques de CSM est donc à prendre en compte afin de pouvoir conserver et transporter ces cellules vers le patient, mais aussi pour la comparaison de résultats expérimentaux. Dans nos conditions, il semblerait que les banques de CSM humaines de moelle osseuse restent stables, *a minima*, entre 6 mois et un an ; et aucun résultat généré lors de ce travail ne l'a été en dehors de cet intervalle.

Impact sur les capacités de différenciation. Bien qu'aucun effet flagrant de la durée de stockage dans l'azote liquide n'ait été observé sur la croissance des CSM conservées à basses températures sur de longues périodes, une analyse plus fonctionnelle de leur capacité à se différencier a aussi été entreprise. L'un des critères principaux permettant de définir une population de cellules comme CSM est en effet leur réponse positive à l'induction à la différenciation adipocytaire, ostéocytaire et chondrocytaire *in vitro*. Aussi bien les cellules de la banque MO24 conservées à -80°C , que celles de la banque MO15 conservées à -196°C , ont donc été systématiquement testées lors de leur second passage après décongélation (une quantité importante de cellules étant nécessaire pour mener simultanément ces trois inductions). Les résultats obtenus sont purement qualitatifs et basés sur l'observation visuelle de marquages histochimiques traduisant la présence ou non de cellules différenciées au sein de la population cellulaire traitée. Il a donc été constaté que les CSM de la banque MO24 étaient encore réceptives aux stimuli de différenciation après 27 semaines de cryoconservation. De même, les CSM de la banque MO15 ont pu être différenciées jusqu'à 30 semaines de cryoconservation dans l'azote liquide. Toutefois, lors de décongélations ultérieures, à partir de 41 semaines de stockage à -196°C , aucune différenciation ostéocytaire n'a pu être obtenue et une très forte diminution de la capacité des CSM à se différencier en adipocytes a également été observée (figure 32).

De manière générale, les études rapportés dans la littérature ne font pas mention de conséquences

néfastes de la cryoconservation de longue durée sur la différenciation [18, 33]. De plus, une comparaison des CSM congelées à -85 ou -196° C n'a permis d'observer aucune différence d'induction à la différenciation des CSM humaines [34]. Une comparaison de CSM de tissu adipeux natives ou cryoconservées a néanmoins montré une réduction importante de leur capacité à se différencier en ostéocytes et adipocytes après un cycle de congélation/décongélation [35]. Il a également été constaté, de manière plus limitée, que la cryoconservation à -152° C entraînait une légère baisse des dépôts calciques (mais pas de l'activité phosphatase alcaline) entre des CSM de moelle osseuse natives et cryoconservées induites pour une différenciation ostéocytaire, mais surtout, que cette différence s'accroissait entre des CSM maintenues à -152° C pendant 6 ou 30 mois [36]. À partir de ces données, et de nos observations limitées à deux banques de deux donneurs, il est donc difficile d'avoir le recul nécessaire pour évaluer l'impact que pourrait avoir une cryoconservation des CSM sur de très longues périodes. Il nous faut cependant envisager que le maintien dans l'azote liquide des banques de CSM utilisées pourrait avoir un impact négatif, si ce n'est sur leur capacité de croissance, sur leurs qualités intrinsèques. On ne peut qu'émettre des hypothèses quant à la cause de cette diminution : il est possible que cela soit essentiellement dû au donneur de la banque MO15, ou que la banque n'ait pas été réalisée ou stockée de manière homogène.

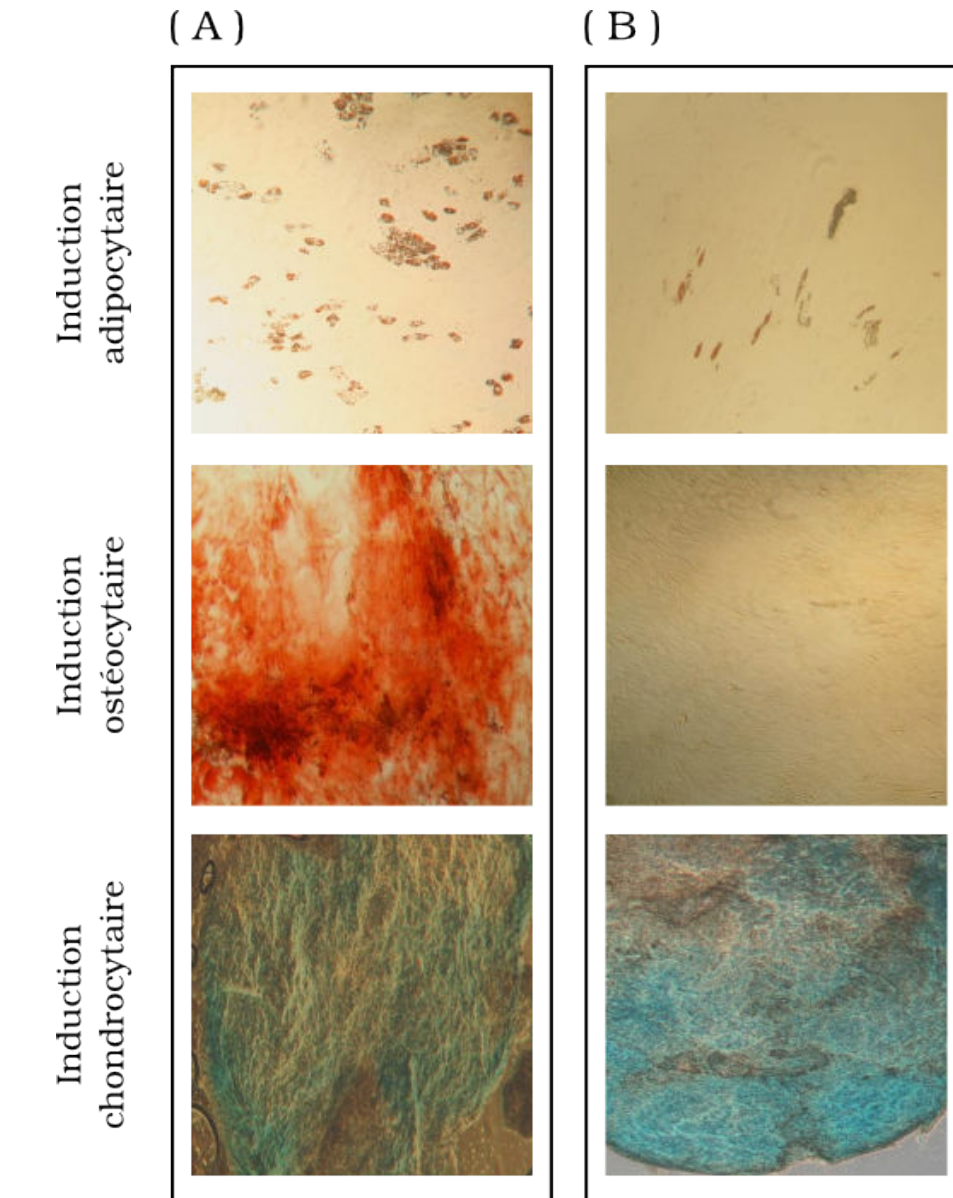


FIGURE 32 – Maintien des CSM en azote liquide pendant (A) 12 semaines et (B) 41 semaines : effets sur la différenciation en adipocytes, ostéocytes et chondrocytes induite par culture en milieux de différenciation Stempro (Life technologies). La banque utilisée est la MO15 à P3. Les marquages histochemiques révèlent : la présence d'adipocytes en rouge par l'Oil Red (coloration des vésicules lipidiques), la présence d'ostéocytes en rouge par l'alizarine (coloration des précipités calciques), la présence de chondrocytes en bleu par le bleu alcian (coloration des agrécans).

RÉSUMÉ

- Plusieurs rampes de température de cryoconservation des CSM ont été évaluées. Il a été déterminé qu'une rampe de température lente était préférable pour maintenir leur capacité de prolifération en culture après décongélation.
- Différents milieux de cryoconservation ont été évalués, dont certains ne contenant pas de sérum. Un milieu contenant 90% (v/v) de SVF et 10% (v/v) de DMSO a été choisi car offrant de meilleures performances de croissance des CSM.
- La stabilité d'une banque de CSM a été suivie sur 65 semaines. La stabilité des banques cellulaires générées a pu être démontrée, en matière de croissance et de différenciation, jusqu'à 40 semaines de stockage dans l'azote liquide. Une diminution des capacités de différenciation ostéocytaire des CSM a été observée après 40 semaines de stockage dans l'azote liquide.

3 Variabilités biologiques des CSM selon les donneurs, la source tissulaire, et la durée du maintien en culture

Les procédés de culture cellulaire à grande échelle ont été essentiellement développés pour la culture de lignées cellulaires immortalisées. Ces dernières, une fois transfectées avec un ADN recombinant, passent par une procédure de sous-clonage afin de sélectionner un clone dont les capacités de croissance et de production sont maximales. Le procédé de culture est donc établi autour d'une population cellulaire génétiquement homogène et ce travail de mise au point est répété pour chaque nouveau clone. La culture de CSM n'est pas compatible avec cette démarche de standardisation. Les cellules prélevées sur un donneur sont, dès l'origine, polyclonales, la population étant constituée de cellules à divers âges biologiques, à des niveaux de différenciation et d'expression génique multiples. En dehors de cette variabilité intrinsèque, le vieillissement des cellules au cours du procédé (du donneur à la phase d'amplification) est détecté dès les premiers jours *in vitro*, le nombre de passages subi par les cellules va donc influencer sur leur performance. Enfin, les CSM ne présentent pas les mêmes caractéristiques entre différents donneurs ou différentes origines tissulaires. À partir de ces constats, 3 possibilités ont été envisagées pour les thérapies cellulaires fondées sur l'utilisation de CSM humaines.

- En application autologue, les cellules d'un même individu sont isolées puis réintroduites après amplification *in vitro*; le choix du donneur n'est donc pas libre et c'est pourquoi l'impact de la santé du patient, son âge, genre et les traitements qu'il a subi (ex : chimiothérapie) vont modifier grandement les capacités des CSM [37], ce qui peut mener à l'échec d'un protocole de production standardisé.
- Lors d'une thérapie allogénique, la sélection d'un donneur tiers unique est envisageable pour créer une banque mère. Le tissu d'origine du prélèvement et la caractérisation *a priori* des cellules sont des facteurs décisifs quant au développement du procédé de culture. Pour pouvoir répéter cette démarche, la création d'une banque de référence standardisée au niveau international commence à être envisagée [38], tout comme la mise en place systématique de dosages préalables de l'activité cellulaire [39].
- Cette même banque de référence pourrait également être utilisée pour évaluer des banques cellulaires mélangeant plusieurs donneurs. Ces banques sont des alternatives envisagées lors du développement de thérapies allogéniques à grande échelle de production. Cela limiterait en effet les efforts de validation répétés à chaque changement de matériel biologique. De plus, de

meilleurs résultats ont pu être atteints, *in vitro* et en clinique, avec un mélange de cellules issues de différents donneurs plutôt que d'un seul [40].

En recherche, l'étude de la variabilité inter-donneur est fortement encouragée pour limiter les conclusions fondées sur des réponses moyennées qui ne correspondraient à aucune réalité biologique. Il est donc conseillé d'effectuer les expériences à partir de cellules d'un seul donneur, de les répéter au minimum avec trois donneurs différents et de limiter le nombre de passages [8]. Ces recommandations sont cependant appliquées de manière variable, soit en raison de limitations d'accès à une quantité suffisante de matériel biologique, soit, plus rarement, qu'une banque mère soit disponible dans le cadre du développement d'un procédé à visée industrielle (plus de 100 tubes cryogéniques disponibles). Pour la culture de CSM porcines, la voie choisie a été de combiner plusieurs donneurs et de sélectionner les mélanges cellulaires les plus performants pour constituer ensuite les banques mères (travaux de la thèse de Caroline Ferrari, [41]). Au contraire, pour les CSM humaines, les banques cellulaires ont été créées en compartimentant chaque donneur. Dans ce cadre, aucune présupposition quant à la gamme de réponses attendues ne pouvait donc être faite. Des comparaisons entre les différentes banques cellulaires ont donc d'abord été effectuées en conditions standards de culture.

3.1 Donneurs et sources tissulaires de CSM

Toutes les banques de CSM à notre disposition (tableau 9) ont été évaluées sur leur capacité de croissance au premier ou au second passage après décongélation (figure 33) pour comparer rapidement trois paramètres : la différence inter-espèce (porc ou humain), inter-origine (moelle osseuse ou tissu adipeux) et inter-donneur (d'âge et genre différent). Comme mentionné dans la section précédente, deux méthodes de congélation ont été utilisées, les banques porcines, MO70 et MO32 ont été cryoconservés avec de l' α -MEM et avec une procédure présentant une rampe de température rapide, quand les autres l'ont été avec le nouveau protocole en présence de 90% de sérum avec une procédure de congélation lente. De plus, ces banques ont été congelées à des passages différents et le nombre de donneurs était limité. C'est pourquoi ces résultats ne donnent qu'un aperçu des variabilités déjà rapportées dans la littérature.

On note sur la figure 33 que les CSM de porcelets montrent globalement une meilleure résistance à la cryoconservation et que leur croissance est plus importante que celle des banques de CSM humaines MO70 et MO32 dans les mêmes conditions de congélation. D'ailleurs, la croissance de ces dernières est en moyenne plus faible que celles des trois autres banques de moelle osseuse (MO15, MO24, MO36).

Les cellules nécessitant un temps d'adaptation après décongélation, la quantité de cellules viables devrait être de manière générale plus importante au second passage qu'au premier. Ceci n'a pas été constaté pour les banques MO70 et MO36, qui ont d'ailleurs été peu utilisées au cours de ce travail, car, au vu de l'arrêt précoce de leur croissance, ces populations cellulaires ont été supposées comme majoritairement sénescences.

Au sein des banques MO15, MO24 et MO36, dont la cryoconservation a été effectuée avec la même méthode et à passage identique, on remarque une corrélation entre l'âge du donneur et les capacités de croissance. L'échantillonnage est néanmoins trop restreint pour pouvoir tirer de ces résultats une conclusion définitive, particulièrement sans anamnèse préalable des donneurs. D'ailleurs, quant à l'impact de l'âge sur la croissance des CSM, les deux banques issues de tissu adipeux, AD38 et AD40, ne confirment pas cette hypothèse (avec seulement deux ans de différence entre les donneuses cependant). Enfin, les banques issues de moelle osseuse ou de tissu adipeux présentent des croissances dont l'ordre de grandeur est semblable. Au vu de ces résultats variables en conditions standards, il semble extrêmement difficile d'affirmer que des données obtenues à partir d'un seul donneur puissent être généralisées à l'ensemble des cellules correspondant à la définition de CSM. Nos données peuvent cependant être mises en perspective avec des études à l'échantillonnage plus vaste.

Concernant les différences inter-espèces, les cellules humaines ont déjà été déterminées comme ayant des capacités prolifératives plus limitées que celles de chèvre [42], de mouton et de lapin [43] (études sur 5 donneurs).

Pour l'évaluation des variations entre donneurs humains, l'âge est un facteur considéré comme évident. Pourtant, deux études incluant 61 donneurs (âges 13 à 80 ans) et 53 donneurs (âges 10 à 89 ans) n'ont pas permis de montrer de corrélation statistiquement significative entre temps de générations des CSM et l'âge des donneurs de moelle osseuse [44, 45]. Il faut cependant préciser que ces constats n'ont été faits, respectivement, qu'après un jour de culture ou au premier passage des cellules après isolement. Au contraire, un travail sur un nombre de donneurs plus restreint (33 donneurs de moelle osseuses de 5 à 55 ans), mais avec un suivi des CSM sur 4 mois, a montré que les différences de croissance apparaissaient bien entre les CSM de donneurs d'âges différents, mais seulement à partir de 5 semaines de culture, quand l'expression des marqueurs géniques de sénescence et l'accumulation des dommages oxydatifs atteignaient des niveaux significatifs [46]. De même, à partir de 55 donneurs de tissu adipeux (âgés de 18 à 72 ans), des temps de générations plus longs ont été observés pour des donneurs dont l'âge dépassait 50 ans, sans que le genre ou l'indice de masse grasseuse influent sur

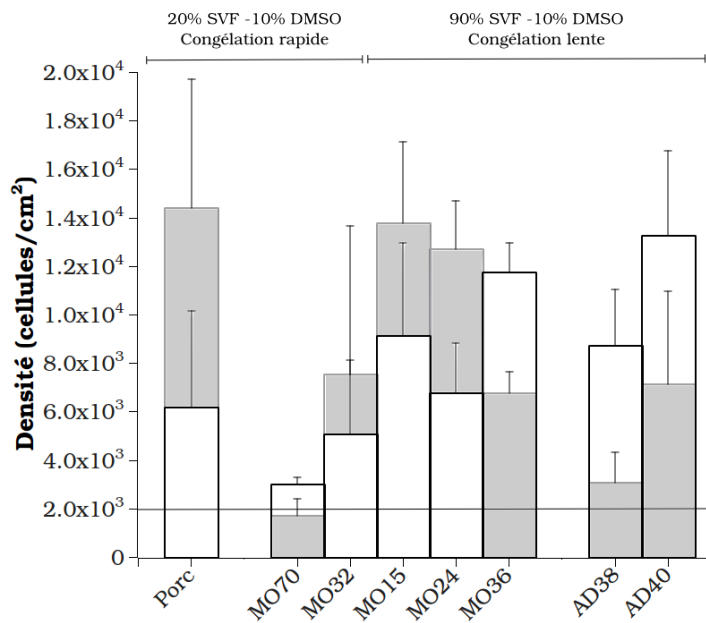


FIGURE 33 – Comparaison de la croissance des CSM selon l'espèce, le donneur et l'origine tissulaire. Résultats à densité d'ensemencement identiques sur boîtes de culture à 2000 cellules/cm² (ligne horizontale noire) : (□) en blanc, densités cellulaires obtenues au premier passage après décongélation ; (■) en gris, densités cellulaires obtenues au second passage après décongélation. Les barres d'erreur sont exprimées en écarts-types (n=3).

Porc : CSM de moelle osseuse de porcelets, MOxx : CSM de moelle osseuse humaine suivi de l'âge du donneur, ADxx : CSM de tissu adipeux humain suivi de l'âge du donneur.

ces résultats [47].

Malgré ce point commun, de nombreuses différences existent entre les CSM issues de moelle osseuse ou de tissu adipeux. Le consensus est que ces dernières sont plus aptes à générer de large population cellulaire. Une comparaison de 18 donneurs de moelle osseuse (âges 44 à 84 ans) et de 18 donneurs de tissu adipeux (âges 26 à 57 ans) a confirmé cette hypothèse en montrant que les CSM de moelle osseuse produisaient en moyenne un nombre de générations inférieur [48]. Toutefois un biais important de cette étude est la distribution de l'âge des donneurs, les opérations de la hanche ou du fémur étant effectuées sur une population globalement plus âgée que celle des procédures de liposuccions. Des comparaisons vraies de CSM, c'est-à-dire issues de différentes origines tissulaires à partir des mêmes donneurs, n'ont pu être réalisées que sur des modèles animaux. Une étude effectuée avec 10 lapins est ainsi parvenue à confirmer que, quel que soit l'âge de la source, les CSM de moelle osseuse avaient un temps de génération plus important de 130% que celles de tissu adipeux [49].

Nos résultats ne sont donc pas en contradiction avec les travaux les précédant. De plus, ces expériences ont contribué à la caractérisation des banques à notre disposition. Dans le but spécifique

du développement d'un procédé d'amplification de CSM, l'importance de cette étape préalable a d'ailleurs été récemment démontrée par deux études. La première a comparé la croissance de CSM issues de 5 donneurs de moelle osseuse (d'âges inférieurs à 30 ans) et il a été estimé que les différences de croissance accumulées entre donneurs pouvaient entraîner jusqu'à 13 jours de retard sur une production [50]. Ensuite, la mise en œuvre de culture sur microporteurs avec des CSM issues de moelle osseuse ou de tissu adipeux a déjà résulté en une croissance moindre des CSM adipocytaires, probablement car cette population n'était pas la cible d'origine du procédé [51]. Au vu de ces résultats, l'obtention d'un procédé de culture robuste pour les CSM d'origine humaine passe par la prise en compte rigoureuse de la source des cellules afin de pouvoir adapter en continu les méthodes de culture. Par exemple, alors que les CSM ont des capacités de prolifération amoindries si le patient a été victime d'un infarctus (étude sur 10 donneurs de moelle osseuse sains, 16 non), l'utilisation d'un environnement hypoxique a déjà permis de rétablir une prolifération suffisante pour éventuellement traiter ces patients de manière autologue [52].

3.2 Variabilité intrinsèque des cultures de CSM

a- Évolution de la croissance des CSM en cours de culture sur différents passages

Les disparités de croissance entre donneurs ont un impact significatif sur la planification d'une méthode d'amplification. En effet, il est nécessaire de maintenir le nombre de générations cumulées des populations au minimum tout en générant une banque de travail de taille adéquate. Dans notre cas, les banques avaient une taille minimale de 3 tubes cryogéniques (cryoconservation de la banque AD38 à P5 et $5 \cdot 10^6$ cellules viables/mL) et maximale de 11 (cryoconservation de la banque MO15 à P3 et $5 \cdot 10^6$ cellules viables/mL). L'efficacité de création d'une banque est donc logiquement liée à la faculté intrinsèque des cellules à se diviser. En conséquence, les âges biologiques de banques de travail de CSM humaines d'origines différentes ne sont pas équivalents, aussi bien *in vivo* (âge et santé du donneur, voir précédemment) qu'*in vitro* (phase d'amplification initiale entre l'isolement et la création de la banque) [53].

Or, comme pour toute culture de cellules primaires, le nombre de générations que peut accumuler une population de CSM est limité dans le temps [9]. Par exemple, la croissance de la banque M032 a été suivie en continu de P2 (passage à réception) à P14, passage auquel il n'était plus possible de maintenir les cellules en culture (figure 34). Un pic de croissance entre les passages 4 à 7 a été observé, mais

au-delà de ce point la population commence à décliner avant d'exhiber un phénotype sénescence à partir du passage 12. Le passage auquel les cellules sont cryoconservées a donc une influence majeure sur leur croissance ultérieure, et comme on peut le voir sur la figure 35 (à gauche), des CSM de cette même banque congelées à P4 ou P6 n'ont pas des vitesses de croissance identiques, au contraire de ce que l'on pourrait obtenir avec des lignées immortalisées. Donc, comme l'âge biologique des cellules influence fortement les rendements de croissance [54], seules des expériences établies, avec la même méthode de cryoconservation, un donneur identique et des cellules aux mêmes passages, peuvent être considérées comme comparables.

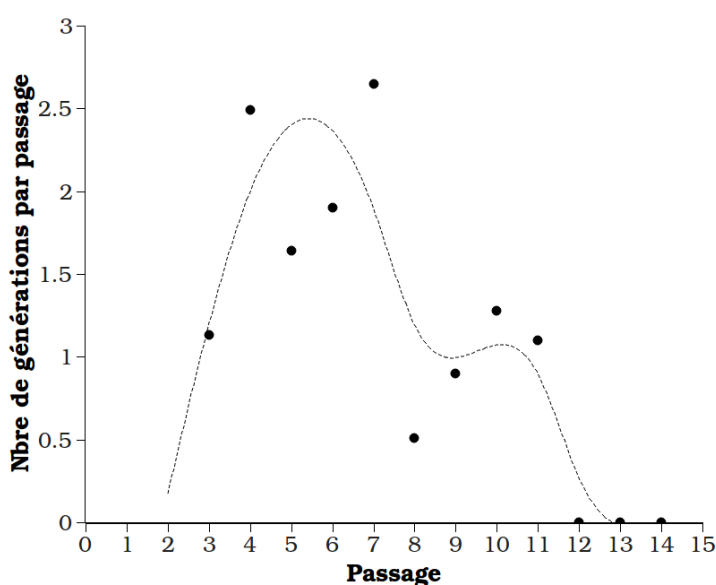


FIGURE 34 – Évolution des capacités de croissance des CSM avec le nombre de passages : exemple de la banque MO32 sur une culture de 60 jours.

b- Répétabilité en conditions standardisées

Une fois les conditions élémentaires de répétabilité établies, il devient possible de quantifier la variabilité intrinsèque à tout suivi de CSM en culture. Cette variabilité incompressible est le produit de tous les paramètres non contrôlés, qu'ils soient biologiques comme l'hétérogénéité de la population ; soient techniques, comme les erreurs de mesure ; ou encore simplement aléatoires. Les résultats de plusieurs amplifications en conditions standards des banques MO32, MO24 et MO15 ont donc été compilés figure 35, et ces banques présentent chacune des croissances avec des coefficients de variation faibles entre les réplicats à chaque point, de 5, 7 et 12,5% en moyenne. La seule exception est le passage suivant la décongélation de la banque MO32, où ces coefficients sont supérieurs à 30%, du

reste, il a été montré précédemment que la méthode de cryoconservation utilisée alors engendrait la création d'une banque non homogène.

Ces résultats étant partiellement dépendant de la méthode de comptage, une estimation de l'erreur engendrée par les manipulations et l'instrumentation (ici, cytomètre capillaire Guava EasyCyte, Millipore) a aussi été réalisée. Sachant que chaque échantillon est systématiquement analysé trois fois, l'erreur technique se situe autour de 5% (en accord avec les indications du fournisseur).

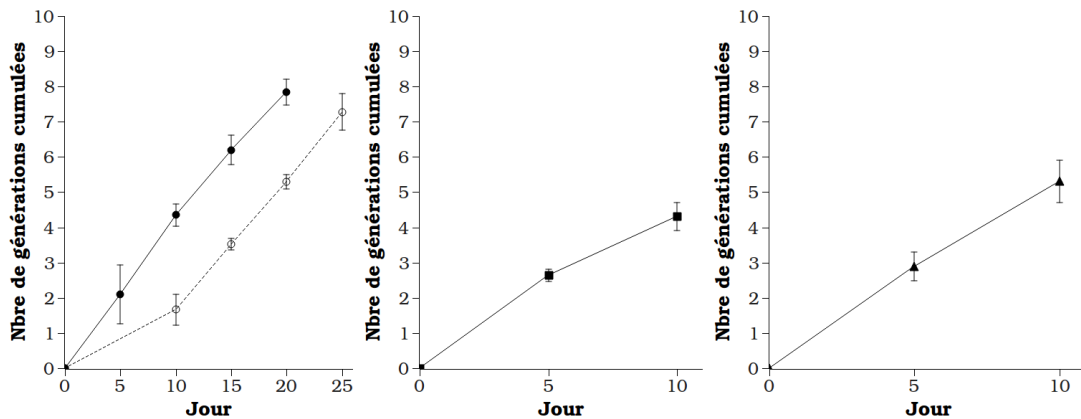


FIGURE 35 – Variabilités intrinsèques de croissance des CSM congelés à différents passages : à gauche, banque MO32, à P4 (●, n=3), et P6 (○, n=2); au milieu, banque MO24 à P3 (■, n=5); à droite, banque MO15 à P3 (▲, n=9). Les barres d'erreur sont exprimées en écarts-types.

De manière générale, la marge de variations d'un test biologique doit être de 15% maximum pour être considérée comme acceptable [55]. Grâce au travail préliminaire présenté dans ce chapitre, nous pouvons affirmer que les CSM humaines qui sont utilisées répondent à ce critère. Cette affirmation n'est toutefois valide que pour un cadre précis, *i.e.* en conditions standards de culture et en suivant la méthodologie développée.

RÉSUMÉ

- Les CSM présentent des capacités de proliférations très variable en fonction de l'espèce dont elles sont issues, de l'identité biologique du donneur et de la source tissulaire dont elles ont été extraites.
- Les CSM ne présentent pas des profils constants de croissance selon la durée que les cellules ont passé en culture (nombre de passages).
- Il est possible de comparer différentes conditions de culture des CSM à partir de banques générées au même passage et cryopréservées dans des conditions identiques.

4 Synthèse

L'ensemble de ce travail a pour but de comprendre les mécanismes d'amplification des CSM, d'avoir une bonne maîtrise des différents phases du procédé d'amplification et ainsi d'atteindre les rendements de cultures nécessaires aux thérapies cellulaires. L'adaptation des procédés de culture à grande échelle des lignées continues déjà utilisés dans l'industrie pharmaceutique, à la culture de CSM est la voie préférentielle suivie par les recherches actuelles. Or, des problématiques, qui ne se posent plus lors de l'étude d'un procédé avec une lignée cellulaire immortalisée, sont à réévaluer concernant les CSM (figure 36). La première concerne les conditions essentielles permettant le développement d'un procédé fiable. La seconde concerne la stabilité des cellules dans le temps, aussi bien lors de leur cryoconservation qu'en cours de culture.

Dans cette optique, une caractérisation systématique des banques de CSM à notre disposition a été entreprise :

- La méthode de cryoconservation a été améliorée. Une congélation en présence de 90% de sérum avec une procédure consistant en rampe de descente en température lente a permis de mieux préserver la croissance des CSM une fois celles-ci remises en culture après décongélation.
- La stabilité des banques a été vérifiée en matière de croissance, mais des réserves sont émises quant au maintien de leur capacité de différenciation quand elles sont stockées plus de 6 mois en azote liquide.
- Les capacités de croissance des CSM varient très significativement selon le donneur (espèce, âge, santé) et l'âge biologique des cellules. Un procédé fiable devrait être validé avec au minimum plusieurs donneurs ; pour cela de larges banques cellulaires sont néanmoins nécessaires.
- En conditions standards de culture, une bonne répétabilité des croissances cellulaires peut être obtenue si les expériences sont effectuées avec des cellules : issues d'un même donneur, à un nombre équivalent de générations cumulées (*i.e.* nombre de passages), et d'une banque maître homogène (figure 36).

Ces résultats ont été générés en conditions standards, aussi bien de cryoconservation que de culture, et à partir du modèle historique des CSM de moelle osseuse. D'autres voies sont bien sûr envisageables.

Quoique la cryoconservation par application d'une rampe de descente en température soit une méthode simple, elle reste imparfaite et la vitrification des cellules est une alternative envisagée pour

leur cryoconservation à long terme. La vitrification est une méthode de congélation extrêmement rapide où les cellules sont directement plongées dans l'azote liquide pour obtenir une transition vitreuse du mélange cellules/agents cryoprotecteurs (à très forte concentration) et ainsi éviter la formation de cristaux d'eau intracellulaires [11]. Cette méthode permettrait également de diminuer la quantité de SVF utilisée à 20%, mais des résultats de croissance contradictoires sont rapportés dans la littérature [56, 57].

Pour l'étude de l'amplification en thérapie cellulaire, la taille réduite des banques et les limitations temporelles qu'implique l'utilisation de CSM de moelle osseuse sont une réelle difficulté. C'est pourquoi, des modèles cellulaires immortalisés sont considérés en tant qu'alternatives, comme par exemple, les lignées de CSM surexprimant la télomérase (hTERT) [58], celles dérivées de CSE [59] ou de CSPi [60]. Le mélange de plusieurs donneurs, bien que critiqué d'un point de vue biologique [8], peut également être un choix valide lors de la mise au point d'un procédé. Les CSM issues de tissu adipeux sont aussi de plus en plus considérées comme une option intéressante, car elles assurent un approvisionnement continu de matériel biologique tout en montrant des capacités de croissance supérieures. Cependant, il a déjà été démontré que la source des CSM était le paramètre menant aux variabilités les plus importantes entre les résultats, ce devant le changement de méthodes de culture ou même de pratiques de laboratoire [61]. Ces réserves ont d'ailleurs contribué au doute entourant la qualification unique de "CSM" pour de nombreuses populations cellulaires différentes.

Pour conclure, les thérapies cellulaires fondées sur l'utilisation de CSM conduisent l'industrie pharmaceutique à repenser l'organisation d'une production biotechnologique. Que ce soit en thérapie autologue ou allogénique, les CSM sont une source de matériel biologique plus variable que les lignées continues tout en montrant une croissance limitée et ne permettent donc pas systématiquement la mise en place des procédures de validation requises par les agences réglementaires. C'est pourquoi des voix s'élèvent pour demander l'adaptation des règles aux spécificités des thérapies cellulaires [62]. Dans le cadre de la recherche, ces difficultés se traduisent par une abondante littérature souvent contradictoire. C'est pourquoi des initiatives restent encouragées pour aboutir à la multiplication des réplicats [8], à la création d'un matériel de référence standardisé [38] et à une définition plus précise des CSM [63].

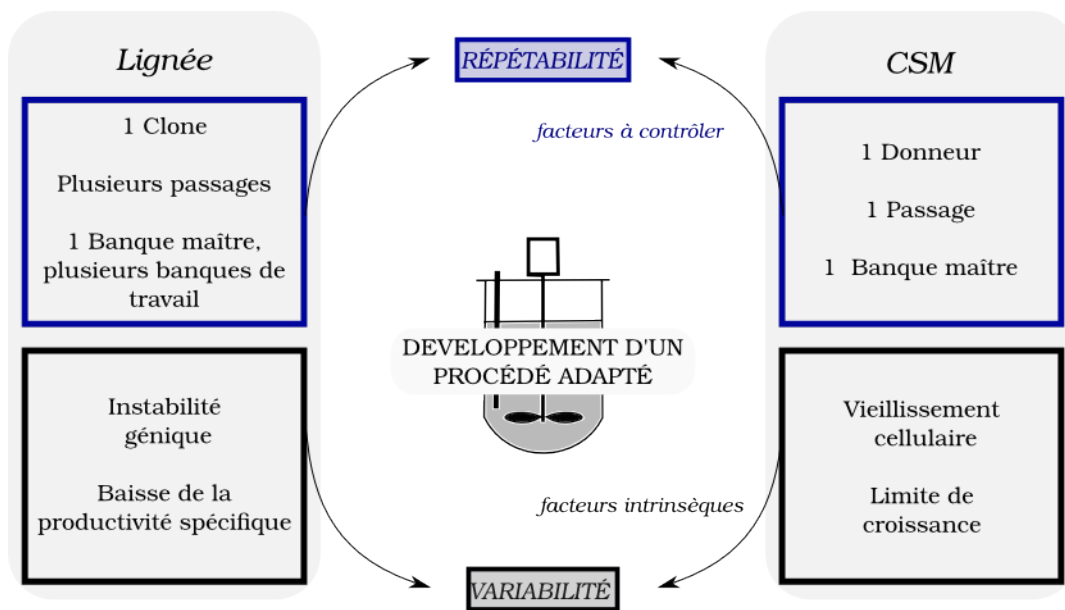


FIGURE 36 – Comparaison des facteurs de variations à intégrer pour développer un procédé de culture adapté aux lignées cellulaires ou aux CSM. Les facteurs de variation contrôlés (**en bleu**) apportent de la répétabilité au système, ceux intrinsèques (**en noir**) sont hors du contrôle de l'expérimentateur et donc les principales sources de variabilité du procédé de culture.

5 Références bibliographiques

- [1] M MENDICINO et al. MSC-based product characterization for clinical trials : an FDA perspective. *Cell stem cell*, 14(2) :141–145, 2014.
- [2] ICH Expert Working GROUP. Development and manufacture of drug substances (chemical entities and biotechnological/biological entities). *Ich harmonised tripartite guideline*, Q11 :1–26, 2012.
- [3] P M O'CALLAGHAN et al. Building a Cell Culture Process with Stable Foundations : Searching for Certainty in an Uncertain World. In, *Animal Cell Culture*, numéro 9 in Cell Engineering, pages 373–406, 2015.
- [4] I D LEWIS et al. Standardization of the CFU-GM Assay Using Hematopoietic Growth Factors. *Journal of hematology*, 5(6) :625–630, 1996.
- [5] Y LIU et al. Effect of serum choice on replicative senescence in mesenchymal stromal cells. *Cytotherapy*, 17(7) :874–884, 2015.
- [6] M LOHMANN et al. Donor Age of Human Platelet Lysate Affects Proliferation and Differentiation of Mesenchymal Stem Cells. *Plos one*, 7(5) :e37839, 2012.
- [7] L J SCHIFF. Review : production, characterization, and testing of banked mammalian cell substrates used to produce biological products. *In vitro cell dev biol anim.*, 41 :65–70, 3-4, 2005.
- [8] M J STODDART et al. In vitro experiments with primary mammalian cells : to pool or not to pool? *European cells & materials*, 24 :i–ii, 2012.
- [9] W WAGNER et al. Different facets of aging in human mesenchymal stem cells. *Tissue engineering. part b, reviews*, 16(4) :445–453, 2010.
- [10] N J ROBINSON et al. Low temperature cell pausing : an alternative short-term preservation method for use in cell therapies including stem cell applications. *Biotechnology letters*, 36(2) :201–209, 2014.
- [11] W ASGHAR et al. Preserving human cells for regenerative, reproductive, and transfusion medicine. *Biotechnology journal*, 9(7) :895–903, 2014.
- [12] R CHINNADURAI et al. Actin cytoskeletal disruption following cryopreservation alters the biodistribution of human mesenchymal stromal cells in vivo. *Stem cell reports*, 3(1) :60–72, 2014.
- [13] M BADOWSKI et al. Mixed effects of long-term frozen storage on cord tissue stem cells. *Cytotherapy*, 16(9) :1313–1321, 2014.
- [14] O G DAVIES et al. The effects of cryopreservation on cells isolated from adipose, bone marrow and dental pulp tissues. *Cryobiology*, 69(2) :342–347, 2014.
- [15] F V PALADINO et al. Comparison between isolation protocols highlights intrinsic variability of human umbilical cord mesenchymal cells. *Cell and tissue banking* :1–14, 2015.
- [16] C POLGE et al. Revival of Spermatozoa after Vitrification and Dehydration at Low Temperatures. *Nature*, 164 :666, 1949.
- [17] G SETH. Freezing mammalian cells for production of biopharmaceuticals. *Methods (san diego, calif.)*, 56(3) :424–431, 2012.

- [18] L A MARQUEZ-CURTIS et al. Mesenchymal stromal cells derived from various tissues : Biological, clinical and cryopreservation aspects. *Cryobiology, In Press*, 2015. DOI : 10.1016/j.cryobiol.2015.07.003.
- [19] Y LIU et al. Effect of Various Freezing Solutions on Cryopreservation of Mesenchymal Stem Cells from Different Animal Species. *Cryoletters*, 32(5) :425–435, 2011.
- [20] L M COSENTINO et al. Preliminary Report : Evaluation of Storage Conditions and Crycocktails during Peripheral Blood Mononuclear Cell Cryopreservation. *Cell preservation technology*, 5(4) :189–204, 2007.
- [21] Y NAALDIJK et al. Effect of different freezing rates during cryopreservation of rat mesenchymal stem cells using combinations of hydroxyethyl starch and dimethylsulfoxide. *Bmc biotechnology*, 12(1) :1–10, 2012.
- [22] F EINI et al. The effects of freeze/thawing process on cryopreserved equine umbilical cord blood-derived mesenchymal stem cells. *Comparative clinical pathology*, 21(6) :1713–1718, 2012.
- [23] A DE ROSA et al. A New Method for Cryopreserving Adipose-Derived Stem Cells : An Attractive and Suitable Large-Scale and Long-Term Cell Banking Technology. *Tissue engineering part c : methods*, 15(4) :659–667, 2009.
- [24] S ROY et al. A simple and serum-free protocol for cryopreservation of human umbilical cord as source of Wharton's jelly mesenchymal stem cells. *Cryobiology*, 68(3) :467–472, 2014.
- [25] F JANZ et al. Evaluation of distinct freezing methods and cryoprotectants for human amniotic fluid stem cells cryopreservation. *Biomed research international*, 2012 :1–10, 2012.
- [26] G MINONZIO et al. Frozen adipose-derived mesenchymal stem cells maintain high capability to grow and differentiate. *Cryobiology*, 69(2) :211–216, 2014.
- [27] S H AL-SAQI et al. Defined serum-free media for in vitro expansion of adipose-derived mesenchymal stem cells. *Cytotherapy*, 16(7) :915–926, 2014.
- [28] D FREIMARK et al. Systematic parameter optimization of a Me2so- and serum-free cryopreservation protocol for human mesenchymal stem cells. *Cryobiology*, 63(2) :67–75, 2011.
- [29] J-L SHEN et al. Effectiveness of human mesenchymal stem cells derived from bone marrow cryopreserved for 23–25 years. *Cryobiology*, 64(3) :167–175, 2012.
- [30] A HUBEL et al. Storage of Human Biospecimens : Selection of the Optimal Storage Temperature. *Biopreservation and biobanking*, 12(3) :165–175, 2014.
- [31] I MASSIE et al. Storage Temperatures for Cold-Chain Delivery in Cell Therapy : A Study of Alginate-Encapsulated Liver Cell Spheroids Stored at -80 or -170 degrees Celsius for Up to 1 Year. *Tissue engineering part c : methods*, 19(3) :189–195, 2012.
- [32] S M DEVITT et al. Successful isolation of viable adipose-derived stem cells from human adipose tissue subject to long-term cryopreservation : positive implications for adult stem cell-based therapeutics in patients of advanced age. *Stem cells international*, 2015 :146421, 2015.
- [33] K W YONG et al. Cryopreservation of Human Mesenchymal Stem Cells for Clinical Applications : Current Methods and Challenges. *Biopreservation and biobanking*, 13(4) :231–239, 2015.
- [34] E J WOODS et al. Optimized cryopreservation method for human dental pulp-derived stem cells and their tissues of origin for banking and clinical use. *Cryobiology*, 59(2) :150–157, 2009.

- [35] A W JAMES et al. Deleterious effects of freezing on osteogenic differentiation of human adipose-derived stromal cells in vitro and in vivo. *Stem cells and development*, 20(3) :427–439, 2011.
- [36] N KOTOBUKI et al. Viability and Osteogenic Potential of Cryopreserved Human Bone Marrow-Derived Mesenchymal Cells. *Tissue engineering*, 11(5-6) :663–673, 2005.
- [37] J WANG et al. Cell therapy with autologous mesenchymal stem cells-how the disease process impacts clinical considerations. *Cytotherapy*, 15(8) :893–904, 2013.
- [38] S VISWANATHAN et al. Soliciting strategies for developing cell-based reference materials to advance mesenchymal stromal cell research and clinical translation. *Stem cells and development*, 23(11) :1157–1167, 2014.
- [39] J GALIPEAU. The mesenchymal stromal cells dilemma-does a negative phase III trial of random donor mesenchymal stromal cells in steroid-resistant graft-versus-host disease represent a death knell or a bump in the road? *Cytotherapy*, 15(1) :2–8, 2013.
- [40] O RINGDEN et al. Pooled MSCs for treatment of severe hemorrhage. *Bone marrow transplantation*, 46(8) :1158–1160, 2011.
- [41] Caroline FERRARI. *Études cinétiques de procédés d'expansion de cellules souches mésenchymateuses cultivées sur microporteurs en systèmes agités*. Thèse, Université de Lorraine, 2012, pages 1–192.
- [42] D SCHOP et al. Growth, metabolism, and growth inhibitors of mesenchymal stem cells. *Tissue engineering. part a*, 15(8) :1877–1886, 2009.
- [43] M J MARTÍNEZ-LORENZO et al. Phenotype and chondrogenic differentiation of mesenchymal cells from adipose tissue of different species. *Journal of orthopaedic research*, 27(11) :1499–1507, 2009.
- [44] G SIEGEL et al. Phenotype, donor age and gender affect function of human bone marrow-derived mesenchymal stromal cells. *Bmc medicine*, 11 :146, 2013.
- [45] H ALVES et al. A Mesenchymal Stromal Cell Gene Signature for Donor Age. *Plos one*, 7(8) :e42908, 2012.
- [46] A STOLZING et al. Age-related changes in human bone marrow-derived mesenchymal stem cells : consequences for cell therapies. *Mechanisms of ageing and development*, 129(3) :163–173, 2008.
- [47] H J YANG et al. The stem cell potential and multipotency of human adipose tissue-derived stem cells vary by cell donor and are different from those of other types of stem cells. *Cells, tissues, organs*, 199(5-6) :373–383, 2014.
- [48] S KERN et al. Comparative analysis of mesenchymal stem cells from bone marrow, umbilical cord blood, or adipose tissue. *Stem cells*, 24(5) :1294–1301, 2006.
- [49] O S BEANE et al. Impact of aging on the regenerative properties of bone marrow-, muscle-, and adipose-derived mesenchymal stem/stromal cells. *Plos one*, 9(12) :e115963, 2014.
- [50] T R J HEATHMAN et al. Characterization of human mesenchymal stem cells from multiple donors and the implications for large scale bioprocess development. *Biochemical engineering journal*, 108 :14–23, 2016.
- [51] J G CARMELO et al. A xeno-free microcarrier-based stirred culture system for the scalable expansion of human mesenchymal stem/stromal cells isolated from bone marrow and adipose tissue. *Biotechnology journal*, 10(8) :1235–1247, 2015.

- [52] R I DMITRIEVA et al. Functional properties of bone marrow derived multipotent mesenchymal stromal cells are altered in heart failure patients, and could be corrected by adjustment of expansion strategies. *Aging*, 7(1) :14–25, 2015.
- [53] M ZAIM et al. Donor age and long-term culture affect differentiation and proliferation of human bone marrow mesenchymal stem cells. *Annals of hematology*, 91(8) :1175–1186, 2012.
- [54] J REN et al. Intra-subject variability in human bone marrow stromal cell (BMSC) replicative senescence : molecular changes associated with BMSC senescence. *Stem cell research*, 11(3) :1060–1073, 2013.
- [55] G TIWARI et al. Bioanalytical method validation : An updated review. *Pharmaceutical methods*, 1(1) :25–38, 2010.
- [56] J H MOON et al. Successful vitrification of human amnion-derived mesenchymal stem cells. *Human reproduction*, 23(8) :1760–1770, 2008.
- [57] D BALCI et al. The Assessment of Cryopreservation Conditions for Human Umbilical Cord Stroma-Derived Mesenchymal Stem Cells towards a Potential Use for Stem Cell Banking. *Current stem cell research & therapy*, 8(1) :60–72, 2013.
- [58] C WEBER et al. Expansion and Harvesting of hMSC-TERT. *The open biomedical engineering journal*, 1 :38–46, 2007.
- [59] P T BROWN et al. Characterization and evaluation of mesenchymal stem cells derived from human embryonic stem cells and bone marrow. *Cell and tissue research*, 358(1) :149–164, 2014.
- [60] K HYNES et al. Generation of functional mesenchymal stem cells from different induced pluripotent stem cell lines. *Stem cells and development*, 23(10) :1084–1096, 2014.
- [61] R TORENSMA et al. The Impact of Cell Source, Culture Methodology, Culture Location, and Individual Donors on Gene Expression Profiles of Bone Marrow-Derived and Adipose-Derived Stromal Cells. *Stem cells and development*, 22 :1086–1096, 7, 2013.
- [62] A I CAPLAN et al. Progressive approval : a proposal for a new regulatory pathway for regenerative medicine. *Stem cells translational medicine*, 3(5) :560–563, 2014.
- [63] D J PROCKOP et al. Are Clinical Trials with Mesenchymal Stem/ Progenitor Cells (MSCs) too Far Ahead of the Science ? Lessons from Experimental Hematology. *Stem cells*, 32 :3055–3061, 2014.

Chapitre 4

Comparaison des performances de bioréacteurs de cultures de différentes géométries pour la croissance de CSM humaines

Sommaire

1	Introduction	177
2	Croissance planaire <i>versus</i> croissance en suspension	178
2.1	Comptage cellulaire	178
2.2	Comparaison de deux types de microporteurs	179
2.3	Comparaison de croissance dans divers systèmes de culture	182
3	Études des paramètres hydrodynamiques et de mise en suspension	185
3.1	Mise en suspension de microporteurs en fioles d'Erlenmeyer	185
3.2	Études des paramètres hydrodynamiques en minibioréacteurs agités	187
3.3	Impact des paramètres hydrodynamiques sur la croissance des CSM	194
3.4	Cultures à petite échelle et régulations	197
4	Synthèse	203
5	Références bibliographiques	206

RÉSUMÉ : Lors de la production actuelle de lots de cellules souches mésenchymateuses (CSM) en vue d'essais cliniques, leur culture est entièrement réalisée sur des surfaces planes. Ces méthodes sont un frein économique à la production industrielle de CSM ; c'est pourquoi l'utilisation de bioréacteurs de diverses géométries est envisagée pour les remplacer. Ce changement de procédé et d'échelle n'est pas anodin, que ce soit sur les techniques biologiques utilisées, les surfaces d'adhérence, ou les contraintes subies par les CSM. Il est donc nécessaire d'étudier l'impact que peuvent avoir ces changements sur la croissance des CSM. L'analyse du développement des systèmes de cultures de CSM sur microporteurs était donc nécessaire. Ce travail a été entrepris de manière systématique, d'abord en évaluant les conséquences d'un passage d'une culture plane à une culture sur microporteurs, ensuite en étudiant les paramètres hydrodynamiques au sein de minibioréacteurs agités, et enfin en réalisant des cultures au sein de ces derniers. Au travers de ces travaux, la complexité des interactions cellules/-microporteurs/agitation a été mise en lumière. Les CSM se sont avérées être particulièrement sensibles à leur environnement physique (surface d'adhérence, contraintes hydrodynamiques, température) et posent de nombreux défis à la montée en échelle.

1 Introduction

L'obtention d'une quantité suffisante de CSM est un frein majeur au développement de leur utilisation thérapeutique à grande échelle. De plus, les paramètres standards de culture des CSM sur des surfaces plastiques planes ne peuvent être mis en œuvre que difficilement et à un coût ne permettant pas la réalisation d'essais cliniques de grande ampleur. Comme il a été détaillé de manière approfondie dans l'état de l'art, des méthodes alternatives de culture peuvent être mises en œuvre. La technique la plus répandue est celle de la culture sur microporteurs. C'est pourquoi, ce travail s'est intéressé à comparer les conséquences sur la croissance de CSM d'un transfert d'une culture statique vers une culture en suspension en mode agité.

L'adaptation des méthodes habituelles de suivi et d'entretien des cultures a été évaluée en utilisant les conditions définies dans le chapitre précédent (un donneur, un passage, une méthode de cryopréservation). Ensuite, différentes procédures de mise en suspension et différents microporteurs ont été comparés. Ces comparaisons avaient pour but de mettre à jour les nombreux facteurs qu'implique un passage vers une culture en mode agitée. Bien que ce type d'étude ait déjà été entrepris dans la littérature, une évaluation préalable des performances attendues sur microporteurs avec des CSM humaines était une étape nécessaire à toute étude plus approfondie des paramètres hydrodynamiques des cultures en mode agité.

Deux systèmes de cultures sur microporteurs, la fiole d'Erlenmeyer et le bioréacteur à agitation axiale, ont tout d'abord été caractérisés à l'aide des outils issus du génie des procédés. Pour réaliser ces études, deux collaborations universitaires ont été mises en place, en particulier pour caractériser la mise en suspension des microporteurs en fiole d'Erlenmeyer (Laboratoire de Génie Chimique, UMR 5503, Toulouse, France) et les tourbillons générés au sein de bioréacteurs de petite échelle par CFD (Laboratoire de Génie Chimique, Université de Liège, Belgique). Ces travaux ont été valorisés dans le cadre de deux publications. Afin de mettre à profit les connaissances générées par ces travaux, des cultures des CSM sur microporteurs ont été mises en œuvre pour évaluer l'impact des paramètres hydrodynamiques sur la croissance des CSM (ex : la vitesse d'agitation, le type de mobile d'agitation ou la fraction volumique de microporteurs).

2 Croissance planaire *versus* croissance en suspension

2.1 Comptage cellulaire

Le transfert d'une culture en 2 dimensions sur une surface plastique vers une culture sur microporteurs implique de nombreux changements comme le changement de surface en terme de rugosité ou de nature. Ces variations entraînent d'importantes évolutions des cinétiques/forces d'adhérence des CSM. Or, si ces facteurs sont cruciaux pour contrôler la croissance de la population, ils le sont aussi quant à la mise en œuvre de certaines techniques nécessitant la récolte des cellules. En effet, de nombreuses méthodes classiques ne sont pas compatibles avec la taille des microporteurs.

Ainsi, le microporteur modèle utilisé pour la culture de cellules Vero et de CSM porcines au sein du laboratoire est le Cytodex 1 ([1, 2]). La méthode de comptage cellulaire classique implique une libération des noyaux à l'acide citrique et leur coloration au cristal violet suivi d'un comptage manuel sur hémocytomètre de Füchs. Cette technique s'est révélée inapplicable au suivi de culture de CSM humaines en raison d'un pourcentage de décrochage des cellules inférieur à 1% (comparé à la quantité de CSMensemencées le jour précédant la phase d'adhérence).

De nombreuses méthodes alternatives ont été testées dans le cadre de ce travail, seules ou conjointement : les traitements enzymatiques (trypsine 0,25% EDTA (m/v), TrypLE, accutase, collagénase), l'EDTA, le choc osmotique avec une solution hypotonique (glucose 1 g.L⁻¹, KCl 0,4 g.L⁻¹, NaCl 8 g.L⁻¹) avec 10% (v/v) de Poloxamer188), le décrochage mécanique (agitation à 40 Hz pendant 15 min), la lyse (tampon Tris-HCl 1 M, EDTA 0,1 M et de SDS 10% m/v). Aucune de ces méthodes ne s'est révélée fiable (plus de 20% de variations sur le comptage répété d'un même échantillon). En effet, le Cytodex 1 étant un microporteur microporeux, une quantité non-négligeable de cellules ou noyaux y restent captifs après ces traitements. Sur la figure 37, il est possible de constater ce phénomène visuellement suite à une coloration fluorescente au Live/Dead (noyaux visibles en rouge), après filtration des microporteurs pour permettre le comptage des échantillons. Comme cette erreur analytique n'est pas constante pour chaque échantillon et qu'aucune méthode de comptage direct sur microporteurs n'a pu être développée au cours de ce travail, des mesures indirectes de la croissance cellulaire ont été appliquées aux suivis de culture sur microporteurs (dosage du glucose et suivi de la réduction de la résazurine).

L'équivalence entre la quantité de glucose consommé et la concentration de la population cellulaire est la première méthode indirecte à avoir été mise en place. Cette corrélation a été vérifiée sur des cultures planaires ($R^2 > 0,9$) pour 3 donneurs différents (figure 38 et 39). Cependant, comme le montrent

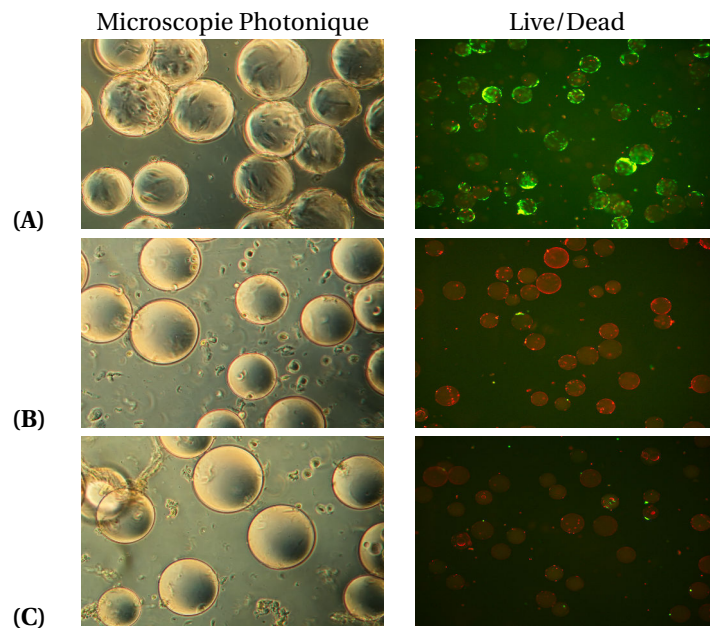


FIGURE 37 – Comparaison qualitative des méthodes de décrochage des CSM sur Cytodex 1 à partir d'un même échantillon : A) Échantillon non traité, B) Décrochage mécanique, C) Décrochage mécanique avec tampon de lyse. Les CSM visualisées en microscopie photonique (à gauche, grossissement $\times 10$) et en microscopie à fluorescence après traitement et filtration des microporteurs (à droite, grossissement $\times 5$). Seules les CSM restantes sur les microporteurs ont été marquées au Live/Dead (cellules viables vertes, mortes en rouge).

ces figures, cette corrélation est différente selon les donneurs et les conditions de culture. Une méthode indirecte alternative a également été mise en place lors de certains suivis : la réduction de la résazurine par les cellules métaboliquement actives de la population (figure 40). Cette quantité de cellules est évaluée par l'activité apparente de leur chaîne mitochondriale. Il faut tout de même mentionner que, comme toutes les méthodes de comptage indirectes basées sur le suivi du métabolisme cellulaire, ces techniques sont sujettes à une importante variabilité dès lors que les conditions de culture sont modifiées, rendant les comparaisons plus délicates.

2.2 Comparaison de deux types de microporteurs

Le Cytodex 1 s'est révélé être un microporteur incompatible avec les méthodes de récoltes usuelles des cellules. L'utilisation de Cytodex 3 (microporteurs enrobés de gélatine) a donc été testée comme alternative car les cellules peuvent alors être récoltées grâce à l'utilisation de collagénase ou de dispase. Les méthodes utilisées sont identiques à celles mises en œuvre lors des cultures sur Cytodex 1.

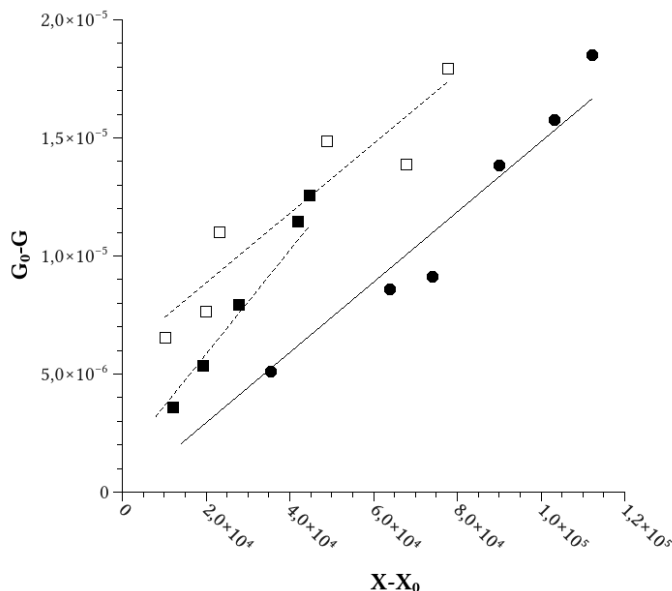


FIGURE 38 – Corrélations du suivi de la croissance des CSM par leur consommation de glucose : X, biomasse à l’instant t en cellules.mL⁻¹ ; X₀, biomasse initiale en cellules.mL⁻¹ ; G, quantité de glucose à l’instant t en mol ; G₀, quantité de glucose initial en mol. Ces corrélations (ajustement linéaire) ont été obtenues après trypsination de CSM adhérentes sur une surface plane à partir de 3 donneurs : Donneur de 24 ans à P4, ensemencement à 1.10⁴ cellules.mL⁻¹ (■), Donneur de 24 ans à P4, ensemencement à 5.10⁴ cellules.mL⁻¹ (□), Donneur de 15 ans à P5, ensemencement à 1.10⁴ cellules.mL⁻¹ (●).

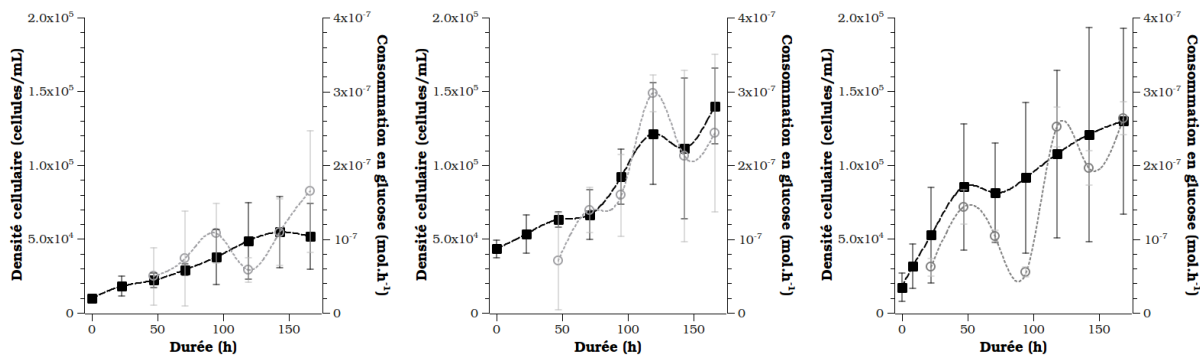


FIGURE 39 – Impact de la méthode de suivi de la croissance des CSM par leur consommation de glucose au cours du temps (○, n=3, en mol.h⁻¹) et avec comptage du nombre de cellules totales par marquage fluorescent avec le réactif Guava Viacount (■, n=3, en cellules/mL). Les CSM de différents donneurs ont été obtenues après trypsination de CSM adhérentes sur une surface plane : à droite) Donneur de 24 ans à P4 (ensemencement à 1.10⁴ cellules.mL⁻¹) ; au milieu) Donneur de 24 ans à P4 (ensemencement à 5.10⁴ cellules.mL⁻¹) ; à gauche), Donneur de 15 ans à P5 (ensemencement à 1.10⁴ cellules.mL⁻¹). Les barres d’erreur sont exprimées en écarts-types.

Les cultures réalisées en parallèle sur Cytodex 1 et Cytodex 3 ont montré une faible consommation de glucose au cours du temps lorsque ces dernières sont cultivées en agitation orbitale (consommation moyenne $Q_{Gluc,Cytodex1}=9,1.10^{-7} \pm 1,3 \text{ mol.h}^{-1}$ et $Q_{Gluc,Cytodex3}=10,3.10^{-7} \pm 1,5 \text{ mol.h}^{-1}$; figure 40). Aucune différence significative en termes de consommation de glucose, de production de lactate ou de lyse cellulaire (exprimée par le relargage de LDH dans le surnageant de culture) n'a pu être identifiée. Cependant, la mise en place d'un suivi de l'état d'oxydo-réduction de la résazurine par les CSM a laissé apparaître que la phase d'adhérence des cellules sur Cytodex 3 était peu efficace. La croissance globale des CSM était encore plus limitée sur Cytodex 3 que sur Cytodex 1.

En prenant en compte la quantité importante de collagénase nécessaire à la récolte des CSM sur Cytodex 3, ce microporteur n'a pas été retenu comme une alternative techniquement viable pour la réalisation d'études ultérieures.

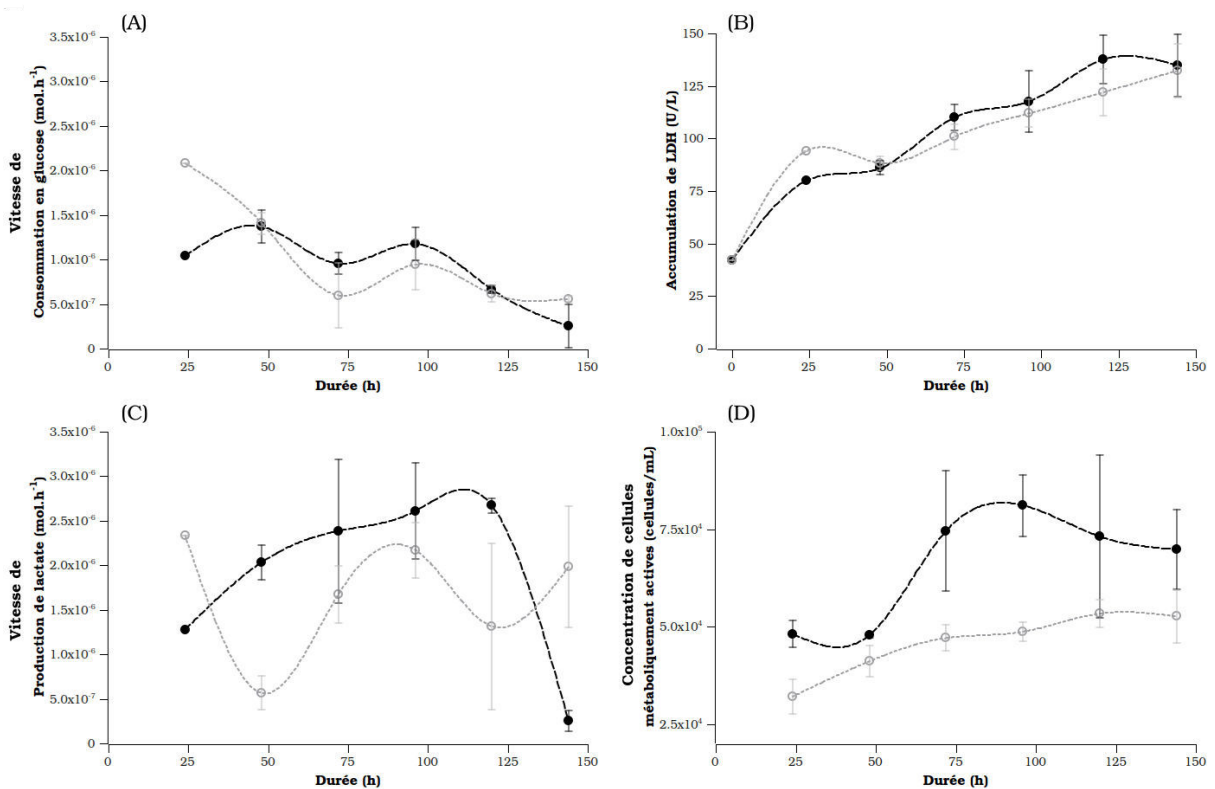


FIGURE 40 – Comparaisons de cultures de CSM sur microporteurs Cytodex 1 et Cytodex 3 en fioles d'Erlenmeyer mises en suspension par agitation orbitale à 70 rpm ($d_{orb}=50 \text{ cm}$) : Cytodex 1 (●, n=3) et Cytodex 3 (○, n=3). (A) Vitesse de consommation de glucose au cours du temps en mol.h^{-1} ; (B) Accumulation de LDH dans le surnageant de culture en U/L ; (C) Production de lactate au cours du temps en mol.h^{-1} ; (D) Quantité de cellules métaboliquement déterminée par la mesure de la réduction de la résazurine en cellules.mL^{-1} . Les CSM utilisées sont issues d'un donneur de moelle osseuse de 24 ans et à P4. Les barres d'erreur sont exprimées en écarts-types.

2.3 Comparaison de croissance dans divers systèmes de culture

Une fois établie la relation entre la quantité de cellules et la consommation de glucose, la croissance des CSM sur microporteurs Cytodex 1 a pu être évaluée dans différents systèmes de culture. La comparaison a été établie entre des CSM issues d'un même donneur lorsque ces dernières étaient cultivées sur une surface plane, sur microporteurs statiques ou sur microporteurs en suspension (agitation axiale en bioréacteur et agitation orbitale en plaque 24-puits). La consommation de glucose a été normalisée selon le volume de la culture afin de pouvoir comparer les différentes échelles. Des CSM issues de deux différents donneurs ont été utilisées (figures 41 A et B).

Les premières données générées sont celles issues de CSM de moelle osseuse d'un donneur de 15 ans (figure 41 A). De manière surprenante, il a été constaté une diminution régulière de la consommation de glucose dès lors que les CSM ont été transférées vers un système de culture en suspension. Il a donc été supposé que la population cellulaire a diminué de manière régulière au cours du temps, au contraire des cultures de référence en 2D. Cela a été confirmé par des observations microscopiques avec marquage au bleu de méthylène des cellules (ces images ne sont pas incluses).

Afin de déterminer si cet effet délétère sur les CSM était dû à la culture des cellules sur les microporteurs ou aux contraintes hydrodynamiques générées lors de leur agitation, des CSM issues de la moelle osseuse d'un second donneur ont été utilisées (figure 41 B). Au contraire des expériences précédentes, les cellules cultivées sur microporteurs ont été soit mises en suspension en bioréacteur à agitation axiale, soit cultivées de manière statique en incubateur. Pareillement, aucune croissance cellulaire n'a été obtenue lors des cultures en bioréacteur. Au contraire, les CSMensemencées sur microporteurs et maintenues en conditions statiques en incubateur ont montré une importante capacité de croissance. La différence d'échelle constatée entre les conditions statiques en 2D et 3D est très probablement due à la différence de concentration volumique d'ensemencement des cellules. Ces résultats soulignent d'autant plus l'échec des amplifications cellulaires précédentes en suspension. Or, plusieurs équipes ont rapporté avoir obtenu de bonnes performances de croissance de CSM sur microporteurs (figure 7).

À partir de ces résultats préliminaires, les limitations du suivi de la consommation de glucose apparaissent clairement, particulièrement au vu de la forte variabilité entre réplicats biologiques et du fait que l'oxygénation et l'alimentation des cultures en suspension pourraient interférer avec ces données. C'est pourquoi, un autre type de microporteurs, le Cytodex 3, avait initialement été envisagé, afin de pouvoir obtenir des résultats de comptage cellulaire fiables, malgré le fait que ce type de microporteurs supporte moins efficacement la croissance des CSM. Malgré ces imprécisions,

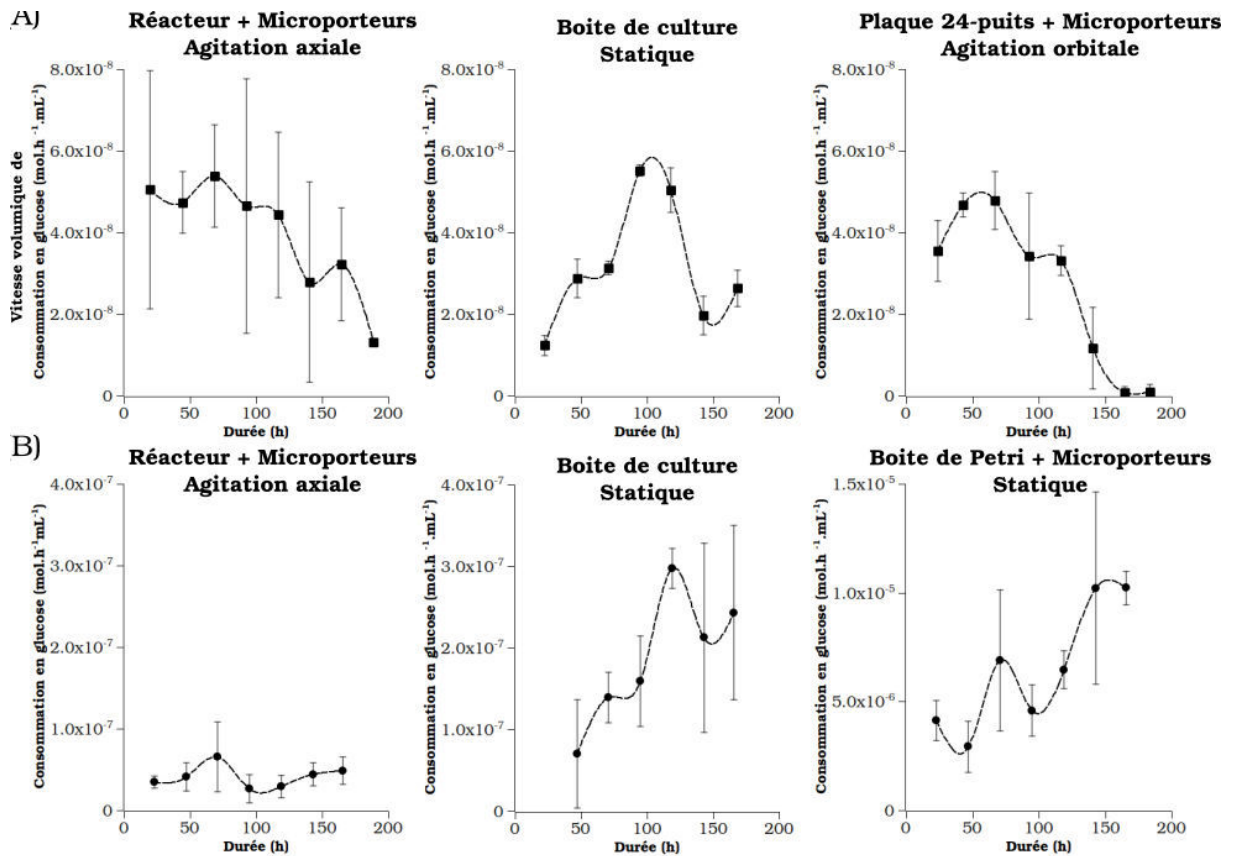


FIGURE 41 – Comparaison de différents systèmes de cultures utilisant des CSM de 2 donneurs de moelle osseuse : (A) de 15 ans, à P5, en mode non-alimenté (■, de gauche à droite, n=6, n=3, n=3) ; (B) de 24 ans, à P4, avec maintien de la concentration en glucose à 1 g.L⁻¹ (●, de gauche à droite, n=5, n=3, n=2). Les cultures agitées ont été réalisées avec des microporteurs Cytodex 1. Pour les CSM MO15 (A), les paramètres d’agitation en bioréacteur étaient de 150 rpm avec un mobile en Oreilles d’éléphant à pompage haut et 8 g.L⁻¹ de microporteurs, les paramètres d’agitation orbitale en plaque 24-puits étaient de 150 rpm ($d_{orb} = 22,5 \text{ cm} \pm 2,5$). Pour les CSM MO24 (B), les paramètres d’agitation en bioréacteur étaient de 110 rpm avec un mobile en Oreilles d’éléphant à pompage haut et 4 g.L⁻¹ de microporteurs. Les barres d’erreur sont exprimées en écarts-types.

il est également apparu clairement que, dans ce cas, le changement d’un système de culture d’un mode statique à agité, et non le changement de surface d’adhérence du plastique vers le Cytodex 1, pouvait avoir un effet négatif sur la croissance des CSM. Parmi les caractéristiques propres à chaque système, la mise en suspension des microporteurs peut donc impacter fortement les performances de croissance. C’est pourquoi, l’étude théorique de la mise en suspension des microporteurs et l’investigation expérimentale de cultures dans des conditions hydrodynamiques diverses ont été entreprises.

RÉSUMÉ

- Aucune méthode directe de comptage cellulaire n'a été établie comme assez fiable pour être utilisée avec des CSM sur Cytodex 1. Deux méthodes indirectes basées sur le métabolisme cellulaire ont été proposées.
- Le Cytodex 1 a été choisi comme microporteur modèle.
- Les CSM cultivées sur microporteurs Cytodex 1 en suspension présentent une croissance plus faible que celles cultivées en statique, que ce soit sur des surfaces planes ou sur microporteurs.

3 Études des paramètres hydrodynamiques et de mise en suspension

La culture sur microporteurs est développée depuis les années 70 mais celle-ci n'a pas été réellement caractérisée du point de vue du génie des procédés. La culture en bioréacteur agité avec microporteurs implique des complexités physiques telles que l'analyse de mélange liquide/gaz/solide et l'utilisation de géométries très variables de bioréacteurs. Plusieurs études ont été menées dans le cadre de ce travail afin de caractériser 2 systèmes de culture de cellules sur microporteurs : les fioles d'Erlenmeyer et les bioréacteurs de petite échelle. Des travaux collaboratifs ont permis de mettre en lumière des conditions opératoires favorables à la culture de CSM grâce à l'utilisation des outils du génie chimique et de la mécanique des fluides numériques (CFD).

3.1 Mise en suspension de microporteurs en fioles d'Erlenmeyer agitées sur table orbitale

La mise en suspension des microporteurs est le facteur central déterminant les paramètres d'agitation des cultures de CSM sur microporteurs. Le postulat de départ est qu'il faut maximiser la surface utile des microporteurs tout en minimisant les contraintes hydrodynamiques appliquées aux cellules. Une agitation permettant un état "juste-suspendu" des microporteurs est donc la méthode la plus fréquemment utilisée (aussi appelé critère de suspension complète). Cette fréquence d'agitation critique N_c (ou N_{js}) est définie comme étant celle ne permettant à aucun microporteur de sédimenter plus de 1 ou 2 secondes au fond d'une cuve. Dans le cas d'un bioréacteur à agitation pendulaire, N_c est déterminée par l'équation de Zwietering [3] :

$$N_c = S \cdot \nu_L^{0.1} \cdot \left[\frac{g(\rho_{mp} - \rho_L)}{\rho_L} \right]^{0.45} \cdot X^{0.13} \cdot d_{mp}^{0.2} \cdot D^{-0.85}$$

où D est le diamètre du mobile d'agitation (en m), ν_L la viscosité cinématique du liquide (en $\text{m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$), ρ_L la densité du liquide (en $\text{kg} \cdot \text{m}^{-3}$), d_{mp} le diamètre moyen des microporteurs (en m), ρ_{mp} la densité des microporteurs (en $\text{kg} \cdot \text{m}^{-3}$), X la fraction volumique des microporteurs et S une constante adimensionnelle dépendante de la géométrie du réacteur et du mobile (pour N_c exprimée en tour/sec).

Par ailleurs, la mise en suspension de microporteurs en fioles d'Erlenmeyer par agitation orbitale n'a pas été décrite dans la littérature alors que ce mode de culture est répandu à petite échelle. C'est pourquoi, grâce à plusieurs collaborations universitaires, une étude a été réalisée afin de fournir

une relation prédisant la vitesse d'agitation critique dans ces conditions, réduisant ainsi la nécessité de déterminer ce paramètre expérimentalement [4]. L'article complet décrivant ces résultats est consultable en annexe B.1. Un aperçu de la méthodologie et de ces résultats est résumé ci-après.

L'analyse dimensionnelle de la mise en suspension de microporteurs par une agitation orbitale a été mise en relation avec 220 expériences pour lesquelles la fréquence de rotation critique N_c avait été déterminée visuellement. Les paramètres variables de ces expériences étaient caractéristiques de la plateforme (diamètre orbital d_0 en m), du liquide (fraction de remplissage proportionnelle à la hauteur de liquide h_L en m, viscosité μ_L en Pa.s et densité ρ_L en kg.m^{-3}), des microporteurs (densité ρ_{mp} en kg.m^{-3} et diamètre de Sauter moyen d_{mp} en m) et de la géométrie du système de culture (fioles d'Erlenmeyer ou cylindres droits, de différents diamètres d en m). Ces observations ont été facilitées par le marquage des microporteurs au bleu trypan. Les conditions opératoires choisies étaient représentatives de celles habituellement utilisées en culture cellulaire sur microporteurs. L'analyse dimensionnelle a identifié 15 paramètres dépendant de 3 grandeurs physiques (masse M, longueur L et temps T) et permettant de décrire le système. Ces paramètres ont été corrélés à un nombre de Froude Fr_c adimensionnel, Fr_c étant directement proportionnel à la vitesse d'agitation critique N_c . Le nombre de paramètres a été réduit par l'application du théorème de Vachy-Buckingham [5]. L'ajustement du modèle de Vachy-Buckingham aux données expérimentales collectées précédemment a abouti à l'équation ci-dessous :

$$Fr_c = \frac{N_c}{\sqrt{g/d}} = A \cdot \left(\frac{d_0}{d}\right)^{-0.25} \cdot \left(\frac{h_L}{d}\right)^{0.49} \cdot (\rho^*)^{1.0} \cdot \left(\frac{d_{mp}}{d}\right)^{-0.07}$$

où la valeur de la constante A était de 0,12 pour la fiole d'Erlenmeyer utilisée et de 1.39 pour des cylindres droits (avec une erreur du modèle de 5,7% et 10,2%, respectivement).

A partir de ces résultats, des conditions d'agitation qui minimisent la puissance dissipée par unité de volume tout en permettant la mise en suspension complète des microporteurs par une agitation orbitale ont été déterminées. Il a été particulièrement intéressant de constater que l'utilisation de cylindres droits et non de fioles d'Erlenmeyer permettait d'obtenir une mise en suspension des microporteurs à une plus faible puissance dissipée (figure 42). L'augmentation du diamètre orbital de la plateforme a le même avantage.

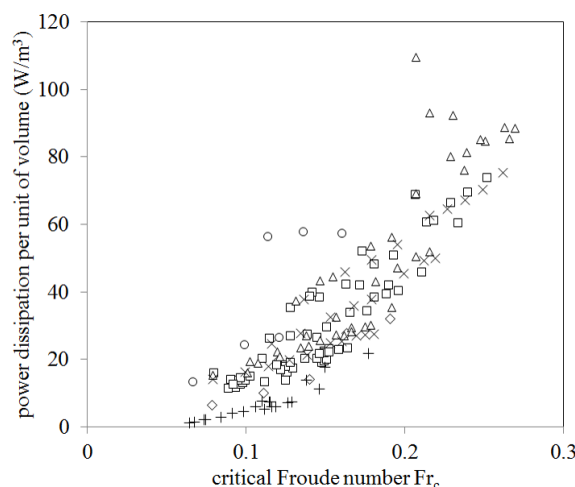


FIGURE 42 – Prédictions de la puissance dissipée par unité de volume en fioles d'Erlenmeyer et cylindres droits (selon les équations 22 et 24 en Annexe B.1, respectivement) en fonction du nombre de Froude critique. Ces expériences ont été réalisées avec des microporteurs Cytodex, Hille et Cytopore-2; avec différentes tailles de fioles d'Erlenmeyer (\diamond) $V_T = 125$ mL, (\square) $V_T = 250$ mL, (\triangle) $V_T = 500$ mL, (\times) $V_T = 1000$ mL, (\circ) $V_T = 5000$ mL; et en cylindres droits(+).

3.2 Études des paramètres hydrodynamiques en minibioréacteurs agités

Afin de mieux décrire les forces subies par les CSM sur microporteurs au sein des minibioréacteurs agités GPC dont la géométrie a été décrite dans le chapitre 2, la turbulence de l'écoulement a été simulée à l'aide des outils de la mécanique des fluides numériques (CFD). Grâce aux travaux d'Éric Olmos, Marie-Laure Collignon et Mathieu Chateau, il nous a été permis, par l'intermédiaire du logiciel Fluent (version 14.5, ANSYS, États-Unis), de réaliser une étude rationnelle de l'impact des paramètres hydrodynamiques sur la culture de CSM sur microporteurs en minibioréacteurs agités.

La description physique des écoulements est fondée sur la conservation de la masse (équation de continuité) et de la quantité de mouvement (équation de Navier-Stokes pour un fluide Newtonien incompressible). Le modèle d'équations de transport le plus répandu permettant de résoudre ces systèmes complexes est le modèle énergie-dissipation ou modèle " $k - \varepsilon$ " qui utilise le concept de viscosité en turbulence isotrope [6].

La CFD permet de résoudre numériquement ces équations pour simuler l'écoulement. Il est donc possible d'obtenir les champs moyens de vitesses, de pressions, d'énergies cinétiques turbulentes k et de dissipations d'énergie turbulente ε dans des conditions opératoires définies au sein de n'importe quelle géométrie de bioréacteur agité [7–9].

Puissance globale dissipée et agitation critique de mise en suspension. Trois différentes configurations de minibioréacteurs étaient à notre disposition, pour une même géométrie de cuve, selon que l'axe d'agitation était équipé d'un mobile en oreille d'éléphant (EE) à pompage haut/ Up , d'un mobile en hélice marine (HM) à pompage haut/ Up , ou d'une turbine Rushton (R). Afin de pouvoir les comparer, leur nombre de puissance N_p a été déterminé par CFD :

$$N_p = \frac{P}{\rho N^3 d^5}$$

où P est la puissance globale dissipée (W), ρ la masse volumique du fluide (kg.m^{-3}), N la fréquence de rotation du mobile (s^{-1}), et d son diamètre (m). P , le seul paramètre inconnu de cette équation, est obtenu par simulation grâce à l'équation :

$$P = \langle \varepsilon \rangle \rho V$$

où $\langle \varepsilon \rangle$ est le taux moyen de dissipation de l'énergie cinétique turbulente ($\text{m}^2.\text{s}^{-3}$), ρ la masse volumique du fluide (993 kg.m^{-3}) et V le volume du liquide (m^3). Ces premières simulations ont permis la création des abaques $N_p = f(Re)$ pour chacune des configurations des minibioréacteurs (le nombre de Reynolds Re est adimensionnel et permet de situer le régime d'écoulement du fluide).

La première étape de toute étude de CFD est de créer un modèle numérique de la géométrie du bioréacteur agité. C'est pourquoi trois maillages représentant un minibioréacteur équipé de 3 types de mobiles différents ont été réalisés. Chacun était composé de 900000 mailles (élément volumique unitaire du domaine de calcul). Un modèle κ - ε *realizable* a été utilisé dans ce cas avec un maillage MRF (*Multiple Reference Frame* où le maillage est fixe à une position donnée du mobile pendant le calcul alors que le système de coordonnées est tournant). La modélisation de la turbulence a ici été effectuée par la méthode de moyennage au sens de Reynolds appliqué aux équations de Navier-Stokes (RANS), qui permet de définir les valeurs caractéristiques du champ d'écoulement comme une superposition de vitesse moyennée au cours du temps et des fluctuations du champ par rapport à cette vitesse moyenne. Ce moyennage temporel sur toutes les échelles de la turbulence permet une simulation plus rapide de l'écoulement. Au moins 15 simulations ont été effectuées pour chaque configuration (exemple présenté en figure 43). Les nombres de puissance N_p déterminés étaient, pour le mobile EE/ Up de 2,1 ; pour la turbine Rushton (R) de 3,3 et pour le mobile HM/ Up de 1,2 dans les conditions opératoires habituelles (inférieures à 500 rpm, $Re \approx 1000$). D'ailleurs, il a été constaté que

les mobiles EE et HM opéraient en régime transitoire, alors que la turbine Rushton générait un flux turbulent au dessus de 100 rpm dans le cadre de cette simulation. Grâce à ces résultats, il a été possible de déterminer une gamme de fréquences d'agitation où les différents mobiles généraient les mêmes puissances globales dissipées (tableaux 17 et 19).

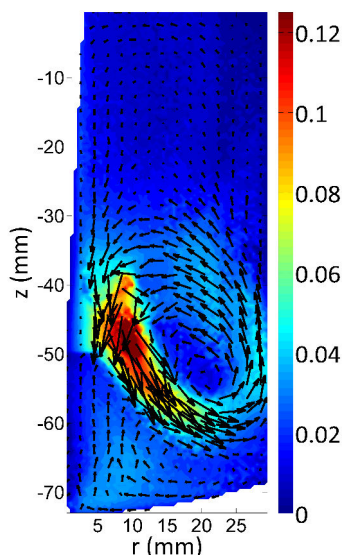


FIGURE 43 – Exemple de champ de vitesses moyennées au cours du temps modélisé par simulation RANS en maillage MRF au sein d'un minibioréacteur GPC de 200 mL équipé d'un mobile d'agitation EE Up. Visualisation dans le plan axial $\Theta=18^\circ$. L'échelle de couleurs représente l'ordre de grandeur des vitesses en m.s^{-1} .

TABLEAU 17 – Puissances globales dissipées obtenues par CFD pour chaque fréquence d'agitation expérimentale au sein des minibioréacteurs GPC de 200 mL

Puissance (W)	P/V (W.m^{-3})	N (rpm)		
		Oreille d'éléphant Up	Hélice marine Up	Turbine Rushton
$3,2.10^{-5}$ W	0,16	75	151	88
$2,4.10^{-4}$ W	1,2	150	308	173
$4,5.10^{-4}$ W	2,25	187	381	214

Pour un set de conditions, ces fréquences d'agitation développent la même puissance globale dissipée pour chaque mobile et sont sur une gamme centrée permettant l'utilisation d'un plan d'expériences (voir description au paragraphe 4.3.3). Le choix de ces valeurs a aussi été justifié par une analyse de la qualité de la mise en suspension des microporteurs à différentes vitesses d'agitation et concentrations de microporteurs Cytodex 1 dans un volume de 200 mL. La vitesse critique de mise en suspension N_c a été déterminée selon l'approche de Zwietering [3] (où les microporteurs ne peuvent sédimenter plus de 1 ou 2 secondes au fond de la cuve). Ces résultats sont résumés dans le tableau 18.

TABLEAU 18 – Fréquences critiques de mise en suspension N_c permettant de maintenir différentes concentrations de microporteurs Cytodex 1 en suspension complète (4 g.L^{-1} , 8 g.L^{-1} et 12 g.L^{-1}) et fréquences minimales d'agitation N_H permettant au nuage de microporteurs de s'étendre sur tout le volume de la cuve à ces mêmes concentrations de Cytodex 1.

		EE Up	HM Up	R
N_c (rpm)		75 ± 5	140 ± 2	163 ± 5
N_H (rpm)	4 g.L^{-1}	110	220	198
	8 g.L^{-1}	135	342	223
	12 g.L^{-1}	150	362	268

La plus petite valeur N_c , 75 rpm, a été choisie comme point de référence. Il est aisé de constater que les fréquences d'agitation choisies précédemment permettent la mise en suspension complète des microporteurs à $P = 3,2 \cdot 10^{-5} \text{ W}$ pour les mobiles EE et HM mais non pour l'agitation générée par la turbine Rushton, ses pales n'étant pas inclinées. Toutefois, à $P = 4,5 \cdot 10^{-4} \text{ W}$, tous les mobiles étudiés créent un nuage de microporteurs s'étendant sur toute la hauteur de liquide, permettant ainsi de comparer uniquement l'impact que peut avoir la géométrie des mobiles sur la distribution des taux de dissipation d'énergie, et ce indépendamment de la puissance globale dissipée et de la mise en suspension des microporteurs.

Échelle de Kolmogorov Au delà de la puissance globale générée par chaque mobile, une estimation de l'échelle de Kolmogorov dans chaque condition est un outil appréciable lors de l'étude des contraintes imposées aux microporteurs. En effet, les phénomènes de turbulence peuvent également être décrits comme un transfert de l'énergie mécanique du mobile vers le fluide, générant ainsi des tourbillons de grandes tailles contenant la majorité de l'énergie cinétique. Ces tourbillons de grandes tailles vont ensuite générer de plus petits tourbillons sous l'action des forces d'inertie et de frictions qu'ils rencontrent, transférant ainsi une partie de leur énergie. Cette fragmentation en cascade, de l'écoulement jusqu'aux tourbillons les plus petits, va libérer directement de l'énergie thermique par dissipation visqueuse. L'échelle de Kolmogorov, λ_k (en m), définit mathématiquement la taille de ces plus petits tourbillons par :

$$\lambda_k = \left(\frac{\nu^3}{\varepsilon_{Tmax}} \right)^{1/4}$$

où ν est la viscosité cinématique ($\nu = \mu/\rho$, $\rho = 993 \text{ kg.m}^{-3}$, $\mu = 0.000692 \text{ Pa.s}$ pour de l'eau à 37° C , qui sont aussi les valeurs utilisées pour les milieux de culture) et ε_{Tmax} le taux de dissipation local maximum ($\text{m}^2 \cdot \text{s}^{-3}$).

La théorie veut que, si la valeur de cette échelle est supérieure à la taille des particules d'intérêt (par

3. Études des paramètres hydrodynamiques et de mise en suspension

exemple une cellule en suspension ou un microporteur), ces dernières ne seront pas endommagées car emportées dans les tourbillons. Dans le cas contraire (particules plus grandes que λ_k), les tourbillons les plus petits vont se dissiper à leur rencontre, transférant ainsi leur énergie, ce qui peut endommager fortement les cellules. Dans le cas des microporteurs, la limite admise avant qu'il n'y ait un impact sur la croissance cellulaire est $\lambda_k \geq 0,6 \times d_{mp}$ [10, 11]. L'échelle de Kolmogorov est principalement dépendante des paramètres du mobile (géométrie, vitesse). Il est d'ailleurs possible d'estimer le taux maximal de dissipation de l'énergie turbulente ε_{Tmax} ($m^2.s^{-3}$) en considérant que celle-ci est maximale dans le volume balayé par le mobile [12] (tableau 19) :

$$\varepsilon_{Tmax} = \frac{P}{\rho V_{mobile}} = \frac{N_p \rho N^3 d^5}{\rho d^3} = N_p N^3 d^2$$

où P est la puissance globale dissipée (W), ρ la masse volumique du fluide ($kg.m^{-3}$), V le volume de liquide balayé par le mobile (m^3), N la fréquence de rotation du mobile ($tour.s^{-1}$), et d son diamètre (m).

TABLEAU 19 – Taux maximal de dissipation de l'énergie turbulent ε_{Tmax} en bioréacteurs GPC de 200 mL pour les valeurs maximales d'agitation expérimentales présentées dans le tableau 17.

	EE	HM	R
ε_{Tmax} ($W.kg^{-1}$)	$3,9.10^{-1}$	$1,5.10^{-2}$	$5,9.10^{-2}$

Grâce aux résultats obtenus précédemment, il nous a été possible d'évaluer *a priori* les fréquences d'agitation choisies pour la réalisation d'expérience de culture de CSM sur microporteurs quant à leur impact probable sur la croissance des cellules. Une estimation des valeurs maximales d'agitation avant l'obtention d'un effet délétère dans les bioréacteurs GPC de 200 mL utilisés est montrée dans le tableau 20.

TABLEAU 20 – Fréquences maximales d'agitation estimées par la taille de l'échelle de Kolmogorov en bioréacteurs GPC de 200 mL.

Volume de remplissage	200 mL		
$d_{particule}$ (en μm)	20	150	250
$\lambda_k =$	$d_{cellules}$	$0,6 \times d_{mp}$	
EE (rpm max)	1000	134	68
HM (rpm max)	675	91	46
R (rpm max)	690	96	49

A partir de ces différents résultats théoriques préliminaires, plusieurs hypothèses ont été émises

quant aux résultats expérimentaux attendus. Tout d'abord, comme le suggère largement le consensus scientifique en culture de cellules de mammifères, l'utilisation de fréquences d'agitation basses (dans notre cas $3,2 \cdot 10^{-5}$ W) serait plus favorable à la croissance cellulaire car générant moins de contraintes. À des fins de comparaison, la réponse d'une lignée cellulaire telle que la cellule CHO se traduit, en canal microfluidique, par une augmentation de la mortalité cellulaire (nécrose et/ou apoptose) à partir de seuils allant de $\varepsilon_t = 1 \text{ W.kg}^{-1}$, pour des cellules adhérentes sur microporteurs, à 100 W.kg^{-1} pour des cellules adhérentes sur une surface plane [13]. Ces résultats sont à comparer aux valeurs faibles calculées dans le tableau 17. Finalement, il semblerait que cette comparaison théorique des contraintes générées par différents mobiles d'agitation indique que le mobile en oreille d'éléphant (EE) serait plus favorable à la croissance cellulaire. C'est pourquoi ce mobile a été choisi comme point central du plan d'expériences visant à évaluer l'impact de l'agitation sur des CSM cultivées sur microporteurs (voir description au paragraphe 4.3.3).

Fréquence d'exposition Dans le cadre de ce travail, cette étude en CFD de la turbulence au sein des minibioréacteurs GPC a été affinée par les Dr Éric Olmos (Université de Lorraine, France) et Marie-Laure Collignon (Université de Liège, Belgique), et ce après que les expériences de culture de CSM aient été réalisées. Ce travail a donné lieu à une publication [14] dont les résultats sont consultables en annexe B.2. Les principaux points d'intérêt pour l'interprétation des données expérimentales générées sont résumés ci-après.

Contrairement à l'étude précédente, la turbulence au sein des minibioréacteurs GPC a été obtenue par la méthode de simulation des grandes échelles (LES). Le but était de décrire plus finement la turbulence au sein des minibioréacteurs en fonction des différents mobiles utilisés. En effet, par LES, les grands tourbillons sont simulés par la résolution directe des équations de Navier-Stokes, alors que seuls les petits tourbillons sont modélisés. Le modèle de sous-mailles utilisé était celui de l'échelle inférieure à la maille de Smagorinski, qui est basé sur l'hypothèse d'un équilibre local entre production et dissipation de l'énergie cinétique turbulente aux petites échelles. De plus, dans ce cas, le maillage n'était pas fixe mais mobile (*Sliding Mesh*), l'écoulement étant calculé à chaque pas de temps. Cette méthode, bien que sollicitant plus de temps de calcul, a permis d'obtenir des résultats plus fiables concernant la distribution des taux de dissipation ε au sein des cuves.

Comme supposé précédemment, il a été démontré que les taux de dissipation maximaux étaient observés au voisinage direct des mobiles. Les différents mobiles étudiés ont montré des taux de

dissipation se développant sur la même gamme de valeur sur le volume de la cuve. Cependant, leur distribution spatiale respective variait fortement. Ainsi, il a été mis en lumière que le mobile en hélice marine (HM) générerait d'importantes zones avec de faibles taux de dissipation, le rendant ainsi plus attractif pour diminuer les contraintes rencontrées par les CSM sur microporteurs. Afin de démontrer formellement ces résultats, une fonction de circulation et de dissipation de l'énergie, $FDCE$, a été créée (similaire à celle décrite par Justen *et al.*[15]). Cette fonction permet de décrire, non pas l'environnement global rencontré par les microporteurs, mais les contraintes réelles rencontrées, c'est à dire la fréquence et le temps passé à l'intérieur des zones critiques où $\lambda_k < d_{mp}$:

$$FDCE = \frac{1}{t_{C,mp}} \frac{\rho}{V_{mp}(\lambda_k < d_{mp})} \cdot \iiint_{V_{mp}(\lambda_k < d_{mp})} \varepsilon dV$$

où $\frac{1}{t_{C,mp}}$ est la fréquence d'exposition des microporteurs à la zone critique, $V_{mp}(\lambda_k < d_{mp})$ le volume de la zone critique visité par les microporteurs et ε le taux de dissipation de l'énergie turbulente simulé dans cette zone critique. Les résultats de cette fonction $FDCE$ ont été comparés pour chaque mobile à un même taux de dissipation moyen $\langle \varepsilon \rangle = 10^{-3} \text{ W.kg}^{-1}$ avec $\lambda_k < 90 \mu\text{m}$. De manière surprenante, le mobile en hélice marine (HM), suivi par la turbine Rushton (R), ont été démontrés comme imposant aux microporteurs moins de contraintes au cours du temps, alors que le mobile en oreille d'éléphant (EE) à pompage haut engendrait une fréquence d'exposition importante des microporteurs à la zone critique (tableau 21).

TABLEAU 21 – Valeurs de la fonction de circulation et de dissipation de l'énergie $FDCE$ en minibioreacteurs GPC de 200 mL pour une concentration de 12 g.L^{-1} de microporteurs à $P = 10^{-3} \text{ W.kg}^{-1}$.

Mobile d'agitation	Fréquence d'agitation (rpm)	$FDCE = \frac{1}{t_{C,\mu C}} \frac{\rho}{V_{\mu C}(\lambda_k < d_p)} \cdot \iiint_{V_{\mu C}(\lambda_k < d_p)} \varepsilon dV$ ($\text{W.m}^3.\text{s}^{-1}$)
EE Up	150	0,357
MP Up	380	0,257
RT	182	0,317

3.3 Impact des paramètres hydrodynamiques sur la croissance des CSM

a- Plan d'expériences

Un plan d'expériences a été mis en place afin d'étudier les effets de l'agitation sur la croissance des CSM sur microporteurs en prenant en compte la complexité des contraintes hydrodynamiques. Comme décrit précédemment, la fréquence d'agitation seule traduit mal le "stress" que peuvent subir les cellules sur microporteurs au sein d'un écoulement généré par agitation mécanique. Trois paramètres d'étude ont été choisis pour mieux évaluer l'ensemble de ces stress : la puissance globale dissipée P (de $3,2 \cdot 10^{-5}$ à $45 \cdot 10^{-5}$ W), la concentration en microporteurs (de 4 à 12 g.L^{-1}) et 3 types de mobiles d'agitation différents (variable catégorielle : EE Up , HM Up , R).

Au vu des analyses précédentes, la puissance globale dissipée et le type de mobile sont les deux facteurs dont dépendait la fréquence d'agitation utilisée (voir tableau 17). Le choix de ces deux paramètres avait pour but d'évaluer quel effet l'hétérogénéité des écoulements au sein de la cuve avait sur la croissance des CSM. Le troisième paramètre, la concentration en microporteurs, cherchait à établir si la quantité de chocs entre microporteurs avait un effet important sur l'amplification cellulaire des CSM. En effet, il a été constaté que les cellules adhérentes sur microporteurs sont beaucoup plus sensibles aux contraintes hydrodynamiques que les cellules en suspension, et cela serait dû en partie aux collisions entre microporteurs. La fréquence de collisions F_c entre particules a été décrite par Cherry et Papoutsakis comme étant proportionnelle à $\frac{(\bar{\varepsilon}\nu)^{1/4}\alpha^2}{d_{mp}^4}$ (où ε est le taux de dissipation moyen de l'énergie turbulente en $\text{m}^2 \cdot \text{s}^{-3}$, ν est la viscosité cinématique en $\text{m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$, α est la fraction du volume occupé par les microporteurs et d_{mp} est le diamètre des microporteurs en m) [16]. Pour une même puissance globale dissipée et à un volume constant, la fraction volumique de microporteurs est donc le facteur déterminant la fréquence de collisions entre microporteurs. Le taux d'ensemencement surfacique des CSM sur les microporteurs a été maintenu constant pour les 3 concentrations de microporteurs à environ 3 cellules par microporteurs. La concentration en glucose a été maintenue tout au long des cultures entre $0,5$ et 1 g.L^{-1} afin que ce dernier ne soit pas un facteur limitant.

Un plan d'expériences factoriel complet de 3 variables, étudiées sur 3 niveaux, comprenant une variable catégorielle, aurait nécessité 27 expériences, et ce, sans effectuer de répétitions. De plus, la plateforme de minibioréacteurs à notre disposition comprenant 6 unités, il était nécessaire d'associer une unité à un contrôle afin d'assurer la reproductibilité entre les différentes précultures. Il a donc été décidé d'établir un plan d'expériences optimisé grâce à l'utilisation du logiciel Modde7 (Umetrics,

Suède) afin de limiter le nombre d'expériences tout en évaluant la variabilité interne (au sein d'une préculture) et externe (entre les différentes précultures). Le plan d'expériences optimisé comprenait au total 18 cultures réparties sur 3 blocs (correspondant ici à une préculture) avec un point central double répété lors de chaque bloc. Le détail des conditions opératoires utilisées est représenté graphiquement sur la figure 44.

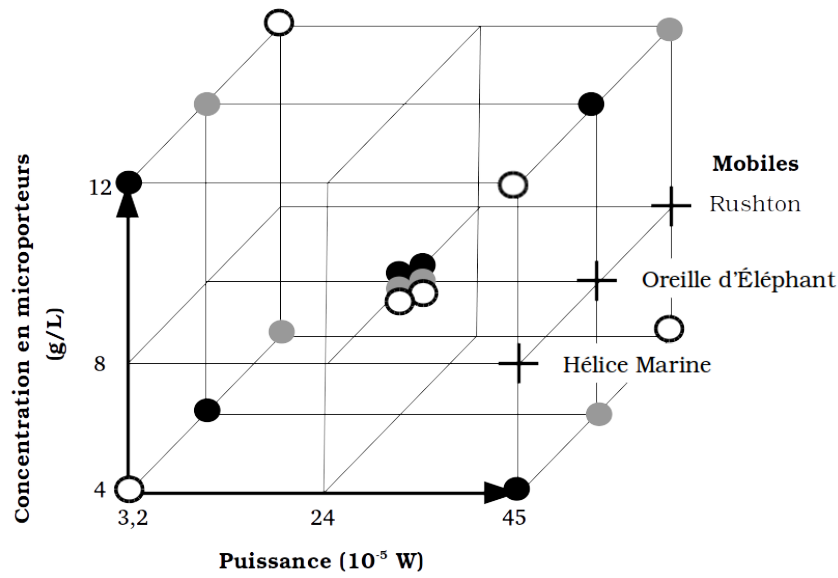


FIGURE 44 – Plan d'expériences : conditions opératoires. Les différents blocs d'expériences sont symbolisés par les points : ● bloc 1, ○ bloc 2, ● bloc 3. Les conditions opératoires du point central sont : 8 g/L de Cytodex 1, avec le mobile en oreille d'éléphant (EE) à $P = 24 \cdot 10^{-5}$ W ou 150 rpm.

Ces expériences ont été réalisées avec les CSM d'une même banque cellulaire, issue d'un donneur de moelle osseuse de 15 ans et amplifiées jusqu'au passage 5 avant d'être mises à adhérer sur microporteurs. La réalisation d'une quatrième préculture s'est avérée nécessaire suite à des pannes techniques des minibioréacteurs sur certaines des cultures requises pour l'analyse du plan expérimental. Les résultats de ce bloc 4 ont été ajoutés *a posteriori* au logiciel Modde7 et contenaient également un duplicat du point central. Les réponses analysées étaient : la quantité totale de glucose consommée (en $\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) ; la quantité totale de cellules récoltées après réadhérence sur boîtes de culture (en nombre de cellules totales) et l'efficacité de clonogénicité des cellules après récolte (en %).

b- Modélisation des résultats

Le modèle généré par Modde7 à partir des réponses obtenues pour chaque expérience est présenté dans la figure 45. Si l'on analyse chaque réponse indépendamment, on constate que la quantité totale

de glucose consommée augmente avec la quantité de microporteurs ensemencés. Cette réponse est parfaitement valide au vu de l'augmentation du nombre de cellules ensemencées par unité de volume. Toutefois, contrairement aux réponses anticipées, la quantité totale de glucose consommée augmente avec la puissance globale dissipée. Cette réponse contradictoire pourrait remettre en cause l'utilisation de la quantité de glucose comme mesure de la quantité de cellules produites. A partir de ces seuls résultats il serait aisé de supposer que l'augmentation de l'agitation, et donc de l'oxygénation, a un impact significatif sur le métabolisme cellulaire et donc sur la consommation de glucose par les cellules.

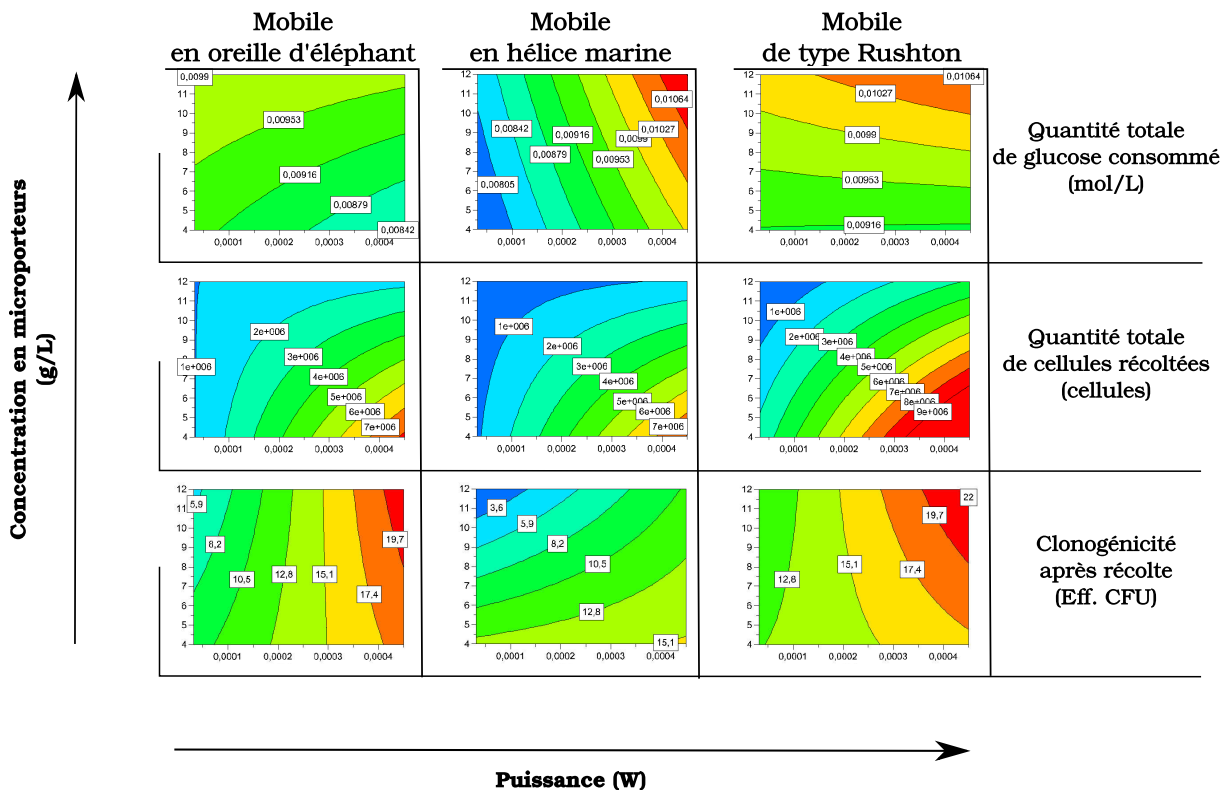


FIGURE 45 – Plan d'expériences : modélisation des résultats par Modde7 (Umetrics, Suède).

La quantité de cellules récoltées est cependant elle aussi largement corrélée avec la puissance dissipée. Les réponses modélisées pour tous les mobiles d'agitation présentent le même profil : la quantité de cellules récoltées augmente avec la puissance dissipée et avec la diminution de la quantité de microporteurs en culture. Or, cette réponse est non seulement une mesure directe de la quantité de cellules produites au cours de la culture, mais mesure aussi la capacité de ré-adhérence au plastique des cellules (caractéristique fondamentale des CSM). Si l'on se réfère au tableau 18, il est possible de supposer, à partir des deux réponses précédentes, que la mise en suspension des microporteurs

est le facteur le plus critique pour favoriser la croissance des CSM, mais cette conclusion serait en contradiction directe avec les résultats présentés sur la figure 41-B comparant la croissance sur microporteurs en condition statique et agitée.

Finalement, la réponse modélisée de la clonogénicité des cellules (mesure directe de la quantité de CSM non-sénescentes récoltées) augmente elle aussi avec la puissance dissipée appliquée au cours des cultures et diminue aussi avec la quantité de microporteurs en culture (pour le mobile HM *Up*, les deux autres mobiles ne montrant aucune tendance concernant la quantité de microporteurs).

c- Analyse

Suite à la réalisation du plan expérimental décrit sur la figure 44, on constate une stimulation de la croissance cellulaire par l'augmentation des contraintes hydrodynamiques. Ces résultats sont en contradiction directe avec les résultats préliminaires obtenus en culture de CSM sur Cytodex 1 (figure 41) et avec les données présentées dans la littérature [17].

Bien que la méthode utilisée pour récolter les CSM soit elle-même imparfaite, on constate une forte perte de cellules au cours des cultures avec un rendement d'amplification inférieur à 1 par rapport à la quantité ensemencée, et ce même dans les conditions les plus favorables (ici, à forte agitation). Il serait possible de critiquer la modélisation obtenue par DOE, toutefois cette perte importante de cellules est en complet accord avec les expériences précédentes (figure 41) réalisées avec 2 banques différentes de CSM. À ce niveau de connaissance, on se retrouve donc face à un paradoxe où la culture de CSM en conditions statiques est plus favorable que la culture en conditions agitées, mais où une agitation à forte puissance est plus favorable à la croissance des cellules qu'une faible agitation.

L'analyse comparative des profils obtenus pour chaque type de mobile n'apporte ici aucun élément supplémentaire. Il n'est pas possible de corréler les réponses biologiques obtenues avec l'un des paramètres préalablement définis et déterminés, que ce soit en termes de taux de dissipation d'énergie turbulente, de l'échelle de Kolmogorov ou de fréquence des collisions. L'hypothèse a donc été faite qu'un facteur *a priori* non-identifié interférerait de manière importante avec ce plan d'expériences.

3.4 Cultures à petite échelle et régulations

La première supposition a été que le facteur sous-jacent interférant avec le plan d'expériences était la régulation de température. En effet, bien que les profils de température relevés au cours des cultures

précédentes n'aient jamais dépassé le point de contrôle de 36,5° C, une différence technique majeure des minibioréacteurs GPC est la technologie de chauffage de leurs cuves. Comme il a été montré dans le tableau 7, les cultures de CSM sont : soit réalisées en incubateur à petite échelle (< 1 L), soit réalisées à grande échelle (> 1 L) en cuve agitée munie d'une double paroi ou d'un manteau chauffant. Dans notre cas, la régulation de la température dans la cuve est entièrement réalisée par sa plateforme, cette dernière étant munie d'une résistance chauffante et d'un circuit d'eau froide (figure 46, à droite).

La régulation de température étant entièrement effectuée en fond de cuve, et notre plan d'expériences étudiant partiellement la mise en suspension des microporteurs, la présence de points chauds au contact direct des cellules pourrait expliquer les résultats contradictoires obtenus lors de la réalisation du plan d'expériences. Avec les moyens techniques à notre disposition (sonde de platine), ces points chauds n'ont pas pu être mis en évidence directement. Il a donc été décidé de démontrer indirectement l'influence que peut avoir le mode de chauffage de minibioréacteurs par la réalisation d'un montage, visible sur la figure 46 (à gauche), dans lequel les minibioréacteurs n'étaient plus régulés par leur plateforme mais par l'intermédiaire d'une enceinte chauffée à 37° C grâce à une ventilation d'air chaud.

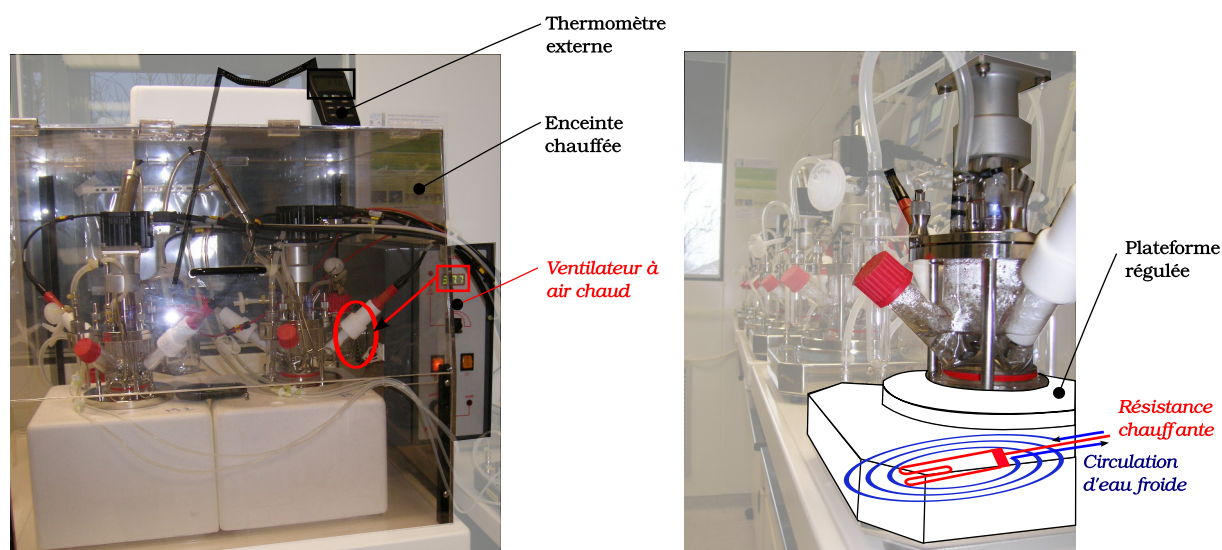
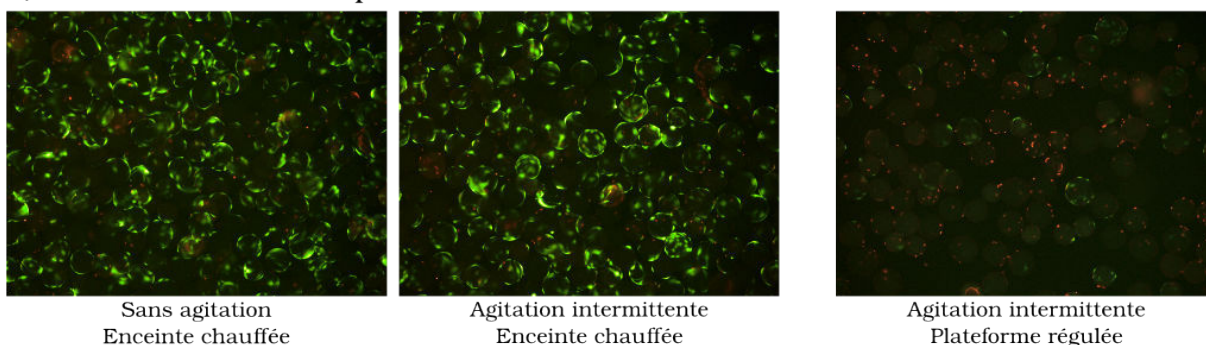


FIGURE 46 – Montages des minibioréacteurs GPC : régulation de la température par enceinte chauffée (à gauche) ou plateforme régulée (à droite).

Deux expériences ont été mises en œuvre : l'une impliquant l'utilisation de l'enceinte chauffée montrée sur la figure 46 (figure 47-A), la seconde impliquant un arrêt de l'agitation après 94 h de culture avec une régulation de température par la plateforme (figure 47-B). Ces cultures ont été réalisées avec des CSM de la banque issue d'un donneur de moelle osseuse de 24 ans à leur quatrième passage

(P4). Ces cultures ont été suivies par les dosages métaboliques usuels (glucose, LDH, lactate), mais aussi par microscopie à fluorescence. Les observations morphologiques obtenues avec utilisation de Live/Dead sont présentées sur la figure 47. Il est aisé de constater que la population de CSM mises en culture sur la plateforme régulée avec une agitation intermittente ne présente presque plus d'activité métabolique après 7 jours de culture, contrairement aux cellules mises en culture en enceinte chauffée (figure 47-A). De même, alors que des CSM cultivées sur ces mêmes plateformes régulées avec une agitation continue arrivent à survivre, l'arrêt de l'agitation diminue drastiquement leur viabilité en 24 h (figure 47-B).

A) Mobile en Oreille d'Eléphant, $t=165$ h



B) Mobile Hélice marine, 192 rpm, sur plateforme régulée

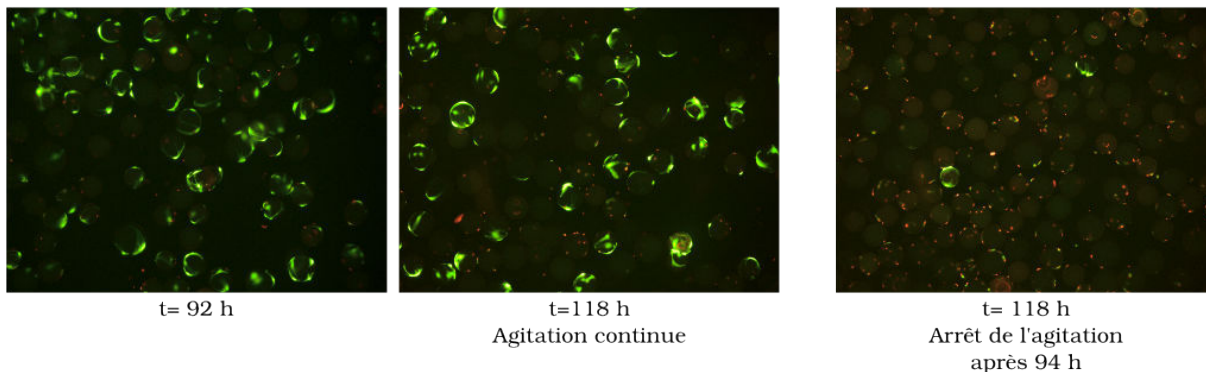


FIGURE 47 – Visualisation de l'effet de la température sur les CSM (MO24, P4) par microscopie à fluorescence (grossissement X100) et coloration au Live/Dead. Les cellules viables sont visibles en vert grâce à l'excitation des produits de l'hydrolyse de la Calcéine AM, les cellules mortes sont en rouge grâce à la liaison de l'EthD1 à l'ADN. A) Observation après 165 h de culture des CSM sur microporteurs en minibioreacteurs GPC, de gauche à droite : non agité en enceinte chauffée, en agitation intermittente en enceinte chauffée, en agitation intermittente sur plateforme régulée. L'agitation intermittente était effectuée par un mobile EE avec des cycles de 10 min à 150 rpm suivis de 50 min sans agitation. B) Comparaison de 2 cultures sur microporteurs en minibioreacteurs GPC agités avec plateforme régulée par mobile HM à 192 rpm, de gauche à droite : état des CSM à 92 h, état des CSM à 118 h en agitation continue, état des CSM à 118 h après arrêt de l'agitation à 94 h.

Les conditions d'agitation choisies pour ces différentes cultures correspondent à une puissance globale dissipée P de $11,5 \cdot 10^{-5}$ W avec une mise en suspension complète des microporteurs à une concentration de Cytodex 1 de 4 g.L^{-1} . L'agitation intermittente par le mobile EE avec des cycles de 10 min à 150 rpm suivies de 50 min sans agitation développe la même puissance globale dissipée au cours du temps que les cultures effectuées dans les mêmes conditions à 110 rpm. Peu de différences ont été constatées entre ces deux conditions en enceinte chauffée, ce qui permet de supposer que la différence de transfert d'oxygène n'est pas impliquée dans ce phénomène. Les suivis métaboliques de ces cultures sont présentés sur la figure 48. La culture effectuée en enceinte chauffée montre de manière logique moins de signe de lyse cellulaire, une plus grande consommation de glucose et une plus grande accumulation de lactate. Il faut cependant noter que ces réponses n'apparaissent qu'à partir d'environ 5 jours de culture et que les différences restent limitées. L'utilisation d'une résistance chauffante au bas de la cuve pourrait donc avoir surtout un effet cumulatif au cours du temps, avec d'éventuels points chauds de faible importance. Afin d'assurer ces conclusions quant à la présence d'éventuels points chauds, une dernière expérience a été réalisée sur les plateformes chauffantes régulées pour visualiser l'effet d'un arrêt de l'agitation (figure 49). Il a été constaté qu'une fois l'agitation arrêtée, le taux de LDH dans le milieu augmentait subitement, la consommation de glucose s'arrêtait, tout comme l'accumulation de lactate.

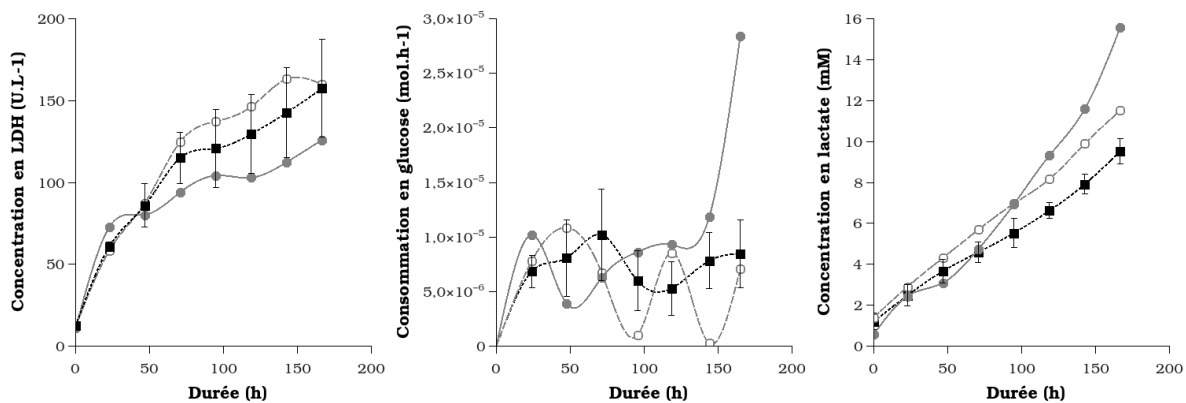


FIGURE 48 – Suivis métaboliques des CSM en minibioréacteurs (de gauche à droite, accumulation de LDH, consommation de glucose, et accumulation de lactate) : effet du mode de régulation de la température. Cultures avec une agitation par un mobile EE U_p : à 150/0 rpm en agitation intermittente sur plateforme régulée (○), à 150/0 rpm en agitation intermittente en enceinte chauffée (●), à 110 rpm en agitation continue sur plateforme régulée (■, $n=5$, les barres d'erreur sont exprimées en écarts-types).

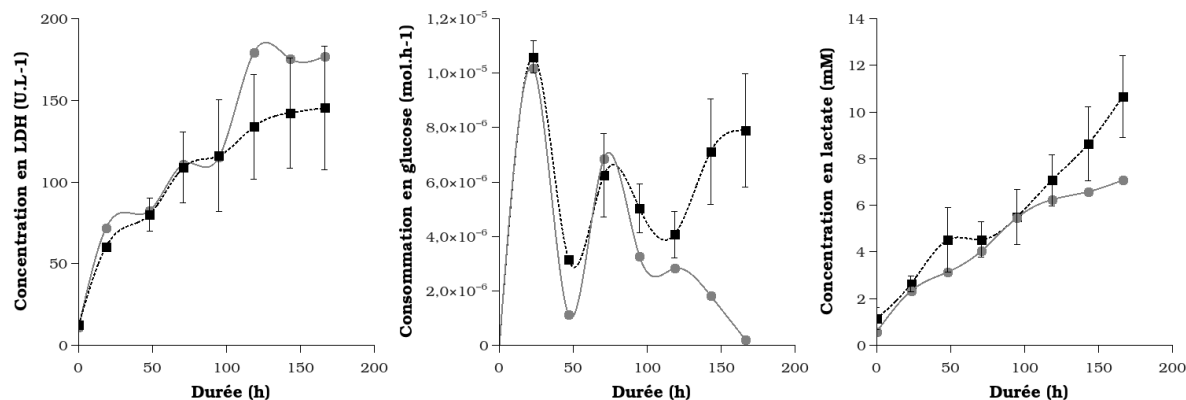


FIGURE 49 – Suivis métaboliques des CSM en minibioreacteurs (de gauche à droite, accumulation de LDH, consommation de glucose, et accumulation de lactate) : effet du mode de régulation de la température avec un arrêt de l’agitation. Cultures avec une agitation par un mobile HM *Up* à 192 rpm sur plateforme régulée : avec arrêt de l’agitation à 94 h (●), en agitation continue (■, n=3, les barres d’erreur sont exprimées en écarts-types).

Au travers de ces expériences, il apparaît que l’utilisation d’une plateforme chauffée par une résistance pour réguler la température n’est pas souhaitable pour la culture de CSM sur microporteurs à petite échelle, en particulier si la culture est prolongée au-delà de 5 jours. Cette observation n’a été faite que tardivement au cours de ces travaux car les suivis de température avec la sonde thermique n’ont jamais indiqué de dépassement du point de consigne, fixé à 36,5° C. De plus, l’orientation donnée à ce projet se focalisait sur la distribution des hétérogénéités au sein des cuves. La mise en suspension des microporteurs est un paramètre fortement lié à la température dans cette configuration de bioréacteur, c’est pourquoi des comparaisons de conditions de cultures en parallèle (ex : agitation intermittente ou continue) n’aurait pas pu faire apparaître ce biais technique, contrairement à l’approche par plan d’expériences. Ces résultats soulignent encore la complexité des méthodes à mettre au point lors de la montée/descente en échelle d’un procédé, ainsi que la fragilité des CSM comparées aux lignées immortalisées.

RÉSUMÉ

- Un modèle de la mise en suspension des microporteurs en fioles d'Erlenmeyer a été construit.
- La caractérisation des écoulements au sein des minibioréacteurs GPC a été effectuée par CFD.
- Un plan d'expériences étudiant l'impact de l'agitation sur les CSM sur microporteurs a été mis en œuvre en ciblant les paramètres opératoires suivants : puissance globale dissipée, type de mobile, concentration en microporteurs, les réponses biologiques suivantes : glucose consommé, cellules récoltées, clonogénicité après récolte.
- L'utilisation d'une résistance chauffante en fond de cuve pour la régulation de température peut avoir des effets négatifs non négligeables en cas d'agitation faible ou intermittente lors de culture de CSM de plus de 5 jours.

4 Synthèse

A partir de l'analyse de la littérature scientifique portant sur les méthodes d'amplification des CSM humaines, plusieurs voies de développement des procédés de culture ont été identifiées. Ce travail a choisi d'explorer l'utilisation de microporteurs Cytodex en conjonction avec des systèmes de cultures en suspension (fioles d'Erlenmeyer et bioréacteurs de petite échelle à agitation mécanique).

Dans un premier temps, il a été constaté qu'un des écueils de l'utilisation des microporteurs Cytodex 1 est leur faible propension à faciliter la récolte des cellules humaines par les méthodes enzymatiques conventionnelles [18–20]. C'est pourquoi, malgré de bons résultats apparents en matière d'adhérence des CSM humaines [20, 21], peu de travaux ont choisi préférentiellement ce type de microporteurs. Nos résultats appuient entièrement ces conclusions avec de faibles rendements de récolte sur Cytodex 1 et des techniques de comptage qui impliquent soit plus d'une heure de traitement enzymatique, soit des méthodes indirectes comme des mesures de la concentration de LDH intracellulaire et l'utilisation de MTT [21–23]. Dans nos travaux, de nombreuses techniques directes de comptage cellulaire ont été testées avant de se limiter à des estimations basées sur le métabolisme, telles que la consommation de glucose ou la réduction de la résazurine par les cellules.

Malgré ces limitations, il a été possible, dans un second temps, de comparer des cultures de CSM en conditions statiques, sur des surfaces planes ou sur microporteurs, à des cultures en suspension. La comparaison de cultures de CSM issues de plusieurs donneurs a déjà été rapportée comme donnant des résultats comparables en terme d'amplification des CSM en conditions statiques ou agitées [22, 24]. De manière surprenante, nos expériences préliminaires en mode agité n'ont pas permis d'atteindre les performances observées en mode statique. Des études approfondies ont donc été menées pour caractériser la mise en suspension des microporteurs et les contraintes subies par les cellules lors de leur culture en suspension dans les deux géométries de bioréacteurs utilisés dans notre étude [4, 14]. Ces études ont été complétées par un plan d'expériences avec des cultures de CSM sur microporteurs utilisant une très large gamme de paramètres opératoires (agitation, type de mobile, concentration en microporteurs) afin de mieux appréhender les critères cruciaux d'un futur changement d'échelle des cultures [25]. Les critères de performances évalués étaient : la quantité de cellules obtenues, la consommation de glucose et la clonogénicité des cellules. Ces analyses approfondies ont permis d'établir un modèle dont l'optimum des performances se situait dans la gamme haute des puissances dissipées par l'agitation mécanique. Or, cette conclusion est à l'exact opposé d'une étude similaire comparant la croissance de CSM humaines à différentes fréquences d'agitation, mais en spinner, avec

des puissances volumiques calculées également par CFD [26]. De plus, une bonne robustesse des CSM humaines face à des systèmes de cultures en suspension de géométries diverses, de 15 mL à 5 L, a déjà été démontrée [27]. L'hypothèse pour expliquer nos résultats a été que ces expériences avaient pu être sujettes à un biais non-identifié au préalable, potentiellement l'exposition des CSM à des températures supérieures à 37° C.

La sensibilité des cellules humaines aux températures supra-physiologiques est depuis longtemps reconnue, que ce soit lors des phénomènes de fièvre ou dans le traitement des tumeurs [28]. L'hyperthermie est la cause majeure de multiples cascades intracellulaires altérant le cytosquelette des cellules, la synthèse des protéines, et le cycle cellulaire, notamment en déclenchant des phénomènes d'apoptose au dessus de 40° C [28]. En culture cellulaire *in vitro*, un arrêt complet de la croissance est constaté pour des lignées cellulaires humaines exposées à une température constante de 41° C sur plusieurs jours et des phénomènes de nécrose massive sont constatés à 45° C après seulement quelques heures d'exposition (au contraire de lignées murines) [29]. Concernant les cultures en plaque 24-puits sur plateforme orbitale, une mesure directe à la surface de la plateforme a pu être effectuée et a révélé une température de contact de 41° C, expliquant ainsi l'échec de l'amplification des CSM. Cependant, des mesures similaires n'ont pas permis de mettre en évidence la présence de points chauds au sein des minibioreacteurs. La réalisation de cultures mettant en œuvre une méthode alternative de régulation de la température et l'établissement d'un lien entre mise en suspension des microporteurs et viabilité cellulaire, nous permettent cependant d'affirmer avec une assez bonne certitude que la température était un paramètre affectant les cellules dans les minibioreacteurs.

De nombreux travaux se sont concentrés sur les transferts de chaleur au sein de cuves agitées en utilisant les systèmes usuels de chauffage (échangeur interne en serpentins, double enveloppe, échangeur Pelletier) et de régulation (*ON/OFF* ou PID) [30]. Tout comme dans l'étude quantifiant les contraintes développées au sein des minibioreacteurs, il est possible de caractériser les coefficients de transfert de chaleur en fonction des paramètres géométriques du mobile ou de la fréquence d'agitation [31, 32]. L'hétérogénéité de ce transfert de chaleur depuis la paroi par les systèmes de double-enveloppe a également été entrepris par mesures directes [33] ou par CFD [34]. La méthode de chauffage non-conventionnelle par résistance chauffante utilisée dans les minibioreacteurs GPC a été choisie en raison de leur petite taille. Il serait donc intéressant d'approfondir ce type d'analyses dans ces réacteurs, non seulement, pour pouvoir conclure avec certitude quant aux résultats générés précédemment, mais surtout, pour évaluer la pertinence de ce paramètre opératoire au sein d'un processus de montée

en échelle de cultures de CSM humaines.

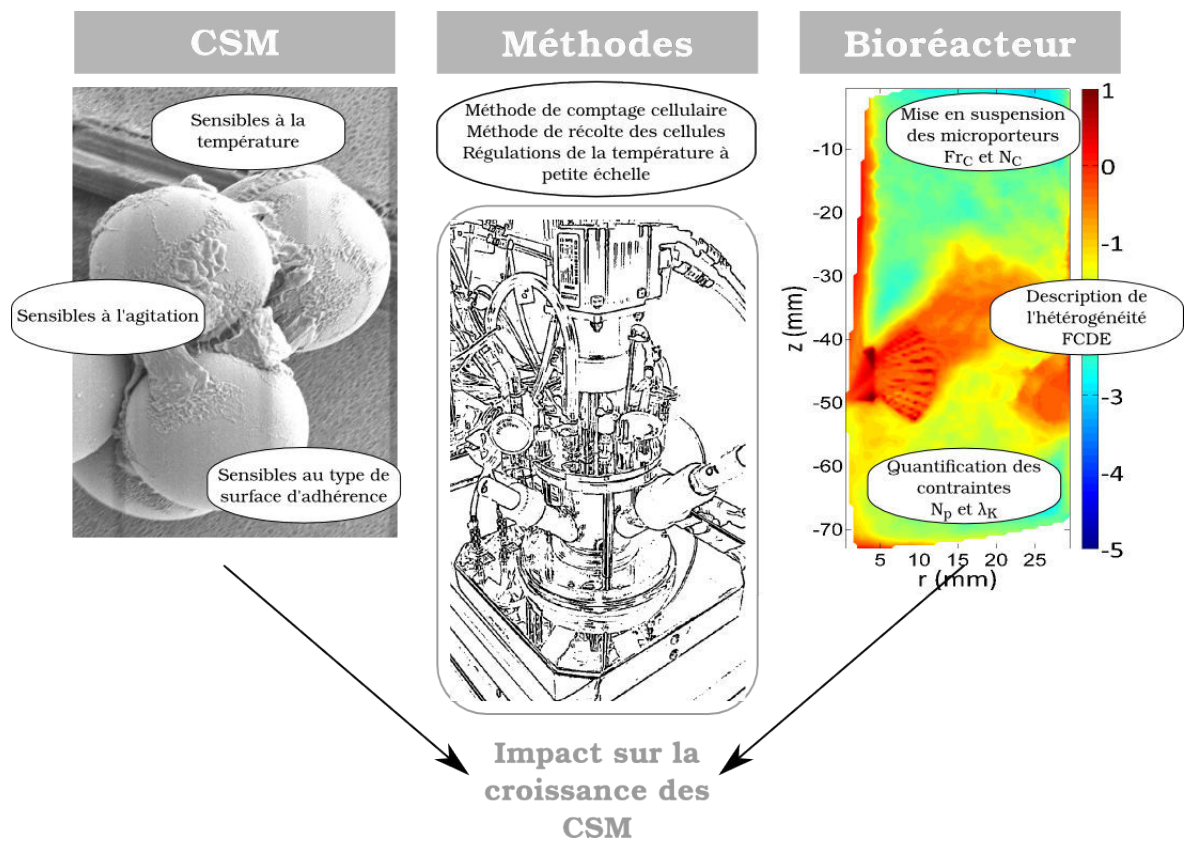


FIGURE 50 – Synthèse des différents aspects mis en évidence, liés aux CSM, aux méthodes de culture et de comptage ainsi qu'aux minibioreacteurs, et susceptibles d'interférer sur la croissance des CSM.

5 Références bibliographiques

- [1] E PETIOT et al. Real-time monitoring of adherent Vero cell density and apoptosis in bioreactor processes. *Cytotechnology*, 64(4) :429–441, 2012.
- [2] C FERRARI et al. Limiting cell aggregation during mesenchymal stem cell expansion on microcarriers. *Biotechnology progress*, 28(3) :780–787, 2012.
- [3] T ZWIETERING. Suspending of solid particles in liquid by agitators. *Chemical engineering science*, 8(3–4) :244–253, 1958.
- [4] E OLMOS et al. Critical agitation for microcarrier suspension in orbital shaken bioreactors : Experimental study and dimensional analysis. *Chemical engineering science*, 122 :545–554, 2015.
- [5] E BUCKINGHAM. On Physically Similar Systems ; Illustrations of the Use of Dimensional Equations. *Physical review*, 4(4) :345–376, 1914.
- [6] A N KOLMOGOROV. Dissipation of energy in locally isotropic turbulence. In *Dokl. Akad. Nauk SSSR*. Tome 32, 1941, pages 16–18.
- [7] A DELAFOSSE et al. LES and URANS simulations of hydrodynamics in mixing tank : Comparison to PIV experiments. *Chemical engineering research and design*, 86(12) :1322–1330, 2008.
- [8] B N MURTHY et al. Assessment of standard, RSM and LES turbulence models in a baffled stirred vessel agitated by various impeller designs. *Chemical engineering science*, 63(22) :5468–5495, 2008.
- [9] T KUMARESAN et al. Effect of impeller design on the flow pattern and mixing in stirred tanks. *Chemical engineering journal*, 115(3) :173–193, 2006.
- [10] M S CROUGHAN et al. Effects of microcarrier concentration in animal cell culture. *Biotechnology and bioengineering*, 32(8) :975–982, 1988.
- [11] C J HEWITT et al. Expansion of human mesenchymal stem cells on microcarriers. *Biotechnology letters*, 33(11) :2325–2335, 2011.
- [12] Brodkey RS KRESTA SM. *Turbulence in mixing applications*. In. *Handbook of industrial mixing*. Wiley-Interscience, 2004. partie 2, pages 19–87.
- [13] J B SIECK et al. Development of a Scale-Down Model of hydrodynamic stress to study the performance of an industrial CHO cell line under simulated production scale bioreactor conditions. *Journal of biotechnology*, 164(1) :41–49, 2013.
- [14] M-L COLLIGNON et al. Large-Eddy Simulations of microcarrier exposure to potentially damaging eddies inside mini-bioreactors. *Biochemical engineering journal*, 108 :30–43, 2016.
- [15] P JÜSTEN et al. A mathematical model for agitation-induced fragmentation of *Penicillium chrysogenum*. *Bioprocess engineering*, 18(1) :7–16, 1997.
- [16] R S CHERRY et al. Hydrodynamic effects on cells in agitated tissue culture reactors. *Bioprocess engineering*, 1(1) :29–41, 1986.
- [17] C SCHIRMAIER et al. Scale-up of adipose tissue-derived mesenchymal stem cell production in stirred single-use bioreactors under low-serum conditions. *Engineering in life sciences*, 14(3) :292–303, 2014.

-
- [18] J VARANI et al. Cell growth on microcarriers : comparison of proliferation on and recovery from various substrates. *Journal of biological standardization*, 14(4) :331–336, 1986.
- [19] C WEBER et al. Expansion and Harvesting of hMSC-TERT. *The open biomedical engineering journal*, 1 :38–46, 2007.
- [20] N E TIMMINS et al. Closed system isolation and scalable expansion of human placental mesenchymal stem cells. *Biotechnology and bioengineering*, 109(7) :1817–1826, 2012.
- [21] D SCHOP et al. Expansion of human mesenchymal stromal cells on microcarriers : growth and metabolism. *Journal of tissue engineering and regenerative medicine*, 4(2) :131–140, 2010.
- [22] J HUPFELD et al. Modulation of mesenchymal stromal cell characteristics by microcarrier culture in bioreactors. *Biotechnology and bioengineering*, 111(11) :2290–2302, 2014.
- [23] A-Ch TSAI et al. Expansion of Human Mesenchymal Stem Cells in a Microcarrier Bioreactor. *Methods in molecular biology*, In press, 2016.
- [24] F PETRY et al. Manufacturing of Human Umbilical Cord Mesenchymal Stromal Cells on Microcarriers in a Dynamic System for Clinical Use. *Stem cells international*, 2016 :4834616, 2016.
- [25] O BARRADAS et al. Evaluation of criteria for bioreactor comparison and operation standardization for mammalian cell culture. *Engineering in life sciences*, 12(5) :518–528, 2012.
- [26] V JOSSEN et al. Theoretical and Practical Issues That Are Relevant When Scaling Up hMSC Microcarrier Production Processes. *Stem cells international*, 2016 :4760414, 2016.
- [27] A W NIENOW et al. Agitation conditions for the culture and detachment of hMSCs from microcarriers in multiple bioreactor platforms. *Biochemical engineering journal*, 108 :24–29, 2016.
- [28] K AHMED et al. Hyperthermia : an effective strategy to induce apoptosis in cancer cells. *Apoptosis*, 20(11) :1411–1419, 2015.
- [29] E P ARMOUR et al. Sensitivity of Human Cells to Mild Hyperthermia. *Cancer research*, 53(12) :2740–2744, 1993.
- [30] P MOHAN et al. Review heat transfer to Newtonian fluids in mechanically agitated vessels. *Experimental thermal and fluid science*, 5(6) :861–883, 1992.
- [31] J KARCZ et al. Heat transfer in jacketed agitated vessels equipped with non-standard baffles. *The chemical engineering journal and the biochemical engineering journal*, 58(2) :135–143, 1995.
- [32] A DEBAB et al. An investigation of heat transfer in a mechanically agitated vessel. *Journal of applied fluid mechanics*, 4(2) :43–50, 2011.
- [33] R ENGESKAUG et al. Wall Heat Transfer in Stirred Tank Reactors. *Industrial & engineering chemistry research*, 44(14) :4949–4958, 2005.
- [34] I BIELKA et al. Local Heat Transfer Process for a Gas–Liquid System in a Wall Region of an Agitated Vessel Equipped with the System of CD6-RT Impellers. *Industrial & engineering chemistry research*, 53(42) :16539–16549, 2014.

Chapitre 5

Vers un milieu sans sérum pour la culture de CSM

Sommaire

1	Introduction	211
2	Comparaison de milieux commerciaux	212
2.1	Effets des hydrolysats de protéines végétales	212
2.2	Milieux complets sans sérum	213
2.3	Adhérence cellulaire	216
3	Étude de la supplémentation de milieux définis pour la croissance des CSM	220
3.1	Apport en Glutamine	220
3.2	Formulations par plan d'expériences	224
4	Synthèse	237
5	Références bibliographiques	241

RÉSUMÉ : Les milieux usuels pour la culture de CSM contiennent en grande majorité un pourcentage non négligeable (de 5 à 20%) de dérivé sanguin. Ce dernier peut être du sérum humain, du lysat humain de plaquettes (LPH), ou du sérum de veau foetal (SVF). Le SVF est l'additif le plus couramment utilisé dans le cadre de l'étude académique des CSM de par sa disponibilité et son coût abordable. Plusieurs obstacles s'opposent cependant à son utilisation pour la culture de CSM à usage thérapeutique : sa composition est complexe et indéfinie, il existe une grande variabilité inter-lots, son utilisation pour un usage thérapeutique pose un risque sanitaire, et la disponibilité de lot BPF risque de diminuer dans le futur avec la généralisation des traitements cellulaires. C'est pourquoi, la formulation d'un milieu défini pour la culture de CSM reste un enjeu majeur, non seulement, pour le contrôle du procédé de culture, mais également, pour une compréhension approfondie des mécanismes biologiques sous-tendant la prolifération des CSM. Différentes alternatives au SVF ont donc été évaluées dans le cadre de ce travail. Tout d'abord, l'ajout d'hydrolysats végétaux a été envisagé. Puis un criblage de milieux sans sérum commerciaux a été réalisé. Finalement, une stratégie de formulation d'un milieu sans sérum a été mise en place. Afin de pouvoir tester un grand nombre de conditions opératoires et de suppléments, deux méthodes de suivi automatisé des cellules ont été mises en place en parallèle : par microscopie et par spectrophotométrie. Les résultats obtenus ont permis de retenir, parmi 25 composés communs des milieux de cultures, 15 composés supportant la croissance des CSM. Cependant, la formulation finale du milieu sans sérum obtenue dans ces travaux ne permet pas encore d'atteindre la prolifération des CSM observée en présence de SVF. Il semble que plusieurs facteurs clefs manquent encore pour stimuler le développement de la population cellulaire. Ces facteurs ont probablement déjà été identifiés, car les milieux commerciaux testés ont tous démontré des performances supérieures ou égales à l'utilisation de SVF. Cependant, la composition de ces milieux n'est pas divulguée. Il a également été montré que l'utilisation d'hydrolysats de protéines végétales ou la modification de la composition en acides aminés du milieu minimum ne sont pas suffisantes pour obtenir un milieu de culture sans sérum qui assure seul la croissance des CSM.

1 Introduction

Le sérum de veau fœtal (SVF) est un élément majeur des milieux de culture de CSM (10-20% du volume final). Ce sérum est le surnageant obtenu après centrifugation et coagulation du sang issu de l'exsanguination par ponction cardiaque de fœtus de veaux lors de l'abattage de vaches gestantes. Le SVF est composé majoritairement d'albumine sérique bovine mais contient également de nombreux facteurs de croissance, hormones, lipides, anti-oxydants et facteurs d'attachement [1]. Sa composition, fluctuante selon les lots, ne peut être considérée comme définie. L'utilisation de SVF est donc un obstacle important au développement d'un procédé de culture de CSM robuste [2]. En effet, contrairement aux lignées cellulaires, les CSM, en tant que cellules primaires, ne peuvent être progressivement adaptées à un milieu appauvri. De plus, les CSM sont aussi envisagées comme produit thérapeutique à part entière et l'utilisation de SVF constitue donc un risque sanitaire par la possible transmission du prion de l'encéphalopathie spongiforme bovine ou le déclenchement de réactions allergiques [3]. Le SVF dédié à la culture de cellules souches est d'ailleurs principalement importé de pays peu touchés par l'épidémie de vache folle comme la Nouvelle-Zélande [1]. De plus, avec l'augmentation de la demande, l'approvisionnement en SVF risque de faire face à une pénurie chronique si la culture de CSM parvient à se développer à grande échelle [4].

Des alternatives au SVF existent déjà pour la culture de CSM et peuvent se diviser en deux groupes : l'utilisation de dérivés sanguins humains en remplacement du SVF (sérum, lysat de plaquettes, plasma enrichi en plaquettes) [5] et des milieux commerciaux sans sérum [6]. Les dérivés sanguins ont été rapportés comme plus performants que le SVF pour stimuler la croissance des CSM [7]. Leur utilisation fait toutefois face à des problèmes identiques de sécurité sanitaire [8–10], de variabilité entre différents lots (donneur et méthodes de préparation) [10–13] et d'approvisionnement limité [14, 15]. Tout comme avec le SVF, le mélange complexe de molécules composant les dérivés sanguins ne permet de déterminer que de manière limitée les besoins métaboliques exacts des CSM en culture. Les milieux commerciaux sans sérum peuvent contenir des dérivés sanguins humains ou être définis, mais leur composition est protégée par le secret industriel. Le remplacement du SVF par des hydrolysats végétaux et différents milieux commerciaux a été évalué ci-après.

Toutefois, l'obtention d'un milieu défini de composition publique serait une avancée importante pour le développement des méthodes de culture de CSM à plus grande échelle (design de stratégie d'alimentation par exemple) et la compréhension de leurs réponses vis-à-vis des signaux extracellulaires, notamment de différenciation. Dans ce cadre, l'analyse de l'ajout de composés à un milieu riche

a déjà été entreprise par différentes équipes afin d'évaluer leurs effets sur les CSM. La stratégie d'étude développée dans ce chapitre a opté pour une approche différente, car, partant d'un milieu minimum, l'ajout simultané de divers composés par une formulation en plan d'expériences a été entrepris afin d'obtenir un milieu dont la composition est optimisée [1], et ce sans interférence possible due à la présence de SVF ou de lysat humain de plaquettes (LPH) [16].

2 Comparaison de milieux commerciaux

2.1 Effets des hydrolysats de protéines végétales

Les hydrolysats de protéines végétales sont obtenus après hydrolyse enzymatique ou chimique de protéines dérivées de plantes et sont donc composés de nombreux petits peptides et d'acides aminés (particulièrement la glutamine après hydrolyse du gluten). Ils sont largement utilisés en culture de cellules animales pour la production de protéines recombinantes. L'identification des composants actifs des hydrolysats est également complexe [17]. Les hydrolysats sont sujets à des variabilités de lots dues aux différentes sources du matériel végétal, de méthodes d'extraction, d'hydrolyse et de purification. Malgré ces inconvénients, leur utilisation en culture de CSM limiterait le risque sanitaire comparé à des suppléments dérivés d'animaux.

Il a déjà été montré que les hydrolysats végétaux purs de soja (HyPep 1511 et HyPep 1510, Sheffield Bio-science) ou de gluten de blé (HyPep 4601, Sheffield Bio-science) avait un impact négatif sur la croissance des CSM [18]. Le remplacement du SVF a donc été entrepris avec des hydrolysats améliorés : l'un contenant un mélange de riz et de gluten de blé (HyPeP 5603, Sheffield Bio-science) et deux autres contenant des hydrolysats végétaux supplémentés de facteurs de croissance recombinants humains (Shef Vax ACF et Shef Vax ACF Plus, Sheffield Bio-science). La méthode ACF de Sheffield (pour "*animal component free*", ou sans composés animaux) utilise un cocktail enzymatique particulier de protéases et d'hydrolysases non protéolytiques permettant ainsi le relargage, non seulement de peptides, mais aussi de carbohydrates, lipides et vitamines. Cette méthode, en conjonction avec l'ajout de suppléments recombinants, crée des hydrolysats plus riches et donc éventuellement plus à même de soutenir la croissance des CSM.

La croissance des CSM a été suivie par microscopie automatisée au Cellscreen après l'ajout de 4 à 8 g.L⁻¹ d'hydrolysats au milieu de base (composé d' α -MEM avec 1% (v/v) d'antibiotiques, 2 mM de Glutamax et 1 ng.mL⁻¹ de FGF2). Une phase d'adhérence de 24 h en α -MEM-10% SVF a initialement

été réalisée pour toutes les conditions. L'effet sur la croissance des CSM durant une culture de 7 jours est visible sur la figure 51. On constate que le remplacement direct du SVF par ces trois hydrolysats a un effet négatif sur la croissance (croissance inférieure au contrôle en α -MEM seul). Cet effet peut être mitigé par un ajout réduit de SVF (2% v/v), montrant ainsi que certains composés présents seulement dans le SVF sont cruciaux pour stimuler la croissance des CSM, et ce même en petite quantité. Au vu de ces résultats, l'utilisation d'hydrolysats pour le développement d'un procédé de culture de CSM n'est pas une alternative viable à l'utilisation de SVF sans un travail plus approfondi et coûteux en temps.

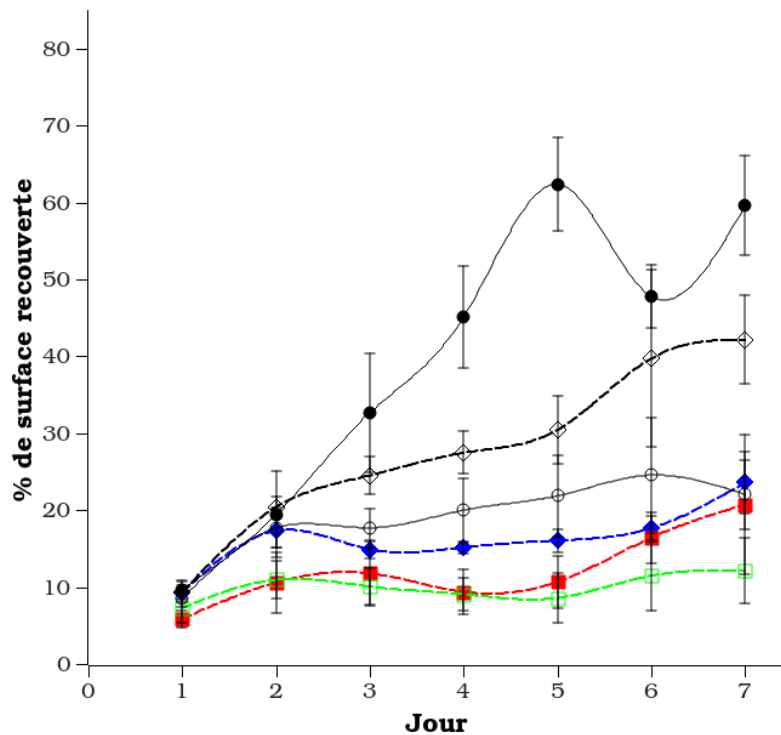


FIGURE 51 – Effet de différents hydrolysats végétaux sur la croissance des CSM humaines observée par microscopie automatisée au Cellscreen en plaque 96-puits (pourcentage de surface recouverte par puits) : α -MEM-VaxACF 8 g.L⁻¹ (◆), α -MEM-VaxACF 8 g.L⁻¹+2% SVF (◇), α -MEM-Vax Plus 4 g.L⁻¹ (■), α -MEM-HyPeP 4 g.L⁻¹ (□), α -MEM+10% SVF (●), α -MEM (○). Les CSM utilisées sont issues d'un donneur de moelle osseuse de 32 ans et à P6. Les barres d'erreur sont exprimées en écarts-types, n=6.

2.2 Milieux complets sans sérum

Plusieurs travaux ont déjà rapporté l'utilisation de milieux sans sérum commerciaux dans le cadre de la culture de CSM :

- milieu PRIME-XV SFM (Irvine Scientific) en culture de CSM sur microporteurs Plastic P-102L (Solohill) enrobés de fibronectine humaine PRIME-XV à $0,1 \mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$ (Irvine Scientific) [19],
- milieu StemPro (Life Technologies) en culture de CSM sur microporteurs Plastic P-102L (Solohill) enrobés de CELLstart CTS (Life Technologies) [20],
- milieux Mosaic SC-SFM (BD) et Mesencult-XF (Stemcell Technologies) en culture de CSM surfacique [21],
- milieux StemPro (Life Technologies), Mosaic SC-SFM (BD) et MSC-T4 (développé en interne par le Cell Science Technology Institute de Sendai au Japon) en culture de CSM surfacique [22],
- milieu MSCGM (Lonza) en culture de CSM sur surface traitée au CellBind (Corning) [23],
- milieux StemPro (Life Technologies) et MSCGM (Lonza) en culture de CSM surfacique [24],
- milieu mTeSR (Stemcell Technologies) en culture de CSM surfacique [25].

Au sein de ces études, une seule a constaté une croissance ralentie des CSM [23], quand toutes les autres ont rapporté des croissances supérieures en milieu sans sérum par rapport au contrôle avec du SVF ou du LPH. L'étude la plus approfondie à ce jour a comparé 4 milieux commerciaux (StemPro de Life Technologies, Nutristem XF de Biological Industries, Mesencult-XF de Stemcell Technologies et StemXVivo SFM de R&D Systems) et 2 milieux développés en interne (BTI-SFM-1 et BTI-SFM-2 du Biotechnology Processing Institute, A*STAR à Singapour), sur des CSM issues de 7 donneurs et 3 sources (moelle osseuse, cordon ombilical, tissu adipocytaire), en culture surfacique et sur microporteurs statiques ou agités [26]. Cette étude extensive permet de conclure également à une meilleure capacité globale des milieux sans sérum commerciaux à soutenir la croissance des CSM mais nuance toutefois ces résultats. En effet, les réponses des CSM sont extrêmement variables selon les donneurs et les résultats obtenus en conditions surfaciques statiques ne se transfèrent pas systématiquement lorsque le système d'adhérence change (surface ou microporteurs agités ou non).

Afin de répliquer ces études avec les banques cellulaires et les méthodes présentes au sein du laboratoire, trois milieux sans sérum commerciaux ont été évalués dans le cadre de ce travail : le milieu StemPro et sa solution d'attachement CELLstart (Life Technologies), le milieu MSC NutriStem XF et sa solution d'attachement de fibronectine recombinante humaine (Biological Industries), et le milieu MSCGM (Lonza). Leur composition détaillée n'est pas connue et seuls les milieux MSCGM et Nutristem sont chimiquement définis. Le Nutristem est le seul des trois à ne contenir aucun composant d'origine animale, mais seul le MSCGM ne requiert pas l'utilisation d'une solution d'attachement extraite de matrice extra-cellulaire (MEC). Les milieux sans sérum développés en interne au sein de laboratoires

de recherche ont également des formulations rarement rendues publiques. Cependant, un milieu pour l'isolement et la culture de CSM sans sérum dont la formulation complète est connue est le PPRF6 (Pharmaceutical Production Research facility de Calgary, Canada) [27]. Il requiert cependant 24 h d'adhérence en milieu avec sérum afin d'initier la culture des CSM. Le milieu PPRF6, comparé à des milieux commerciaux, a été préparé selon la formulation établie par Jung *et al.* [27], à l'exception du DMEM/F12, ici remplacé par de l' α -MEM/F12.

La croissance des CSM dans ces différents milieux a été évaluée par analyse d'images automatisée au Cellscreen et comparée à la croissance des mêmes cellules cultivées en α -MEM+10% SVF. Ces résultats sont présentés sur la figure 52. Tous les milieux commerciaux testés ont permis une croissance des CSM supérieure à celle observée en présence de SVF, alors que le milieu PPRF6 a simplement montré une performance équivalente. Afin d'apporter une information supplémentaire à ces résultats, il a alors été décidé de s'intéresser plus particulièrement à la phase d'adhérence des cellules en étudiant l'impact de l'utilisation de solutions d'attachement lors de la culture de CSM sans sérum.

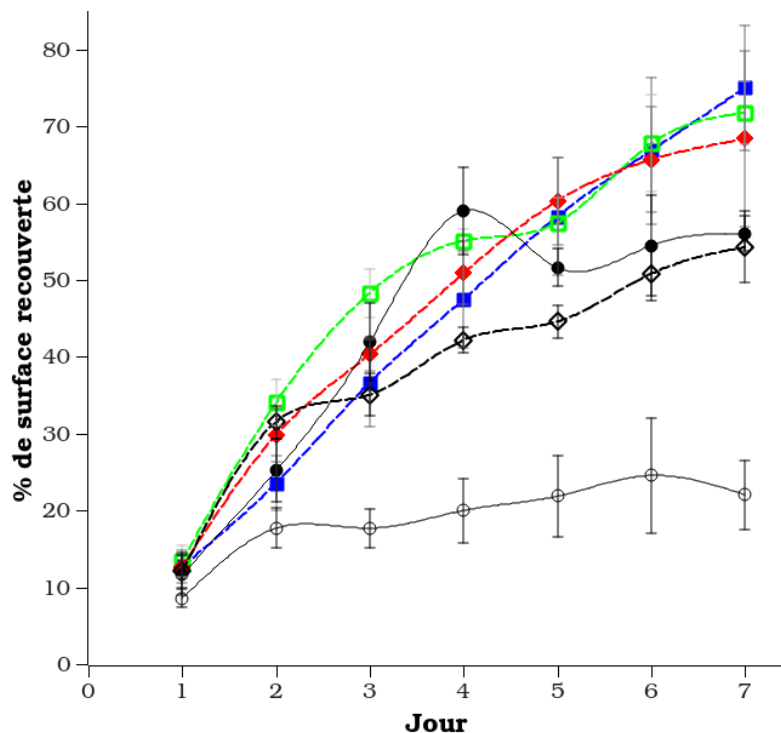


FIGURE 52 – Effet de milieux commerciaux sans sérum sur la croissance des CSM humaines observée par microscopie automatisée au Cellscreen en plaque 96-puits (pourcentage de surface recouverte par puits) : StemPro (■), MSCGM (□), Nutristem XF (◆), PPRF6 (◇), α -MEM+10% SVF (●), α -MEM (○). Les CSM utilisées sont issues d'un donneur de moelle osseuse de 32 ans et à P6. Les barres d'erreur sont exprimées en écarts-types, n=6.

2.3 Adhérence cellulaire

Comme indiqué par les fournisseurs, le MSCGM supporte la croissance des cellules sans nécessité de prétraitement des surfaces d'adhérence par une solution d'attachement, alors que le Stempro, le Nutristem et le PPRF6 en requiert un. La croissance des CSM a donc été évaluée sur plaque 96-puits avec ou sans solution d'attachement CELLStart en milieux Stempro et PPRF6, et avec ou sans solution d'attachement BI (fibronectine humaine recombinante) en milieu Nutristem. Les mesures de croissance ont été faites par microscopie automatisée au Cellscreen et par mesure du pourcentage de réduction de la résazurine au cours du temps (mesure de l'activité du métabolisme cellulaire d'une population). Les résultats obtenus sont visibles sur la figure 53.

Les résultats de croissance avec solution d'attachement présentent des tendances similaires à celles obtenues précédemment, bien que des CSM issues d'un autre donneur aient été utilisées. Le milieu Nutristem supporte la croissance des CSM même en l'absence de traitement de surface, alors que pour les milieux StemPro et PPRF6 on constate une diminution de la surface recouverte par les CSM en l'absence de traitement de surface d'un facteur 4 et 9, respectivement (figure 53, gauche). Ces résultats ne semblent cependant pas être corrélés avec les mesures de l'activité métabolique des cellules mesurées par la réduction de la résazurine au cours du temps (figure 53, droite). Bien que cette méthode ait déjà été utilisée comme mesure indirecte de la quantité de cellules en culture sur microporteurs dans ce travail (figure 40), elle reste sensible à différentes sortes d'interférences [28] : la quantité de protéines dans le milieu [29], le temps d'incubation pouvant mener à la formation d'un composé non coloré, l'hydrorésorufine [30] et l'hétérogénéité cellulaire de la population étudiée ainsi que sa sensibilité aux ROS ou radicaux libres [31]. Dans notre étude, les résultats d'activité métabolique obtenus montrent un artefact évident au vu des images des tapis cellulaires obtenues par microscopie qui confirment l'intérêt des solutions d'attachement (figure 54). On peut en déduire que le passage brutal d'un milieu avec sérum à un milieu sans sérum interfère donc de manière importante avec cette méthode, qui ne serait donc pas adéquate.

Une amplification réussie des CSM *in vitro* semble donc être grandement dépendante de facteurs d'attachement dans le cas des milieux sans sérum StemPro et PPRF6 (figure 54). Certaines études ont déjà abordé l'impact de diverses solutions d'attachement sur la croissance des CSM en milieu avec sérum. Des réponses contradictoires ont été obtenues quant à l'avantage de traiter les surfaces avec des solutions pures de protéines de la MEC (laminine, fibronectine, collagène) ou du Matrigel (assortiment complexe de laminin collagène IV, entactine, protéoglycane, facteur de croissance) pour

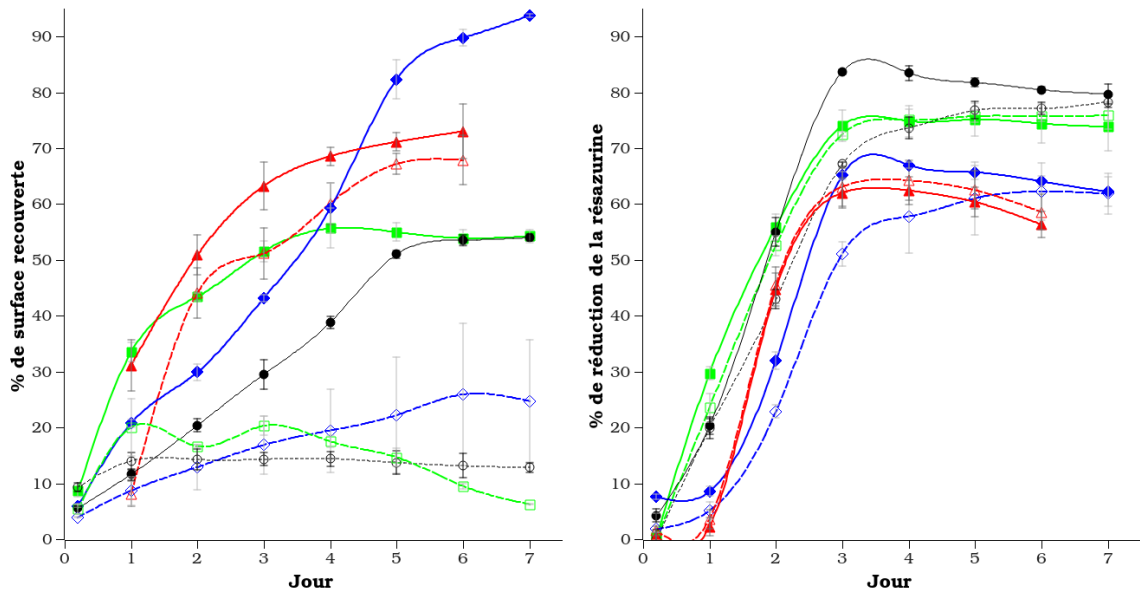


FIGURE 53 – Effet de solutions d’adhérence sur la croissance des CSM humaines lors de culture en milieux commerciaux sans sérum. Résultats observés en plaque 96-puits : à gauche, par microscopie automatisée au Cellscreen (pourcentage de surface recouverte par puits) ; à droite, par spectrophotométrie à 600 nm et 570 nm (calcul du pourcentage de réduction de la résazurine). Les milieux commerciaux sans sérum testés sont : StemPro avec (◆) et sans (◇) CellStart, Nutristem XF avec (▲) et sans (△) solution d’attachement BI, PPRF6 avec (■) et sans (□) CellStart, α -MEM+10% SVF (●), α -MEM (○). Les CSM utilisées sont issues d’un donneur de moelle osseuse de 15 ans et à P5. Les barres d’erreur sont exprimées en écarts-types, $n=6$.

stimuler l’attachement et la croissance des CSM [32, 33]. Seule l’utilisation de polymère synthétique de poly-l-lysine en parallèle d’un milieu contenant du sérum est systématiquement rapportée comme impactant négativement la croissance des CSM [32, 33]. Ces résultats tendent à montrer que les lots de SVF ont un impact non négligeable sur les profils de croissance des CSM. En effet, il a été démontré que l’attachement des CSM à une surface résulte de l’action synergique du sérum et des motifs RGD présentés par la fibronectine ou la vitronectine [34]. En milieu contenant du sérum, c’est donc l’adsorption des protéines sériques (hors albumine) sur les surfaces traitées qui contrôle l’attachement et la croissance des CSM. Or la quantité et composition en protéines sériques sont variables en fonction des lots.

L’étude des solutions de traitement de surface en milieu sans sérum pourrait donc apporter une réponse plus nette quant aux besoins des CSM en facteurs d’adhérence. Cependant, en fonction du milieu sans sérum utilisé, les résultats obtenus sont, là encore, contradictoires. En effet, dans une autre expérience, la comparaison de l’attachement et de la croissance des CSM après traitement

des surfaces en milieu sans sérum StemCell (Cell Culture Technologies) avec celles obtenues en milieu avec sérum a montré une croissance extrêmement limitée, quel que soit le facteur d'adhérence utilisé (collagène IV, fibronectine, laminine, et vitronectine à $5 \mu\text{mol.cm}^{-2}$) [35]. En utilisant le milieu MesenCult-XF (Stemcell Technologies), des facteurs de multiplication jusqu'à deux fois supérieures à ceux obtenues en milieu avec sérum ont pu être générés, en conjonction avec la solution d'attachement MesenCult-ACF (composée de diverses protéines de MEC) ou le polymère synthétique Synthemax (formé d'un polymère d'acrylate greffé d'un motif PQVTRGDVFTMP issu de la vitronectine). Ces résultats, tout comme ceux générés dans ce travail, démontrent l'importance de la complémentarité entre la composition du milieu et la solution d'attachement utilisée. Il faut cependant constater que les milieux α -MEM+10% SVE, MSCGM et Nutristem ne nécessitent pas l'utilisation de prétraitement des surfaces d'adhérence. Pour faciliter l'industrialisation et la montée en échelle de la culture des CSM, l'élimination de cette étape serait extrêmement avantageuse. C'est pourquoi, pour les études suivantes de formulation d'un milieu défini pour la culture de CSM, le parti pris a été de développer une composition ne nécessitant pas de solution d'attachement et d'intégrer les facteurs d'adhérence directement dans le milieu de culture.

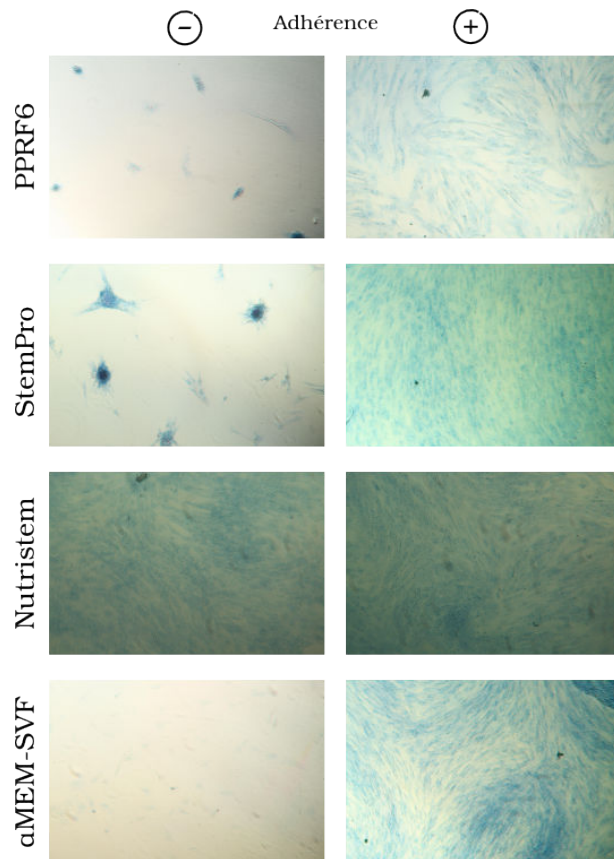


FIGURE 54 – Effet de solutions d’adhérence sur la morphologie des CSM humaines lors de cultures en milieux commerciaux sans sérum : visualisation au microscope photonique à contraste de phase de CSM après coloration au bleu de méthylène à la suite d’une culture en plaque 96-puits d’une durée de 7 jours en milieux commerciaux sans sérum sans traitement des surfaces par une solution d’attachement (à gauche) ou avec (à droite), grossissement $\times 10$.

RÉSUMÉ

- Les hydrolysats protéiques végétaux semblent ne pas pouvoir remplacer efficacement à eux seuls le SVF pour la culture de CSM.
- Les milieux sans sérum commerciaux, avec leur solution d’attachement, stimulent d’avantage la croissance des CSM que la supplémentation en SVF d’un milieu minimum.
- L’efficacité d’adhérence cellulaire est l’un des points clef du développement d’un milieu sans sérum et peut être améliorée, soit par la synergie entre les composants du milieu et le traitement des surfaces d’adhérence, soit par la composition du milieu seule.

3 Étude de la supplémentation de milieux définis pour la croissance des CSM

Les expériences précédentes ont été établies en utilisant des milieux commerciaux sans sérum de composition inconnue et des milieux semi-définis sans sérum (avec ajout d'hydrolysats ou en milieu PPRF6). L'impact de la supplémentation en composés utilisés fréquemment en culture cellulaire a alors été étudiée afin de formuler un milieu sans sérum de composition connue afin de mieux contrôler la croissance des CSM. Le premier axe d'étude s'est focalisé sur la consommation de glutamine et d'acides aminés par les CSM. Le second axe est constitué par le développement séquentiel d'un milieu complexe dont la formulation a été optimisée par DOE.

3.1 Apport en Glutamine

La glutamine est utilisée comme source d'énergie complémentaire au glucose en culture cellulaire et supporte particulièrement la croissance des cellules se divisant rapidement et ayant besoin de synthétiser des protéines et des acides nucléiques en grande quantité. En tant que cellules se divisant lentement, les CSM ont un métabolisme principalement glycolytique et leur dépendance à un apport de glutamine n'a pas été formellement démontrée. En effet, certaines études n'ont visualisé aucun effet sur la croissance des CSM après l'ajout de glutamine [16, 36], quand d'autres ont mesuré sa consommation par les CSM [37] ou noté un effet négatif sur la croissance de CSM porcines en l'absence de glutamine [38]. Toutefois, la glutamine ou la L-alanyl-L-glutamine (Glutamax, Life Technologies) sont systématiquement ajoutées aux milieux de culture des CSM.

La glutamine est instable au pH et à la température physiologiques en milieu liquide, se dégradant spontanément en acide 2(S)-5-oxopyrrolidine-2-carboxylique et ion ammonium. Or, ce dernier peut avoir un effet toxique pour les cellules par l'acidification du cytoplasme et de la matrice mitochondriale [39] (à 2,4 mM pour les CSM humaines) [36]. Le Glutamax est plus stable à 37° C et il a d'ailleurs déjà été montré que son utilisation favorisait la croissance des CSM comparé à l'utilisation de glutamine simple [40]. En effet, la dégradation spontanée en l'absence de cellules de la glutamine est de l'ordre de $5,2 \mu\text{M}\cdot\text{h}^{-1}$ dans nos conditions, alors que celle du Glutamax en glutamine et alanine est quasi nulle (données non montrées). L'hydrolyse du Glutamax dans le surnageant de culture est en effet la résultante de deux phénomènes : la dégradation par les protéases sériques et celle effectuée par la sécrétion de peptidases extracellulaires par les cellules [41].

3. Étude de la supplémentation de milieux définis pour la croissance des CSM

Afin de vérifier l'intérêt du Glutamax comparé à la glutamine pour favoriser la croissance des CSM, une étude a été menée en plaque 6-puits et dans du milieu α -MEM+10% SVF non supplémenté, ou supplémenté par de la glutamine, ou du Glutamax à 2 mM. Les paramètres cinétiques de ces cultures ont été suivis en sacrifiant un puits par jour pendant 6 jours (figure 55 et tableau 22) et en dosant la concentration d'acides aminés dans le surnageant par HPLC aux jours 1, 3 et 6 (figure 56).

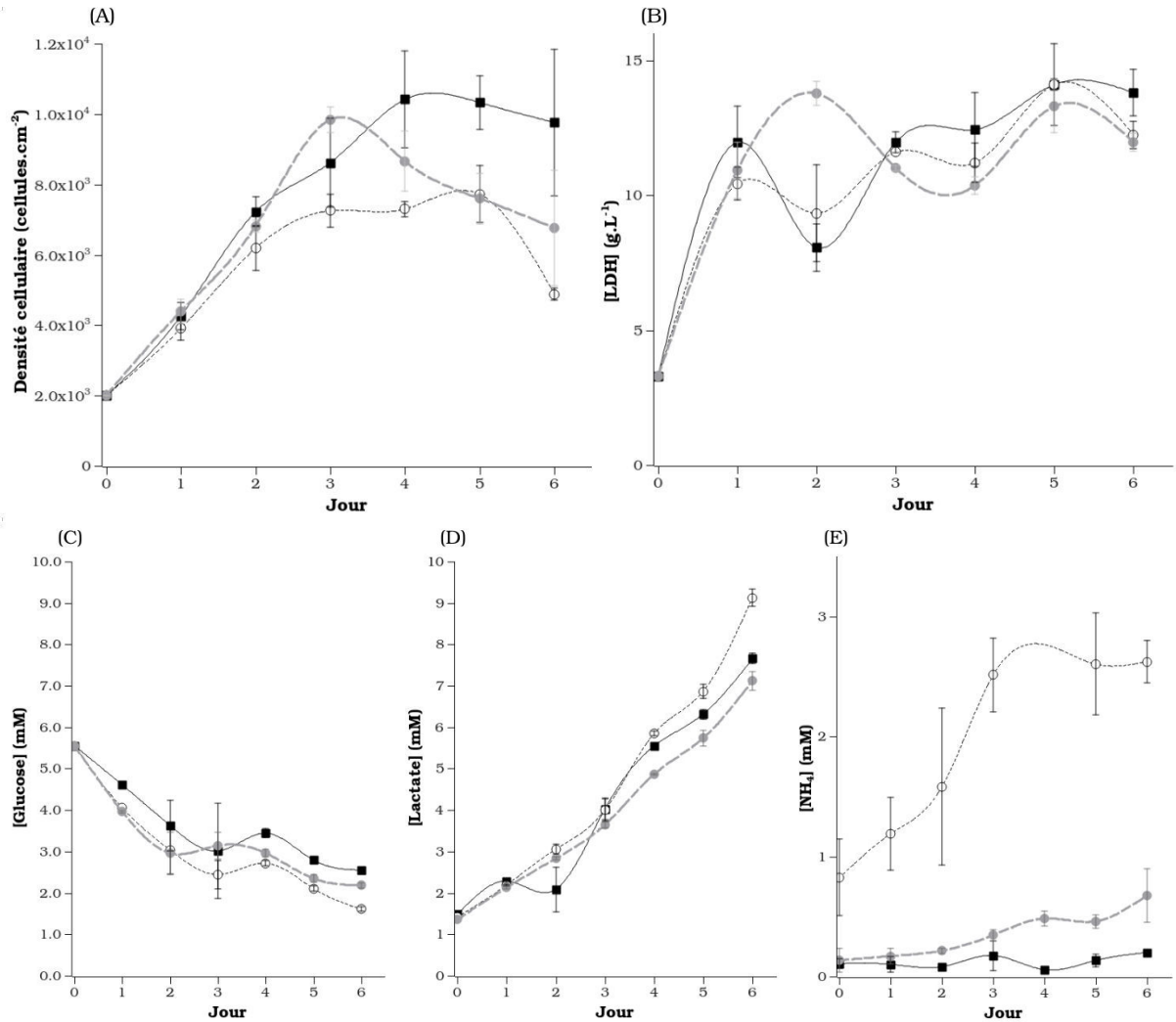


FIGURE 55 – Effet de l'apport en glutamine sur la croissance des CSM humaines en plaque 6-puits : α -MEM+10% SVF (■), α -MEM+10% SVF-2 mM Gln (○), α -MEM+10% SVF-2 mM Gmax (●). (A), densité cellulaire obtenue par comptage au Guava Viacount. (B), évolution de la concentration de LDH dans le surnageant de culture au cours du temps. Évolution de la concentration en glucose (C), lactate (D) et ions ammonium (E) dans le surnageant de culture au cours du temps. Les CSM utilisées sont issues d'un donneur de moelle osseuse de 24 ans et à P4. Les barres d'erreur sont exprimées en écarts-types, n=3.

Une diminution de la concentration cellulaire a été constatée lors de l'ajout de glutamine ou de Glutamax (figure 55, haut et gauche), cette différence devenant visible après 3 jours de culture. Cette supplémentation semble avoir peu d'impact sur l'évolution des concentrations de glucose, de lactate ou sur la lyse des cellules (mesurée indirectement par l'accumulation de LDH dans le milieu extra-cellulaire). Cependant, la quantité des ions ammonium accumulée dans le milieu a dépassé la valeur seuil inhibitrice de 2,4 mM pour la condition supplémentée en glutamine au troisième jour, tendant ainsi à démontrer l'effet inhibiteur des ions ammonium sur la croissance. Ce raisonnement ne peut cependant être appliqué à la supplémentation du milieu de croissance des CSM en Glutamax, cette condition n'ayant jamais dépassé 0,7 mM de NH_4 accumulé dans le milieu extra-cellulaire. Avec un rendement $Y_{Lactate/Glucose}$ de 1,71, il semblerait cependant que l'utilisation de Glutamax ait engagé la population de CSM vers un métabolisme utilisant de manière plus importante la voie aérobie, ce qui, pour une population cellulaire sensible au stress oxydant, pourrait être la cause de la limitation de croissance observée.

Afin de mieux appréhender l'impact des ajouts en glutamine ou Glutamax, le dosage des AA a également été entrepris par HPLC. On constate sur la figure 56 l'absence de variations significatives au cours du temps de la consommation d'AA par les CSM, que ces derniers soient essentiels (HIS, ILE, LEU, MET, THR et VAL ; la PHE et le TRP n'ont pas été dosés) ou non. Une étude similaire a établi que la glutamine était l'acide aminé le plus consommé par les CSM à un taux de $5,6 \cdot 10^{-11} \text{ mmol} \cdot \text{cellule}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ [37]. Au vu de la précision du dosage par HPLC et du taux de dégradation spontanée de la glutamine mesurée, nos résultats ne permettent pas d'affirmer que ces CSM aient consommé de la glutamine.

Ces résultats de suivis de la consommation des AA, dans le cadre du développement d'un milieu sans sérum, tendent à démontrer l'enjeu mineur que constitue le milieu minimum en tant que support pour la croissance des CSM. C'est pourquoi la formulation par plan d'expériences, réalisée ci-après, s'est entièrement focalisée sur l'ajout d'éléments absents des milieux de base comme les facteurs de croissance, hormones ou facteurs d'adhérence. Toutefois, au vu des variabilités de croissance préalablement constatées entre CSM issues de différents donneurs, un mélange de glutamine et de Glutamax a également été pris comme facteur du plan d'expériences.

3. Étude de la supplémentation de milieux définis pour la croissance des CSM

TABLEAU 22 – Effet de l'apport en glutamine sur la croissance des CSM humaines : paramètres macro-cinétiques de cultures

	$\mu_{max,app}$ (h ⁻¹)	X_t (cellules totales)	q_{Gluc} (mmol.cellule ⁻¹ .h ⁻¹)	q_{Lac} (mmol.cellule ⁻¹ .heure ⁻¹)	q_{NH_4} (mmol.cellule ⁻¹ .h ⁻¹)	$Y_{Lactate/Glucose}$
Sans Gln ajoutée	0,0149	$9,8.10^4 \pm 2,1.10^4$	$3,2.10^{-7}$	$5,1.10^{-7}$	$5,7.10^{-9}$	2,1
Gln 2 mM	0,0122	$4,9.10^4 \pm 1,7.10^3$	$4,7.10^{-7}$	$8,4.10^{-7}$	$2,4.10^{-7}$	2,0
Gmax 2 mM	0,0132	$6,8.10^4 \pm 1,7.10^4$	$3,5.10^{-7}$	$5,4.10^{-7}$	$4,6.10^{-8}$	1,7
Schop, 2009 (n=5), Gln 2 mM [36]	0,020	nd	$3,8.10^{-8}$	nd	$6,8.10^{-7}$	2,0
Higuera, 2012 (n=3), Gln 2 mM [37]	0,019	nd	$7,3.10^{-8}$	$1,5.10^{-9}$	nd	2,3

(Gln : glutamine, Gmax : Glutamax, Gluc : glucose, Lac : lactate, NH₄ : ion ammonium, nd : non déterminé)

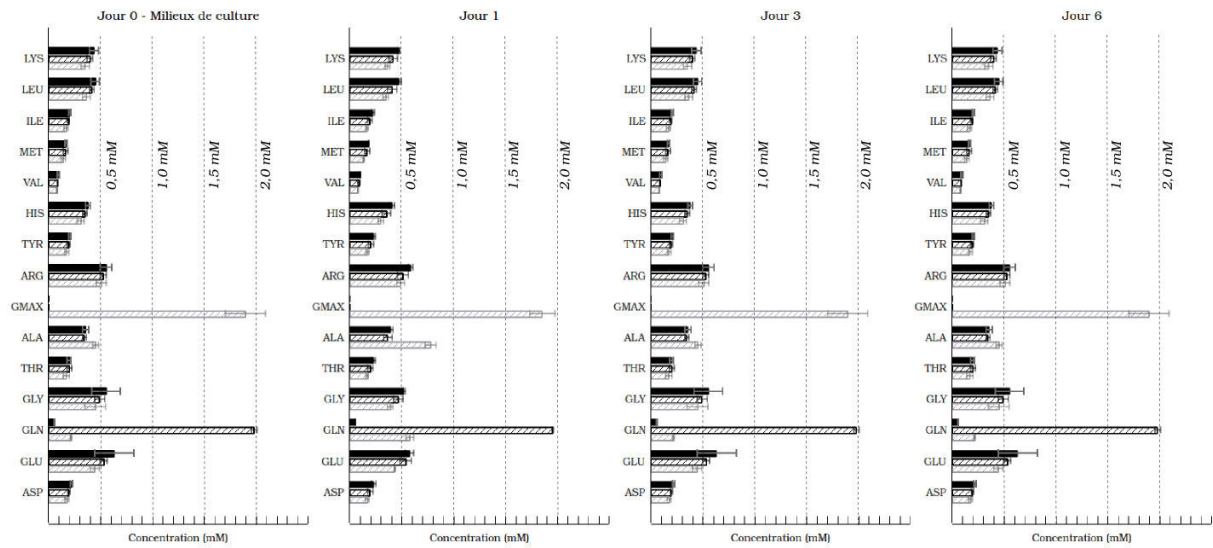


FIGURE 56 – Suivi des acides aminés dans le surnageant de culture en plaque 6-puits par HPLC (données non corrigées par rapport à la dégradation spontanée des AA) : α -MEM+10% SVF (■), α -MEM+10% SVF-2 mM Gln (▨), α -MEM+10% SVF-2 mM Gmax (▩). Les CSM utilisées sont issues d'un donneur de moelle osseuse de 24 ans et à P4. Les barres d'erreur sont exprimées en écarts-types, n=3.

3.2 Formulations par plan d'expériences

Une stratégie de formulation par plan d'expériences a été mise en place pour :

- supprimer le SVF du milieu,
- obtenir un milieu chimiquement défini
- obtenir de meilleures performances de croissance des CSM.

Dans un premier temps, différents composés ont été ajoutés à un milieu inspiré par le milieu PPRF6 [27] pour former le Milieu 1. Le Milieu 1 se différencie du PPRF6 (composition détaillée tableau 25) par 3 aspects :

- Le milieu de base, le DMEM/F12 a été remplacé par l' α -MEM/F12. En conséquence, aucun acide ascorbique n'a été ajouté au milieu, l' α -MEM/F12 en contenant déjà 25 mg.L^{-1} . De plus, la concentration en glutamine fournie par le milieu basal est diminuée de 4 mM à 1,5 mM. C'est pourquoi 2 mM de Glutamax ont également été ajoutés au milieu 1. Une cinétique de croissance a été établie comparant l'utilisation d' α -MEM (milieu minimum de référence dans ces travaux) ou d' α -MEM/F12 comme milieu minimum à la formulation du Milieu 1. Aucune différence en terme de croissance n'a été établie. Cependant, étant donné que le milieu F12 (composition détaillée, voir annexe A.3) apporte des composés non présents dans l' α -MEM seul (oligéléments, hypoxanthine et acide lipoïque), l' α -MEM/F12 a été choisi. L'ajout d'HEPES a également été supprimé pour le Milieu 1.
- De manière similaire, la concentration en FGF2 a été diminuée de 2 à 1 ng.mL^{-1} (concentration du milieu de référence dans ces travaux). Cette diminution a également été démontrée comme n'ayant pas d'effet sur la croissance des CSM en conditions sans sérum.
- Différents suppléments ont été intégrés au milieu par l'intermédiaire d'un cocktail de composés, le B27 (composition détaillée en annexe A.4, les concentrations exactes ne sont pas divulguées). Le supplément B27 (Life Technologies) comprend notamment de la progestérone, de la BSA, de la putrescine, de l'insuline et de la transferrine.

Ce milieu 1, inspiré du PPRF6, a donc été testé sur microplaque 96-puits avec suivi par microscopie automatisée au Cellscreen (figure 57). Une phase d'attachement préalable en sérum n'ayant pas été réalisée (au contraire des recommandations pour l'usage de PPRF6 en culture de CSM), les performances de croissance de ce milieu se sont révélées extrêmement faibles, quoiqu'encourageantes en comparaison de celles obtenues dans les mêmes conditions avec le PPRF6 (figure 53).

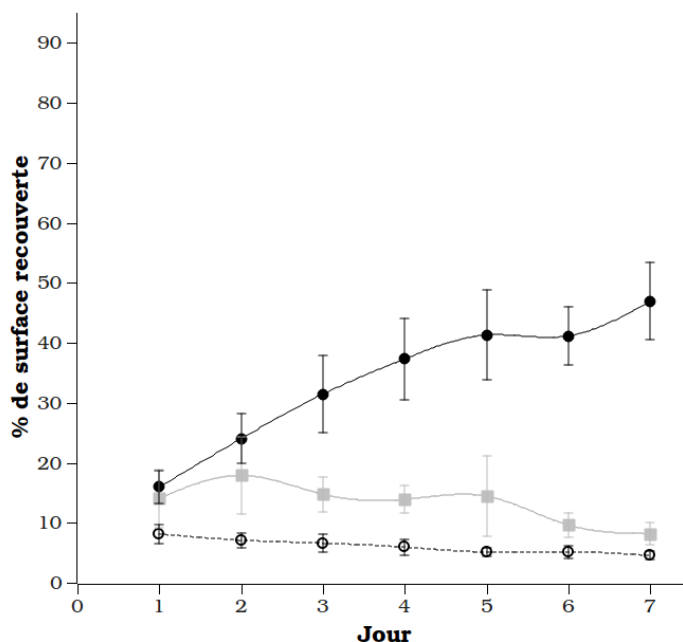


FIGURE 57 – Premier essai de formulation d’un milieu sans sérum pour la croissance des CSM humaines avec un suivi par analyse d’images automatisée au Cellscreen en plaque 96-puits (pourcentage de surface recouverte par puits) : Milieu 1 (■), α -MEM+10% SVF (●), α -MEM (○). Les CSM utilisées sont issues d’un donneur de moelle osseuse de 32 ans et à P6. Les barres d’erreur sont exprimées en écarts-types, n=12.

Dans un second temps, suite à cette expérience préliminaire, la stratégie de formulation d’un milieu sans sérum a été mise en place grâce à l’utilisation du logiciel Modde7. Le milieu de base utilisé pour toutes les conditions était composé de α -MEM/F12, supplémenté par 0,1 mM de β -mercaptoéthanol, 1 ng/mL de FGF2, 1 ng/mL de TGF β 1, 40 ng/mL d’hydrocortisone et 1% v/v d’antibiotiques. Le milieu sans sérum développé à partir du Milieu 1 poursuivait trois objectifs : l’élimination de la fétuine (dérivé sanguin couteux semi-purifié composé de diverses glycoprotéines médiatrices de l’adhérence), le soutien de la croissance des CSM sans traitement de surface, l’obtention d’un coût au litre comparable ou inférieur aux milieux commerciaux (500 à 800 € par litre). À partir d’une analyse de la littérature, les suppléments à tester ont été choisis en fonction des éléments connus de la composition du SVF, du lysat de plaquettes et de milieux sans sérum utilisés pour la culture de CSM [6]. Le détail des suppléments testés est résumé dans le tableau 23. Les concentrations en suppléments ont été déterminées à partir des données de la littérature et des considérations de coût.

À partir de ces facteurs (*i.e.* suppléments utilisés) et leur niveaux (*i.e.* concentrations), le logiciel Modde7 a généré un plan d’expériences de 76 conditions (détaillé Annexe A.5) comprenant 3 réplicats

TABLEAU 23 – Formulation par plan d'expériences 1 : suppléments testés.

Supplément	Intérêt pour la culture de CSM	Concentration recommandée	Référence	Concentrations testées
Glutamax	Remplacement de la glutamine par un composé plus stable	2 mM	[40]	0-2 mM d'équivalent glutamine
Lectine (glycoprotéine végétale)	Analogue de glycopeptide de la fétuine, améliore l'attachement cellulaire	10-20 mg.L ⁻¹	[42, 43]	0-0,3 mg.L ⁻¹
Sérotonine	Inducteur de la différenciation musculaire, présent dans d'autres milieux sans sérum pour CSM	10 µM	[44, 45]	0-10 µM
Oestradiol	Inducteur de la différenciation ostéocytaire, prévient le vieillissement en diminuant la réduction des télomères	0,001-0,1 µM	[46, 47]	0-0,01 µM
IGF1	Inducteur de la différenciation neurale et ostéocytaire, stimule la prolifération des CSM	25-150 µg.L ⁻¹	[48, 49]	0-150 µg.L ⁻¹
LDL	7 mg/L dans le sérum humain, inducteur de l'apoptose (contrôle négatif)	5-10 mg.L ⁻¹	[50]	0-0,4 mg.L ⁻¹
Synthéchol	Stimule la prolifération cellulaire (modèle murin avec cholestérol)	5-15 g.L ⁻¹	[51]	0-21 g.L ⁻¹
Gélatine (collagène dénaturé)	Facteur d'adhérence	Traitement de surface	[52, 53]	0-200 mg.L ⁻¹
Laminine	Facteur d'adhérence	Traitement de surface	[33, 52, 53]	0-0,02 mg.L ⁻¹
Fibronectine	Facteur d'adhérence	Traitement de surface	[33, 53-55]	0-30 mg.L ⁻¹
B27 (cocktail de suppléments)	Inducteur de la différenciation neurale	1X	[56, 57]	0-1X

au point central. Chaque condition correspondait à une colonne de 6-puits en plaque 96-puits. Deux expériences ont été menées en parallèle à partir des mêmes pools de cellules, l'une suivant la croissance caractérisée par la surface et par l'utilisation du Cellscreen, l'autre en termes d'activité métabolique par la réduction de la résazurine au spectrophotomètre. Deux modèles indépendants ont été créés en utilisant le logiciel Modde7, l'un extrapolant la réponse des cellules mesurées au Cellscreen par l'intégrale de la densité cellulaire totale (ITCD) des courbes de croissance obtenues (validité du modèle 0,61 ; reproductibilité 0,92) ; l'autre, basé sur le même principe, mais avec les courbes de réduction de la résazurine (validité du modèle 0,86 ; reproductibilité 0,42).

De manière similaire à l'étude précédente dédiée à l'importance des traitements d'adhérence en milieux sans sérum commerciaux (figure 53), une importante différence a été notée entre les résultats obtenus par l'analyse microscopique de la croissance des CSM et ceux obtenus par spectrophotométrie (réduction de la résazurine). En effet, peu de conditions ont permis une meilleure croissance que celle obtenue avec le contrôle positif en α -MEM+10% SVF lors de l'analyse des surfaces recouvertes

par les CSM, alors qu'avec la résazurine, une grande majorité des milieux l'ont dépassé. Ces deux réponses n'ont donc pas pu être intégrées dans le même modèle. Les failles d'une mesure de l'activité métabolique ont déjà été mises en avant précédemment, en particulier à cause de l'interférence possible de certains composés avec cette mesure. De plus, la visualisation directe des cellules a déjà été démontrée plus fiable en comparaison des mesures indirectes (métaboliques par MTS ou par dosage de l'ADN) [58]. Les mesures de réduction de la résazurine sont donc présentées pour information dans la suite de ce chapitre, mais toutes les conclusions quant à l'intérêt d'un supplément ont été établies à partir des mesures du pourcentage de surface recouverte par les cellules.

Après analyse des réponses et création des modèles de croissance par le logiciel Modde7, peu de facteurs se sont révélés statistiquement significatifs car les différences observées étaient trop faibles par rapport au nombre de réplicats au point central et aux extrémités du modèle. Dans le cas d'une croissance suivie par rapport à la surface occupée par les cellules, la gélatine était un facteur à effet positif, et le supplément B27 négatif (figure 58). La modélisation de l'effet des facteurs d'adhérence (figure 59), tend à montrer l'impact négatif que peut avoir l'ajout de fibronectine directement dans le milieu. La dynamique de l'adsorption des protéines de la MEC au plastique, comparée à celles des cellules, est donc un facteur crucial de l'attachement cellulaire [55, 59].

Afin d'avoir une base plus complète de développement d'un milieu sans sérum, la fonction "*Optimizer*" du logiciel Modde7 a été utilisée. À partir du modèle généré, cette fonction procède à la maximisation de la réponse par itérations (méthode Nelder-Mead), que les facteurs soient statistiquement significatifs ou non. La composition optimisée, appelée Milieu 2, est détaillée dans le tableau 25. Suite à l'élimination du cocktail de suppléments B27, la formulation du Milieu 2 a été modifiée et deux composés ont été ajoutés à cette formulation : la BSA et la progestérone. Cette formulation a également été complétée par l'ajout d'HEPES et de putrescine pour former le Milieu 3 (tableau 25). Seules ces décisions concernant l'ajout d'HEPES et de putrescine n'ont pas été basées sur le modèle obtenu par plan d'expériences, mais par comparaison directe entre les milieux 1 et 2 avec ou sans ajout du supplément.

Les croissances obtenues avec et sans HEPES, BSA, putrescine, et progestérone sont visibles sur les figures 60 et 61. Aucune différence significative n'a été obtenue concernant l'ajout d'HEPES, de BSA ou de putrescine. Or ces facteurs ont été démontrés comme favorables à la croissance des CSM lorsqu'ils étaient intégrés au PPRF6 [27], c'est pourquoi ils ont été maintenus dans la composition des Milieux 2, 3 et 4 (tableau 25). De plus, le remplacement de la BSA par de l'albumine recombinante humaine

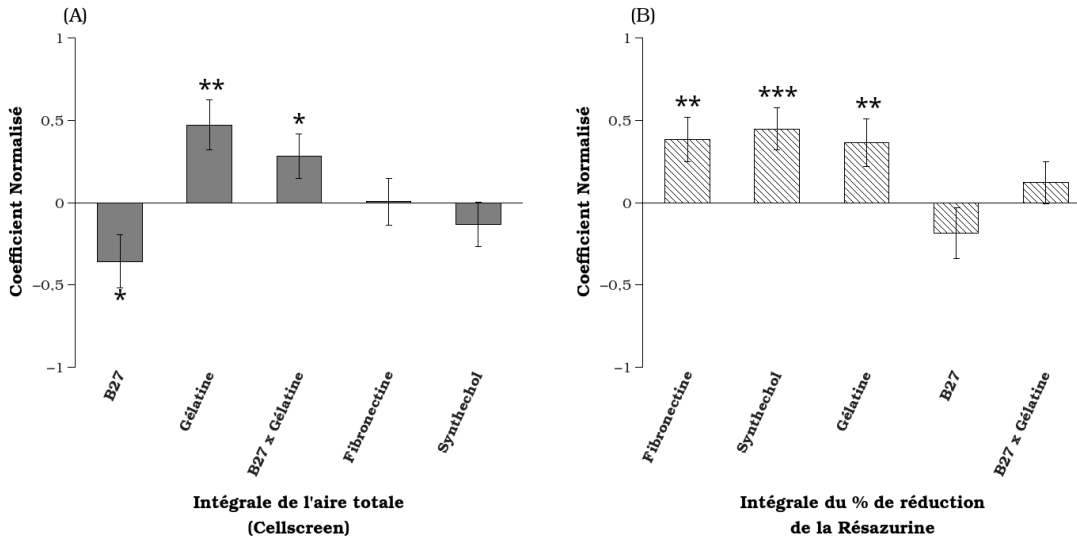


FIGURE 58 – Analyse du plan de formulation par Modde7 : effets significatifs de certains suppléments. Les coefficients ont été normalisés par rapport aux effets cumulés de tous les suppléments utilisés dans le plan de formulation. Ces effets ont été obtenus par l’analyse des intégrales des cinétiques de cultures en plaque 96-puits d’une durée de 7 jours : (A) avec des suivis par microscopie automatisée au Celscreen (■), (B) avec des suivis en spectrophotométrie à 600 nm et 570 nm (calcul du pourcentage de réduction de la résazurine) (▨). L’effet positif ou négatif du supplément sur la valeur de chaque intégrale est significatif selon la valeur de $p < 0,01$ ***; $< 0,05$ **; $< 0,1$ *. Les CSM utilisées sont issues d’un donneur de moelle osseuse de 32 ans et à P6. Les barres d’erreur sont exprimées en écarts-types, n=18.

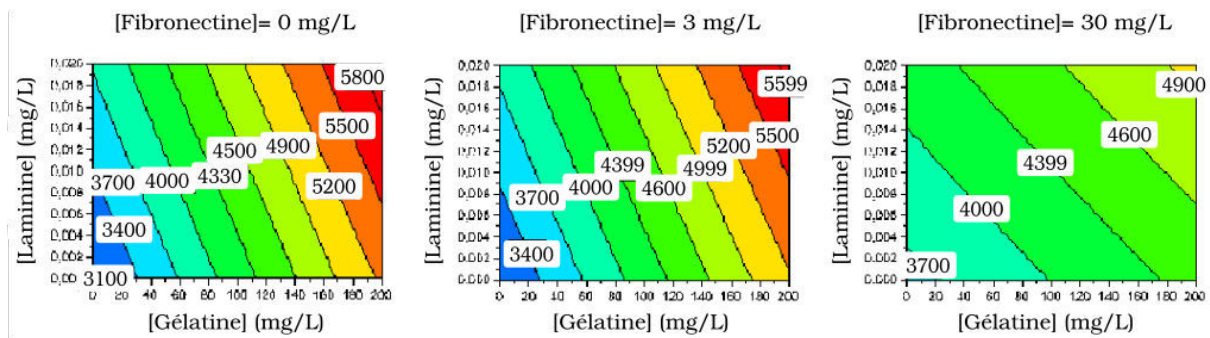


FIGURE 59 – Modélisation des résultats du plan de formulation par Modde7 en fonction de trois facteurs d’adhérence solubles dans le milieu : la fibronectine bovine, la laminine humaine et la gélatine bovine. Les valeurs encadrées correspondent à l’intégrale du pourcentage de surface recouverte par les CSM lors de cultures en plaque 96-puits au cours de cultures de 7 jours suivies par microscopie automatisée au Celscreen. Les CSM utilisées sont issues d’un donneur de moelle osseuse de 32 ans et à P6.

a un effet fortement négatif sur la croissance des CSM (diminution de 40% de la surface recouverte par le cellules). Le seul composé avec un effet fortement positif sur la croissance des cellules est la progestérone (figure 60, droite) avec un accroissement de 50% de la surface recouverte par les CSM lorsque ce dernier fait partie de la composition du Milieu 2.

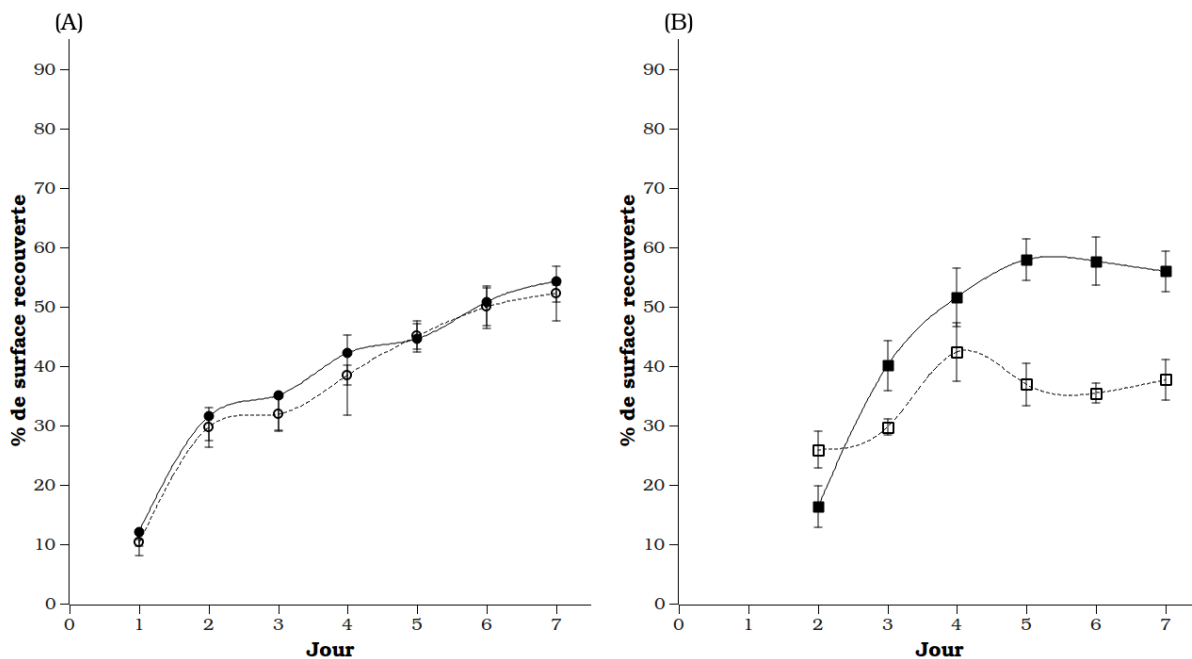


FIGURE 60 – Effet de l'apport en HEPES et progestérone sur la croissance des CSM humaines en plaque 96-puits par un suivi en microscopie automatisée au Cellscreen (pourcentage de surface recouverte par puits). (A), comparaison entre le Milieu 1 sans (○) et un avec de l'HEPES (●) ; les CSM utilisées sont issues d'un donneur de moelle osseuse de 32 ans et à P6 ; une phase d'adhérence de 24 h en α -MEM+10% SVF a été réalisée. (B), comparaison entre le Milieu 2 (■) et ce dernier sans progestérone (□) ; les CSM utilisées sont issues d'un donneur de moelle osseuse de 15 ans et à P5. Les barres d'erreur sont exprimées en écarts-types, n=18.

Afin d'améliorer la composition du Milieu 3, un second plan d'expériences de formulation a été mis en place. Douze nouveaux suppléments ont été identifiés sur la base de leurs propriétés spécifiques (tableau 24). Les concentrations en suppléments ont été déterminées à partir des données de la littérature et des considérations de coût. Le logiciel Modde7 a généré un plan d'expériences de 105 conditions (détaillé Annexe A.6) comprenant 9 réplicats au point central. La même méthodologie que pour le premier plan d'expériences a été appliquée : la croissance des CSM a été suivie par microscopie automatisée au Cellscreen et les ITCD des réponses obtenues ont été intégrés dans un modèle par le logiciel Modde7 afin d'obtenir une formulation optimisée de ces composants par la fonction "Optimizer". La formulation obtenue est détaillée dans le tableau 25 sous le nom de milieu 4.

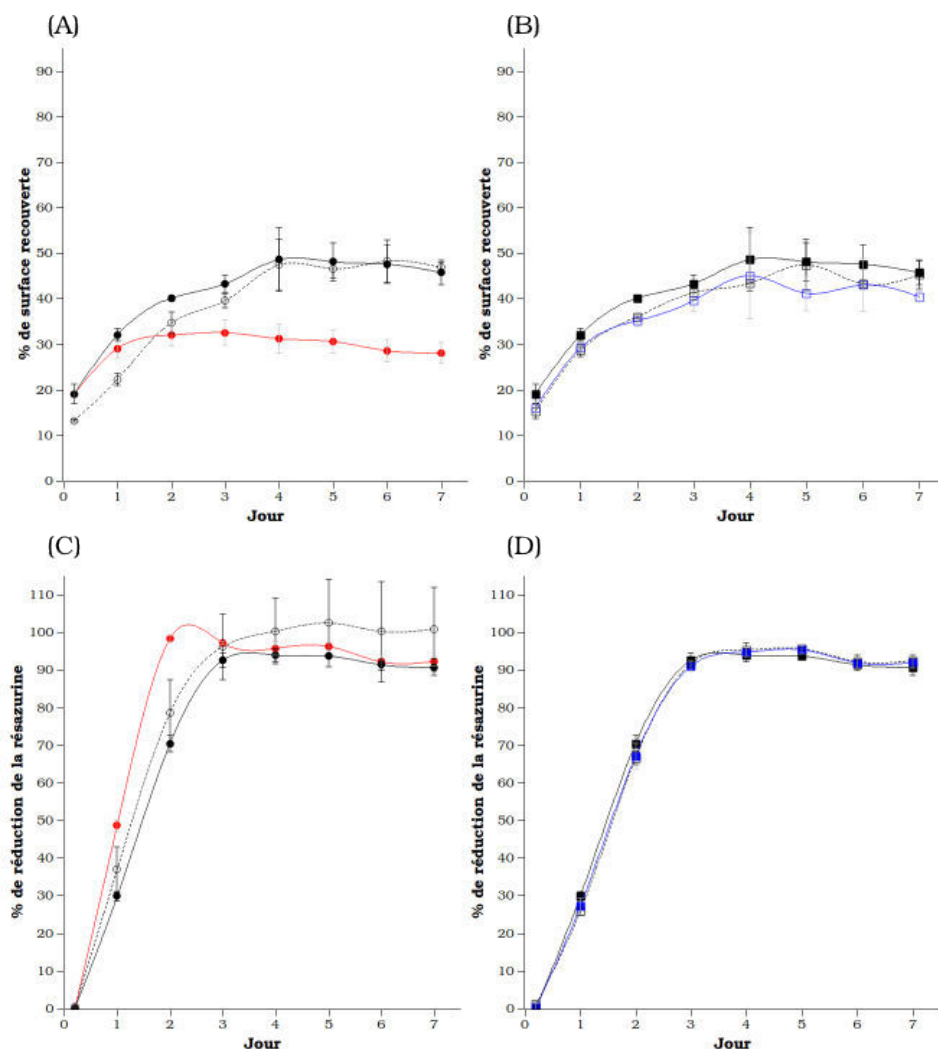


FIGURE 61 – Effet de l'apport en albumine et putrescine sur la croissance des CSM humaines. Résultats obtenus en plaque 96-puits : (A et B), par microscopie automatisée au Cellscreen (pourcentage de surface recouverte par puits) ; (C et D), par spectrophotométrie à 600 nm et 570 nm (calcul du pourcentage de réduction de la résazurine). (A et C), comparaison entre le Milieu 2 (●), ce dernier sans BSA (○), ou avec la BSA substituée par de l'albumine recombinante humaine à 4 g.L^{-1} (●). (B et D), comparaison entre le Milieu 2 (□), ce dernier supplémenté par 9 mg.L^{-1} (■) ou 50 mg.L^{-1} (■) de putrescine. Les CSM utilisées sont issues d'un donneur de moelle osseuse de 15 ans et à P5. Les barres d'erreur sont exprimées en écarts-types, $n=18$.

3. Étude de la supplémentation de milieux définis pour la croissance des CSM

TABLEAU 24 – Formulation par plan d'expériences 2 : suppléments testés

Supplément	Intérêt pour la culture de CSM	Concentration recommandée	Référence	Concentrations testées
EPO	Protection contre le stress oxydant et l'apoptose, prolifération cellulaire, inducteur de la différenciation ostéocytaire	10^4 - 10^5 U.L ⁻¹	[60, 61]	0-0,1 U.L ⁻¹
PDGF	Prolifération cellulaire, stimule la sécrétion vésiculaire, nécessaire à la différenciation adipocytaire, chondrocytaire et angiogénique	10 μ g.L ⁻¹	[62-64]	0-20 μ g.L ⁻¹
SCF	Favorise la prolifération et la migration cellulaire	50-100 μ g.L ⁻¹	[65, 66]	0-20 μ g.L ⁻¹
Adrénaline	Favorise la prolifération et la migration cellulaire	10 μ M	[67]	0-10 μ M
Leptine	Expression du récepteur à la leptine sur 94% des CSM clonogéniques	nd	[68]	0-5 μ g.L ⁻¹
EGF	Favorise la prolifération cellulaire et stimule l'expression de hTERT	10-20 μ g.L ⁻¹	[62, 69]	0-20 μ g.L ⁻¹
Insuline	Favorise la prolifération cellulaire en milieu sans sérum, sans effet avec adjonction de LPH	10-40 mg.L ⁻¹	[16, 27]	0-25 mg.L ⁻¹
Transferrine	Favorise la prolifération cellulaire en milieu sans sérum	5,5-25000 mg.L ⁻¹	[16, 27, 62]	0-25 mg.L ⁻¹
ATP	Protection contre l'apoptose lié à l'élimination du sérum	10 μ M	[70]	0-25 μ M
Acide folique	Protection contre les cassures de l'ADN dues à l'incorporation d'uracile, nécessaire à la différenciation angiogénique	0,4-3,1 mg.L ⁻¹	[44, 71, 72]	1,15-4 mg.L ⁻¹
Héparane sulfate	Favorise la prolifération cellulaire à faible dose, favorise la sénescence au dessus de 100 mg.L ⁻¹ , peut être utilisé comme facteur d'attachement	160 μ g.L ⁻¹ (héparine)	[73-75]	0-1000 μ g.L ⁻¹
Acide ascorbique	Favorise la prolifération cellulaire, protection contre la sénescence due au stress oxydant	35-50 mg.L ⁻¹	[62, 76-78]	25-50 mg.L ⁻¹

(nd : non déterminé)

Les expériences précédentes nous ont permis de passer au crible 25 suppléments usuels des milieux de culture cellulaire afin de soutenir la croissance des CSM en conditions sans sérum. Cependant, les différentes étapes de l'optimisation ont été menées en utilisant une source de CSM de moelle osseuse issue de donneurs différents : donneur de 32 ans à P6 pour la formulation du Milieu 1 et 2, donneur de 15 ans à P5 pour la formulation du Milieu 3 et donneur de 36 ans à P6 pour la formulation du Milieu 4 (détails des banques cellulaires, tableau 9). Afin de valider nos résultats, une expérience finale en comparant en parallèle les Milieux 1, 2, 3 et 4 avec des CSM issues d'un même donneur de moelle osseuse de 24 ans à P4 a donc été réalisée. Des cultures ont été menées en plaque 6-puits et les paramètres cinétiques de ces cultures ont été suivis en sacrifiant un puits par jour pendant 6 jours (figure 62 et 63).

TABLERAU 25 – Évolutions des formulations sans sérum au cours de la stratégie d'optimisation par plans d'expériences. Les références des suppléments sont détaillées dans le chapitre Matériels et Méthodes. Le milieu PPRF6 (Pharmaceutical Production Research Facility, version 6) est un milieu sans sérum développé pour les CSM, de composition connue, à utiliser en conjonction avec une solution d'attachement [27]. Il a servi de base à ce travail de formulation. La composition du supplément B27 est décrite en annexe A-4. Les milieux 2 et 4 ont été optimisés avec Modde7 par la méthode de Nelder-Mead.

	PPRF6		Milieu 1	Milieu 2	Milieu 3	Milieu 4
Milieu de base (v/v)	DMEM F12 Anti-Anti	$50:50$ $50:50$ 1:100	$50:50$ F12 Anti-Anti	$50:50$ $50:50$ 1:100	$50:50$ $50:50$ 1:100	$50:50$ $50:50$ 1:100
Suppléments (v/v)	Concentré défini de lipides	1:1000				
			B27 Synthechol			
	Féruine Glutamine FGF2 TGF β 1 Hydrocortisone	1000 580 2.10^{-3} 1.10^{-3} $3.62.10^{-2}$	Féruine Glutamax FGF2 TGF β 1 Hydrocortisone β - mercaptopéthanol	1000 434 1.10^{-3} 1.10^{-3} 4.10^{-2} 7,813	434 1.10^{-3} 1.10^{-3} 4.10^{-2} 7,813	434 1.10^{-3} 1.10^{-3} 4.10^{-2} 7,813
	Progesterone	$5.66.10^{-3}$	Progesterone	6.10^{-3}	6.10^{-3}	6.10^{-3}
			IGF1	$1.5.10^{-1}$	$1.5.10^{-1}$	$1.5.10^{-1}$
			Estradiol	$2.72.10^{-3}$	$2.72.10^{-3}$	$2.72.10^{-3}$
			Gélatine	200	200	200
			Laminine	2.10^{-2}	2.10^{-2}	2.10^{-2}
			BSA	4000	4000	4000
Suppléments (mg/L)	Albumine hu- maine HEPES Putrescine Insuline bovine Transferrine	4000 1167,68 9 23,29 25,44	HEPES Putrescine Insuline humaine rec. Transferrine SCF EGF ATP Acide folique	1168 9	1168 9	1168 9
	NaHCO ₃ Acide ascorbique	1722,14 50				25 2.10^{-2} 2.10^{-2} 10,1 1,15

Anti-Anti : antibiotiques-antimycotiques; rec : recombinante

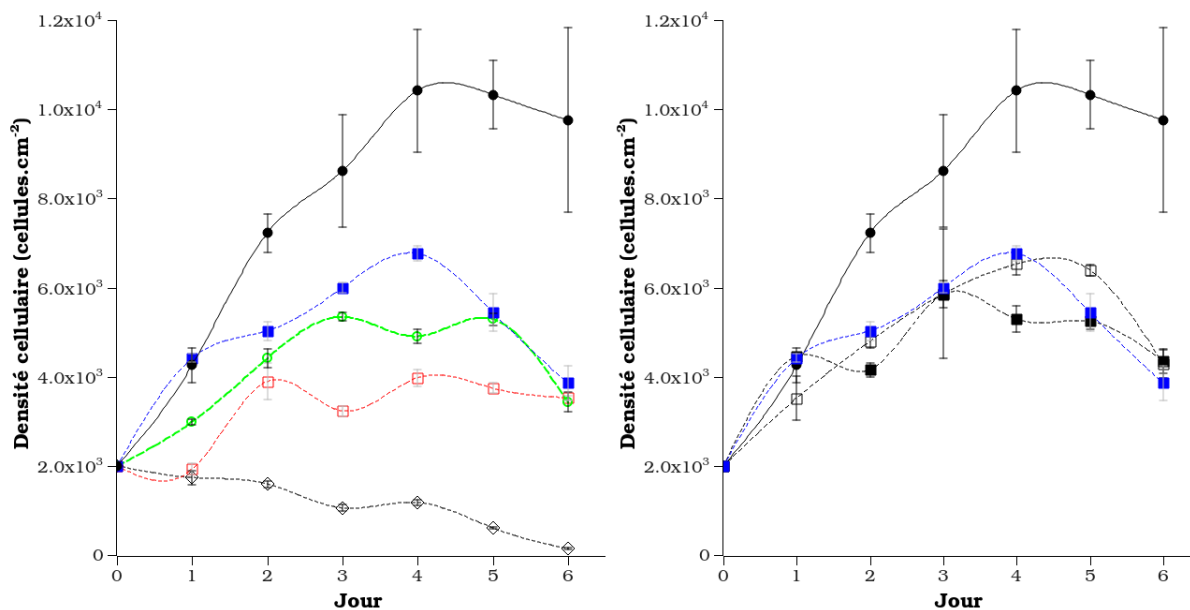


FIGURE 62 – Comparaison des milieux sans sérum de formulation définie : effets sur la croissance des CSM en plaque 6-puits. (A), comparaison des milieux sans sérum : Milieu 1 (\diamond), Milieu 2 (\square), Milieu 3 (\circ), Milieu 4 (\blacksquare), et l' α -MEM+10% SVF (\bullet). (B), comparaison du Milieu 4 (\blacksquare), au Milieu 4 après 24 h d'adhérence en α -MEM+10% SVF (\blacksquare), ou au Milieu 4 en conjonction avec une surface d'adhérence traitée au Geltrex (\square), et à l' α -MEM+10% SVF (\bullet). Les CSM utilisées sont issues d'un donneur de moelle osseuse de 24 ans et à P4. Les barres d'erreur sont exprimées en écarts-types, n=3.

TABLEAU 26 – Comparaison des milieux sans sérum de formulation définie : paramètres macro-cinétiques

	$\mu_{max,app}$ (h ⁻¹)	X_t (cellules totales)	q_{Gluc} (mmol.cellule ⁻¹ .h ⁻¹)	q_{Lac} (mmol.cellule ⁻¹ .h ⁻¹)	$Y_{Lactate/Glucose}$
α -MEM+10% SVF	0,0149	$9,8.10^4 \pm 2,1.10^4$	$3,2.10^{-7}$	$5,1.10^{-7}$	2,1
Milieu 1	0	$1,4.10^3 \pm 1,9.10^2$	$6,3.10^{-8}$	$2,8.10^{-7}$	2,2
Milieu 2	0,0094	$3,5.10^4 \pm 5,0.10^2$	$1,2.10^{-7}$	$3,1.10^{-7}$	1,9
Milieu 3	0,0104	$3,4.10^4 \pm 2,2.10^3$	$1,6.10^{-7}$	$3,0.10^{-7}$	2,0
Milieu 4	0,0102	$3,9.10^4 \pm 3,9.10^3$	$1,3.10^{-7}$	$2,4.10^{-7}$	2,1
Milieu 4 avec adhérence SVF	0,0099	$4,1.10^4 \pm 2,7.10^3$	$2,7.10^{-7}$	$4,7.10^{-7}$	1,8
Milieu 4 avec Geltrex	0,0117	$4,3.10^4 \pm 3,2.10^3$	$1,4.10^{-7}$	$2,5.10^{-7}$	1,9

On constate que les performances du Milieu 4 sur la croissance des CSM sont inférieures à celles du milieu de référence α -MEM+10% SVF (tableau 26). Cependant, une amélioration progressive de la croissance des CSM est visible avec l'évolution des milieux de la formulation 1 à 4. La comparaison des vitesses spécifiques de consommation q_{Gluc} , de production q_{Lac} et du rendement $Y_{Lactate/Glucose}$ montre que l'ajout de suppléments conduit à une meilleure efficacité d'utilisation du glucose par rapport au milieu avec sérum. Le milieu PPRF6 permet de soutenir la croissance des CSM de manière équivalente au contrôle en α -MEM+10% SVF après une phase d'adhérence de 24 h en sérum (figure 52). L'effet d'un meilleur attachement cellulaire a donc également été testé pour le Milieu 4 en étudiant la croissance des CSM dans ce milieu après 24 h d'attachement en sérum ou après traitement des surfaces d'adhérence par une solution de Geltrex (extrait de membrane basale de lignée cellulaire tumorale murine composé de laminine, collagène IV, entactine, et de protéoglycanes à héparane sulfate) (figure 62 et 63 ; et tableau 26). L'utilisation d'une solution d'attachement présente un léger effet positif quant à la croissance des CSM tout en conservant un métabolisme plus efficace. Cependant, les performances de croissance restent inférieures à celles observées dans un milieu contenant du sérum. Certains éléments essentiels à la prolifération cellulaire des CSM manqueraient donc encore à la formulation du Milieu 4.

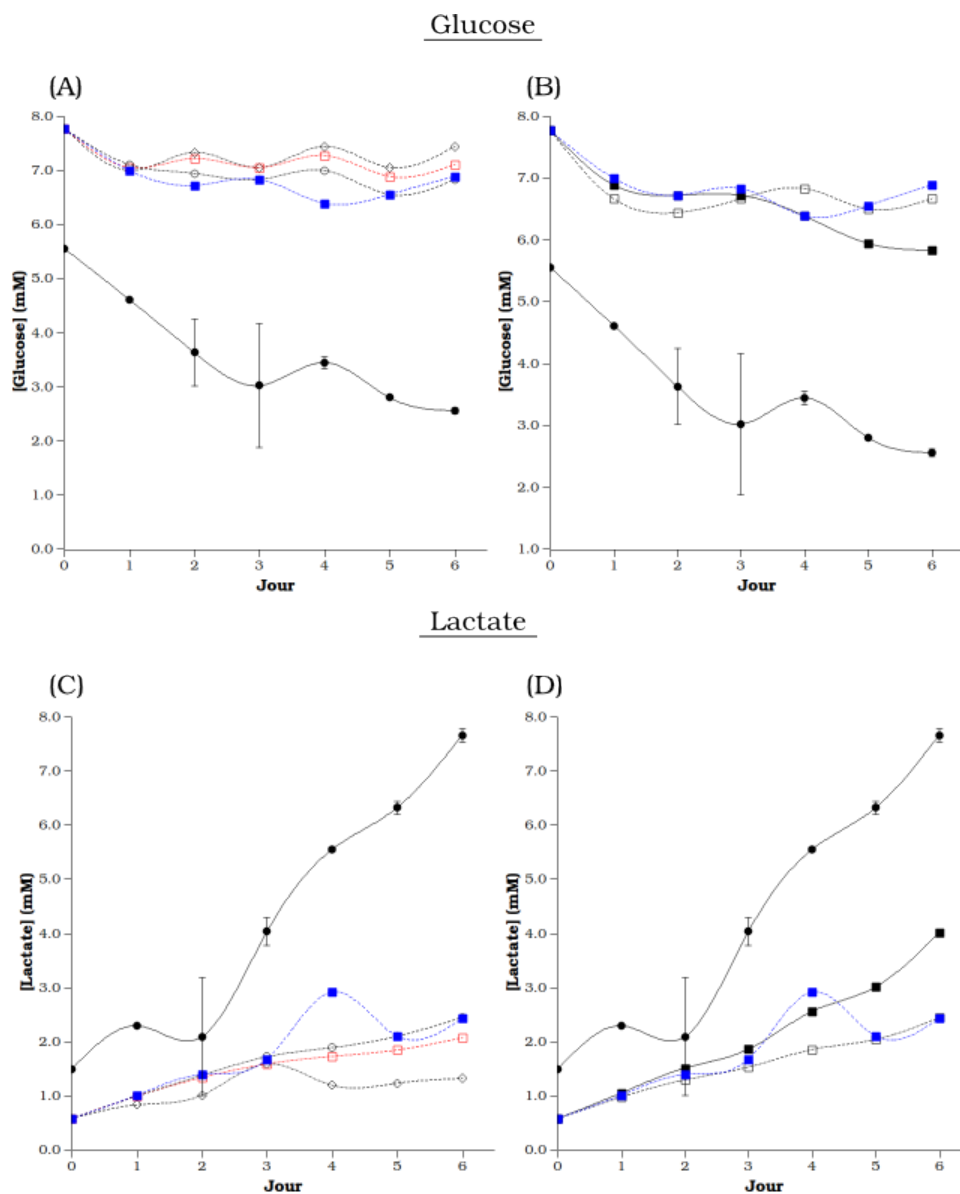


FIGURE 63 – Comparaison des milieux sans sérum de formulation définie : effets sur le métabolisme des CSM (culture en plaque 6-puits) ; (A et B), concentration en glucose dans le surnageant au cours du temps ; (C et D), concentration en lactate dans le surnageant au cours du temps. (A et C), comparaisons des milieux sans sérum : Milieu 1 (\diamond), Milieu 2 (\square), Milieu 3 (\circ), Milieu 4 (\blacksquare), à l' α -MEM+10% SVF (\bullet). (B et D), comparaison du Milieu 4 (\blacksquare), au Milieu 4 après 24 h d'adhérence en α -MEM+10% SVF (\blacksquare), ou au Milieu 4 en conjonction avec une surface d'adhérence traitée au Geltrex (\square), et à l' α -MEM+10% SVF (\bullet). Les CSM utilisées sont issues d'un donneur de moelle osseuse de 34 ans et à P4. Les barres d'erreur sont exprimées en écarts-types, n=3.

RÉSUMÉ

- La glutamine ne semble pas être un élément essentiel de soutien à la croissance des CSM.
- La consommation d'AA des CSM au cours du temps est faible.
- Le développement d'un milieu sans sérum pour la culture de CSM a été entrepris et reste à poursuivre. Avec une vitesse spécifique de croissance réduite de 30%, la quantité maximale de cellules correspond à la moitié de celles obtenues avec sérum. Par contre, un effet sur le métabolisme est observé avec une meilleure efficacité d'utilisation du glucose.
- Sur 25 suppléments usuels des milieux de culture des CSM, 15 ont pu être observés comme facteurs stimulant positivement la prolifération des CSM.

4 Synthèse

L'objectif premier de ce travail était de définir les conditions physiques et biochimiques propices à la prolifération des CSM dans un procédé contrôlé en vue de leur utilisation à plus grande échelle pour un usage thérapeutique. L'utilisation de dérivés sanguins (SVF, sérum humain, LPH) dans le milieu de culture des CSM s'est révélé particulièrement efficace pour soutenir la croissance des CSM [7–10]. Cependant, la composition de ces suppléments est mal définie et augmente le risque sanitaire de leur utilisation.

Des alternatives prêtes à l'usage ont été évaluées dans cette étude : le remplacement du SVF par des hydrolysats de protéines végétales et l'utilisation de milieu sans sérum commerciaux. Les hydrolysats végétaux utilisés, même supplémentés par des facteurs de croissance recombinants humains (Shef Vax ACF et Shef Vax ACF Plus, Sheffield Bio-science), n'ont pas permis de soutenir la croissance des CSM humaines. Au contraire, tous les milieux commerciaux testés ont permis une croissance améliorée de la population de CSM comparée à celle obtenue avec le SVF. Leur composition n'est toutefois pas disponible, et ce manque de données ne permet pas une caractérisation suffisante du procédé d'expansion, et en particulier des mécanismes biologiques sous-tendant la prolifération des CSM (figure 64). Il est possible que des fractions non définies soient présentes dans ces milieux, ce qui n'est pas souhaitable.

Une stratégie de formulation a donc été mise au point, dans laquelle divers suppléments, connus comme favorisant la croissance des CSM, ont été criblés en partant d'un milieu de base (α -MEM, β -mercaptoéthanol, FGF2, TGF β , hydrocortisone) [38]. La formulation par plan d'expériences est la méthodologie qui a été choisie. En effet, l'utilisation de la DOE a déjà été mise en application avec succès pour définir un milieu sans sérum favorisant la croissance des CSM sous forme d'agrégats [79] ou pour optimiser le milieu de production d'anticorps par des lignées CHO [80, 81]. Nos résultats sont mitigés, peu de facteurs s'étant révélés statistiquement significatifs. Le principal intérêt d'une modélisation par DOE, qui est la visualisation d'interactions entre différents facteurs, n'a donc pas pu être obtenu. Cependant, parmi les 25 suppléments préalablement démontrés dans la littérature comme favorisant la croissance des CSM (en conditions avec ou sans sérum selon l'étude concernée), 15 ont pu être confirmés comme favorisant la prolifération cellulaire en conditions définies.

L'apport de LDL, pourtant présent dans le sérum, a déjà été démontré comme favorisant l'apoptose cellulaire sous sa forme oxydée [50]. Le modèle obtenu par DOE lui attribue d'ailleurs un effet négatif

sur la surface recouverte par les CSM (coefficient normalisé de -0,2 ; $p > 0,5$). Cet effet nous permet donc de valider partiellement la formulation optimisée obtenue en suivant notre méthodologie. Le LDL en a d'ailleurs été éliminé par le modèle généré par DOE. Les autres suppléments éliminés comprenaient notamment la lectine, la leptine et l'EPO. Or, dans cette étude, ces derniers ont été étudiés à des concentrations suboptimales en raison de leur coût important. Leur concentration d'intégration à un milieu sans sérum est donc à approfondir avant de pouvoir conclure quant à leur intérêt. De même, l'héparane sulfate, et non l'héparine (plus sulfatée) ou un variant purifié [82], a probablement été ajoutée à une concentration trop importante, la courbure du modèle n'ayant pas permis de déterminer sa concentration optimale. Le cocktail de suppléments B27 (Annexe A.4) a été identifié comme ayant également un effet négatif sur la croissance des CSM. Quoique simplifiant la formulation du milieu et apportant de nombreux additifs connus pour favoriser la croissance des CSM, le B27 reste un cocktail dont les concentrations ne sont pas divulguées, et dont certains composés sont susceptibles d'avoir un effet inhibiteur sur les CSM. Ces derniers pourraient être :

- le glutathion, car le RPMI, qui est le seul milieu de base en contenant, n'est pas propice à la croissance des CSM [16],
- le sélénium, qui peut avoir un effet délétère sur la clonogénicité des CSM [27], bien que ce dernier soit rapporté comme étant un stimulateur de la croissance des CSM en combinaison avec du sérum [83],
- un autre composé présent dans le B27 comme le sélénite de sodium, la carnitine, la corticostéroïde, le galactose, l'acide linoléique, l'acide linoléique, l'acétate de rétynille, la triodo-L-thyronine. En effet, aucune donnée publiée, à notre connaissance, ne permet de conclure quant à l'effet de ces additifs sur la croissance des CSM.

Peu d'études se sont focalisées sur le métabolisme des CSM *in vitro* [36–38] et la plus grande partie de la littérature sur les CSM a utilisé un milieu limité en glucose (de 1 à 4,5 g.L⁻¹ pour l' α -MEM et le DMEM, respectivement) avec un ajout de glutamine à 2 mM. Les données générées dans notre travail en présence de sérum de veau foetal tendent à montrer que l'ajout de glutamine n'est pas nécessaire lorsque les CSM concernées ne présentent pas une prolifération importante. Le remplacement de la glutamine par du Glutamax permet de limiter l'effet inhibiteur de l'accumulation d'ions ammonium dans le milieu de culture sans effet majeur sur les cellules. Cependant, lors de la formulation du milieu sans sérum, l'ajout de Glutamax à un milieu minimum, contenant pourtant déjà de la glutamine, a été considéré par le modèle comme un facteur positif. L'interférence du SVF dans l'interprétation des données générées lors de l'étude des CSM est donc ainsi encore mis en avant.

Il a été montré que les performances de croissance de CSM issues de différents donneurs en milieu contenant du sérum ne pouvaient être corrélées avec celles obtenues par les mêmes CSM en milieu sans sérum commerciaux et que les résultats obtenus variaient de manière importante entre les donneurs [26]. La stratégie de formulation séquentielle développée dans ce travail mériterait de prendre en compte un facteur catégoriel, la source des CSM, pour obtenir un milieu dont la composition s'appliquerait de manière plus généralisée. De même, la formulation d'un milieu sans sérum pour les CSM est spécifique d'un système de culture et les résultats obtenus sur surface plane ne peuvent être transposés directement à l'usage de microporteurs [26]. Le choix de différents milieux de culture pour favoriser l'expansion des CSM est donc dépendant du donneur de CSM, de la surface de culture mais aussi d'un équilibre complexe entre de multiples composés. Ainsi, quoique seulement 50% de la biomasse ait été obtenus en milieu complet défini par rapport aux conditions en présence de SVE, une approche par plan d'expériences avec élimination complète des composants indéfinis (SVE, LPH, B27, fétuine) reste probablement la voie la plus adaptée quant à l'évaluation de chaque supplément d'un milieu de culture. Enfin, cette étude ne s'est intéressée qu'à la prolifération des CSM. Or, la majorité des facteurs de croissance peuvent engager les CSM vers une voie de différenciation ou les faire vieillir prématurément [84]. Idéalement, la mise en œuvre d'un criblage plus étendu de suppléments de culture devrait donc intégrer une méthode analytique à haut débit comme la RT-PCRq pour appréhender, non seulement, leur effet direct sur la croissance des CSM, mais aussi, les éventuelles conséquences sur le phénotype final des cellules.

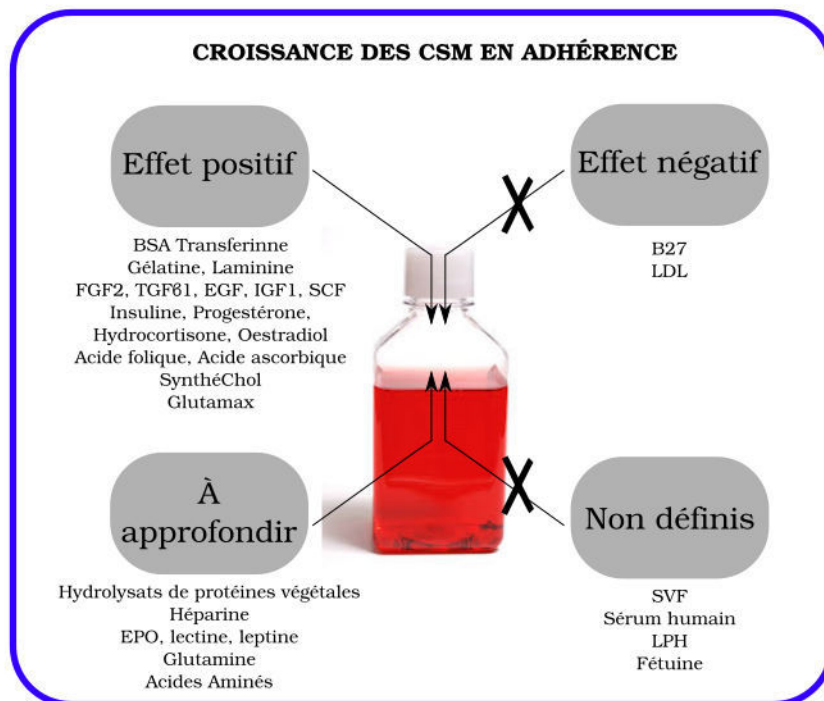


FIGURE 64 – Synthèse des résultats sur la formulation de milieux de culture sans SVF pour CSM.

5 Références bibliographiques

- [1] M BUTLER. Serum and Protein Free Media. In, *Animal Cell Culture*, numéro 9, pages 223–236, 2015.
- [2] F MANNELLO et al. Concise review : no breakthroughs for human mesenchymal and embryonic stem cell culture : conditioned medium, feeder layer, or feeder-free ; medium with fetal calf serum, human serum, or enriched plasma ; serum-free, serum replacement nonconditioned medium, or ad hoc formula ? All that glitters is not gold ! *Stem cells (dayton, ohio)*, 25(7) :1603–1609, 2007.
- [3] M SUNDIN et al. No alloantibodies against mesenchymal stromal cells, but presence of anti-fetal calf serum antibodies, after transplantation in allogeneic hematopoietic stem cell recipients. *Haematologica*, 92(9) :1208–1215, 2007.
- [4] D A BRINDLEY et al. Peak serum : implications of serum supply for cell therapy manufacturing. *Regenerative medicine*, 7(1) :7–13, 2012.
- [5] H HEMEDA et al. Evaluation of human platelet lysate versus fetal bovine serum for culture of mesenchymal stromal cells. *Cytotherapy*, 16(2) :170–180, 2014.
- [6] S GOTTIPAMULA et al. Serum-free media for the production of human mesenchymal stromal cells : a review. *Cell proliferation*, 46(6) :608–627, 2013.
- [7] S GRIFFITHS et al. Human platelet lysate stimulates high-passage and senescent human multipotent mesenchymal stromal cell growth and rejuvenation in vitro. *Cytotherapy*, 15(12) :1469–1483, 2013.
- [8] S CASTIGLIA et al. Inactivated human platelet lysate with psoralen : a new perspective for mesenchymal stromal cell production in Good Manufacturing Practice conditions. *Cytotherapy*, 16(6) :750–763, 2014.
- [9] F ATASHI et al. Autologous Platelet-Rich Plasma : A Biological Supplement to Enhance Adipose-Derived Mesenchymal Stem Cell Expansion. *Tissue engineering part c : methods*, 21(3) :253–262, 2014.
- [10] P R AMABLE et al. Mesenchymal stromal cell proliferation, gene expression and protein production in human platelet-rich plasma-supplemented media. *Plos one*, 9(8) :e104662, 2014.
- [11] C MENARD et al. Clinical-grade mesenchymal stromal cells produced under various good manufacturing practice processes differ in their immunomodulatory properties : standardization of immune quality controls. *Stem cells and development*, 22(12) :1789–1801, 2013.
- [12] A LAITINEN et al. A robust and reproducible animal serum-free culture method for clinical-grade bone marrow-derived mesenchymal stromal cells. *Cytotechnology* :1–16, 2015.
- [13] M LOHMANN et al. Donor Age of Human Platelet Lysate Affects Proliferation and Differentiation of Mesenchymal Stem Cells. *Plos one*, 7(5) :e37839, 2012.
- [14] F PERUT et al. Preparation method and growth factor content of platelet concentrate influence the osteogenic differentiation of bone marrow stromal cells. *Cytotherapy*, 15(7) :830–839, 2013.
- [15] D T SHIH et al. Preparation, quality criteria, and properties of human blood platelet lysate supplements for ex vivo stem cell expansion. *New biotechnology*, 32(1) :199–211, 2015.

- [16] N FEKETE et al. Essential Components for Ex Vivo Proliferation of Mesenchymal Stromal Cells. *Tissue engineering part c : methods*, 20(2) :129–139, 2013.
- [17] M MOSSER et al. Combination of yeast hydrolysates to improve CHO cell growth and IgG production. *Cytotechnology*, 65(4) :629–641, 2013.
- [18] Scott R. Growth of mesenchymal stromal cells in automated microwell cultures : influence of the engineering environment on cell growth kinetics and non-directed differentiation. University College London, 2008.
- [19] T R J HEATHMAN et al. Expansion, harvest and cryopreservation of human mesenchymal stem cells in a serum-free microcarrier process. *Biotechnology and bioengineering*, In Press, 2015. DOI : 10.1002/bit.25582.
- [20] F DOS SANTOS et al. A xenogeneic-free bioreactor system for the clinical-scale expansion of human mesenchymal stem/stromal cells. *Biotechnology and bioengineering*, 111(6) :1116–1127, 2014.
- [21] S GOTTIPAMULA et al. Isolation, expansion and characterization of bone marrow-derived mesenchymal stromal cells in serum-free conditions. *Cell and tissue research*, 356(1) :123–135, 2014.
- [22] K SATO et al. Serum-free isolation and culture system to enhance the proliferation and bone regeneration of adipose tissue-derived mesenchymal stem cells. *In vitro cellular and developmental biology. animal*, In Press, 2015. DOI : 10.1007/s11626-014-9860-0.
- [23] Y WANG et al. Human mesenchymal stem cells possess different biological characteristics but do not change their therapeutic potential when cultured in serum free medium. *Stem cell research and therapy*, 5(6) :132, 2014.
- [24] P WUCHTER et al. Evaluation of gmp compliant culture media for in vitro expansion of human bone marrow mesenchymal stromal cells. *Experimental hematology*, In Press, 2016. DOI : 10.1016/j.exphem.2016.02.004.
- [25] J E HUDSON et al. A defined medium and substrate for expansion of human mesenchymal stromal cell progenitors that enriches for osteo- and chondrogenic precursors. *Stem cells and development*, 20(1) :77–87, 2011.
- [26] K Y TAN et al. Serum-free media formulations are cell line-specific and require optimization for microcarrier culture. *Cytotherapy*, 17(8) :1152–1165, 2015.
- [27] S JUNG et al. Identification of growth and attachment factors for the serum-free isolation and expansion of human mesenchymal stromal cells. *Cytotherapy*, 12(5) :637–657, 2010.
- [28] V M C QUENT et al. Discrepancies between metabolic activity and DNA content as tool to assess cell proliferation in cancer research. *Journal of cellular and molecular medicine*, 14(4) :1003–1013, 2010.
- [29] P GOEGAN et al. Effects of serum protein and colloid on the alamarBlue assay in cell cultures. *Toxicology in vitro*, 9(3) :257–266, 1995.
- [30] J O'BRIEN et al. Investigation of the Alamar Blue (resazurin) fluorescent dye for the assessment of mammalian cell cytotoxicity. *European journal of biochemistry / febs*, 267(17) :5421–5426, 2000.
- [31] S N RAMPERSAD. Multiple applications of Alamar Blue as an indicator of metabolic function and cellular health in cell viability bioassays. *Sensors (basel, switzerland)*, 12(9) :12347–12360, 2012.
- [32] L QIAN et al. Improving the expansion and neuronal differentiation of mesenchymal stem cells through culture surface modification. *Biomaterials*, 25(7–8) :1331–1337, 2004.

- [33] M T LAM et al. Comparison of several attachment methods for human iPS, embryonic and adipose-derived stem cells for tissue engineering. *Journal of tissue engineering and regenerative medicine*, 6(3) :s80–s86, 2012.
- [34] A. A. SAWYER et al. Regulation of mesenchymal stem cell attachment and spreading on hydroxyapatite by RGD peptides and adsorbed serum proteins. *Biomaterials*, 26(13) :1467–1475, 2005.
- [35] De SALZIG et al. Attachment, Growth, and Detachment of Human Mesenchymal Stem Cells in a Chemically Defined Medium. *Stem cells international*, 2016 :e5246584, 2016.
- [36] D SCHOP et al. Growth, metabolism, and growth inhibitors of mesenchymal stem cells. *Tissue engineering. part a*, 15(8) :1877–1886, 2009.
- [37] G A HIGUERA et al. Patterns of amino acid metabolism by proliferating human mesenchymal stem cells. *Tissue engineering. part a*, 18(5-6) :654–664, 2012.
- [38] C FERRARI et al. Investigation of growth conditions for the expansion of porcine mesenchymal stem cells on microcarriers in stirred cultures. *Applied biochemistry and biotechnology*, 172(2) :1004–1017, 2014.
- [39] M SCHNEIDER et al. The importance of ammonia in mammalian cell culture. *Journal of biotechnology*, 46(3) :161–185, 1996.
- [40] P A SOTIROPOULOU et al. Characterization of the optimal culture conditions for clinical scale production of human mesenchymal stem cells. *Stem cells (dayton, ohio)*, 24(2) :462–471, 2006.
- [41] A CHRISTIE et al. Glutamine-based dipeptides are utilized in mammalian cell culture by extracellular hydrolysis catalyzed by a specific peptidase. *Journal of biotechnology*, 37(3) :277–290, 1994.
- [42] S E TOLLEFSEN et al. The B4 lectin from *Vicia villosa* seeds interacts with N-acetylgalactosamine residues alpha-linked to serine or threonine residues in cell surface glycoproteins. *The journal of biological chemistry*, 258(8) :5172–5176, 1983.
- [43] H NISHIMURA et al. Lectins induce resistance to proteases and/or mechanical stimulus in all examined cells—including bone marrow mesenchymal stem cells—on various scaffolds. *Experimental cell research*, 295(1) :119–127, 2004.
- [44] D R MARSHAK et al. Chemically defined medium for human mesenchymal stem cells. *U.s. patent*, 5908782, 1999.
- [45] N HIROTA et al. Serotonin augments smooth muscle differentiation of bone marrow stromal cells. *Stem cell research*, 12(3) :599–609, 2014.
- [46] A BREU et al. Estrogen reduces cellular aging in human mesenchymal stem cells and chondrocytes. *Journal of orthopaedic research : official publication of the orthopaedic research society*, 29(10) :1563–1571, 2011.
- [47] Y GAO et al. Crosstalk between Wnt/beta-catenin and estrogen receptor signaling synergistically promotes osteogenic differentiation of mesenchymal progenitor cells. *Plos one*, 8(12) :e82436, 2013.
- [48] J DOORN et al. Insulin-like growth factor-I enhances proliferation and differentiation of human mesenchymal stromal cells in vitro. *Tissue engineering. part a*, 19(15-16) :1817–1828, 2013.
- [49] T J HUAT et al. IGF-1 enhances cell proliferation and survival during early differentiation of mesenchymal stem cells to neural progenitor-like cells. *Bmc neuroscience*, 15 :91, 2014.

- [50] X LI et al. Cell membrane damage is involved in the impaired survival of bone marrow stem cells by oxidized low-density lipoprotein. *Journal of cellular and molecular medicine*, 18(12) :2445–2453, 2014.
- [51] H LI et al. Cholesterol loading affects osteoblastic differentiation in mouse mesenchymal stem cells. *Steroids*, 78(4) :426–433, 2013.
- [52] F MITTAG et al. Laminin-5 and type I collagen promote adhesion and osteogenic differentiation of animal serum-free expanded human mesenchymal stromal cells. *Orthopedic reviews*, 4(4) :e36, 2012.
- [53] S GRONTHOS et al. Integrin-mediated interactions between human bone marrow stromal precursor cells and the extracellular matrix. *Bone*, 28(2) :174–181, 2001.
- [54] R KULAWIG et al. Identification of fibronectin as a major factor in human serum to recruit subchondral mesenchymal progenitor cells. *The international journal of biochemistry & cell biology*, 45(7) :1410–1418, 2013.
- [55] H KOI et al. Effects of matrix proteins and heparin-binding components in fetal bovine serum upon the proliferation of ectoplacental cone cells in mouse blastocysts cultured in vitro. *Biology of reproduction*, 52(4) :759–770, 1995.
- [56] K A TRZASKA et al. Specification of a Dopaminergic Phenotype from Adult Human Mesenchymal Stem Cells. *Stem cells*, 25(11) :2797–2808, 2007.
- [57] J GENG et al. Decorin promotes myogenic differentiation and mdx mice therapeutic effects after transplantation of rat adipose-derived stem cells. *Cytotherapy*, 14(7) :877–886, 2012.
- [58] G K Y CHAN et al. A simple high-content cell cycle assay reveals frequent discrepancies between cell number and ATP and MTS proliferation assays. *Plos one*, 8(5) :e63583, 2013.
- [59] B LADOUX et al. Physically based principles of cell adhesion mechanosensitivity in tissues. *Reports on progress in physics*, 75(11) :116601, 2012.
- [60] M-H KIM et al. Transduction of human EPO into human bone marrow mesenchymal stromal cells synergistically enhances cell-protective and migratory effects. *Molekuliarnaia biologii*, 44(4) :656–663, 2010.
- [61] J H RÖLFING et al. The osteogenic effect of erythropoietin on human mesenchymal stromal cells is dose-dependent and involves non-hematopoietic receptors and multiple intracellular signaling pathways. *Stem cell reviews*, 10(1) :69–78, 2014.
- [62] B GHARIBI et al. Effects of medium supplements on proliferation, differentiation potential, and in vitro expansion of mesenchymal stem cells. *Stem cells translational medicine*, 1(11) :771–782, 2012.
- [63] F NG et al. PDGF, TGF- β and FGF signaling is important for differentiation and growth of mesenchymal stem cells (MSCs) : transcriptional profiling can identify markers and signaling pathways important in differentiation of MSC into adipogenic, chondrogenic and osteogenic lineages. *Blood*, 112(2) :295–307, 2008.
- [64] T LOPATINA et al. Platelet-derived growth factor regulates the secretion of extracellular vesicles by adipose mesenchymal stem cells and enhances their angiogenic potential. *Cell communication and signaling : ccs*, 12 :26, 2014.
- [65] X CHEN et al. Bioreactor expansion of human adult bone marrow-derived mesenchymal stem cells. *Stem cells (dayton, ohio)*, 24(9) :2052–2059, 2006.

- [66] K BANTUBUNGI et al. Stem cell factor and mesenchymal and neural stem cell transplantation in a rat model of Huntington's disease. *Molecular and cellular neuroscience*, 37(3) :454–470, 2008.
- [67] X WU et al. Adrenaline stimulates the proliferation and migration of mesenchymal stem cells towards the LPS-induced lung injury. *Journal of cellular and molecular medicine*, 18(8) :1612–1622, 2014.
- [68] B O ZHOU et al. Leptin-receptor-expressing mesenchymal stromal cells represent the main source of bone formed by adult bone marrow. *Cell stem cell*, 15(2) :154–168, 2014.
- [69] P SALEHINEJAD et al. Effect of EGF and FGF on the expansion properties of human umbilical cord mesenchymal cells. *In vitro cellular and developmental biology. animal*, 49(7) :515–523, 2013.
- [70] J L BERLIER et al. Adenosine triphosphate prevents serum deprivation-induced apoptosis in human mesenchymal stem cells via activation of the MAPK signaling pathways. *Stem cells (dayton, ohio)*, 33(1) :211–218, 2015.
- [71] N HARIDAS et al. Establishment of Impaired Angiogenesis Using Human Placental Mesenchymal Stem Cells under Micronutrient Deficiency. *Translational medicine*, 6(1), 2016.
- [72] M FENECH. Folate (vitamin B9) and vitamin B12 and their function in the maintenance of nuclear and mitochondrial genome integrity. *Mutation research/fundamental and molecular mechanisms of mutagenesis*, 733(1–2) :21–33, 2012.
- [73] L LING et al. Effect of heparin on the biological properties and molecular signature of human mesenchymal stem cells. *Gene*, 576(1, Part 2) :292–303, 2016.
- [74] H HEMEDA et al. Heparin concentration is critical for cell culture with human platelet lysate. *Cytotherapy*, 15(9) :1174–1181, 2013.
- [75] J LEI et al. Cell number and chondrogenesis in human mesenchymal stem cell aggregates is affected by the sulfation level of heparin used as a cell coating. *Journal of biomedical materials research part a, In Press*, 2016. DOI : 10. 1002/jbm. a. 35713.
- [76] S H BAE et al. L-Ascorbic acid 2-phosphate and fibroblast growth factor-2 treatment maintains differentiation potential in bone marrow-derived mesenchymal stem cells through expression of hepatocyte growth factor. *Growth factors (chur, switzerland)* :1–8, 2015.
- [77] C WEI et al. Effects of vitamin C on characteristics retaining of in vitro-cultured mouse adipose-derived stem cells. *In vitro cellular & developmental biology. animal*, 50(1) :75–86, 2014.
- [78] S-G JEONG et al. Endogenous ROS levels are increased in replicative senescence in human bone marrow mesenchymal stromal cells. *Biochemical and biophysical research communications*, 460(4) :971–976, 2015.
- [79] S ALIMPERTI et al. Serum-free spheroid suspension culture maintains mesenchymal stem cell proliferation and differentiation potential. *Biotechnology progress*, 30(4) :974–983, 2014.
- [80] Y ROUILLER et al. A high-throughput media design approach for high performance mammalian fed-batch cultures. *Mabs*, 5(3) :501–511, 2013.
- [81] H ZHANG et al. Rational development of a serum-free medium and fed-batch process for a GS-CHO cell line expressing recombinant antibody. *Cytotechnology*, 65(3) :363–378, 2012.
- [82] S Je WIJESINGHE et al. Affinity Selection of FGF2-Binding Heparan Sulfates for Ex Vivo Expansion of Human Mesenchymal Stem Cells. *Journal of cellular physiology, In Press*, 2016. DOI : 10. 1002/jcp. 25454.

- [83] H ALVES et al. Effect of antioxidant supplementation on the total yield, oxidative stress levels, and multipotency of bone marrow-derived human mesenchymal stromal cells. *Tissue engineering. part a*, 19(7-8) :928-937, 2013.
- [84] Y W EOM et al. The role of growth factors in maintenance of stemness in bone marrow-derived mesenchymal stem cells. *Biochemical and biophysical research communications*, 445(1) :16-22, 2014.

Chapitre 6

Impact du procédé d'amplification sur la qualité des CSM produites en vue d'un usage thérapeutique

Sommaire

1	Introduction	249
2	Impact du procédé d'amplification sur l'identité des CSM	250
2.1	Présence ou absence des antigènes de surface	250
2.2	Potentiel de différenciation en ostéocytes, chondrocytes et adipocytes	251
3	Impact des procédés d'amplification sur le vieillissement des CSM	256
3.1	Suivi du caractère souche en cours de culture	256
3.2	Suivi de l'acquisition d'un phénotype sénescence	257
4	Synthèse	265
5	Références bibliographiques	268

RÉSUMÉ : Les CSM sont envisagées comme un produit thérapeutique à part entière, bien que ces cellules aient des caractéristiques encore mal définies *in vivo* et *in vitro*. Même si peu de données sont disponibles quant aux caractéristiques cellulaires menant à l'efficacité clinique des thérapies cellulaires, des éléments laissent penser que leurs capacités de différenciation ou d'immunomodulation sont grandement dépendantes de leur sensibilité au vieillissement. C'est pourquoi, plusieurs techniques d'analyses ont été mises en places afin d'évaluer l'impact du procédé de culture sur l'identité et la qualité des CSM. Ces méthodes étaient : l'analyse du profil des antigènes de surface des CSM par cytométrie capillaire, l'étude de leur capacité de différenciation par marquage histochimique, le suivi de l'expression génique, l'analyse du caractère souche des CSM, et enfin, la caractérisation de la sénescence cellulaire par marquage histochimique, le suivi de l'expression génique par RT-PCRq, la quantification de la longueur des télomères et la quantification de dommages causés sur l'ADN génomique. En fonction de l'attribut qualitatif abordé, le procédé de culture a présenté divers types d'impacts sur les CSM. L'identité des CSM récoltées après amplification n'a cependant pas été remise en cause, même s'il subsiste un doute quant à leur intérêt thérapeutique au vu de leur vieillissement accéléré en cours de culture.

1 Introduction

Les CSM sont amplifiées *in vitro* en vue de leur utilisation comme produit cellulaire thérapeutique. L'étude de la qualité des cellules obtenues après amplification est donc une étape nécessaire pour évaluer l'efficacité du procédé de culture. Cette validation requiert des méthodes d'analyse diverses (cytométrie, marquage histochimique, expression génique, figure 65). La caractérisation des CSM doit donc permettre, au minimum, de vérifier que la population cellulaire finale ne dévie pas des limites établies par la Société Internationale de Thérapie Cellulaire (ISCT) [1]. Toutefois, une analyse plus approfondie de la réponse cellulaire, en particulier du vieillissement biologique, pourrait également être utile lors du développement d'un procédé d'amplification à grande échelle des CSM. Ces caractéristiques, détaillées dans l'article de revue intégré au chapitre 1 (en anglais, chapitre 1, section 1.3.3), sont résumées ci-dessous.

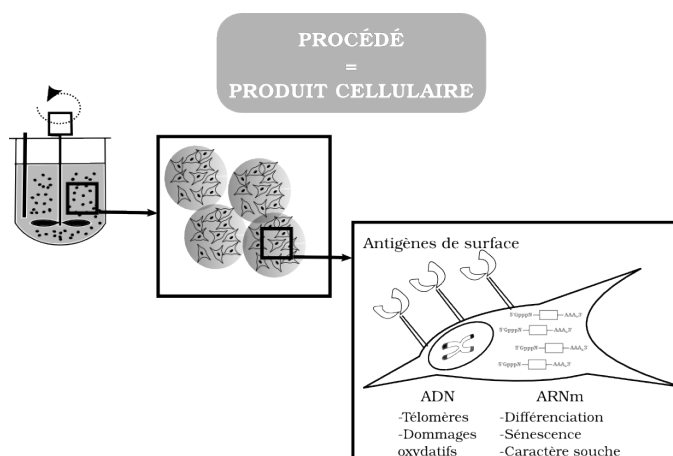


FIGURE 65 – Problématiques de la caractérisation des CSM lors de la mise en place d'un procédé de culture sur microporteurs en bioréacteurs agités.

La définition des CSM, établie en 2006 [1], détermine l'identité des CSM sur 3 critères : l'adhérence au plastique en milieu contenant du SVE, la présence/absence de marqueurs de surface donnés et la multipotence en 3 lignages, ostéocytaire, chondrocytaire et adipocytaire (tableau 4). La discrimination des marqueurs de surface est effectuée par cytométrie : les marqueurs CD73, CD90 et CD105 doivent être détectés sur plus de 95% de la population cellulaire tandis que les marqueurs CD34, CD45, CD14, CD79 α , et HLA-DR ne doivent être détectés que sur moins de 2%. Bien que non intégrées dans la définition courante des CSM, certaines autres caractéristiques, liées au vieillissement ou au caractère souche de ces cellules, peuvent aussi être suivies. Le caractère souche se détermine, soit, par l'auto-renouvellement des cellules (clonogénicité), soit, par l'expression de marqueurs de pluripotence

(facteurs de transcription Oct-4, Nanog, Sox2). Le vieillissement cellulaire se traduit de multiples façons : la morphologie des cellules est modifiée (accroissement de leur taille et de la quantité de β -galactosidase au niveau des lysosomes), leurs télomères se raccourcissent, des dommages de l'ADN peuvent survenir, et certains transcrits régulant le cycle cellulaire (p16^{INK4A}, p53, p21^{WAF1}) sont surexprimés, orientant ainsi les CSM vers la quiescence ou la sénescence.

Toutes ces méthodes d'analyse ont été mises en place dans ce travail. Elles ont été mises en œuvre au cours des études précédentes, quand ces dernières permettaient de récolter suffisamment de cellules :

- l'étude de l'impact de l'agitation sur la croissance des CSM sur microporteurs en bioréacteurs (chapitre 5, section 4.3.3),
- l'étude de la comparaison de différentes méthodes de régulation de température (chapitre 5, section 4.3.4),
- et finalement, une étude de la comparaison de l'effet de la densité d'ensemencement, avec ou sans ajout de SVF, en boîtes de culture statique.

2 Impact du procédé d'amplification sur l'identité des CSM

2.1 Présence ou absence des antigènes de surface

Les antigènes de surface, aussi appelés clusters de différenciation (CD), ont été détectés grâce à des anticorps conjugués à une molécule fluorescente (PE ou FITC) par cytométrie capillaire. Ces marquages ont été effectués selon le protocole transmis par le laboratoire d'Ingénierie Moléculaire et Physiopathologie articulaire (IMoPA, UMR7365, Nancy, France) et détaillés dans le chapitre Matériels et Méthodes en section 2.4.3 [2]. Les marqueurs CD44 et CD166 ne sont pas présents dans le panel officiel de l'ISCT. Cependant, il a déjà été démontré que, seule une partie minoritaire de la population de CSM de moelle osseuse présentait l'antigène CD44 [3], et que l'antigène CD166 était sous exprimé lorsque les CSM étaient induites vers une voie de différenciation [4]. Ces deux marqueurs ont donc également été analysés. Le suivi des antigènes de surface caractéristiques des CSM a été effectué avant et après amplification de CSM sur microporteurs en minibioréacteurs (figure 66). On constate que, quelle que soit la puissance dissipée par l'agitation pendant 7 jours de culture, aucune différence significative n'a été détectée en termes d'expression des marqueurs de surface. L'identité de la population cellulaire n'a donc pas été modifiée par le procédé de culture.

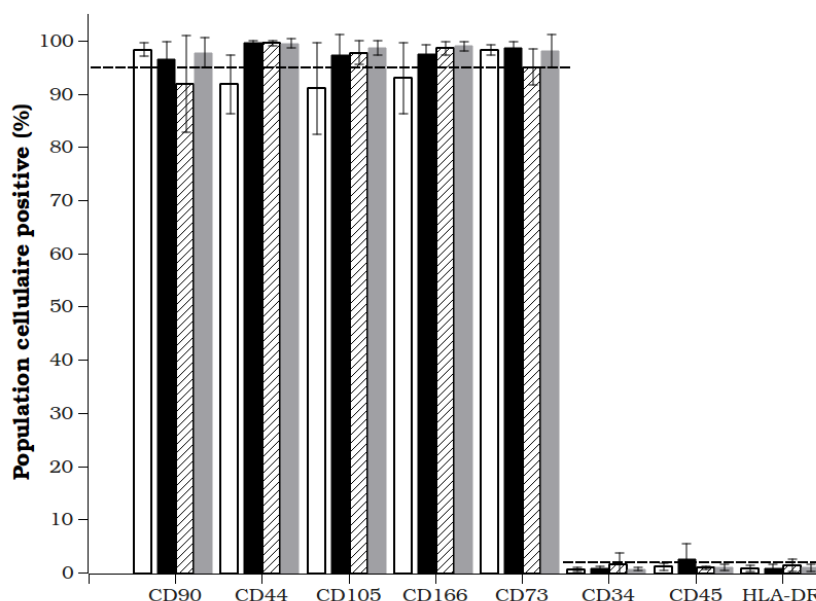


FIGURE 66 – Analyse de la présentation des antigènes de surface caractéristiques des CSM (présence \geq 95% de CD90, CD44, CD105, CD166, CD73 ; et absence \leq 2% de CD34, CD45 et HLA-DR) par cytométrie capillaire au Guava (Millipore) de CSM issues d'un donneur de moelle osseuse de 15 ans et à P5 (□) lors d'une préculture avant ensemencement sur microporteurs Cytodex 1. Après culture de 7 jours en minibioréacteurs à $P= 3,2.10^{-5}$ W (■), $P= 24.10^{-5}$ W (▨), et $P= 45.10^{-5}$ W (■), ces CSM ont été récoltées sur boîtes et analysées en parallèle de la préculture. Les barres d'erreur sont exprimées en écarts-types, $n=4$.

Les CSM cultivées ici étant issues d'une population préalablement purifiée, il semblerait que peu de conditions conduisent les CSM à modifier leur phénotype surfacique. A notre connaissance, seuls des changements du milieu de culture, ont été rapportés comme modifiant la présence des antigènes de surface lors de l'amplification des CSM [5].

2.2 Potentiel de différenciation en ostéocytes, chondrocytes et adipocytes

Après amplification, les CSM doivent avoir gardé leur potentiel de différenciation en vue de leur utilisation clinique en ingénierie tissulaire. La technique classique pour évaluer cette capacité est d'induire la différenciation par la mise en culture des CSM amplifiées à une densité d'ensemencement critique dans un milieu contenant les facteurs de différenciation adéquats. La différenciation est ensuite évaluée par marquage histochimique. Cette méthode a été utilisée pour comparer la capacité de différenciation avant et après amplification de CSM sur microporteurs en minibioréacteurs à deux puissances dissipées d'agitation. Par cette méthode qualitative, sur la figure 67, on constate que, quelles

que soient les conditions d'amplification, toutes les populations de CSM ont conservé leur capacité de différenciation en trois lignages.

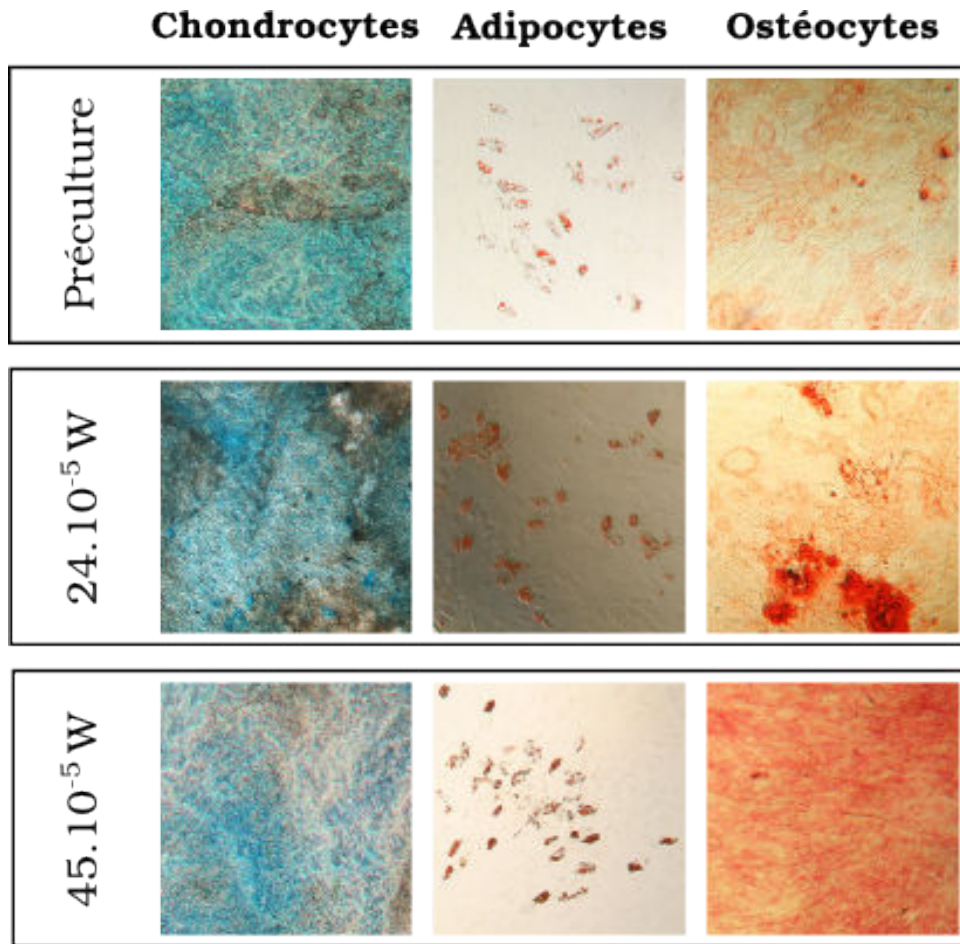


FIGURE 67 – Visualisation de la différenciation des CSM après cultures sous différentes puissances dissipées en minibioreacteurs (7 jours), par microscopie photonique à contraste de phase après marquage histochimique (grossissement $\times 10$) : différenciations en chondrocytes, adipocytes, et ostéocytes induites par culture de 21 jours dans des milieux de différenciation Stempro (Life technologies). Les marquages histochimiques révèlent : la présence d'adipocytes en rouge par l'Oil Red (coloration des vésicules lipidiques), la présence d'ostéocytes en rouge par l'alizarine (coloration des précipités calciques), la présence de chondrocytes en bleu par le bleu alcian (coloration des agrécanes).

Ces résultats doivent cependant être nuancés car cette méthode ne permet pas d'évaluer la proportion de CSM s'étant différenciée au sein de la population induite, et il est aisé de constater que la totalité des CSM ne s'est pas différenciée. En parallèle des marquages histochimiques, un suivi des marqueurs de l'expression génique de la différenciation a donc aussi été effectué par RT-PCRq. Au vu des quantités importantes de cellules nécessaires pour les essais de différenciation et l'extraction des ARN, seules les CSM cultivées sous conditions d'agitation élevée, où le nuage de microporteurs était

entièrement en suspension, ont pu être récoltées en assez grande quantité pour effectuer ces mesures en parallèle. Les quantités de six transcrits ont été mesurées relativement à celles des niveaux d'expression de la préculture non induite à la différenciation. Les six transcrits choisis sont des marqueurs de l'orientation précoce ou tardive vers le lignage chondrocytaire (COL2A et ACAN respectivement), adipocytaire (FABP4 et LPL respectivement) et ostéocytaire (ALPL et BGLAP respectivement). Les résultats obtenus sont visibles sur la figure 68. On constate que, contrairement aux résultats précédents obtenus par marquage histochimique, la capacité de différenciation des CSM a été modifiée après une culture de 7 jours sur microporteurs.

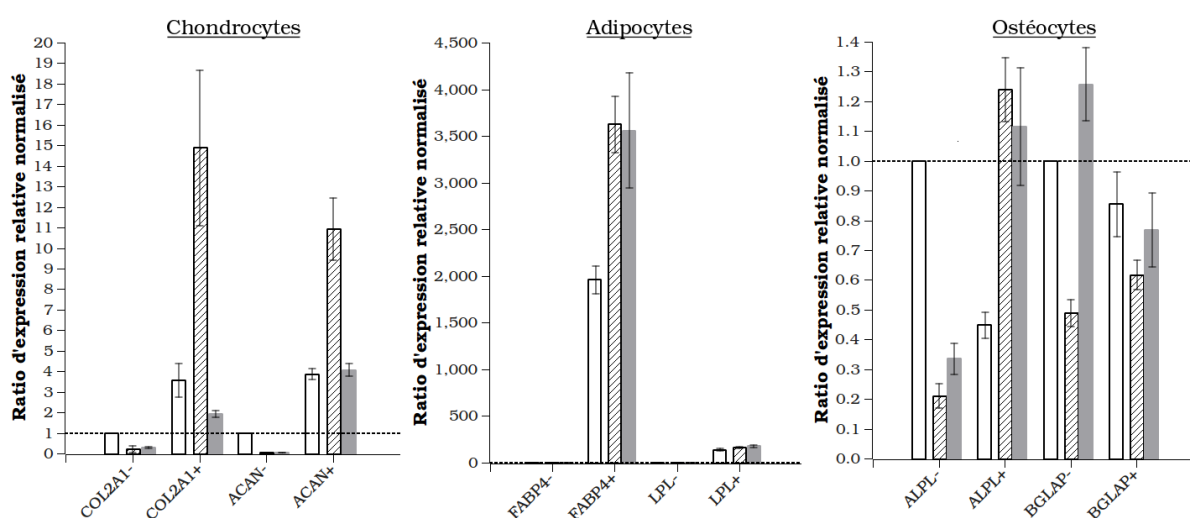


FIGURE 68 – Analyse de l'expression des gènes de la différenciation des CSM par RT-PCRq de CSM issues d'un donneur de moelle osseuse de 15 ans et à P5 (□) utilisées comme préculture avant ensemencement sur microporteurs Cytodex 1. Après des cultures en minibioréacteurs à $P=24.10^{-5}$ W (▨) et $P=45.10^{-5}$ W (■), les CSM ont été récoltées sur boîtes, induites à la différenciation et analysées en parallèle de la préculture. Les gènes dont l'expression en ARNm ont été suivies sont des révélateurs de la différenciation précoce (COL2A1, FABP4, ALPL) ou tardive (ACAN, LPL, BGLAP) en chondrocytes, adipocytes ou ostéocytes, respectivement. Les différenciations ont été induites par culture en milieu de différenciation Stempro (GENE +) ou non (GENE -). Le ratio d'expression est normalisé par rapport à la préculture non différenciée. Les barres d'erreur sont exprimées en écarts-types, n=2.

Tout d'abord, les ratios d'expression normalisée présentent de grandes différences d'ordres de grandeur entre les différents lignages : facteur 0,5-1,2 pour le lignage ostéocytaire, facteur 4-15 pour le lignage chondrocytaire, facteur 2000-4000 pour le lignage adipocytaire. Ces ordres de grandeurs étant cohérents entre les résultats obtenus sur la préculture induite et sur les CSM issues de culture en bioréacteurs, elles sont plus probablement liées à la technique de différenciation utilisée et à l'efficacité des amorces. Au vu des résultats obtenus après analyse des transcrits ostéocytaires, on

constate que la méthode de différenciation des CSM en ostéocytes est probablement déficiente. Par ailleurs, les CSM issues de bioréacteurs expriment toutefois trois fois plus de transcrits chondrocytaires précoces et tardifs que le contrôle induit issu de la préculture. L'expression des transcrits adipocytaires précoces est également augmentée d'un facteur 2 pour les cellules amplifiées sur microporteurs. Ainsi, contrairement aux résultats issus du seul marquage histochimique, on peut donc conclure que le procédé de culture sur microporteurs sensibilise les CSM à la différenciation adipocytaire et chondrocytaire. Une hypothèse pourrait être les tensions subies par les cellules lors de leur adhérence sur les microporteurs, les contraintes hydromécaniques subies au sein des minibioréacteurs ou les chocs inter-microporteurs [6].

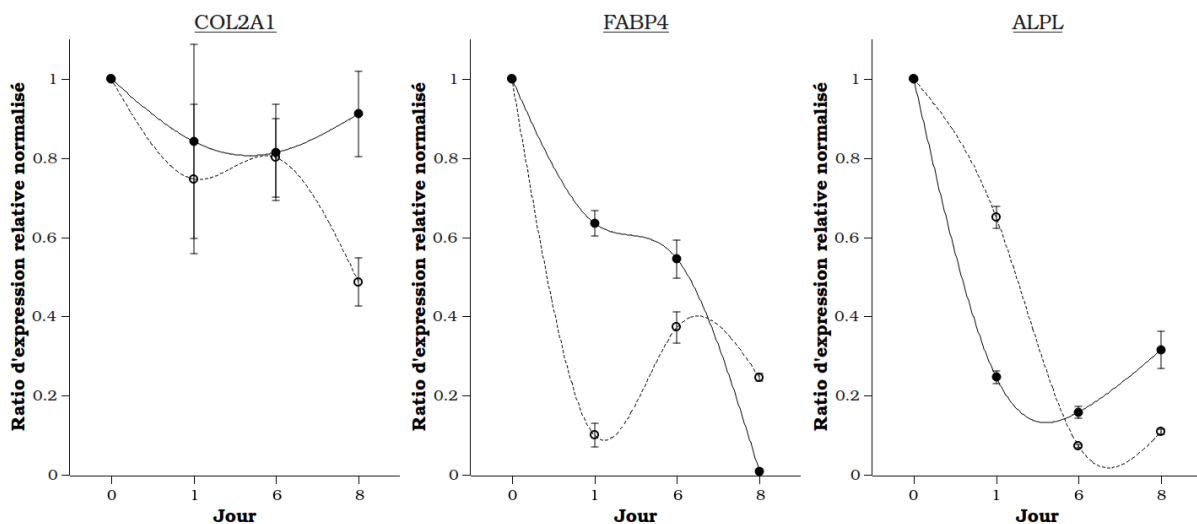


FIGURE 69 – Suivi de l'expression des gènes révélateurs de la différenciation précoce des CSM par RT-PCRq au cours de cultures en minibioréacteurs à $P= 24.10^{-5}$ W (●) et $P= 45.10^{-5}$ W (○). Le ratio d'expression est normalisé par rapport à la préculture ($t=0$). La différenciation précoce est suivie par l'expression des gènes en ARNm : COL2A1 pour la différenciation chondrocytaire, FABP4 pour la différenciation adipocytaire, ALPL pour la différenciation ostéocytaire. Les barres d'erreur sont exprimées en écarts-types, $n=2$.

De plus, l'utilisation de la RT-PCRq pour comparer la capacité des CSM à se différencier présente l'avantage de traiter les échantillons en parallèle, limitant ainsi les artefacts liés à la coloration histo-chimique. Cette méthode permet également de vérifier si les CSM sont orientées vers un lignage différencié en cours de culture et en l'absence d'induction. En effet, il a été préalablement montré que la culture sur microporteurs pouvait induire une différenciation spontanée des CSM en ostéocytes [6]. Un suivi au cours du temps de l'expression des gènes précoces de différenciation a alors été effectué sans faire intervenir d'inducteurs de différenciation (figure 69). Quelque soit le lignage de différenciation suivi, la quantité de transcrits marqueurs de la différenciation diminue fortement en cours de

culture. On peut supposer que cet effet est dû aux contraintes hydrodynamiques ou à des conditions opératoires qui n'étaient pas complètement maîtrisées (ex : température).

RÉSUMÉ

- L'identité de la population de CSM a été suivie par cytométrie capillaire. Aucune différence n'a été constatée après amplification des CSM en bioréacteurs sur microporteurs par rapport à une culture en boîte statique.
- La quantification des ARNm par RT-PCRq permet une analyse plus informative de la différenciation des CSM comparée à l'analyse histochimique.
- La différenciation des CSM a pu être quantifiée par RT-PCRq. Il semblerait que l'amplification des CSM en bioréacteurs favorise la différenciation adipocytaire et chondrocytaire.
- En cours de culture sur microporteurs, les CSM n'ont pas été induites vers un lignage différencié.

3 Impact des procédés d'amplification sur le vieillissement des CSM

Les CSM sont des cellules primaires possédant des capacités de prolifération significative, de plusieurs mois [7], comparées à des cellules humaines différenciées mises en culture (survie *in vitro* d'environ 1 semaine). Les CSM ont donc un caractère souche limité et peuvent donc être sujettes au vieillissement cellulaire par sénescence. Ce mécanisme biologique peut être potentiellement fortement influencé par le procédé d'amplification dont le but est d'obtenir une quantité importante de CSM en un temps minimum. Plusieurs méthodes de suivi du caractère souche et de la sénescence cellulaire ont donc été utilisées pour analyser la qualité des CSM générées.

3.1 Suivi du caractère souche en cours de culture

Le caractère souche est défini par le fait que même une cellule isolée peut s'auto-renouveler pour donner naissance à une nouvelle population de cellules non différenciées (clonogénicité). Il peut également être démontré par l'expression de plusieurs facteurs de transcription caractéristiques de la pluripotence (Oct-4, Nanog, Sox-2). Le terme de "cellules souches" ne peut s'appliquer de manière complète aux CSM à cause de leur multipotence, leur sensibilité à la sénescence et l'hétérogénéité de chaque population isolée. Toutefois, la clonogénicité d'une partie de la population de CSM est révélatrice de la capacité de prolifération globale de cette population [8, 9], tout comme l'expression de marqueurs de pluripotence, quand ces derniers sont détectés [10–12].

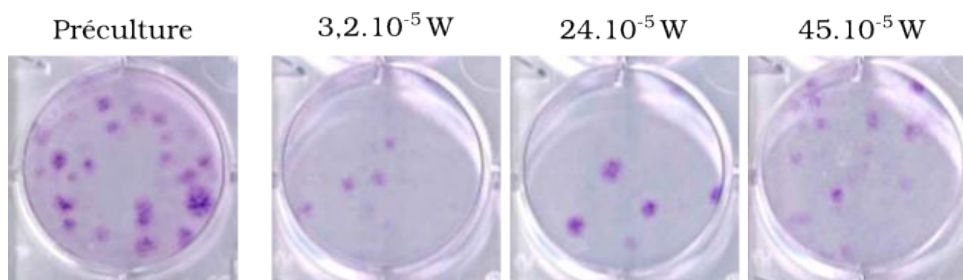


FIGURE 70 – Visualisation de la clonogénicité des CSM par test du nombre de CFU sur plaque 6-puits (ensemencement à 100 cellules par puits). Marquage des colonies de CSM issues d'un donneur de moelle osseuse de 15 ans au cristal violet 5% (m/v) après 21 jours d'incubation. Comparaison entre une préculture et des cultures en minibioréacteurs sur microporteurs Cytodex 1 à différentes puissances $P= 3,2.10^{-5} W$, $24.10^{-5} W$, $45.10^{-5} W$, les cellules étant récoltées sur boîtes.

Pour suivre le caractère souche, le test du nombre de CFU obtenu après dilution limite a été effectué sur les populations de CSM récoltées après amplification en minibioréacteurs (exemple de résultat sur la figure 70). Ces données avaient été utilisées pour caractériser la réponse des CSM à différentes

conditions de culture en minibioréacteurs lors de la réalisation d'un plan d'expériences (réponses modélisées sur la figure 45). Ces résultats mettent en avant une plus faible clonogénicité que dans la pré-culture, et le fait que de fortes puissances d'agitation semblent favoriser la clonogénicité des CSM. Il a d'ailleurs été démontré que ces conditions d'agitation favorisaient un transfert thermique plus homogène et diminuaient la lyse cellulaire (chapitre 4, section 4.3.4). La diminution de la capacité de clonogénicité des CSM a déjà été corrélée à leur capacité à se différencier [13]. Dans ce cas cependant, l'orientation vers le lignage adipocytaire était diminué, tandis que l'aptitude des CSM à se différencier en ostéocytes était conservée [13]. Nos données pourraient donc être également indicatives d'une sélection de la population de CSM en cours de culture.

L'expression du gène de pluripotence Nanog a également été suivie au cours du temps par RT-PCRq (figure 71). Ce transcrite est diminué d'un facteur 10 dès 24 h après la mise en contact des CSM et des microporteurs (agitation orbitale en fiole d'Erlenmeyer pendant la phase d'adhérence). Le procédé sur microporteurs semble donc défavorable à la pluripotence des CSM, ces résultats allant dans le même sens que ceux observés lors du suivi de l'expression de certains gènes de la différenciation (figure 69).

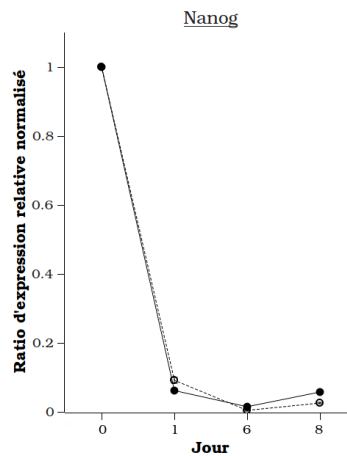


FIGURE 71 – Suivi de l'expression du gène Nanog révélateur du caractère souche des CSM par RT-PCRq au cours de cultures en minibioréacteurs à $P= 24.10^{-5}$ W (●) et $P= 45.10^{-5}$ W (○). Le ratio d'expression est normalisé par rapport à la préculture (t=0). Les barres d'erreur sont exprimées en écarts-types, n=2.

3.2 Suivi de l'acquisition d'un phénotype sénescence par les CSM en cours de culture

L'obtention d'une quantité importante de CSM se heurte à la limite décrite par Hayflick, pour laquelle les cellules, devenues sénescences, présentent une morphologie modifiée, sont bloquées entre les phase G1 et S du cycle cellulaire (phase de répllication de l'ADN) et ne peuvent plus, ni se

différencier, ni prendre part à la régulation immunitaire. C'est pourquoi, il est conseillé de limiter le nombre de générations cumulées imposé aux CSM lors de l'intégralité du procédé d'amplification (de la banque maître au produit thérapeutique) [14]. Cependant, le mécanisme de sénescence est aussi la principale barrière à la tumorigénèse et participe grandement à la sécurité d'utilisation des CSM comparées aux CSE ou aux CSPi [15]. La compréhension des facteurs conduisant à l'apparition d'un phénotype sénescence pourrait ainsi aider à définir une fenêtre opératoire du procédé, en fonction du donneur dont sont issues les CSM.

La technique classique du suivi de la sénescence consiste à révéler la présence accrue de β -galactosidase au niveau des lysosomes (état de sénescence tardive) par un substrat chromogénique, le X-Gal, dont la partie indolique est libérée par cette enzyme à pH acide et oxydée en un produit insoluble bleu [16]. Cette méthode histochemique, comme les marquages de la différenciation, ne permet qu'une approche qualitative ou semi-quantitative de la présence ou l'absence de cellules sénescence au sein de la population de CSM étudiées. En effet, une quantification par microscopie ou spectrophotométrie à 615 nm ne peut être considérée comme fiable au vu des artefacts de coloration importants causés par le pH de la réaction et par la densité cellulaire locale des cellules. Les résultats présentés sur la figure 72 permettent donc juste de visualiser qu'une partie des cellules de la préculture, tout comme les CSM cultivées en minibioreacteurs, présentent des signes de sénescence tardive.

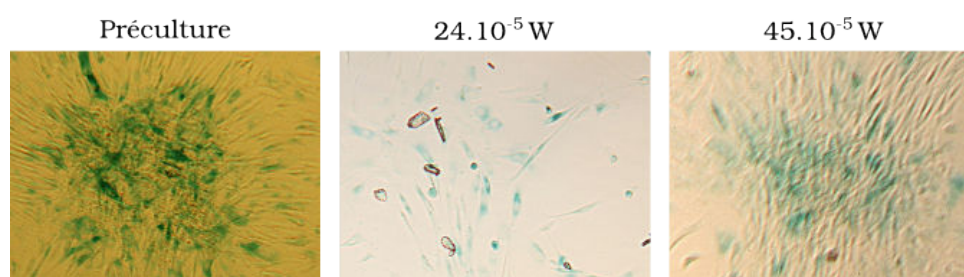


FIGURE 72 – Suivis de la sénescence tardive des CSM en microscopie photonique à contraste de phase (grossissement $\times 10$) par marquage histochemique de la β -galactosidase au X-Gal (en bleu). CSM issues d'un donneur de moelle osseuse de 15 ans et à P5 utilisées en préculture et en cultures de 7 jours en minibioreacteurs sur microporteurs Cytodex 1 à différentes puissances $P= 24.10^{-5}$ W ou 45.10^{-5} W et récoltées sur boîtes.

Afin de mieux quantifier l'apparition de la sénescence en cours de culture, trois méthodes supplémentaires d'analyse ont été testées : le suivi de l'expression par RT-PCR de deux inhibiteurs de kinases cycline-dépendantes (CDK), les transcrits $p16^{INK4A}$ et $p21^{WAF1}$, la mesure de la longueur des télomères par PCRq et la quantification des sites apuriques-apyrimidiques (AP) de l'ADN génomique. Ces mesures permettent ainsi de mesurer aussi bien la sénescence répliquative (SR) que celle induite

par le stress (SIPS).

La protéine p53 est au cœur de la balance cellulaire orientant les cellules vers l'apoptose ou la sénescence. En réaction à certains stress, cette protéine va déclencher l'expression des protéines p16 et/ou p21 [17–19]. L'expression de la protéine p16 peut aussi être induite par le raccourcissement des télomères. Les protéines p16 et p21, en se liant à certaines CDK, empêchent la phosphorylation de la protéine Rb. Cette même protéine Rb régule les complexes de transcription E2F-DP dont le rôle est nécessaire à l'entrée des cellules en phase S [17–19]. Le suivi de la quantité de transcrits p16^{INK4A} et p21^{WAF1} peut donc représenter une mesure indirecte de l'évolution des CSM vers la sénescence. Les résultats obtenus par RT-PCRq sont présentés sur la figure 73 et représentent l'évolution de la quantité d'ARNm p16^{INK4A} et p21^{WAF1} au sein des CSM au cours de cultures sur microporteurs en minibioreacteurs. Une diminution transitoire d'un facteur 5 du niveau d'expression de ces transcrits est constatée au cours des 24 premières heures d'adhérence des CSM sur les microporteurs. Une augmentation régulière de leur niveau d'expression est ensuite observée au cours de cultures réalisées avec deux puissances d'agitation. Comme pour la sous-expression du gène Nanog, on peut supposer que cet effet est dû aux contraintes hydrodynamiques ou au chauffage trop important des cellules par la plateforme chauffante.

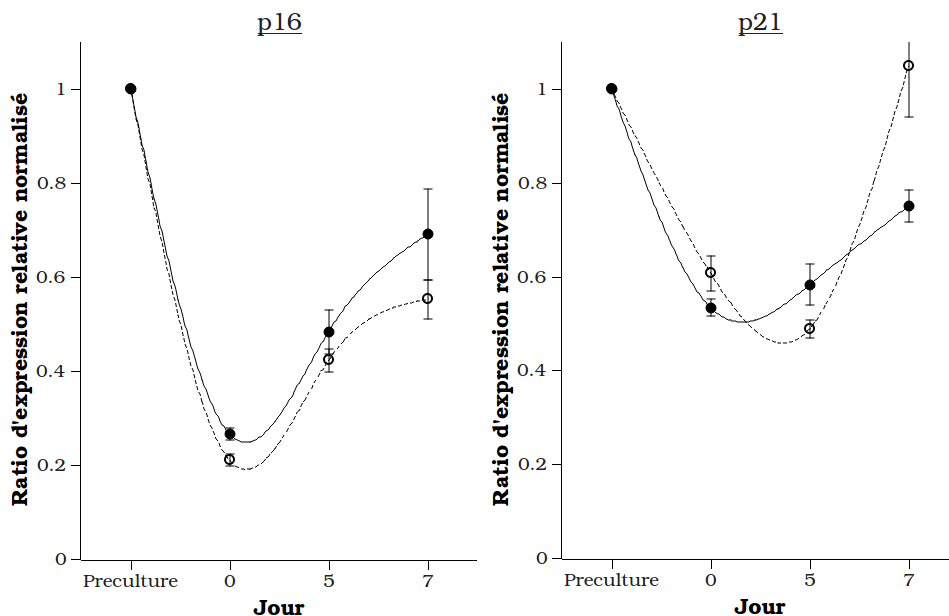


FIGURE 73 – Suivi de l'expression des gènes p16 et p21 révélateurs du la sénescence précoce des CSM par RT-PCRq au cours de cultures en minibioreacteurs à $P= 24.10^{-5}$ W (●) et $P= 45.10^{-5}$ W (○). Le ratio d'expression est normalisé par rapport à la préculture (t=0). Les barres d'erreur sont exprimées en écarts-types, n=2.

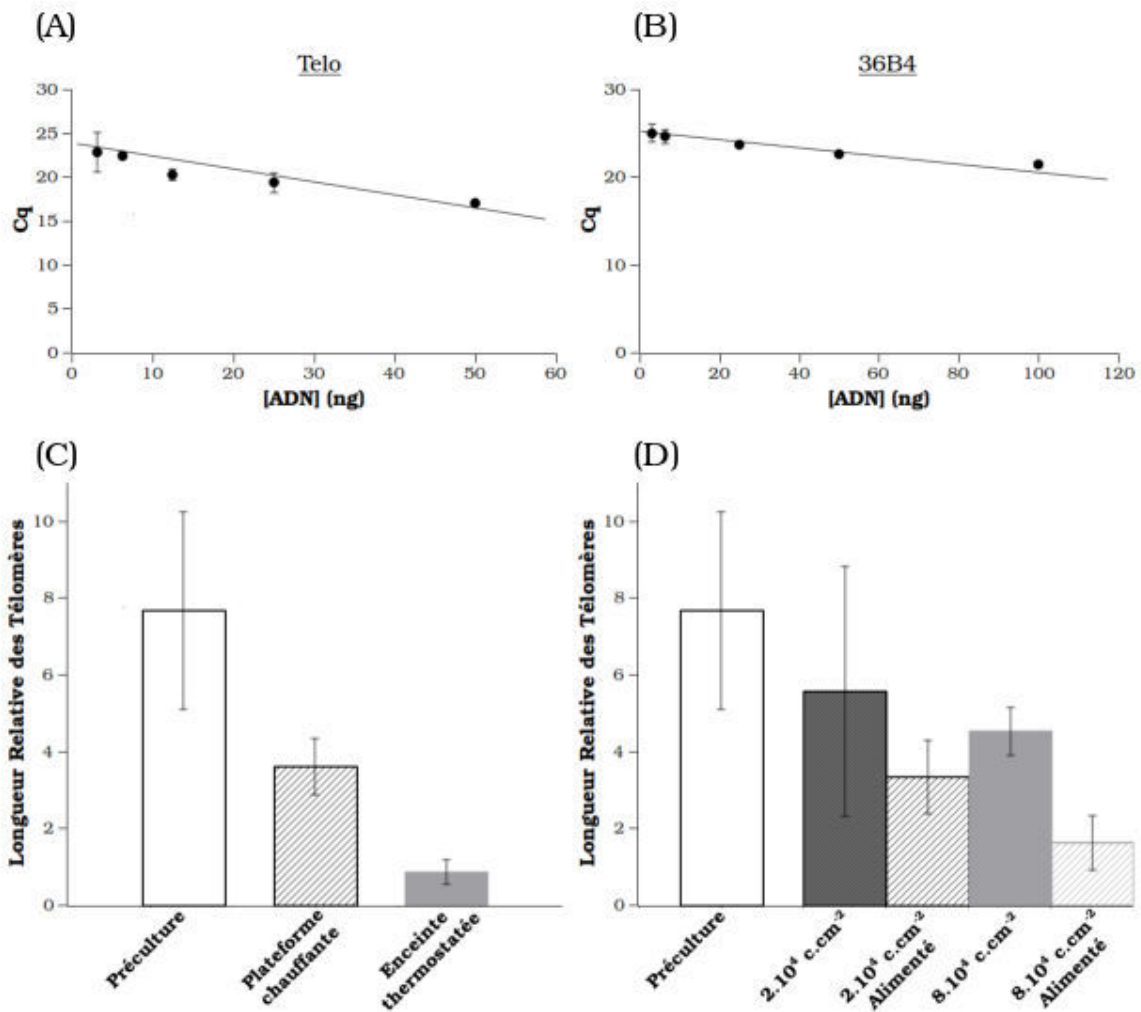


FIGURE 74 – Mesure de la longueur des télomères par PCRq.

(A), efficacité des amorces Telo (●, 92,6%) et (B) 36B4 (●, 97%) sur l'ADN de cellules HUVEC (référence de normalisation).

(C), mesure de la longueur des télomères de cellules issues d'un donneur de moelle osseuse de 24 ans à P4 en préculture (□) et sur microporteurs Cytodex 1 après culture de 7 jours en minibioréacteurs dont la température était régulée par plateforme régulée (▨) ou enceinte chauffée (■). Les barres d'erreur sont exprimées en écarts-types, n=2.

(D), mesure de la longueur des télomères de cellules issues d'un donneur de moelle osseuse de 24 ans à P4 en préculture (□) et après 7 jours de culture statique en boîte à 2000 cellules.cm⁻²-non alimentée (■), à 2000 cellules.cm⁻²-alimentée (▨), à 8000 cellules.cm⁻²-non alimentée (■), et à 8000 cellules.cm⁻²-alimentée (▨). Les barres d'erreur sont exprimées en écarts-types, n=3.

La mesure directe de la sénescence répliquative a alors été entreprise (figure 74) sur d'autres expériences que celles de l'étude de l'effet de l'agitation sur les CSM. La mesure de la longueur des télomères par PCRq consiste à faire une quantification relative de la séquence répétée composant

les télomères humains (TTAGGG), par rapport à un ou plusieurs gènes à copie unique dans l'ADN humain (36B4 ou β -globine). Cette méthode est déjà clairement établie dans la littérature [20–22]. Ces mesures sont normalisées par rapport à une référence interne dont la longueur des télomères est considérée constante, ici des cellules HUVEC issues d'une même banque cellulaire. Les efficacités de transcription des amorces Telo et 36B4 dans les conditions de PCR de la littérature ont d'abord été validées (figure 74, en haut, supérieures à 90%). Les amorces du gène de la β -globine n'ont pas permis l'amplification de cet ADN génomique, aucun signal fluorescent n'ayant été obtenu dans les conditions recommandées par la littérature.

La mesure de la longueur des télomères a été réalisée au cours de deux expériences : l'une comparant les méthodes de régulation de la température en minioréacteurs (chapitre 4, section 4.3.4) ; l'autre comparant les densités d'ensemencement sur boîtes de 25 cm² lors de cultures d'une durée de 7 jours avec l'ajout ou non d'une solution de SVF décomplémenté supplémentée par 5 ng.mL⁻¹ de FG2 et 5 ng.mL⁻¹ de TGF β , du jour 2 au jour 6, à hauteur de 0,4 μ L par celluleensemencée. Les résultats sont présentés sur la figure 74 (C et D, respectivement). Logiquement, la longueur des télomères diminue entre la préculture et les CSM récoltées en fin de procédé. On observe aussi qu'elle est diminuée d'un facteur 4 entre les cellules cultivées en bioréacteurs régulés par plateforme chauffante et celles cultivées en enceinte thermostatée (figure 74, C). Ces résultats sont en concordance avec une plus grande prolifération des CSM dans l'enceinte thermostatée (visibles sur les figures 48 et 47) et donc la manifestation d'une sénescence répllicative.

Les résultats obtenus lors des essais comparant deux densités cellulaires d'ensemencement, avec ou sans alimentation en SVF supplémenté, sont plus contrastés (figure 74, D et tableau 27). L'addition de SVF augmente la prolifération cellulaire et donc diminue la longueur des télomères. En effet, le SVF utilisé est supplémenté en TGF β 1 et FGF2, ces deux facteurs de croissance fonctionnant en synergie pour favoriser la prolifération des CSM [23, 24]. Contrairement au FGF2, le TGF β 1 a d'abord été identifié comme inducteur de la sénescence cellulaire [25]. Toutefois, il a depuis été démontré que cet effet était directement lié à l'augmentation de la capacité proliférative [26]. Nos données sont donc en accord avec les résultats de la littérature.

Cependant, malgré la plus grande vitesse de prolifération des CSMensemencées à un faible taux, les longueurs mesurées des télomères restent supérieures à celles observées avec le taux d'ensemencement supérieur. On démontre ainsi que la sénescence répllicative n'est pas le seul phénomène à intervenir sur la longueur des télomères. En effet, celle-ci diminue, non seulement, avec l'accumu-

TABLEAU 27 – Cinétiques de croissance et phénomènes de sénescence

	Conditions de culture sur boîtes			
	2.10 ⁴		8.10 ⁴	
Ajout de SVF supplémenté	Non	Oui	Non	Oui
Nbre de générations	2,3	2,8	1,3	2,1
$\mu_{\max, \text{app}}$ (h ⁻¹)	0,011	0,012	0,007	0,009
Longueur relative des télomères	5,6 ± 3,3	3,3 ± 0,9	4,5 ± 0,6	1,6 ± 0,7
Nbre de sites AP pour 10 ⁵ pb	29,0 ± 1,9	27,2 ± 0,9	28,7 ± 0,4	37,3 ± 0,9

lation du nombre de générations des cellules, mais également, si l'enzyme responsable du maintien des télomères, la télomérase (hTERT) présente une activité réduite. La télomérase a été détectée à de faibles niveaux au sein de populations de CSM [27, 28]. Cependant, certaines CSM conservent la longueur de leurs télomères sur plus de 40 générations [7], indiquant ainsi que cette enzyme est suffisamment active au sein des CSM. Or, la télomérase est également impliquée dans de nombreuses voies cellulaires, elle peut être inhibée par la protéine p21 et apporte une protection aux cellules contre les stress oxydatifs [29–31]. Deux hypothèses peuvent donc expliquer le phénomène observé : une inhibition de hTERT résultant de l'obtention d'une confluence trop importante des cellules lors de l'ensemencement le plus élevé (inhibition de contact) et l'accumulation intracellulaire de ROS causée par l'ajout de sérum et de TGF β 1 [32–34].

Afin de tester cette seconde hypothèse, une quantification du nombre de sites AP présents sur l'ADN génomique en fin de culture a donc été réalisée (figure 75 et tableau 27). En effet, la quantité de sites AP sur l'ADN augmente avec l'âge cellulaire par un défaut de réparation des brins d'ADN [35] et sous l'effet des ROS [36]. Or, la quantité de superoxyde intracellulaire augmente également avec l'âge cellulaire [37, 38] et peut être directement liée à la perte des capacités de différenciation des CSM [39]. Avec une augmentation de 25% du nombre de sites AP sur la totalité du génome, on peut supposer que ce phénomène est intervenu dans la condition alimentée et à forte densité d'ensemencement.

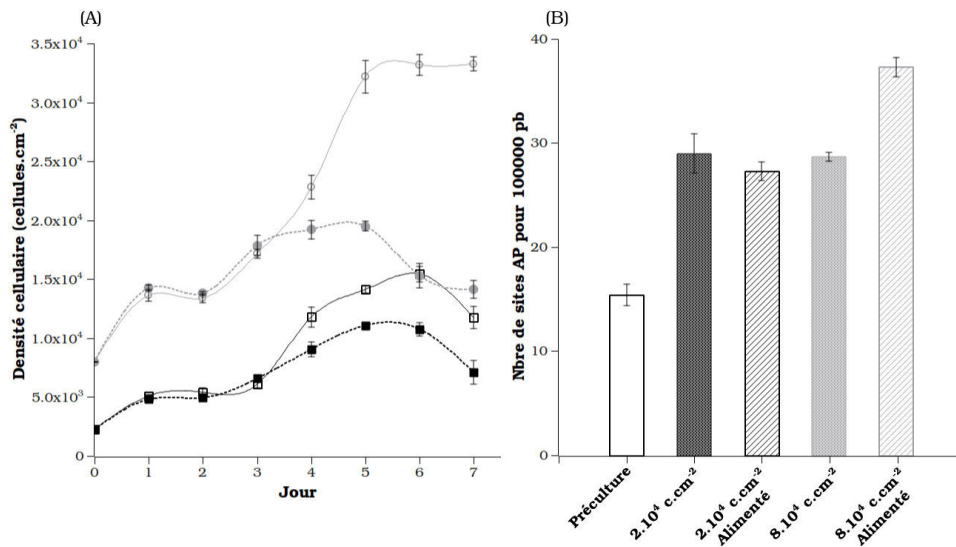


FIGURE 75 – Suivi du stress oxydant par quantification des sites AP de l'ADN génomique de CSM issues d'un donneur de moelle osseuse de 24 ans, à P4, cultivées sur boîtes de culture T25 avec deux densités d'ensemencement (2000 et 8000 cellules.cm⁻²) avec ou sans ajout de SVF décomplémenté supplémenté par 5 ng.mL⁻¹ de FG2 et 5 ng.mL⁻¹ de TGFβ (alimentation du jour 2 à 6 à 0,4 μL par cellule ensemencée). (A), cinétique de croissance obtenue au Guava Viacount : 8000 cellules.cm⁻²-alimentée (○), 8000 cellules.cm⁻²-non alimentée (●), 2000 cellules.cm⁻²-alimentée (□), 2000 cellules.cm⁻²-non alimentée (■). (B), quantité de site AP pour 100000 paires de bases d'ADN génomique après 7 jours de culture : CSM issues d'un donneur de moelle osseuse de 24 ans à P4 ayant servi de préculture (□), 2000 cellules.cm⁻²-non alimentée (■), 2000 cellules.cm⁻²-alimentée (▨), 8000 cellules.cm⁻²-non alimentée (■), 8000 cellules.cm⁻²-alimentée (▨). Les barres d'erreur sont exprimées en écarts-types, n=3.

RÉSUMÉ

- Le caractère souche des CSM est limité et diminue au cours des cultures sur microporteurs comparativement à une culture statique.
- Le suivi de la sénescence des CSM par le marquage qualitatif de la β -galactosidase peut être complété par un suivi quantitatif de la longueur des télomères par PCRq et le niveau d'expression des gènes p16 et p21 pour établir la limite proliférative des CSM au cours d'un procédé de culture.
- La longueur des télomères, l'expression de gènes du cycle cellulaire et les dommages de l'ADN dus au stress oxydant, sont des propriétés complémentaires, qui peuvent être suivies en cours de culture afin de mieux appréhender les mécanismes de vieillissement cellulaire déclenchés par le procédé de culture.

4 Synthèse

L'amplification des CSM *in vitro* est une étape nécessaire à leur utilisation thérapeutique mais peut modifier l'identité de la population cellulaire au point de compromettre leur efficacité. L'identité des CSM *in vivo* et les caractéristiques réellement recherchées en vue de leur utilisation restent encore assez floues, ce qui crée des difficultés relatives au choix des méthodes analytiques à mettre en œuvre. Un compromis *a minima* a été approuvé par la communauté scientifique afin de faciliter les comparaisons entre laboratoires [1]. Ce consensus stipule qu'une population de CSM doit être adhérente au plastique dans un milieu contenant du sérum, présenter un profil spécifique d'antigènes de surface et être différenciable en ostéocytes, chondrocytes et adipocytes. Ces méthodes ont été appliquées aux cellules obtenues au cours des cultures étudiées par nos travaux. Le milieu utilisé contenait 10% de SVE, les CSM étant récoltées par adhérence sur boîtes de culture. Leur profil d'antigènes de surfaces correspond à celui recommandé et n'a pas été modifié par le procédé de culture. De même, ces cellules, induites à la différenciation en 3 lignages, ont toutes été positives aux marquages histochimiques adipocytaires, chondrocytaires et ostéocytaires.

Par ailleurs, il a été constaté visuellement qu'une partie de la population de CSM, que ce soit de la préculture ou des CSM récoltées après amplification, n'avait pas la capacité à se différencier. Ce résultat peut être relié à l'hétérogénéité clonale des populations de CSM [40]. Il a donc été décidé de développer une méthode permettant de mieux quantifier la différenciation des CSM par suivi de l'expression génique par RT-PCRq. Les ARNm ciblés par cette méthode ont été choisis, après analyse de la littérature, comme révélateurs de la différenciation précoce ou tardive de chaque lignage d'intérêt. Il a ainsi été possible de déterminer que le procédé de culture utilisé (sur microporteurs Cytodex 1, en minibioréacteurs agités, sur plateforme chauffante) favorisait la différenciation adipocytaire et chondrocytaire (seulement pour de plus faibles puissances d'agitation dans ce dernier cas), des difficultés ayant été rencontrées pour l'analyse de la différenciation ostéocytaire. La méthode de différenciation ostéocytaire, reste à approfondir pour le choix des amorces, de l'ARNm cible, du milieu et de la surface de différenciation.

Plusieurs autres caractéristiques des CSM ne sont pas incluses dans la définition des CSM admises par l'ISCT : la capacité immunomodulatoire des cellules, leur caractère souche (auto-renouvellement, clonogénicité et pluripotence) ou le fait que, selon leur âge biologique, ces cellules peuvent dériver en dehors des critères établis par l'ISCT. L'analyse des capacités immunomodulatoires des CSM met en œuvre des systèmes de co-cultures CSM/lymphocytes et le dosage de cytokines. Ces techniques

complexes sortaient du cadre de notre travail et n'ont donc pas été développées. Le caractère souche "vrai" des CSM, bien que largement débattu [41–45], a pu être analysé par l'intermédiaire d'un test du nombre de CFU et le dosage de l'ARNm du facteur de transcription Nanog [46]. La proportion de CSM ayant gardé leur capacité de clonogénicité, déjà faible dans les banques cellulaires/précultures utilisées (aux alentours de 30%), a été réduite par la mise en place de l'étape d'amplification en bioréacteurs.

Afin d'approfondir ces résultats, des techniques d'analyse du vieillissement cellulaire ont également été mises en oeuvre. Les phénomènes de sénescence ont été abordés par l'intermédiaire de plusieurs méthodes d'analyses microscopiques ou moléculaires : le marquage de la β -galactosidase, le dosage des ARNm p16 et p21 inducteurs du blocage du cycle cellulaire, la mesure de la longueur des télomères par PCRq, et la quantification des dommages de l'ADN causés par les ROS (dosage du nombre de sites AP sur le génome cellulaire). Plusieurs conclusions ont été tirées de ces analyses. Premièrement, la diminution du caractère souche des CSM et l'apparition d'un phénotype sénescence sont déjà présents avant l'amplification intensive des CSM sur microporteurs [7]. Ensuite, la mise en place du procédé d'amplification favorise la sénescence des CSM, et ce quels que soient les paramètres utilisés (surface d'adhérence, régulation de température, taux d'ensemencement, alimentation) [47]. Enfin, certaines conditions de culture favorisant l'accumulation de superoxyde intracellulaire, comme la normoxie, peuvent accélérer le vieillissement *in vitro* des CSM.

Le vieillissement cellulaire des CSM est un processus dont peut dépendre grandement leur utilisation en tant que thérapie autologue et allogénique (âge biologique du donneur, taille des banques cellulaires, stabilité cellulaire au cours du temps). Par ailleurs, ce vieillissement dépend également des conditions de culture. L'enjeu crucial d'un procédé d'amplification des CSM étant de maintenir l'identité et la valeur thérapeutique de ces cellules, des méthodes analytiques complémentaires doivent être mises au point pour définir la population cellulaire initiale et celle d'intérêt avant même d'envisager un rétro-contrôle du procédé en fonction des attributs qualitatifs des CSM. Ce travail a tenté de mettre en place les suivis en cours de culture de ces caractéristiques cellulaires avec ces méthodes. Les données partielles collectées ont mis en lumière le fait qu'un rendement cellulaire important n'était pas le seul point clef du développement et de l'optimisation d'un procédé d'amplification des CSM (figure 76). L'accumulation de données caractérisant les CSM tout au long de leur manipulation *in vitro* serait un grand pas vers une meilleure compréhension de leur procédé de culture.

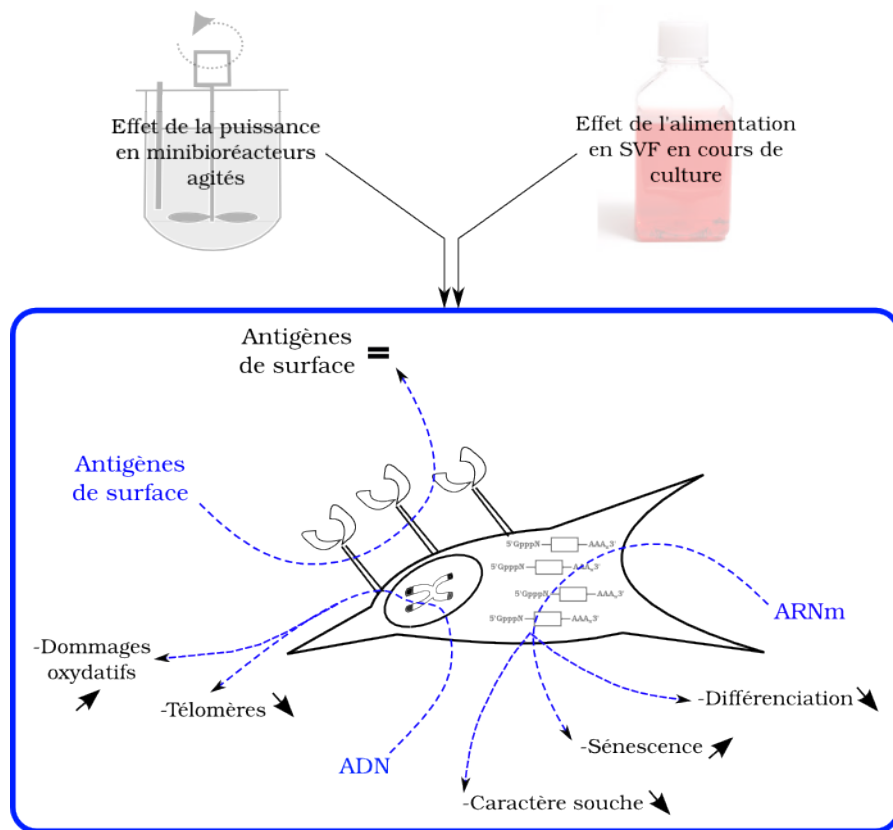


FIGURE 76 – Synthèse des résultats sur l'intégration de diverses méthodes analytiques pour la compréhension de l'impact du procédé de culture sur l'identité et la qualité des CSM.

5 Références bibliographiques

- [1] M DOMINICI et al. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. the international society for cellular therapy position statement. *Cytotherapy*, 8(4) :315–317, 2006.
- [2] L BASCIANO et al. Long term culture of mesenchymal stem cells in hypoxia promotes a genetic program maintaining their undifferentiated and multipotent status. *Bmc cell biology*, 12(1) :12, 2011.
- [3] S R R HALL et al. Identification and isolation of small CD44-negative mesenchymal stem/progenitor cells from human bone marrow using elutriation and polychromatic flow cytometry. *Stem cells translational medicine*, 2(8) :567–578, 2013.
- [4] G G WALMSLEY et al. High-Throughput Screening of Surface Marker Expression on Undifferentiated and Differentiated Human Adipose-Derived Stromal Cells. *Tissue engineering. part a*, 21(15-16) :2281–2291, 2015.
- [5] B GHARIBI et al. Effects of medium supplements on proliferation, differentiation potential, and in vitro expansion of mesenchymal stem cells. *Stem cells translational medicine*, 1(11) :771–782, 2012.
- [6] P TSENG et al. Spontaneous osteogenesis of MSCs cultured on 3d microcarriers through alteration of cytoskeletal tension. *Biomaterials*, 33(2) :556–564, 2012.
- [7] M A BAXTER et al. Study of telomere length reveals rapid aging of human marrow stromal cells following in vitro expansion. *Stem cells (dayton, ohio)*, 22(5) :675–682, 2004.
- [8] F DOS SANTOS et al. Ex vivo expansion of human mesenchymal stem cells : a more effective cell proliferation kinetics and metabolism under hypoxia. *Journal of cellular physiology*, 223(1) :27–35, 2010.
- [9] C LANGE et al. Accelerated and safe expansion of human mesenchymal stromal cells in animal serum-free medium for transplantation and regenerative medicine. *Journal of cellular physiology*, 213(1) :18–26, 2007.
- [10] E PIERANTOZZI et al. Pluripotency regulators in human mesenchymal stem cells : expression of NANOG but not of OCT-4 and SOX-2. *Stem cells and development*, 20(5) :915–923, 2011.
- [11] S S FATIMAH et al. Stemness and angiogenic gene expression changes of serial-passage human amnion mesenchymal cells. *Microvascular research*, 86 :21–29, 2013.
- [12] Y ZHU et al. Alteration of Histone Acetylation Pattern during Long-Term Serum-Free Culture Conditions of Human Fetal Placental Mesenchymal Stem Cells. *Plos one*, 10(2) :e0117068, 2015.
- [13] C M DIGIROLAMO et al. Propagation and senescence of human marrow stromal cells in culture : a simple colony-forming assay identifies samples with the greatest potential to propagate and differentiate. *British journal of haematology*, 107(2) :275–281, 1999.
- [14] M M BONAB et al. Aging of mesenchymal stem cell in vitro. *Bmc cell biology*, 7 :14, 2006.
- [15] L HE et al. A shorter telomere is the key factor in preventing cultured human mesenchymal stem cells from senescence escape. *Histochemistry and cell biology*, 142(3) :257–267, 2014.
- [16] D J KURZ et al. Senescence-associated (beta)-galactosidase reflects an increase in lysosomal mass during replicative ageing of human endothelial cells. *Journal of cell science*, 113 (Pt 20) :3613–3622, 2000.

- [17] J CHEN et al. Contribution of p16ink4a and p21cip1 pathways to induction of premature senescence of human endothelial cells : permissive role of p53. *American journal of physiology - heart and circulatory physiology*, 290(4) :H1575–H1586, 2006.
- [18] K-R YU et al. Aging-Related Genes in Mesenchymal Stem Cells : A Mini-Review. *Gerontology*, 59(6) :557–563, 2013.
- [19] R MIRZAYANS et al. Role of p16(INK4a) in Replicative Senescence and DNA Damage-Induced Premature Senescence in p53-Deficient Human Cells. *Biochemistry research international*, 2012 :951574, 2012.
- [20] A AVIV et al. Impartial comparative analysis of measurement of leukocyte telomere length/DNA content by Southern blots and qPCR. *Nucleic acids research*, 39(20) :e134, 2011.
- [21] R M CAWTHON. Telomere measurement by quantitative PCR. *Nucleic acids research*, 30(10) :e47, 2002.
- [22] R M SAMSONRAJ et al. Telomere length analysis of human mesenchymal stem cells by quantitative PCR. *Gene*, 519(2) :348–355, 2013.
- [23] S JUNG et al. Identification of growth and attachment factors for the serum-free isolation and expansion of human mesenchymal stromal cells. *Cytotherapy*, 12(5) :637–657, 2010.
- [24] N FEKETE et al. Essential Components for Ex Vivo Proliferation of Mesenchymal Stromal Cells. *Tissue engineering part c : methods*, 20(2) :129–139, 2013.
- [25] T ITO et al. FGF-2 suppresses cellular senescence of human mesenchymal stem cells by down-regulation of TGF-beta2. *Biochemical and biophysical research communications*, 359(1) :108–114, 2007.
- [26] G WALENDA et al. TGF-beta1 does not induce senescence of multipotent mesenchymal stromal cells and has similar effects in early and late passages. *Plos one*, 8(10) :e77656, 2013.
- [27] S ZIMMERMANN et al. Lack of telomerase activity in human mesenchymal stem cells. *Leukemia*, 17(6) :1146–1149, 2003.
- [28] Y ZHOU et al. Trend of telomerase activity change during human iPSC self-renewal and differentiation revealed by a quartz crystal microbalance based assay. *Scientific reports*, 4, 2014.
- [29] X-Q WU et al. Feedback regulation of telomerase reverse transcriptase : new insight into the evolving field of telomerase in cancer. *Cellular signalling*, 25(12) :2462–2468, 2013.
- [30] J C ESTRADA et al. Human mesenchymal stem cell-replicative senescence and oxidative stress are closely linked to aneuploidy. *Cell death and disease*, 4 :e691, 2013.
- [31] A BORODKINA et al. Interaction between ROS dependent DNA damage, mitochondria and p38 MAPK underlies senescence of human adult stem cells. *Aging*, 6(6) :481–495, 2014.
- [32] T von ZGLINICKI. Oxidative stress shortens telomeres. *Trends in biochemical sciences*, 27(7) :339–344, 2002.
- [33] Y LIU et al. Effect of serum choice on replicative senescence in mesenchymal stromal cells. *Cytotherapy*, 17(7) :874–884, 2015.
- [34] J WU et al. TGF-beta1 induces senescence of bone marrow mesenchymal stem cells via increase of mitochondrial ROS production. *Bmc developmental biology*, 14 :21, 2014.

- [35] H ATAMNA et al. A method for detecting abasic sites in living cells : age-dependent changes in base excision repair. *Proceedings of the national academy of sciences of the united states of america*, 97(2) :686–691, 2000.
- [36] J NAKAMURA et al. 5'-nicked apurinic/aprimidinic sites are resistant to beta-elimination by beta-polymerase and are persistent in human cultured cells after oxidative stress. *The journal of biological chemistry*, 275(8) :5323–5328, 2000.
- [37] J-Y HEO et al. Downregulation of APE1/Ref-1 is involved in the senescence of mesenchymal stem cells. *Stem cells (dayton, ohio)*, 27(6) :1455–1462, 2009.
- [38] S-G JEONG et al. Endogenous ROS levels are increased in replicative senescence in human bone marrow mesenchymal stromal cells. *Biochemical and biophysical research communications*, 460(4) :971–976, 2015.
- [39] H ALVES et al. A link between the accumulation of DNA damage and loss of multi-potency of human mesenchymal stromal cells. *Journal of cellular and molecular medicine*, 14(12) :2729–2738, 2010.
- [40] K C RUSSELL et al. In vitro high-capacity assay to quantify the clonal heterogeneity in trilineage potential of mesenchymal stem cells reveals a complex hierarchy of lineage commitment. *Stem cells*, 28(4) :788–798, 2010.
- [41] P BIANCO et al. The meaning, the sense and the significance : translating the science of mesenchymal stem cells into medicine. *Nature medicine*, 19(1) :35–42, 2013.
- [42] D G PHINNEY et al. MSCs : science and trials. *Nature medicine*, 19(7) :812, 2013.
- [43] M F PITTENGER. MSCs : science and trials. *Nature medicine*, 19(7) :811, 2013.
- [44] W E FIBBE et al. MSCs : science and trials. *Nature medicine*, 19(7) :812–813, 2013.
- [45] P BIANCO. Reply to MSCs : science and trials. *Nature medicine*, 19(7) :813–814, 2013.
- [46] THE INTERNATIONAL STEM CELL INITIATIVE. Characterization of human embryonic stem cell lines by the international stem cell initiative. *Nature biotechnology*, 25(7) :803–816, 2007.
- [47] W WAGNER et al. Replicative senescence of mesenchymal stem cells : a continuous and organized process. *Plos one*, 3(5) :e2213, 2008.

Conclusion générale et Perspectives

Au fur et à mesure que des résultats encourageants sont générés dans le cadre d'études précliniques et cliniques, il est de plus en plus évident que l'avenir des thérapies cellulaires mettant en oeuvre des cellules souches passe par l'utilisation de procédés d'amplification cellulaire en bioréacteur pour permettre de généraliser l'utilisation de ces nouveaux traitements thérapeutiques au plus grand nombre.

Les travaux de cette thèse ont eu pour but d'étudier, de manière intégrée, les procédés d'amplification de cellules souches mésenchymateuses humaines. Une approche englobant les étapes de la culture de CSM a été menée en partant de la caractérisation des banques de cellules, en passant par l'étude de l'impact des conditions de culture en bioréacteurs, aux conditions biochimiques par une étude des milieux sans sérum, et enfin en analysant la qualité du matériel cellulaire obtenu. Les CSM humaines ont été choisies comme modèles d'étude dans nos travaux car les CSM sont un type cellulaire plus disponible que les CSE et les CSPi. De nombreux travaux ont déjà été générés quant à leur potentiel thérapeutique en ingénierie tissulaire et en thérapie tissulaire. Cependant, l'étude de leur production à grande échelle reste encore limitée. Les premiers travaux de Caroline Ferrari réalisés au laboratoire sur des CSM porcines, ont fourni une base à nos travaux [1]. Nos résultats se sont focalisés sur quatre questions essentielles pour le développement de ces procédés. Elles ont fait chacune l'objet d'un chapitre de cette thèse :

- Chapitre 1 et 2 : État de l'art et Matériels et méthodes.
- Chapitre 3 : Pertinence du modèle cellulaire choisi et robustesse des réponses biologiques.
- Chapitre 4 : Comparaison des différentes géométries de bioréacteurs pour la croissance de CSM humaines.
- Chapitre 5 : Vers un milieu sans sérum pour la culture de CSM.

— Chapitre 6 : Impact du procédé d'amplification sur la qualité des CSM produites en vue d'un usage thérapeutique.

Pertinence du modèle cellulaire choisi et robustesse des réponses biologiques

- Résultats : Afin d'évaluer la faisabilité de la mise en place d'un procédé de culture, des banques cellulaires de CSM issues de plusieurs donneurs ont d'abord été évaluées. Différentes méthodes de cryopréservation ont également été testées. La démonstration a été faite que ces dernières résistaient mieux à la cryoconservation dans un milieu riche en SVF et avec une rampe de température lente. La stabilité et la robustesse des profils de croissance des CSM ont également été mesurées au sein de différentes banques, sur plusieurs passages et selon la durée de leur période de stockage en azote liquide.
- Conclusions : Il a ainsi été déterminé qu'au vu des variabilités observées, des comparaisons entre conditions opératoires ne pouvaient être valides qu'au sein de CSM issues d'une même banque et utilisées à passage identique. Ceci constitue un défi majeur à relever pour le développement d'un procédé de culture de CSM à grande échelle, dont la robustesse doit être au préalable démontrée.
- Perspectives : Dans le cadre de ce développement, l'utilisation d'un modèle de CSM immortalisées serait un outil appréciable afin d'étudier plus finement l'impact des conditions expérimentales. C'est pourquoi, certaines études utilisent les lignées "hTERT-MS" [2], qui sont des CSM transformées pour sur-exprimer la télomérase et ainsi échapper à la sénescence. La comparabilité de ces cellules avec des CSM non transformées peut cependant être débattue, les CSM exprimant très faiblement la télomérase. Or, cette enzyme est au cœur de multiples voies de signalisation intracellulaire. Par exemple, les "hTERT-MS" ne présentent pas à leur surface des intégrines identiques à celles des CSM [3]. Une alternative récente est d'utiliser une banque de CSPi. Ces dernières peuvent être différenciées en CSM par simple changement du milieu de culture créant ainsi des "CSM dérivées de CSPi" dont le phénotype semble plus proche de celui de CSM primaires [4–8]. Le premier essai clinique d'un traitement allogénique à base de CSPi, le CYP-001 basé sur la technologie Cymerus™ de Cynata Therapeutics (Australie), vient d'ailleurs d'être approuvé par la Agence de régulation des médicaments et produits de santé (MHRA) britannique. Ce produit est constitué de CSM dérivées de CSPi afin de traiter les cas aigus de GvHD résistante aux stéroïdes, et l'objectif déclaré de Cynata Therapeutics est de mettre au point des traitements par une "méthode de production robuste et commercialement viable de

CSM"*. Des tests préliminaires ont été réalisés au cours de ces travaux pour intégrer ce modèle, dans le futur, à la thématique de culture en réacteurs des CSM au sein du laboratoire.

Comparaison des différentes géométries de bioréacteurs pour la croissance de CSM humaines

- **Résultats :** Une fois ce cadre déterminé, différentes géométries de bioréacteurs pour la croissance de CSM humaines ont été comparées. La croissance des CSM en conditions classiques, sur boîtes de culture plastique (surface plane statique), a été comparée à celles observées dans différents systèmes de cultures sur microporteurs. Avant cette étape, de nombreux essais ont été réalisés pour mettre au point une méthode de comptage des CSM sur les microporteurs Cytodex 1, choisis dans ces travaux comme microporteurs modèles. Au vu du caractère microporeux de ces microporteurs et des forces d'adhérence importantes développées par les CSM humaines, seule la mesure indirecte de la population au travers de l'évolution de sa consommation en glucose a pu être utilisée, malgré les hypothèses établissant cette mesure indirecte. Un autre type de microporteurs, le Cytodex 3, a également été testé pour éviter cet écueil, car leur surface peut être dégradée par l'utilisation de collagénase ou de dispase. Cette option a été abandonnée au vu des performances de croissance moindre des CSM sur ces microporteurs. Des essais préliminaires ont aussi été conduits sur microporteurs Solohill (tableau 6) et ont été abandonnés pour les mêmes raisons. *Différentes géométries de systèmes de culture ont été comparées à la méthode de culture traditionnelle sur boîtes. L'agitation pendulaire en spinners à petite échelle (125 mL) a été abandonnée rapidement car menant à la destruction des microporteurs en quelques jours. Les systèmes de culture à agitation orbitale et axiale soutenant très mal la croissance des CSM, contrairement aux cultures plane ou aux cultures sur microporteurs statiques en incubateur, il a été décidé d'approfondir la problématique de la résistance des CSM aux contraintes hydrodynamiques.*

Deux systèmes de cultures ont été envisagés pour le développement à petite échelle d'un procédé de culture de CSM sur microporteurs : l'utilisation de fioles d'Erlenmeyer et celle de bioréacteurs mécaniquement agités. Ces deux systèmes sont transposables à grande échelle en cultures de cellules mammaliennes, jusqu'à 2000 L pour les systèmes à agitation orbitale [9–11] et 25000 L pour les systèmes à agitation axiale [12]. L'utilisation de systèmes d'agitation orbitale avec contrôles en ligne est plus récente [13–16], mais leur caractérisation en termes d'ingénierie est déjà avancée [17–20]. Toutefois leur utilisation en culture de CSM est limitée. Ils sont principalement utilisés

*. <http://www.bioinformant.com/cynata-approved-to-launch-worlds-1st-clinical-trial-with-an-allogeneic-ipsc-derived-product/>, 20 septembre 2016

pour favoriser l'homogénéité de la distribution des CSM lors de leur phase d'attachement sur une matrice en ingénierie tissulaire [21–23], et assez peu pour leur amplification sur microporteurs [24]. En effet, le principal critère de montée en échelle des cultures sur microporteurs est la vitesse minimale de mise en suspension (N_{js}), ce paramètre étant déterminé visuellement pour les cultures en systèmes d'agitation orbitale. Dans le cadre de ce travail, *une corrélation originale permettant la détermination de N_{js} a priori a été établie* [25] (article détaillé en anglais, en Annexe B-1, page 297). L'utilisation de fioles d'Erlenmeyer ou de microplaques en agitation orbitale permet de comparer aisément en parallèle de multiples conditions de culture (milieu, taux d'ensemencement, type de microporteurs), mais plus difficilement de multiples conditions d'agitation. Cela aurait, en effet, nécessité plusieurs incubateurs en parallèle, instrumentés de plateformes d'agitation de diamètre orbital variable. C'est pourquoi, l'étude de l'impact des paramètres d'agitation sur la culture de CSM sur microporteurs a été entreprise en bioréacteur à cuve agitée sur une plateforme de 6 minibioréacteurs (GPC, volume utile maximal de 200 mL). La caractérisation de la turbulence au sein de ces minibioréacteurs a été réalisée par les Dr Marie-Laure Collignon et Éric Olmos, ce qui a donné lieu à une publication détaillée en Annexe B.2-2 (page 321) [26]. Ces expériences ont permis de comparer différents types de mobiles d'agitation (mobile en oreille d'éléphant (EE), turbine Rushton (R) et mobile en hélice marine (HM)). Pour une même puissance globale dissipée, une fonction de circulation et de dissipation a été définie afin de comparer, non seulement les contraintes moyennes subies par les CSM sur microporteurs, mais aussi la fréquence à laquelle elles sont exposées à une zone de contraintes maximales, ici définie par la taille critique de l'échelle de Kolmogorov. Dans ce cadre, *les mobiles d'agitation ont été classés en fonction de leur capacité à générer des conditions plus ou moins contraignantes de culture* : le mobile EE, la turbine Rushton et le mobile HM, respectivement. Un plan d'expériences a été mis en place afin de tester cette hypothèse sur la réponse biologique des CSM sur microporteurs Cytodex 1. Trois paramètres ont été choisis : les mobiles d'agitation, la puissance globale dissipée et la quantité de microporteurs. Après la réalisation des 18 cultures composant ce plan, aucune conclusion n'a pu être tirée quant à l'effet de l'agitation sur la culture des CSM sur microporteurs. En effet, au vu des résultats obtenus, les cultures ont souffert de difficultés dues à la technique de régulation de la température par une résistance chauffante. Cette méthode de chauffage, par la base des bioréacteurs, peut avoir un impact fort sur la viabilité cellulaire, surtout quand la totalité des microporteurs n'est pas mise en suspension.

- Conclusions : La mise en œuvre d'un système à petite échelle permettant d'effectuer efficace-

ment plusieurs cultures parallèles peut donc être sujette à des problématiques identiques que lors de montées en échelle d'un procédé. Par exemple, la montée en échelle d'un système à agitation orbitale peut créer une augmentation de la température par friction [27]. De plus, lors d'une montée en échelle de 15 mL à 5 L, il a récemment été mis en évidence que, pour une même vitesse critique de mise en suspension, la croissance des CSM sur microporteurs était plus importante à petite échelle malgré une taille inférieure de l'échelle de Kolmogorov [28]. Au vu de cette étude de Nienow *et. al* [28] en minibioréacteurs Ambr15 (TAP Biosystem, Royaume-Uni, 24 à 48 cultures parallèles), il semblerait donc que les CSM soient plus résistantes aux contraintes hydrodynamiques qu'escompté, et que leur oxygénation puisse être un paramètre plus important que précédemment anticipé. L'identification des paramètres critiques d'un procédé de culture par une approche en plan d'expériences sur les minibioréacteurs Ambr15 a, d'ailleurs, validé l'utilisation de ces bioréacteurs à petite échelle en tant que modèle pour des réacteurs de 5 à 15000 L en cultures de CHO [29].

- Perspectives : Dans le cadre de cette étude, la comparaison de différentes géométries de bioréacteurs pour la croissance des CSM a fourni aux CSM une surface d'adhérence sous la forme des microporteurs Cytodex 1. Ce choix est largement accepté dans la littérature comme le plus économiquement viable pour la culture de CSM à grande échelle [30]. Cependant, il a été mis en évidence la difficulté de trouver un système pour la culture de CSM permettant une récolte des CSM avec un fort rendement et transposable sur diverses échelles (parallélisation de systèmes à petite échelle pour les thérapies autologues, montée en échelle pour les thérapies allogéniques). Plusieurs études se sont penchées sur des solutions techniques aux problèmes de clarification et de lavage des cellules issues de ces cultures, que ce soit par filtration tangentielle [31–33] ou par centrifugation continue [33, 34]. Des alternatives sont donc de plus en plus envisagées et redéfinissent entièrement la problématique de l'intensification des procédés de culture de CSM : de nouveaux microporteurs solubles après traitement à l'EDTA sont maintenant en cours de développement [35] et la culture en agrégats est de plus en plus considérée comme une alternative viable à la culture sur microporteurs [36–38]. La mise en place de ces systèmes de culture permettrait une analyse plus approfondie des CSM et pourrait permettre la réalisation de plans d'expériences menant à une réelle compréhension de l'effet de l'agitation et de l'aération sur la culture de CSM.

Vers un milieu sans sérum pour la culture de CSM

- Résultats : Une seconde voie d'étude de l'amplification des CSM concerne les paramètres bio-

chimiques, notamment par la formulation du milieu de culture. Or, le milieu de référence pour la culture de CSM est composé en grande partie de sérum de veau fœtal (SVF). Le SVF étant très variable, mal défini et pouvant poser un risque sanitaire, des milieux commerciaux, dont la formulation est protégée, existent déjà. Certains de ces milieux ont été testés dans le cadre de nos travaux et des meilleurs résultats de croissance des CSM en conditions statiques qu'en milieu contenant du SVF ont été obtenus. Deux autres orientations ont été suivies pour remplacer le SVF sans utiliser de solutions d'attachement : d'abord sa substitution par des hydrolysats végétaux, posant un risque sanitaire moindre, et la formulation d'un milieu complexe défini par plan d'expériences. Le milieu complexe obtenu, appelé Milieu 4, est formulé sur la base d'un milieu minimum, l' α -MEM/F12, supplémenté de 21 composés. Les performances obtenues avec ce milieu étaient 50% inférieures à celles obtenues dans un milieu supplémenté en SVF.

- Conclusions : Il a pu être déterminé qu'une partie de l'efficacité des milieux commerciaux résidait dans leur solution d'attachement, bien que certains puissent soutenir la croissance des CSM sans nécessiter de traitement des surfaces d'adhérence. L'utilisation d'une solution d'attachement en conjonction avec le Milieu 4 formulé au laboratoire par plan d'expériences n'a pas permis de stimuler fortement la croissance des CSM, indiquant par là même que certains composés essentiels à la croissance des CSM étaient, soit absents du Milieu 4, soit en concentrations non optimales. Or, la gamme de concentration choisie pour chaque composé répondait également à des exigences financières afin de développer un milieu utilisable à plus grande échelle. Dans le dessein de généraliser l'utilisation des CSM en thérapeutique, cette formulation est cependant une avancée intéressante car sa composition intégrale est connue et peut donc être optimisée plus en avant.
- Perspectives : Les difficultés du développement d'un milieu sans sérum ont d'ailleurs déjà été soulignées par le fait que l'efficacité d'un milieu sans sérum dépend fortement du donneur dont est issue la population de CSM [3, 39]. C'est pourquoi, certains chercheurs ont pris le parti de choisir un milieu de production en fonction de sa plus faible variabilité inter-donneur [40]. De plus, des résultats obtenus par criblage haut débit de composés en conditions statiques, dans notre cas par microscopie automatisée, ne seraient pas transposables à des systèmes sur microporteurs, comme l'ont démontré Tan *et al.* [39]. La croissance des CSM est contrôlée par des interactions complexes entre la nature des CSM, la composition du milieu et la surface d'adhérence qui leur est fournie. Or, chacun de ces facteurs est hautement variable dans les conditions de culture classiques. Une voie de contrôle envisagée est de contrôler l'adsorption

aléatoire des protéines de la MEC, fournies par le milieu, au plastique des boîtes de culture, par l'utilisation de polymères synthétiques [41]. Un de ces polymères prometteurs est le PMEDSAH, dont il est possible de contrôler l'épaisseur de matrice et l'hydrophobicité [42], et qui a été démontré comme capable de soutenir la croissance des CSE en milieu sans sérum [43]. Une seconde alternative est l'amplification à grande échelle de CSPi, dont la culture dans un système défini (milieu E8, microporteurs en polystyrène recouvert de vitronectine) permet d'obtenir jusqu'à 10^6 cellules.mL⁻¹ [44]. Ce système permettrait d'éviter l'écueil d'une médecine personnalisée limitée aux seuls donneurs chez qui les CSM seraient compatibles avec le procédé développé.

Impact du procédé d'amplification sur la qualité des CSM produites en vue d'un usage thérapeutique

- **Résultats** : Tout développement de procédé nécessite le suivi des caractéristiques d'intérêt du produit final. Dans le cas des CSM, ces critères consensuels ont été définis *a minima* par l'expression de divers marqueurs de surfaces, leur capacité d'adhérence au plastique et celle à se différencier en 3 lignages (ostéocytaire, adipocytaire et chondrocytaire). Cependant, ces caractéristiques sont peu quantifiables par les méthodes recommandées par l'ISCT ou présentent peu de variations en réponse à des changements du procédé de culture. Afin d'évaluer les progrès générés par nos travaux sur la stimulation de la prolifération des CSM, des méthodes traditionnelles ont d'abord été mises en place (cytométrie capillaire, marquages histochimiques, test des CFU). Une alternative aux marquages histochimiques a également été testée en suivant l'expression de la différenciation par RT-qPCR. La sénescence des CSM a également été suivie. Il a été possible d'appliquer partiellement ces techniques pour comparer l'impact de différentes vitesses d'agitation sur la culture de CSM sur microporteurs et celui de différentes densités d'ensemencement des CSM, avec ou sans alimentation, en cultures statiques.
- **Conclusions** : Ces dernières expériences ont permis de démontrer, en soutien de la littérature existante, l'importance du contrôle de la balance entre vieillissement des CSM et quantité de cellules produites. Le procédé d'amplification définit et remodèle la population de CSM d'origine, ce qui détermine leur efficacité thérapeutique et leur intérêt en clinique. Des méthodes de caractérisation approfondie des CSM sont donc à mettre en place au-delà des critères recommandés par l'ISCT [45].
- **Perspectives** : En amont du procédé de culture, la compréhension de l'effet du choix du donneur (âge, sexe, état de santé) et de la méthode d'isolation des CSM, est cruciale pour la mise en

place du procédé adéquat (choix du milieu et de la surface d'adhérence). L'intégration de méthodes à plus haut débit (ScorecardTM, puces à ARN) ou la démonstration de changements liés à certains marqueurs clefs (âge biologique) pourraient permettre un suivi continu des CSM, de leur extraction à leur amplification jusqu'à leur suivi *in vivo* au sein du receveur [46, 47]. Dans le cadre du développement d'un procédé de culture à grande échelle, ces informations pourraient permettre d'orienter la population cellulaire vers un lignage spécifique d'intérêt ou de déterminer un optimum de croissance pour lequel le vieillissement cellulaire ne compromet pas l'efficacité thérapeutique, et ce tout en limitant la probabilité de formation tumorale.

En conclusion, nos travaux apportent une contribution à la problématique de l'amplification des CSM dans une perspective globale : de l'établissement des banques de CSM, à leur amplification en bioréacteurs, idéalement dans un milieu défini, tout en maintenant leurs caractéristiques intrinsèques. La perspective à long terme d'une utilisation des CSM à grande échelle a été le point central de cette étude, principalement par l'approfondissement des paramètres d'agitation pour la mise œuvre de systèmes de culture transposables en cuve agitée, mais aussi par une démarche rationnelle d'étude de la formulation d'un milieu sans sérum. Dans le cadre plus vaste de la culture de cellules humaines à usages thérapeutiques, l'étude de ces problématiques doit être poursuivie, que ce soit pour des cellules primaires, embryonnaires ou pluripotentes induites. Les thérapies cellulaires, avec la thérapie génique, sont qualifiées de "médicaments de thérapie innovante", et en terme de procédés biologiques, remettent en cause les connaissances établies en culture de lignées cellulaires immortalisées. C'est pourquoi, une compréhension approfondie de l'environnement physique et biologique rencontré par les cellules au cours des procédés d'amplification et de différenciation est d'autant plus nécessaire. Elle devrait fournir un cadre robuste au développement de ces thérapies innovantes en vue, non seulement, de soigner, mais aussi, de réparer le corps humain.

Références bibliographiques

- [1] Caroline FERRARI. *Études cinétiques de procédés d'expansion de cellules souches mésenchymateuses cultivées sur microporteurs en systèmes agités*. Thèse, Université de Lorraine, 2012, pages 1–192.
- [2] C WEBER et al. Expansion and Harvesting of hMSC-TERT. *The open biomedical engineering journal*, 1 :38–46, 2007.
- [3] De SALZIG et al. Attachment, Growth, and Detachment of Human Mesenchymal Stem Cells in a Chemically Defined Medium. *Stem cells international*, 2016 :e5246584, 2016.
- [4] L ZOU et al. A simple method for deriving functional MSCs and applied for osteogenesis in 3d scaffolds. *Scientific reports*, 3 :2243, 2013.
- [5] Q ZHAO et al. MSCs derived from iPSCs with a modified protocol are tumor-tropic but have much less potential to promote tumors than bone marrow MSCs. *Proceedings of the national academy of sciences of the united states of america*, 12(2) :530–535, 2014.
- [6] J ZHANG et al. Exosomes released from human induced pluripotent stem cells-derived MSCs facilitate cutaneous wound healing by promoting collagen synthesis and angiogenesis. *Journal of translational medicine*, 13(1) :49, 2015.
- [7] M TANG et al. Human induced pluripotent stem cell-derived mesenchymal stem cell seeding on calcium phosphate scaffold for bone regeneration. *Tissue engineering. part a*, 20(7-8) :1295–1305, 2014.
- [8] R XU et al. hiPS-MSCs differentiation towards fibroblasts on a 3d ECM mimicking scaffold. *Scientific reports*, 5(8480) :1–7, 2015.
- [9] X ZHANG et al. Use of orbital shaken disposable bioreactors for Mammalian cell cultures from the milliliter-scale to the 1,000-liter scale. *Advances in biochemical engineering/biotechnology*, 115 :33–53, 2010.
- [10] W KLÖCKNER et al. Advances in shaking technologies. *Trends in biotechnology*, 30(6) :307–314, 2012.
- [11] S AHUJA et al. Application of multivariate analysis and mass transfer principles for refinement of a 3-L bioreactor scale-down model—when shake flasks mimic 15,000-L bioreactors better. *Biotechnology progress, In Press*, 2015. DOI : 10.1002/btpr.2134.
- [12] S S OZTURK. Equipment for Large-Scale Mammalian Cell Culture. In, numéro 139 in *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology*, pages 69–92, 2013.
- [13] C WITTMANN et al. Characterization and application of an optical sensor for quantification of dissolved O₂ in shake-flasks. *Biotechnology letters*, 25(5) :377–380, 2003.
- [14] T ANDERLEI et al. Online respiration activity measurement (OTR, CTR, RQ) in shake flasks. *Biochemical engineering journal*, 17(3) :187–194, 2004.
- [15] X GE et al. Real-time monitoring of shake flask fermentation and off gas using triple disposable noninvasive optical sensors. *Biotechnology progress*, 28(3) :872–877, 2012.
- [16] K SCHNEIDER et al. Optical device for parallel online measurement of dissolved oxygen and pH in shake flask cultures. *Bioprocess and biosystems engineering*, 33(5) :541–547, 2010.
- [17] A DUCCI et al. Orbitally shaken bioreactors—viscosity effects on flow characteristics. *Aiche journal*, 60(11) :3951–3968, 2014.

- [18] W KLÖCKNER et al. Correlation between mass transfer coefficient $k_L a$ and relevant operating parameters in cylindrical disposable shaken bioreactors on a bench-to-pilot scale. *Journal of biological engineering*, 7 :28, 2013.
- [19] J BÜCHS et al. Calculating liquid distribution in shake flasks on rotary shakers at waterlike viscosities. *Biochemical engineering journal*, 34(3) :200–208, 2007.
- [20] H ZHANG et al. Computational-fluid-dynamics (CFD) analysis of mixing and gas-liquid mass transfer in shake flasks. *Biotechnology and applied biochemistry*, 41(Pt 1) :1–8, 2005.
- [21] K Taek LIM et al. Synergistic effects of orbital shear stress on in vitro growth and osteogenic differentiation of human alveolar bone-derived mesenchymal stem cells. *Biomed research international*, 2014 :316803, 2014.
- [22] D J GRIFFON et al. A comparative study of seeding techniques and three-dimensional matrices for mesenchymal cell attachment. *Journal of tissue engineering and regenerative medicine*, 5(3) :169–179, 2011.
- [23] L WANG et al. Effect of initial seeding density on human umbilical cord mesenchymal stromal cells for fibrocartilage tissue engineering. *Tissue engineering. part a*, 15(5) :1009–1017, 2009.
- [24] M SHA et al. Microcarrier-Based Expansion of Adipose-Derived Mesenchymal Stem Cells in Shake Flasks. *Bioprocessing journal*, 12(4) :32–38, 2014.
- [25] E OLMOS et al. Critical agitation for microcarrier suspension in orbital shaken bioreactors : Experimental study and dimensional analysis. *Chemical engineering science*, 122 :545–554, 2015.
- [26] M-L COLLIGNON et al. Large-Eddy Simulations of microcarrier exposure to potentially damaging eddies inside mini-bioreactors. *Biochemical engineering journal*, 108 :30–43, 2016.
- [27] K RAVAL et al. Characterization of heat transfer of large orbitally shaken cylindrical bioreactors. *Biochemical engineering journal*, 86 :1–7, 2014.
- [28] A W NIENOW et al. Agitation conditions for the culture and detachment of hMSCs from microcarriers in multiple bioreactor platforms. *Biochemical engineering journal*, 108 :24–29, 2016.
- [29] V JANAKIRAMAN et al. Application of High-Throughput Mini-Bioreactor System for Systematic Scale-Down Modeling, Process Characterization and Control Strategy Development. *Biotechnology progress*, 31(6) :1623–1632, 2015.
- [30] A S SIMARIA et al. Allogeneic cell therapy bioprocess economics and optimization : single-use cell expansion technologies. *Biotechnology and bioengineering*, 111(1) :69–83, 2014.
- [31] B CUNHA et al. Exploring continuous and integrated strategies for the up- and downstream processing of human mesenchymal stem cells. *Journal of biotechnology*, In Press, 2015. DOI : 10.1016/j.jbiotec.2015.02.023.
- [32] B CUNHA et al. Filtration methodologies for the clarification and concentration of human mesenchymal stem cells. *Journal of membrane science*, 478 :117–129, 2015.
- [33] A C SCHNITZLER et al. Bioprocessing of human mesenchymal stem / stromal cells for therapeutic use : current technologies and challenges. *Biochemical engineering journal*, 108 :3–13, 2016.
- [34] S HASSAN et al. Allogeneic cell therapy bioprocess economics and optimization : downstream processing decisions. *Regenerative medicine*, 10(5) :591–609, 2015.

-
- [35] CORNING, éditeur. *A new microcarrier platform for efficient cell production and recovery*. BioProcess International. (Hynes Convention Center). Boston, 2015.
- [36] S SART et al. Three-Dimensional Aggregates of Mesenchymal Stem Cells : Cellular Mechanisms, Biological Properties, and Applications. *Tissue engineering part b : reviews*, 20(5) :365–380, 2013.
- [37] Y LI et al. Three-dimensional spheroid culture of human umbilical cord mesenchymal stem cells promotes cell yield and stemness maintenance. *Cell and tissue research, In Press*, 2015. DOI : 10.1007/s00441-014-2055-x.
- [38] S ALIMPERTI et al. Serum-free spheroid suspension culture maintains mesenchymal stem cell proliferation and differentiation potential. *Biotechnology progress*, 30(4) :974–983, 2014.
- [39] K Y TAN et al. Serum-free media formulations are cell line-specific and require optimization for microcarrier culture. *Cytotherapy*, 17(8) :1152–1165, 2015.
- [40] P WUCHTER et al. Evaluation of gmp compliant culture media for in vitro expansion of human bone marrow mesenchymal stromal cells. *Experimental hematology, In Press*, 2016. DOI : 10.1016/j.exphem.2016.02.004.
- [41] J D KRUTTY et al. Surface functionalization and dynamics of polymeric cell culture substrates. *Current opinion in biotechnology. Tissue, cell & pathway engineering* (2016) 40 :164–169, 2016.
- [42] R KUMAR et al. Predictive Model for the Design of Zwitterionic Polymer Brushes : A Statistical Design of Experiments Approach. *Acs applied materials & interfaces, In Press*, 2016. DOI : 10.1021/acsami.6b04370.
- [43] L G VILLA-DIAZ et al. Synthetic polymer coatings for long-term growth of human embryonic stem cells. *Nature biotechnology*, 28(6) :581–583, 2010.
- [44] S M BADENES et al. Defined Essential 8™ Medium and Vitronectin Efficiently Support Scalable Xeno-Free Expansion of Human Induced Pluripotent Stem Cells in Stirred Microcarrier Culture Systems. *Plos one*, 11(3) :e0151264, 2016.
- [45] C MARTIN et al. Revisiting MSC expansion from critical quality attributes to critical culture process parameters. *Process biochemistry, In Press*, 2016. DOI : 10.1016/j.procbio.2016.04.017.
- [46] J REN et al. Intra-subject variability in human bone marrow stromal cell (BMSC) replicative senescence : molecular changes associated with BMSC senescence. *Stem cell research*, 11(3) :1060–1073, 2013.
- [47] D F STRONCEK et al. Establishing a bone marrow stromal cell transplant program at the national institutes of health clinical center. *Tissue engineering. part b, reviews*, 20(3) :200–205, 2014.

Annexe A

Composition des milieux de culture

A.1 Milieu Essentiel Minimum de modification alpha

Sels	(mg/L)
CaCl ₂	200,00
MgSO ₄	97,67
KCl	400,00
NaHCO ₃	2200,00
NaCl	6800,00
NaH ₂ PO ₄ , H ₂ O	122,00
Acides Aminés	
L-Alanine	25,00
L-Arginine, HCl	126,00
L-Asparagine, H ₂ O	50,00
Acide L-Aspartique	30,00
L-Cystine, 2HCl	31,30
L-Cystéine, HCl	100,00
Acide L-Glutamique	75,00
Glycine	50,00
L-Histidine, HCl, H ₂ O	42,00
L-Isoleucine	52,00
L-Leucine	52,00
L-Lysine, HCl	72,50
L-Méthionine	15,00
L-Phénylalanine	32,00
L-Proline	40,00
L-Sérine	25,00
L-Thréonine	48,00
L-Tryptophane	10,00
L-Tyrosine, 2Na, 2H ₂ O	51,90
L-Valine	46,00
Vitamines	
Chlorure de choline/B4	1,00
Acide folique/B9	1,00
Nicotinamide/niacinamide/PP/B3	1,00
Acide D-panthoténique, sel d'hémi-calcium/B5	1,00
Pyridoxal, HCl/B6	1,00
Riboflavine/B2	0,10
Thiamine, HCl/aneurine/B1	1,00
Biotine/B7	0,10
Cobalamine/B12	1,36
Acide L-Ascorbique, Na/C	50,00
Autres	
D-Glucose	1000,00
Rouge phénol, Na/phénolsulfonephtaléine	11,00
myo-Inositol	2,00
Acide pyruvique, Na	110,00
Acide thioctique/lipoïque	0,20

A.2 Milieu de Dulbecco modifié selon Iscove

Sels	(mg/L)
CaCl ₂	165,30
MgSO ₄	97,67
KCl	330,00
NaHCO ₃	3024,00
NaCl	4505,00
NaH ₂ PO ₄ , H ₂ O	1090,00
KNO ₃	0,076
Na ₂ SeO ₃ , 5H ₂ O	0,017
Acides Aminés	
L-Alanine	25,00
L-Arginine, HCl	84,00
L-Asparagine, H ₂ O	28,40
Acide L-Aspartique	30,00
L-Cystine, 2HCl	91,24
L-Glutamine	584,00
Acide L-Glutamique	75,00
Glycine	30,00
L-Histidine, HCl, H ₂ O	42,00
L-Isoleucine	105,00
L-Leucine	105,00
L-Lysine, HCl	146,00
L-Méthionine	30,00
L-Phénylalanine	66,00
L-Proline	40,00
L-Sérine	42,00
L-Thréonine	95,00
L-Tryptophane	16,00
L-Tyrosine, 2Na, 2H ₂ O	103,79
L-Valine	94,00
Vitamines	
Chlorure de choline/B4	4,00
Acide folique/B9	4,00
Nicotinamide/niacinamide/PP/B3	4,00
Acide D-panthoténique, sel d'hémi-calcium/B5	4,00
Pyridoxal, HCl/B6	4,00
Riboflavine/B2	0,40
Thiamine, HCl/aneurine/B1	4,00
Biotine/B7	0,013
Cobalamine/B12	0,013
Autres	
D-Glucose	4500,00
Rouge phénol, Na/phénolsulfonephtaléine	16,00
myo-Inositol	7,20
Acide pyruvique, Na	110,00
HEPES	5958,00

A.3 Milieu F12 de Ham

Sels	(mg/L)
CaCl ₂	44,00
KCl	223,60
NaHCO ₃	1176,00
NaCl	7599,00
NaH ₂ PO ₄ , H ₂ O	142,00
MgCl ₂ , 6H ₂ O	122,00
FeSO ₄ , 7H ₂ O	0,834
CuSO ₄ , 5H ₂ O	0,00249
ZnSO ₄ , 7H ₂ O	0,863
Acides Aminés	
L-Alanine	8,90
L-Arginine, HCl	211,00
L-Asparagine, H ₂ O	15,00
L-Cystéine, HCl	35,12
L-Glutamine	146,00
Acide L-Glutamique	14,70
Glycine	7,50
L-Histidine, HCl, H ₂ O	21,00
L-Isoleucine	4,00
L-Leucine	13,10
L-Lysine, HCl	36,50
L-Méthionine	4,50
L-Phénylalanine	5,00
L-Proline	34,50
L-Sérine	10,50
L-Thréonine	11,90
L-Tryptophane	2,04
L-Tyrosine, 2Na, 2H ₂ O	5,40
L-Valine	11,70
Vitamines	
Chlorure de choline/B4	14,00
Acide folique/B9	1,30
Nicotinamide/niacinamide/PP/B3	0,036
Acide D-panthoténique, sel d'hémi-calcium/B5	0,50
Pyridoxine, HCl/B6	0,06
Riboflavine/B2	0,037
Thiamine, HCl/aneurine/B1	0,03
Biotine/B7	0,0073
Cobalamine/B12	1,40
Autres	
D-Glucose	1802,00
Rouge phénol, Na/phénolsulfonephtaléine	10,00
myo-Inositol	18,00
Acide pyruvique, Na	110,00
Acide thioctique/lipoïque	0,21
Acide linoléique	0,084
Hypoxanthine	4,10
Thymidine	0,73
Putrescine, 2HCl/tétraméthylène diamine	0,161

A.4 Liste des composés présents dans le supplément B27

BSA
Transferrine
Insuline
Progestérone
Putrescine
Sélénite de sodium
Biotine
L-carnitine
Corticostérone
Éthanolamine
D(+)-galactose
Glutathione (réduite)
Acide linoléique
Acide linoléique
Acétate de rétinyle
Sélénium
T3 (triiodo-1-thyronine)
DL-tocophérol (vitamine E)
DL-tocophérol acétate
Catalase
Superoxyde dismutase

A.5 Plans de formulation

TABLEAU 1 – Plan d'expériences : formulation du milieu 2

Composé Unité	Glutamax X	Lectin mg/L	Sérotinine µM	Oestradiol µM	IGF1 mg/L	LDL mg/L	Laminine mg/L	Fibronectine mg/L	SynthéChol X	B27 X	Gélatine mg/L
1	0	0,3	10	0	0,00	0,4	0	0	0	0	0
2	1	0,3	0	0	0,00	0	0	30	0	0	20
3	0	0,03	0	0	0,15	0,4	0,02	0	1	1	0
4	0	0,03	0	0,01	0,00	0	0,02	30	0	0	200
5	1	0	0	0,01	0,00	0,4	0	30	1	1	200
6	1	0,3	10	0,01	0,15	0,4	0,02	30	1	1	200
7	0	0,3	10	0,01	0,15	0,4	0	30	1	1	200
8	0	0,03	0	0	0,00	0,4	0,02	30	1	0	200
9	1	0,3	10	0	0,00	0	0,02	0	0	0	200
10	0	0,3	0	0,01	0,00	0	0	30	1	0	200
11	0	0	0	0,01	0,15	0,4	0,02	30	0	0	0
12	0	0,3	0	0,01	0,15	0,4	0	3	0	0	200
13	1	0,3	10	0,01	0,00	0,4	0	0	0	1	200
14	0	0,3	0	0,01	0,00	0,4	0	30	0	1	0
15	0	0,3	0	0,01	0,15	0	0	0	1	1	0
16	1	0	0	0	0,15	0,4	0	30	0	0	200
17	1	0,3	10	0,01	0,15	0	0	0	1	0	200
18	0	0,3	10	0	0,00	0	0,02	0	1	0	0
19	0	0,03	10	0	0,00	0	0	30	1	0	200
20	1	0	10	0	0,15	0,04	0,02	30	0	1	200
21	1	0,3	0	0,01	0,15	0	0,02	30	0	1	0
22	1	0	10	0,01	0,00	0	0,02	30	1	0	200
23	0	0,3	0	0	0,05	0,04	0,01	3	0	0	200
24	0	0	10	0	0,00	0,4	0,02	0	0	0	0
25	1	0,3	0	0	0,00	0,4	0,02	30	0	1	200
26	1	0,3	0	0	0,15	0,04	0	0	0	0,5	0
27	0	0,3	10	0	0,15	0,4	0,02	30	0	0	200
28	1	0,03	0	0	0,15	0	0,02	0	0	0	20
29	1	0,3	10	0,01	0,00	0	0	30	1	1	0
30	0	0,3	10	0,01	0,00	0,04	0,02	30	0	0	0
31	1	0,03	0	0,01	0,15	0,04	0	30	1	0	20
32	0	0,3	0	0	0,00	0	0,02	0	0	1	0
33	0	0,03	10	0,01	0,00	0	0,02	3	1	1	200
34	1	0	0	0	0,15	0	0	30	1	1	0
35	0	0,3	10	0,01	0,15	0,4	0,02	0	1	0	20
36	0	0	10	0	0,00	0,4	0	30	0	1	200
37	1	0,3	0	0,01	0,00	0,4	0,02	3	1	1	0
38	1	0,3	0	0	0,15	0	0,02	3	1	1	200
39	0	0	0	0,01	0,00	0,4	0,02	0	0	1	200
40	1	0	10	0,01	0,15	0	0,02	0	1	1	0
41	1	0,03	10	0,01	0,00	0,4	0,02	30	0	1	0
42	1	0,3	0	0,01	0,15	0,4	0,02	30	1	0	200
43	0	0,3	10	0	0,15	0	0,02	30	1	1	0
44	0	0	10	0,01	0,00	0	0	0	0	0	200
45	1	0	0	0	0,00	0,04	0,02	30	0	0,5	0
46	0	0	10	0,01	0,15	0	0	30	0	1	0
47	1	0,3	10	0	0,15	0	0	30	0,5	0,5	200
48	0	0	0	0,01	0,15	0,04	0,02	0	1	0	200
49	0	0	0	0	0,15	0	0,02	30	0,5	0,5	200
50	0	0,03	10	0	0,15	0,4	0	0	0	1	200
51	0	0,3	0	0	0,15	0,04	0	30	0	1	200
52	1	0	10	0	0,00	0,4	0,02	0	1	1	200
53	0	0,3	10	0,01	0,15	0	0,02	0	0	1	200
54	1	0,03	10	0	0,15	0,4	0	30	0,5	1	20
55	0	0	10	0,01	0,00	0,4	0	0	1	1	0
56	0	0,3	0	0	0,15	0,4	0	30	1	0	0
57	0	0	0	0,01	0,00	0	0,02	30	1	1	20
58	1	0	10	0	0,05	0	0	3	0	0	0
59	1	0,03	0	0	0,00	0	0	0	1	0	200
60	0	0,3	0	0	0,00	0,4	0	0	1	1	200
61	1	0,3	0	0	0,00	0,4	0,02	0	0	0	0
62	1	0,3	0	0	0,00	0,04	0,02	30	1	1	200
63	1	0	0	0,01	0,15	0	0	0	0	1	200
64	1	0,3	10	0	0,15	0,4	0,02	3	0,1	1	0
65	1	0,3	0	0,01	0,00	0	0,01	0	0	0	0
66	1	0,03	0	0	0,00	0,4	0	3	0	1	20
67	0	0	10	0	0,15	0,04	0	3	1	1	20
68	1	0,3	10	0,01	0,15	0,4	0,02	30	1	1	200
69	0	0,03	10	0,01	0,05	0,4	0,01	30	0,5	0	200
70	1	0	0	0,01	0,15	0,4	0	0	1	0	0
71	1	0,3	10	0,01	0,15	0,4	0	30	0	0	0
72	0	0	0	0	0,00	0,04	0	0	0	0	0
73	1	0	10	0	0,15	0,4	0,02	30	1	0	0
74	1	0,3	10	0,01	0,15	0,4	0,02	30	1	1	200
75	1	0,3	10	0	0,00	0,4	0	30	1	0	200
76	1	0	10	0,01	0,15	0,4	0,02	3	0	0,1	200

TABLEAU 2 – Plan d'expériences : formulation du milieu 4

Composé	EPO	PDGF	SCF	Adrénaline	Leptine	EGF	Insuline	Transferrine	ATP	Acide folique	Héparane	Acide ascorbique
Unité	mU/L	ng/mL	ng/mL	µM	ng/mL	ng/mL	mg/L	mg/L	µM	µg/mL	ng/mL	µg/mL
1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1,15	0	25
2	50	10	10	5	2,5	10	12,5	12,5	12,5	2,575	500	37,5
3	100	20	20	10	5	20	25	25	25	4	1000	50
4	0	20	0	0	5	20	25	25	0	4	0	50
5	100	20	0	10	0	0	0	25	0	1,15	0	50
6	0	20	20	10	5	0	25	25	0	1,15	1000	25
7	0	20	0	0	5	20	25	25	0	4	0	50
8	0	0	20	10	5	20	0	25	0	1,15	0	50
9	100	20	0	0	0	0	25	0	25	4	1000	25
10	100	0	0	0	0	20	0	0	25	4	0	50
11	100	20	20	10	0	20	25	0	25	1,15	0	50
12	100	0	20	0	5	0	25	0	0	1,15	1000	50
13	0	0	20	0	0	20	25	25	25	1,15	0	25
14	100	0	0	10	0	20	25	25	0	1,15	1000	25
15	0	0	0	0	5	0	0	25	0	4	1000	25
16	100	0	0	0	5	20	0	25	25	1,15	1000	50
17	100	0	0	10	5	20	25	0	0	4	0	25
18	0	0	20	0	0	20	25	25	25	1,15	0	25
19	100	20	0	0	5	0	25	25	25	1,15	0	25
20	0	0	0	0	5	0	0	25	0	4	1000	25
21	100	20	0	10	5	0	0	0	0	4	1000	50
22	100	0	20	0	5	0	25	0	0	1,15	1000	50
23	0	0	20	10	0	20	0	0	0	4	1000	50
24	0	20	0	10	0	20	0	25	25	4	0	25
25	50	10	10	5	2,5	10	12,5	12,5	12,5	2,575	500	37,5
26	100	0	20	10	5	0	0	25	25	4	0	25
27	50	10	10	5	2,5	10	12,5	12,5	12,5	2,575	500	37,5
28	0	0	20	0	5	20	25	0	25	4	1000	25
29	0	20	0	10	0	20	0	25	25	4	0	25
30	100	20	20	0	0	20	0	25	0	4	1000	25
31	100	0	0	10	5	20	25	0	0	4	0	25
32	0	0	20	0	5	20	25	0	25	4	1000	25
33	100	20	0	10	5	0	0	0	0	4	1000	50
34	0	20	0	10	5	20	0	0	25	1,15	1000	25
35	100	0	20	10	0	0	0	0	25	1,15	1000	25
36	0	20	20	0	0	0	0	25	25	1,15	1000	50
37	100	0	20	0	5	0	25	0	0	1,15	1000	50
38	0	20	20	0	5	0	0	0	25	4	0	50
39	0	0	0	10	0	0	25	25	25	4	1000	50
40	0	20	0	0	0	20	25	0	0	1,15	1000	50
41	50	10	10	5	2,5	10	12,5	12,5	12,5	2,575	500	37,5
42	0	0	20	10	0	20	0	0	0	4	1000	50
43	100	20	20	0	5	20	0	0	0	1,15	0	25
44	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1,15	0	25
45	50	10	10	5	2,5	10	12,5	12,5	12,5	2,575	500	37,5
46	0	0	20	10	5	20	0	25	0	1,15	0	50
47	100	0	20	10	5	0	0	25	25	4	0	25
48	0	20	20	10	0	0	25	0	0	4	0	25
49	0	20	20	10	0	0	25	0	0	4	0	25
50	100	0	0	0	5	20	0	25	25	1,15	1000	50
51	50	10	10	5	2,5	10	12,5	12,5	12,5	2,575	500	37,5
52	0	20	20	0	0	0	0	25	25	1,15	1000	50
53	0	20	20	0	5	0	0	0	25	4	0	50
54	0	20	0	10	5	20	0	0	25	1,15	1000	25
55	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1,15	0	25
56	100	20	0	0	5	0	25	25	25	1,15	0	25
57	100	20	0	0	0	0	25	0	25	4	1000	25
58	50	10	10	5	2,5	10	12,5	12,5	12,5	2,575	500	37,5
59	100	20	20	0	5	20	0	0	0	1,15	0	25
60	100	20	0	0	0	0	25	0	25	4	1000	25
61	100	20	0	10	0	0	0	25	0	1,15	1000	50
62	100	0	20	0	0	0	0	25	25	1,15	1000	25
63	0	20	20	0	0	0	0	25	25	1,15	1000	50
64	0	0	0	10	0	0	25	25	25	4	1000	50
65	100	0	0	0	0	20	0	0	25	4	0	50
66	0	0	0	10	5	0	25	0	25	1,15	0	50
67	100	0	0	0	0	20	0	0	25	4	0	50
68	0	0	20	10	0	20	0	0	0	4	1000	50
69	100	0	20	0	0	0	25	25	0	4	0	50
70	0	20	20	10	5	0	25	25	0	1,15	1000	25
71	0	0	0	10	5	0	25	0	25	1,15	0	50
72	0	20	0	10	5	20	0	0	25	1,15	1000	25
73	100	20	20	10	5	20	25	25	25	4	1000	50
74	0	0	0	0	5	0	0	25	0	4	1000	25
75	0	0	0	10	0	0	25	25	25	4	1000	50
76	100	0	20	0	0	0	25	25	0	4	0	50
77	100	0	0	10	0	20	25	25	0	1,15	1000	25
78	100	0	0	10	5	20	25	0	0	4	0	25
79	100	20	0	10	5	0	0	0	0	4	1000	50
80	100	20	20	0	0	20	0	25	0	4	1000	25
81	0	20	20	10	0	0	25	0	0	4	0	25
82	100	0	20	0	0	0	25	25	0	4	0	50
83	0	0	20	0	5	20	25	0	25	4	1000	25
84	0	20	20	0	5	0	0	0	25	4	0	50
85	100	20	20	10	0	20	25	0	25	1,15	0	50
86	100	0	0	0	5	20	0	25	25	1,15	1000	50
87	100	0	20	10	0	0	0	0	25	1,15	1000	25
88	100	20	20	10	0	20	25	0	25	1,15	0	50
89	50	10	10	5	2,5	10	12,5	12,5	12,5	2,575	500	37,5
90	100	20	0	0	5	0	25	25	25	1,15	0	25
91	50	10	10	5	2,5	10	12,5	12,5	12,5	2,575	500	37,5
92	100	20	20	10	5	20	25	25	25	4	1000	50
93	0	20	0	10	0	20	0	25	25	4	0	25
94	100	20	20	0	0	20	0	25	0	4	1000	25
95	0	20	0	0	5	20	25	25	0	4	0	50
96	0	0	20	0	0	20	25	25	25	1,15	0	25
97	100	20	20	0	5	20	0	0	0	1,15	0	25
98	100	0	20	10	5	0	0	25	25	4	0	25
99	0	0	20	10	5	20	0	25	0	1,15	0	50
100	100	0	0	10	0	20	25	25	0	1,15	1000	25
101	0	20	0	0	0	20	25	0	0	1,15	1000	50
102	0	0	0	10	5	0	25	0	25	1,15	0	50
103	0	20	0	0	0	20	25	0	0	1,15	1000	50
104	100	20	0	10	0	0	0	25	0	1,15	0	50
105	0	20	20	10	5	0	25	25	0	1,15	1000	25

Annexe B

Articles publiés

B.1 Critical agitation for microcarrier suspension in orbital shaken bioreactors : experimental study and dimensional analysis.

Éric Olmos^{*†}, Karine Loubière^{‡§}, Céline Martin^{*†}, Guillaume Delaplace[¶], Annie Marc^{*†}

Abstract :

Orbital shaken bioreactors are widely used at the laboratory scale for the culture of animal cells in suspension mode. In the case of adherent-dependent cell lines, the choice of agitation conditions at which all particles are just-suspended (or attain complete suspension) have often to be determined. Indeed, with orbital shaken bioreactors, this choice results from the combination of two parameters : the orbital diameter and the agitation rate. That is why, a new experimental protocol for the determination of critical agitation conditions for microcarrier complete suspension has been developed in this paper. It consisted in a side-view visualization of blue-stained particles in shaken Erlenmeyer flasks and cylindrical flasks. 220 experiments representative of animal cell culture conditions have been carried out to study the effect of various operating conditions (bioreactor size and geometry, particle type, density and diameter, liquid viscosity, shaking diameter, filling ratio). Furthermore, a dimensional analysis has been performed, leading to a correlation relating a Froude number (in which the critical agitation N_c for complete particle suspension is embedded) to four other dimensionless numbers. Then, the critical agitation conditions reported determined in this paper were analyzed and discussed with respect to the data available in literature on the flow structure occurring inside the flask. Our findings revealed that high orbital shaking diameters and large cylindrical vessels should be promoted to get microcarriers into suspension at a minimized power dissipation per unit of volume.

Published as : E OLMOS, Karine LOUBIERE, Céline MARTIN, Guillaume DELAPLACE et Annie MARC. Critical agitation for microcarrier suspension in orbital shaken bioreactors : Experimental study and dimensional analysis. *Chemical engineering science*, 122 :545–554, 2015

*. CNRS Laboratoire Réactions et Génie des Procédés, UMR 7274, 2 avenue de la forêt de Haye TSA 40602, Vandœuvre-lès-Nancy, F-54518, France.

†. Université de Lorraine, LRGP, CNRS UMR 7274, 2 avenue de la forêt de Haye TSA 40602, Vandœuvre-lès-Nancy, F-54518, France.

‡. CNRS, Laboratoire de Génie Chimique (LGC UMR 5503), 4 allée Emile Monso, BP 84234, F-31432 Toulouse, France

§. Université de Toulouse ; INPT, ENSIACET, F-31432 Toulouse, France

¶. INRA, Laboratoire PIHM UR 638, BP 39, F-59651 Villeneuve d'Ascq, France

B.1.1 Nomenclature

a_i ($i = 1 \dots 11$)	model constants	(-)
α	filling ratio	(-)
β	optimization criterion	(-)
d	maximal flask diameter (Figure 1)	(m)
d_p	mean particle diameter	(m)
d_0	orbital shaking diameter	(m)
d_1	flask dimension (Figure 1)	(m)
d_2	flask dimension (Figure 1)	(m)
D	impeller diameter	(m)
ε	turbulent dissipation rate	($\text{m}^2 \cdot \text{s}^{-3}$)
Fr_a	axial Froude number (Equation 16)	(-)
Fr_c	critical Froude number for microcarrier complete suspension (Equation 5)	(-)
Fr_r	radial Froude number (Equation 17)	(-)
g	gravity constant	($\text{m} \cdot \text{s}^{-2}$)
h_1	flask dimension (Figure 1)	(m)
h_2	flask dimension (Figure 1)	(m)
h_3	flask dimension (Figure 1)	(m)
h_L	liquid height at rest	(m)
h_T	liquid height at maximum working volume	(m)
l_K	Kolmogorov scale	(m)
μ_L	dynamic liquid viscosity	(Pa.s)
μ^*	dimensionless viscosity	(-)
N	agitation rate	(s^{-1})
N_c	critical agitation rate for particle complete suspension	(s^{-1})
N_{exp}	number of experiments	(-)
Ne	Newton number	(-)
Ne'	modified Newton number	(-)
ν_L	kinematic liquid viscosity	($\text{m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$)

P	power dissipation	(W)
$\pi_i (i = 1 \dots 7)$	dimensionless numbers	(-)
P/V	power dissipation per unit of volume	(W.m ⁻³)
ϕ	volume fraction of particles	(-)
Re	Reynolds number	(-)
ρ^*	dimensionless density	(-)
ρ_L	liquid density	(kg.m ⁻³)
ρ_p	particle density	(kg.m ⁻³)
S	Zwietering constant (Equation 1)	(-)
T	temperature	(K)
V_L	liquid volume	(m ³)
V_T	maximum liquid working volume	(m ³)
V_P	particle total volume	(m ³)
X	mass concentration of particles	(kg.m ⁻³)

B.1.2 Introduction

Adherent-dependent cell culture on microcarriers in mixed bioreactors finds many applications in the pharmaceutical industry for the production of vaccines. Other applications are now found in tissue engineering and in cell therapy, particularly for the expansion of mesenchymal stem cells [2]. In adherent-dependent cell cultures, a particular attention has to be paid to bioreactor agitation. A too low agitation condition may lead to microcarrier settling and to the occurrence of some gradients of pH, O₂ or nutrient concentrations whereas a too vigorous mixing would lead to cell or microcarrier damage. In microcarrier cultures, hydromechanical damage arises from particle-particle collisions, impeller-microcarrier interactions and/or liquid turbulence and, especially, from turbulent eddies whose characteristic dimension is similar to microcarrier size [3]. Microcarrier suspension in bioreactors is generally looked for in order to avoid particle-particle contact points, and thus to increase the available adherence area for the cells and to enhance mass transfer between cells and their environment. Hence, to define a suitable mixing strategy as well as for scale-up purposes, the critical agitation rate for particle complete suspension N_c (also called the just-suspended agitation rate) has to be considered and quantified : N_c refers to the minimum agitation conditions at which all particles attain complete suspension [4]. The definition of the critical agitation rate for particle complete

suspension relies on usual concepts in solid-liquid mixing tanks. While at low agitation rates, all particles remain settled at the bottom of the vessel, an increase of N induces the motion of a fraction of particles (partial suspension). A further increase of N reduces the number of particles settled till N_c for which no particles remain deposited more than one or two seconds approximately (complete suspension). For higher agitation rates, gradients of particle concentration are reduced towards full homogeneity (homogeneous suspension). Particle suspension is the result of complex phenomena involving turbulent eddies, forces acting on particles (drag, buoyancy, gravity), wall-particle and particle-particle interactions. In the case of mechanically stirred bioreactors with a central impeller rotating around a vertical axis, the critical agitation rate N_c is generally predicted using the well-known Zwietering equation [4] as a function of impeller diameter D , liquid physico-chemical properties (kinematic viscosity ν_L and density ρ_L), particle diameter d_p , density ρ_p and mass concentration of particles X :

$$N_c = S \cdot \nu_L^{0.1} \cdot \left[\frac{g(\rho_p - \rho_L)}{\rho_L} \right]^{0.45} \cdot X^{0.13} \cdot d_p^{0.2} \cdot D^{-0.85} \quad (1)$$

The value of the constant S is related to the geometry of the vessel and impeller. However, [5] have shown that, in the case of microcarrier suspension, the relation (1) may provide a 50 % overestimation of N_c , probably due to the low density difference between liquid and microcarriers. [6] got further insight into microcarrier suspension by analyzing the liquid flow structure using Particle Image Velocimetry (PIV) measurements in a mechanically stirred vessel. Indeed, they compared the flow induced by seven designs of impellers, chosen among usual designs in animal cell culture processes and especially measured the power dissipation at the critical impeller agitation rate for microcarrier complete suspension. With this approach, the authors identified the TTP Mixel[®] and the Ear Elephant as two impeller designs minimizing the hydromechanical stresses encountered when complete suspension was reached. Furthermore, these authors showed that, for all impellers, the liquid velocity fields were globally similar at the critical agitation rate for particle complete suspension. Bioreactors agitated by an axial rotation of the impeller remain the most used systems for adherent-dependent cell cultures, especially because detailed knowledge can be found on their global characteristics (mixing time, hydromechanical stress, oxygen-liquid mass transfer), thus allowing a good scalability. Nevertheless, a major issue may arise from the use of air or oxygen sparging to ensure a sufficient amount of dissolved oxygen for cell respiration as it may lead to undesired foam or cell damage due to bubble burst at the gas-liquid free surface [7].

Beside these usual culture systems, flasks shaken by an orbital motion have been revisited these

last years for microbial and cell culture. Indeed, [8] has estimated that more than 90 % of all culture experiments in biotechnology are performed in shaken bioreactors. More recently, disposable bioreactors for animal cell culture in suspension mode, consisting in a cylindrical vessel shaken by an orbital motion, were shown as valuable systems in terms of mixing efficiency and oxygen transfer up to a scale of 1000 L [9–11]. An additional advantage of this mode of culture is the lack of damaging bubble bursts. Despite these new developments, surprisingly, concerning animal cell cultures on microcarriers, no data or correlation providing the critical agitation rate for complete suspension of microcarriers or, more generally of any kind of particles, are reported in the literature for shaken bioreactors.

In mechanically stirred vessels, the classic procedure to investigate liquid-solid suspensions consists in observing the vessel bottom. Although it has been intensively studied in literature, the definition of particle suspension in these systems is still discussed [12]. In shaken flasks, no standard protocol exists until now. As the shaking table is placed under the flask, the visualization of flask bottom would have required a modified shaking table, which would have been more complicated to handle. Therefore, the present study was devoted to investigate the microcarrier suspension in shaken flasks and, especially, to determine the critical agitation conditions (resulting from combined effects between agitation rate and orbital diameter) for microcarrier complete suspension as a function of the operating parameters (density of fluids and particles, viscosity, particle diameter and type). For that, a new protocol was first proposed to experimentally determine N_c for a given orbital shaking diameter. It was based on visual observations of blue-stained particle suspension obtained for 220 mixing conditions, changing flask design (Erlenmeyer flask or cylindrical flask) and size, liquid volume V_L , orbital shaking diameter d_0 , liquid viscosity μ_L and density ρ_L , particle type, density ρ_P and diameter d_P . Most of the operating conditions were characteristic of animal cell culture at the laboratory scale. Some additional conditions were also considered to test the robustness of the model, for example by considering other solid particles than the microcarriers used for cell culture. Secondly, a dimensional analysis based on the knowledge of the physical mechanisms involved was performed, leading to a correlation relating a Froude number (in which the critical agitation rate N_c for particle complete suspension was embedded) to four other dimensionless numbers (including the ratio between the orbital shaken diameter and the flask diameter). Then, the critical agitation rates reported in this paper were analyzed and discussed with respect to the data available in literature on the flow structure occurring inside the flask. At last, our results were used to identify the agitation conditions that promoted microcarriers suspension at a minimized power dissipation per unit of volume.

B.1.3 Material and methods

a- Shaken flasks and shaker

A bench top shaker Kühner LT-X placed in a temperature and CO₂ partial pressure controlled incubator was used (Kühner, Basel, Switzerland). The orbital shaking diameter d_0 was chosen equal to 1.25, 2.5 and 5 cm. Precisions of agitation rate and temperature measurements were ± 0.1 rpm and ± 0.3 °C respectively. Two geometries and various scales of shaken flasks were used. The first shape was widespread Erlenmeyer flask with a maximum liquid working volume V_T of 125, 250, 500, 1000 mL (Corning, USA) and 5000 mL (Duran, Germany). These systems have convex bottoms (Figure 1). The second one consisted of glass straight cylindrical vessel with inner diameters of 2.4, 3.8, 4.5, 5.5, 8.7 and 11.5 cm. A schematic representation and detailed dimensions of Erlenmeyer flasks are given in Figure 1 and in Table 1.

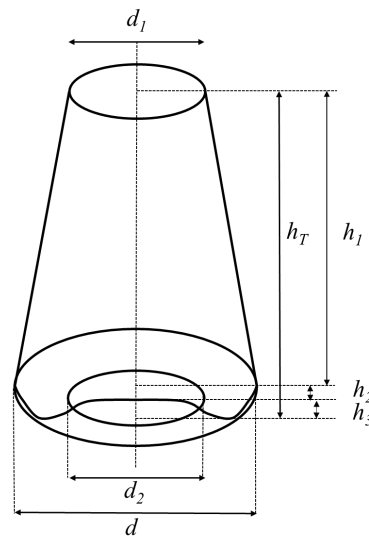


FIGURE 1 – Schematic representation of Erlenmeyer flask.

TABLEAU 1 – Dimensions of Erlenmeyer flasks.

	Maximum liquid working volume V_T (mL)				
	125	250	500	1000	5000
d (cm)	6.6	8.3	10.1	12.8	22
d_1 (cm)	3.1	4.8	5.2	5.4	10.3
d_2 (cm)	4.2	4.9	6.6	6.6	14.4
h_1 (cm)	7.4	9.2	12.8	15.0	27.3
h_2 (cm)	0.4	1.1	1.5	2.2	1.7
h_3 (cm)	0.7	0.7	0.5	0.6	2.0

From Table 1, it can be observed that a degree of homothety existed between the Erlenmeyer flasks of different sizes. In particular, the following ratio was conserved whatever the flasks :

$$\frac{h_1}{d} = 1.17 \pm 0.07 \quad (2)$$

The other ratios (h_2/d ; h_3/d ; d_1/d and d_2/d), were not conserved from one flask to another :

$$0.42 < \frac{d_1}{d} < 0.58 ; 0.06 < \frac{h_2}{d} < 0.17 ; 0.05 < \frac{h_3}{d} < 0.11 ; 0.52 < \frac{d_2}{d} < 0.65 \quad (3)$$

b- Fluids and liquid volume characterization

The fluid used in the present study was water either at 20 °C ($\mu_L = 1$ mPa.s, $\rho_L = 1000$ kg.m⁻³) or at 37 °C ($\mu_L = 0.7$ mPa.s, $\rho_L = 993$ kg.m⁻³) with similar density and viscosity to cell culture media. To get further insight in suspension mechanisms, the viscosity of the liquid was also increased by using aqueous solutions of CarboxyMethylCellulose (CMC, Fluka 21902) at a volume fraction of 1 % ($T = 37^\circ\text{C}$, $\rho_L = 999$ kg.m⁻³, $\mu_L = 20$ mPa.s) and 0.3 % ($T = 37^\circ\text{C}$, $\rho_L = 999$ kg.m⁻³, $\mu_L = 6.5$ mPa.s). Despite, in most cases, CMC solutions are expected to be non-newtonian [13], the newtonian flow behavior of our CMC solutions was confirmed using rheological measurements on a double-Couette rheometer from TA instruments (New Castel, USA) (Figure 2). It was also previously observed at the same concentrations by [14]. The range of shear rates is in agreement with the values obtained by Computational Fluid Dynamics numerical simulations of liquid flow in unbaffled shaken flasks by [15].

Due to the facts that liquid volumes are practically and classically used during set-up of animal cell cultures in shaken flasks and that the determination of liquid height is more difficult than liquid volume (convexity of Erlenmeyer flask bottoms), V_L has been chosen as the parameter characterizing the liquid phase domain for the dimensional analysis. For each Erlenmeyer flask, different liquid volumes V_L were thus tested and associated with different filling ratios of liquid, α , defined as $\alpha = V_L/V_T$, which varied between 0.08 and 0.8. In cylindrical flasks, the definition of total volume V_T is meaningless imposing rather the use of liquid height at rest h_L in the dimensional analysis. Indeed, as in classical agitated bioreactors, some authors (for instance [16]) measured the liquid height h_L instead of V_L , in shaken systems. In our opinion, the measurement of liquid volume is more precise than liquid height, especially in bench top culture systems. To make easier the comparison of our results with literature data, liquid heights at rest were also measured for each filling rate in Erlenmeyer flasks and ratios h_L/d

calculated (Table 2). In cylindrical flasks, h_L/d varied from 0.2 to 0.7.

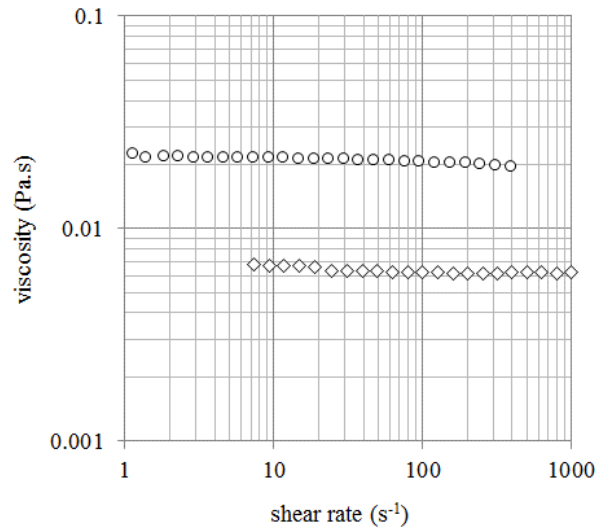


FIGURE 2 – Rheograms of medium-viscosity CMC solutions at a concentration of 0.3 (◇) and 1 % (○).

TABLEAU 2 – Values of the ratio h_L/d for each filling ratio α for experiments in Erlenmeyer shaken flasks.

α (%)	Flask maximum working volume V_T (mL)				
	125	250	500	1000	5000
8	0.173	0.120	0.114	0.142	0.137
16	0.198	0.168	0.169	0.187	0.180
20	0.213	0.192	0.197	0.211	0.203
24	0.230	0.217	0.227	0.237	0.228
32	0.270	0.269	0.289	0.292	0.280
40	0.319	0.324	0.355	0.352	0.337
48	0.376	0.381	0.425	0.417	0.400
56	0.441	0.441	0.498	0.487	0.466
64	0.514	0.504	0.575	0.562	0.538
72	0.595	0.568	0.656	0.642	0.615
80	0.684	0.636	0.740	0.727	0.696

c- Characteristics of the particles

The particles used in the present study were, either particles that are commonly used as animal cell microcarriers such as Cytodex-1 (GE Healthcare), Cytopore 2 (GE Healthcare) or Hillex (SoloHill), or not, such as Sephadex G10 and G25 (GE Healthcare), which were used to test the robustness of the model. Cytodex 1 are dextran beads with positive-charged DEAE groups throughout matrix. They are qualified of microporous. Molecules up to 100 000 molecular weight can entry these carriers, but the

pores are not available for cells. Cytopore 2 are composed of cross-linked cellulose with positive DEAE charges groups. With a pore size averaging $30 \mu\text{m}$, their porosity is more than 90 %. Like Cytodex 1, their surface is microporous to facilitate the cell adhesion, but their pores allow the entry of cells and protect them from shear forces. Hillex microcarriers are composed of polystyrene modified with a cationic amine which improves cell attraction. Solid and smooth construction prevents absorption of toxic byproducts. Sephadex are gel filtration media prepared by crosslinking dextran with epichlorohydrin. Different types of Sephadex differ in their degree of cross-linking and hence in their degree of swelling and their molecular fractionation range, from G-10 for small molecules to G-75 for larger molecules. For example the fractionation range of globular proteins is lower than 700 Da for Sephadex G-10 and between 1000 and 5000 Da for Sephadex G-25. As claimed by the supplier, the beads behave as rigid spheres obeying Darcy's Law. Pores are not available for cells.

For each of these particles, the hydrated mean Sauter diameter d_p were measured on 9 samples using laser diffraction technique (Mastersizer, Malvern, Worcestershire, UK) and standard deviations of particle size distributions were calculated. Diffraction data were collected and post-treated using a dedicated software (Mastersize, version 2.17). Particle density ρ_p was obtained from supplier data. Densities, mean diameters and surface properties of the particles are given in Table 3.

TABLEAU 3 – Characteristics of the hydrated particles.

Particle	Cytodex-1	Cytopore-2	Hillex	Sephadex G10	Sephadex G25
density (kg.m^{-3})	1030	1030	1100	1242	1093
mean diameter (μm)	260 ± 120	306 ± 98	145 ± 40	86.5 ± 24	79 ± 32
surface quality	rough	porous	smooth	porous	porous
porosity	low (MW cut-off < 100,000)	high (pore size = $30 \mu\text{m}$)	no	low (MW cut-off < 700)	low (MW cut-off < 1000-5000)

Thus, these particles exhibited a wide range of diameters, densities and structure properties but remained similar to cell culture microcarriers. The volume fraction of wet particles, defined as the ratio of wet particle total volume to liquid volume $\phi = V_p / V_L$ varied from 0.02 to 0.4 .

d- Experimental measurement of critical agitation rate for particle complete suspension

The method developed for measuring the critical agitation rate for particle complete suspension was based on a colorimetric technique. Side-view pictures from particle suspension and visual determination were used to identify critical agitation rate N_c , at a given d_0 , by using a camera fixed on the orbital shaker using a clamp-like apparatus. To get enough image contrast between solid and liquid phases, wet particles were stained during 12 hours using Trypan Blue and rinsed with fresh water. To determine N_c , agitation rate was first set to a low value for which particles remained settled on the bottom of the flask. Then, agitation rate was increased till N_c for which particles suspension was observed. Note that the homogeneous particle suspension was not considered in the present study : only the complete suspension state was investigated. An example of image acquisition, provided in Figure 3, shows the impact of an increase in agitation rate on Cytodex-1 suspension in a 250 mL Erlenmeyer flask. To determine particle suspension, a 1 rpm step was applied to the shaker and N was maintained constant during 20 s approximately. The same procedure was repeated till complete suspension of particles was observed (Figure 3D). Depending on the operating conditions, particle suspension suddenly moves from a completely settled state to a complete suspension state or exhibited an intermediate state characterized by a particles gathering in the centre of the flask (Figures 3B and 3C) before complete suspension. Whatever the case, the transition from settled to completely suspended particles occurred within a few rpm, allowing an excellent precision for N_c determination.

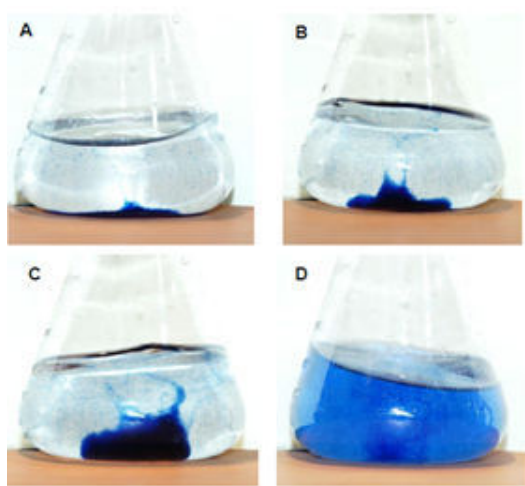


FIGURE 3 – The different steps leading to the complete suspension of Cytodex-1 microcarriers in a 250 mL Erlenmeyer flask. Operating conditions are $V_L = 120$ mL, $d_0 = 2.5$ cm, agitation rate : (A) $N = 110$ rpm, (B) $N = 114$ rpm, (C) $N = 116$ rpm, (D) $N = 120$ rpm. Complete suspension was observed for $N_c = 120$ rpm.

B.1.4 Results

a- Establishment of the dimensionless correlation in Erlenmeyer flasks as a function of the filling ratio $\alpha = V_L / V_T$

As filling ratio is more adapted to Erlenmeyer flasks, the dimensional analysis methodology was first described in this case. The establishment of the dimensionless correlation based on h_L / d ratio for both cylindrical and Erlenmeyer flasks is proposed in section b-. The implementation of the dimensional analysis and the establishment of the dimensionless correlation consisted in three steps : (i) list of the physical quantities influencing the target variable N_c , (ii) establishment of the complete set of dimensionless numbers and (iii) determination of the process relationship linking N_c to the other dimensionless numbers.

List of the physical quantities influencing the target variable The critical agitation rate for complete suspension, N_c , was chosen as target variable for dimensional analysis. As a first step, the physical quantities influencing N_c in Erlenmeyer flasks should be listed, verifying that these quantities were independent on one another. They could be then classified according to :

1. The geometric parameters characterizing :
 - the shaker : this was the orbital diameter d_0 ,
 - the flask : they corresponded to the liquid filling ratio α , to the characteristic diameter of the Erlenmeyer flask d (see Figure 1) and to other geometrical parameters, noted $\{p_{geo}\}$ with $\{p_{geo}\} = \{d_1, d_2, h_1, h_2, h_3\}$
2. The material parameters related to the liquid phase (ρ_L, μ_L) and to the particles (ρ_p, d_p , particle volume fraction ϕ).
3. The gravity acceleration g .

Finally, the initial list of the physical quantities influencing the critical agitation rate for complete suspension in shaken flasks was :

$$N_c = f(d_0, \alpha, d, \rho_L, \mu_L, \rho_p, d_p, \phi, g, \{p_{geo}\}) \quad (4)$$

Establishment of the complete set of dimensionless numbers Fifteen parameters, which depended on three fundamental dimensions (mass M, length L and time T), were involved in equation 4. They

could be reduced, according to the Vachy-Buckingham theorem, to a relationship between $(15 - 3) = 12$ dimensionless numbers. Among them, three (equal to the number of fundamental dimensions) physical quantities (ρ_L , g and d) should be chosen as individual physical quantities (or as basis) to form the core matrix of the dimensional matrix, while the other ones would constitute the residual matrix (Table 4). This choice would of course impact the set of dimensionless numbers obtained, but [17] demonstrated that the sets associated with the different possible basis are equivalent from one to each other, as one set can be transformed into another one by matrix transformations. In Table 4, the columns were assigned to the individual physical quantities and the rows to the exponents related to their expression as a power product of the fundamental dimensions.

TABLEAU 4 – Dimensional matrix of the physical quantities influencing N_c .

	Residual matrix								Core matrix		
	N_c	d_0	α	μ_L	ρ_p	d_p	ϕ	$\{p_{geo}\}$	g	ρ_L	d
Mass (M)	0	0	0	1	1	0	0	0	0	1	0
Length (L)	0	1	0	-1	-3	1	0	1	1	-3	1
Time (T)	-1	0	0	-1	0	0	0	0	-2	0	0

When transforming the core matrix into a unit matrix, a new residual matrix whose exponents were used to construct the dimensionless numbers, was obtained (Table 5).

TABLEAU 5 – New dimensional matrix obtained after transforming the core matrix into a unit matrix.

	Residual matrix								Core matrix		
	N_c	d_0	α	μ_L	ρ_p	d_p	ϕ	$\{p_{geo}\}$	g	ρ_L	d
	0.5	0	0	0.5	0	0	0	0	1	0	0
	0	0	0	1	1	0	0	0	0	1	0
	-0.5	1	0	1.5	0	1	0	1	0	0	1

From the new residual matrix reported in Table 5, the following dimensionless ratios were constructed :

$$\begin{aligned} \pi_1 &= \left(\frac{N_c}{\sqrt{g/d}} \right) = Fr_c ; \pi_2 = \left(\frac{d_0}{d} \right) ; \pi_3 = \alpha ; \pi_4 = \left(\frac{\mu_L}{\rho_L \cdot g^{0.5} \cdot d^{1.5}} \right) = \mu^* ; \pi_5 = \left(\frac{\rho_p}{\rho_L} \right) = \rho^* \\ \pi_6 &= \left(\frac{d_p}{d} \right) ; \pi_7 = \phi ; \{ \pi_{geo} \} \end{aligned} \quad (5)$$

Thus, the dimensional analysis stated that the critical Froude number, Fr_c , in which the critical agitation rate N_c for particle complete suspension in flasks was embedded, was potentially affected by a minimum of 7 dimensionless numbers, describing respectively the effect of orbital shaking diameter (π_2), liquid filling ratio (π_3), liquid viscosity ($\pi_4 = \mu^*$), particle density ($\pi_5 = \rho^*$), particle diameter (π_6), volume fraction of particles ($\pi_7 = \phi$) and geometrical characteristics of the flasks (π_{geo}).

Determination of the process relationship predicting N_C Having no mechanistic indication on the mathematical form of the relationship linking Fr_c to the other dimensionless numbers, the simplest monomial form was looked for :

$$Fr_c = \frac{N_c}{\sqrt{g/d}} = A \cdot \left(\frac{d_0}{d}\right)^{a_1} \cdot (\alpha)^{a_2} \cdot (\mu^*)^{a_3} \cdot (\rho^*)^{a_4} \cdot \left(\frac{d_p}{d}\right)^{a_5} \cdot (\phi)^{a_6} \cdot \prod_j \pi_{geo,j}^{a_j} \quad (6)$$

where :

$$\prod_j \pi_{geo,j}^{a_j} = \left(\frac{d_1}{d}\right)^{a_7} \cdot \left(\frac{d_2}{d}\right)^{a_8} \cdot \left(\frac{h_1}{d}\right)^{a_9} \cdot \left(\frac{h_2}{d}\right)^{a_{10}} \cdot \left(\frac{h_3}{d}\right)^{a_{11}} \quad (7)$$

In Equation 6, A was a constant and a_1, a_2, \dots, a_{11} were the exponents to which the dimensionless numbers were raised to. An optimization algorithm (non-linear GRC, Excel, Microsoft) was used to identify the constant and the different exponents of the preceding model by minimizing the following criterion for the N_{exp} experiments :

$$\beta = \frac{1}{N_{exp}} \sum_{i=1}^{N_{exp}} \left| \frac{Fr_{c,i}^{exp} - Fr_{c,i}^{mod}}{Fr_{c,i}^{exp}} \right| \quad (8)$$

$Fr_{c,i}^{exp}$ and $Fr_{c,i}^{mod}$ were the experimental and modeled values of Fr_c for experiment i respectively and N_{exp} the number of experiments. To simplify the optimization algorithm, it has been chosen to directly include the influence of the geometrical dimensionless numbers into the initial constant of the monomial form, leading to

$$Fr_c = \frac{N_c}{\sqrt{g/d}} = A_{ef} \cdot \left(\frac{d_0}{d}\right)^{a_1} \cdot (\alpha)^{a_2} \cdot (\mu^*)^{a_3} \cdot (\rho^*)^{a_4} \cdot \left(\frac{d_p}{d}\right)^{a_5} \cdot (\phi)^{a_6} \quad (9)$$

with

$$A_{ef} = A \cdot \left(\frac{d_1}{d}\right)^{a_7} \cdot \left(\frac{d_2}{d}\right)^{a_8} \cdot \left(\frac{h_1}{d}\right)^{a_9} \cdot \left(\frac{h_2}{d}\right)^{a_{10}} \cdot \left(\frac{h_3}{d}\right)^{a_{11}} \quad (10)$$

Using experimental data obtained with Erlenmeyer flasks, the identification of the parameters led to model I (Equation 11) for the prediction of the critical Froude number Fr_c with a relative error of 4.2 % (Figure 4) :

$$Fr_c = \frac{N_c}{\sqrt{g/d}} = 0.105 \cdot \left(\frac{d_0}{d}\right)^{-0.25} \cdot (\alpha)^{0.42} \cdot (\mu^*)^{0.01} \cdot (\rho^*)^{0.87} \cdot \left(\frac{d_p}{d}\right)^{-0.09} \cdot (\phi)^{0.002} \quad (11)$$

Noticing that, in Equation 11, the exponents on dimensionless viscosity and volume particle fraction

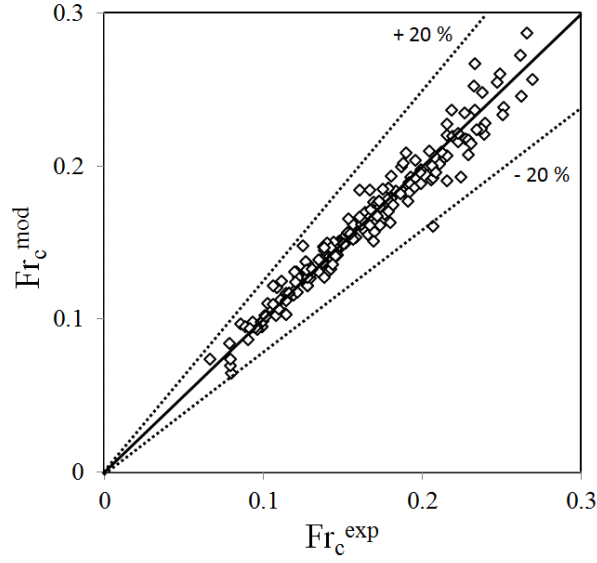


FIGURE 4 – Comparison of predicted (model I, Equation 11) and experimental critical Froude numbers Fr_c for experiments in shaken Erlenmeyer flasks.

were low in comparison with the other exponents, the reduction of model I was then successfully tested by removing these two dimensionless numbers (model II, Equation 12) with a relative error of 4.2 % (Figure 5) :

$$Fr_c = \frac{N_c}{\sqrt{g/d}} = 0.105 \cdot \left(\frac{d_0}{d}\right)^{-0.25} \cdot (\alpha)^{0.42} \cdot (\rho^*)^{1.0} \cdot \left(\frac{d_p}{d}\right)^{-0.07} \quad (12)$$

It can be noticed that the constants and the exponents of Equations 11 and 12 were very similar, which indicated that no physical information was lost when reducing Equation 11.

For both models I and II, the ranges of operating conditions on which the models were proven valid in Erlenmeyer flasks were : $3.21 \times 10^{-6} < \mu^* < 4.96 \times 10^{-4}$; $1.01 < \rho^* < 1.24$; $6.62 \times 10^{-4} < d_p/d < 5.56 \times 10^{-3}$; $0.02 < \phi < 0.4$; $0.05 < \alpha < 0.8$; $0.058 < d_0/d < 0.91$; $0.42 < d_1/d < 0.58$; $0.52 < d_2/d < 0.65$; $1.1 < h_1/d < 1.24$; $0.06 < h_2/d < 0.17$; $0.05 < h_3/d < 0.11$; $0.067 < Fr_c < 0.27$.

Noticing that, by definition, $Fr_c \propto N_c \cdot d^{0.5}$ and that $Fr_c \propto \left(\frac{d_0}{d}\right)^{-0.25} \cdot \left(\frac{d_p}{d}\right)^{-0.075}$ (Equation 12), the scaling law of critical agitation rate for the complete suspension of given microcarriers, with respect to d_0 and d , would thus be in Erlenmeyer flasks :

$$N_c \propto d_0^{-0.25} \cdot d^{-0.18} \quad (13)$$

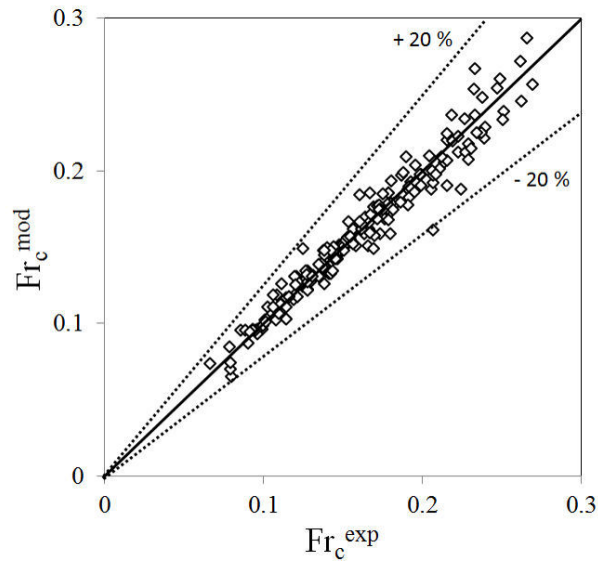


FIGURE 5 – Comparison of predicted (model II, Equation 12) and experimental critical Froude numbers Fr_c for experiments in shaken Erlenmeyer flasks.

b- Establishment of the dimensionless correlation in Erlenmeyer and cylindrical shaken flasks as a function of the h_L/d ratio

As previously exposed, it is possible to substitute the filling ratio α by the dimensionless liquid height (h_L/d) in Equations 11 and 12 using the data of Table 2 and the data related to cylindrical vessels.

New data fitting led to Equation 14 (model III) for both cylindrical and Erlenmeyer flasks (Figure 6) :

$$Fr_c = \frac{N_c}{\sqrt{g/d}} = A \cdot \left(\frac{d_0}{d}\right)^{-0.25} \cdot \left(\frac{h_L}{d}\right)^{0.49} \cdot (\rho^*)^{1.0} \cdot \left(\frac{d_p}{d}\right)^{-0.07} \quad (14)$$

The values of constant A and of relative error of model III were 0.12 and 5.7 % for Erlenmeyer flasks and 1.39 and 10.2 % for cylindrical flasks. Equation 14 thus provides an equivalent scaling law to Equation 13 despite a slight difference between the value of the exponent of h_L/d and α in these equations.

B.1.5 Discussion

a- Influence of operating parameters on Fr_c

Up to now, microcarrier suspension in shaken bioreactors was not studied in literature. That is the reason why dimensional analysis, which is known as a robust tool for the description of complex

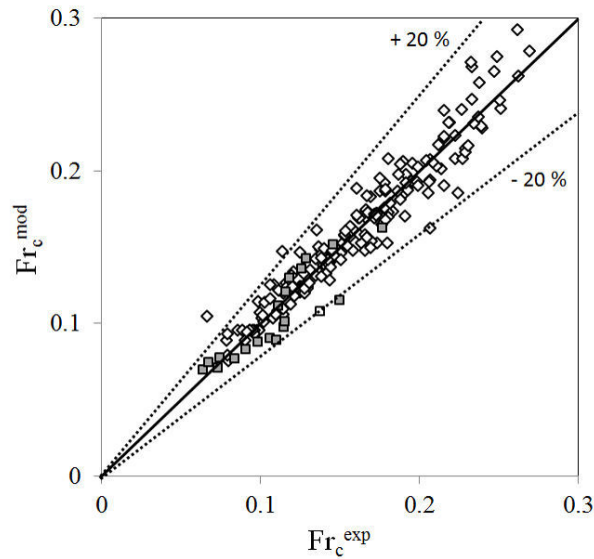


FIGURE 6 – Comparison of predicted (model III, Equation 14) and experimental critical Froude numbers Fr_c for experiments in shaken Erlenmeyer (\diamond) and cylindrical (\blacksquare) flasks.

phenomena, has been used in the present work. Our results demonstrated that the dimensionless numbers defining the flask geometry, the dimensionless viscosity and the particle volume fraction had small influence on the critical Froude number. As a consequence, particle suspension could be precisely characterized using a set of only 5 dimensionless numbers (Fr_c , d_0/d ; ρ^* ; d_p/d ; α or h_L/d).

The impact of particle concentration on Fr_c was shown to be very low for the volume fraction of particles considered ($\phi < 0.4$); a similar trend is generally observed in mechanically stirred systems. When particles were not completely suspended, higher local concentrations of particles in the region of flask bottom could increase the apparent viscosity of the liquid. However, Equation 11 revealed that an increase of liquid viscosity did not impact the critical agitation rate for particle complete suspension. To further discuss this low effect of liquid viscosity on particle suspension, the flow regime inside the flask for the range of operating conditions studied was determined. In the case of shaken flasks, [18] proposed a criterion based on a flask Reynolds number defined as :

$$Re = \frac{N \cdot d^2}{\nu_L} \quad (15)$$

For $Re > 60,000$, flow regime was suggested to be turbulent whereas for lower values, flow was supposed laminar. The definition of this Reynolds number is nevertheless questionable, due to the choice of the characteristic linear velocity $N \cdot d$ which has an incomplete physical meaning for orbital shaken bioreactors. In classical stirred tank reactors, the characteristic linear velocity $N \cdot D$ (where D

is the impeller diameter), which is proportional to the impeller tip speed ($\pi \cdot N \cdot D$), is generally used. Indeed, such a choice corresponds to the maximum linear velocity that an element of fluid could reach in the reactor. Based on this observation, [19] defined, for planetary mixers, a characteristic linear velocity whose analytical expression (deduced from the instantaneous kinematics of a point located at the end of the tip) integrated the combination of both rotation and gyration movements of the mixer. These authors then used this consistent linear velocity to define the Reynolds number. Thus, in our case, the velocity ($N \cdot d_0$) should rather be used in the definition of the Reynolds number, as suggested by [20].

Using Equation 15 anyway, the Reynolds numbers remained lower than 50 000 for all of our experiments, which would indicate a non-fully turbulent regime. Thus, the low impact of liquid viscosity on the critical agitation rate for particle suspension could not be due to the occurrence of a fully turbulent flow inside the flasks, as generally admitted in conventional mechanically stirred vessels. Nevertheless, in our opinion, such considerations should be taken with caution. The interactions between particles and flask walls, described by the dimensionless ratio d_p/d remained weak, as indicating by the low fitted values of the exponent (-0.07). Similarly to mechanically stirred reactors, the major contribution of particles on the critical agitation rate came from the ratio of particle to liquid densities and from the filling ratio (α or h_L/d) which impacted the relative effect of gravity and buoyancy forces.

Particle suspension and shaken flask hydrodynamics In a general point of view, particle suspension should be linked to liquid velocity fields, especially at the critical agitation rate. Indeed, using Particle Image Velocity measurements, [6] revealed that, at the particle complete suspension, the velocity fields obtained using various impeller designs in a mixing vessel were very similar. Recently, [16] provided a thorough characterization of the flow and mixing dynamics in a cylindrical shaken bioreactor thanks to phase-resolved PIV measurements. In particular, they showed that the transport phenomena were controlled by the occurrence of either two counter rotating vortices or a vertical vortex rotating around the flask axis. In the first case, which corresponded to the in-phase flow regime, these authors demonstrated that two counter-rotating vortices took source near the free surface, progressively reached the flask bottom and disappear when increasing the agitation rate. The free surface shape remained mainly two-dimensional. In the second case, occurring for higher rotation rates, the so-called out-of-phase regime appeared, characterized by a phase delay between the interface orientation and the shaker table position. A vortex with a vertical axis was then formed on the side of the bioreactor

opposite to the highest side of the free surface [16]. From these observations, the same authors established a scaling law predicting the transitional agitation rate from the in-phase to the out-of-phase regimes. It was based on the analysis of the free surface motion (the driving mechanism in a shaken bioreactor) and, in particular, the maximum inclination and dimensionless wave amplitude of the free surface. Depending on the dimensionless fluid height h_L/d , this scaling law was differently expressed.

- If $h_L/d < (d_0/d)^{0.5}$, [16] showed that the Froude number Fr_a related to the regime transition depends on the ratio h_L/d and on the orbital to flask diameters ratio d_0/d , such as :

$$Fr_a = \frac{2(\pi \cdot N)^2 \cdot d_0}{g} = \left(\frac{1}{a_0}\right) \cdot \left(\frac{h_L}{d}\right) \cdot \left(\frac{d_0}{d}\right)^{0.5} \quad (16)$$

where a_0 was given equal to 1.4 for water at 20°C. In this case, the two counter-rotating vortices were found to effectively reach the flask bottom. It is interesting to observe that these three ratios were comparable to the ones established in Model II (Equation 12) when considering only the liquid phase characteristics.

- If $h_L/d > (d_0/d)^{0.5}$, [16] showed that the scaling law involved only the Froude number Fr_r :

$$Fr_r = \frac{2(\pi \cdot N)^2 \cdot d}{g} = \left(\frac{1}{a_0}\right) \quad (17)$$

From a fluid mechanics point of view, it is relevant to suppose that particle suspension should efficiently took place at the transition between these two regimes, especially when the two counter-rotating vortices reached the bioreactor bottom. For this reason, we have compared our experimental agitation rates for particle complete suspension to the transition agitation rate predicted by Equations 16 or 17. We should keep in mind that [16] performed their experiments in cylindrical shaken bioreactors only, and not in shaken Erlenmeyer flasks. This comparison was reported in Figure 7 for Cytodex-1 microcarrier. A good agreement was obtained when Equation 16 was used, even for the operating conditions corresponding to $h_L/d > (d_0/d)^{0.5}$. This comparison remained satisfactory when applied to our experiments in cylindrical flasks (Figure 7).

This was confirmed by considering the critical Froude number defined in Equation 5 which could be related to the axial Froude number defined in Equation 16, such as :

$$Fr_c = \frac{N_c}{\sqrt{g/d}} \propto Fr_a^{0.5} \left(\frac{d_0}{d}\right)^{-0.5} \quad (18)$$

By introducing Equation 16 in Equation 18, we obtained :

$$\text{Fr}_c \propto \left[\left(\frac{h_L}{d} \right) \cdot \left(\frac{d_0}{d} \right)^{0.5} \right]^{0.5} \cdot \left(\frac{d_0}{d} \right)^{-0.5} = \left(\frac{h_L}{d} \right)^{0.5} \cdot \left(\frac{d_0}{d} \right)^{-0.25} \quad (19)$$

As previously shown (Equation 14), the dimensional analysis has predicted :

$$\text{Fr}_c \propto \left(\frac{h_L}{d} \right)^{0.49} \cdot \left(\frac{d_0}{d} \right)^{-0.25} \quad (20)$$

An excellent agreement was thus observed between our model (Equation 12) and the scaling law proposed by [16] for regime transition (Equation 16). These results would suggest that the mechanisms controlling the complete suspension of particles in shaken flasks were related to regime transition and, especially, to the occurrence of the two counter-rotating vortices reaching the flask bottom.

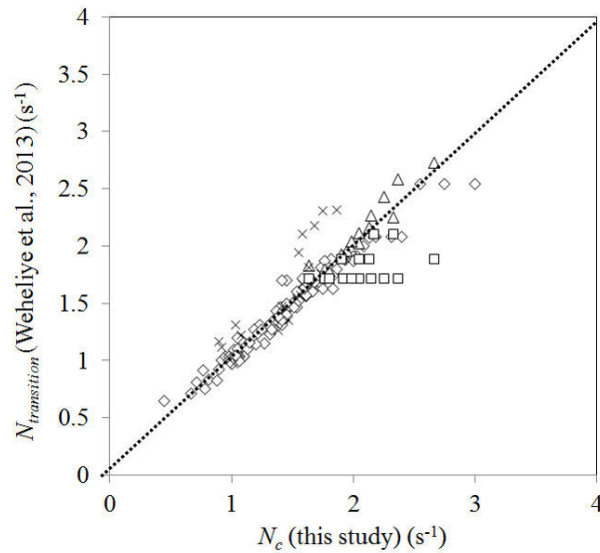


FIGURE 7 – Comparison of experimental critical agitation rates in shaken Erlenmeyer flasks (this work) with agitation rates characteristic of flow regime transitions in shaken cylinders [16]. (◇) $h_L/d < (d_0/d)^{0.5}$ and Equation 16; (△) $h_L/d > (d_0/d)^{0.5}$ and Equation 16; (□) $h_L/d > (d_0/d)^{0.5}$ and Equation 17. Comparison between experiments in cylindrical flasks and predictions of Equation 16 are also given (×). Experimental data of N_c was here restricted to Cytodex-1 microcarriers suspension.

b- Suspending particles at lower power dissipation per unit of volume

When suspended in bioreactors, microcarriers and the cells adhered on their surface are subjected to hydrodynamic stresses arising from cell-turbulence interactions or collisions between microcarriers

[3]. The consequences are cell damage on the microcarriers or cell detachment that can lead to a rapid cell lysis and, consequently, to a decrease of process productivity. In a fully-turbulent flow, a commonly used theory states that cell damage mainly occurs when the Kolmogorov length scale becomes lower than the microcarrier characteristic size. This length scale is directly related to the turbulent dissipation rate ε . Considering a mean value for the Kolmogorov scale in the mixing vessel $\langle l_K \rangle$, the power dissipation per unit of volume P/V can be related to the mean value of the turbulent dissipation rate $\langle \varepsilon \rangle = P / (\rho_L V_L)$ and thus to $\langle l_K \rangle$:

$$\langle l_K \rangle = \left(\frac{v_L^3}{\langle \varepsilon \rangle} \right)^{0.25} \quad (21)$$

However, the physical meaning of this theory is still discussed [7]. Moreover, as mentioned earlier, when basing on the definition of the Reynolds number given in Equation 15, the flow encountered during our experiments would be not fully turbulent. If this is confirmed, it would limit even more the relevancy of the preceding Kolmogorov theory in the present study performed in shaken flask.

That is why a criterion based on the minimization of the power dissipation per unit of volume at the complete suspension state appears at present as the best strategy for the scale-up of microcarrier-based culture processes [7]. In unbaffled Erlenmeyer flasks, power dissipation was provided by [21] :

$$Ne' = 70 \cdot Re^{-1} + 25 \cdot Re^{-0.6} + 1.5 \cdot Re^{-0.2} \quad (22)$$

with the modified Newton and Reynolds numbers defined by :

$$Ne' = \frac{P}{\rho_L \cdot N^3 \cdot d^4 \cdot V_L^{1/3}} ; Re = \frac{\rho_L \cdot N \cdot d^2}{\mu_L} \quad (23)$$

Thus, in Erlenmeyer flasks, the power dissipation per unit of volume did not depend on the orbital diameter d_0 . This was not the case in cylindrical vessels as shown by a recent study in which a relationship was proposed to predict the power dissipation in cylindrical vessels shaken by an orbital motion [22] :

$$Ne = 9 \cdot Re^{-0.17} \cdot \left(\frac{V_L}{d^3} \right)^{0.44} \cdot \left(\frac{N^2 \cdot d_0}{g} \right)^{0.42} \quad (24)$$

with the Newton and Reynolds numbers defined by :

$$Ne = \frac{P}{\rho_L \cdot N^3 \cdot d^5} ; Re = \frac{\rho_L \cdot N \cdot d^2}{\mu_L} \quad (25)$$

Equation 24 was proven to be valid for $2400 < Re < 250000$, $0.004 < (N^2 \cdot d_0)/g < 0.12$, $0.085 < V_L/d^3 < 0.5$ and when liquid motion was induced in the cylindrical flask, i.e. for mixing conditions with $Fr_a > 0.28 \cdot (V_L/d^3) \cdot (d_0/d)$. This latter condition, and especially the value of the constant 0.28, was verified for vessel sizes between 10 and 2000 L, which were significantly bigger than the volumes tested in the present study. However, the values of Reynolds numbers, axial Froude and ratio V_L/d^3 calculated for our experiments in cylindrical flasks were in the validity range of Equation 24.

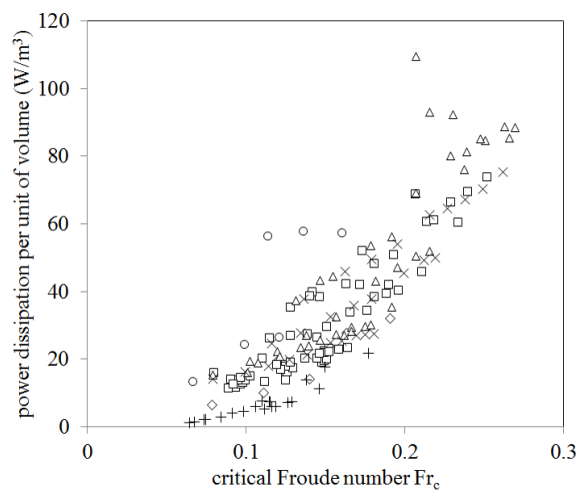


FIGURE 8 – Predictions of power dissipation per unit of volume in shaken Erlenmeyer flasks and cylinders in function of the experimental critical Froude number using Equations 22 and 24 respectively. Experiments with microcarriers (Cytodex-1, Hillex, Cytopore-2). Shaken flasks (\diamond) $V_T = 125$ mL, (\square) $V_T = 250$ mL, (\triangle) $V_T = 500$ mL, (\times) $V_T = 1000$ mL, (\circ) $V_T = 5000$ mL. Cylindrical vessel (+).

The calculations of power dissipation per unit of volume in shaken flasks by using Equation 22, revealed that power dissipation was slightly correlated with the critical Froude number (Figure 8). Thus, a reduction of power dissipation to reach particle suspension could be achieved by reducing Froude number. That means that the use of large orbital shaking diameter is beneficial to the minimization of the power dissipation required for particle complete suspension. Furthermore, the impact of flask size on power dissipation at a given Froude number was not sensible, thus indicating a good scalability of power dissipation per unit of volume required for particle suspension, when vessel size increases. Using the 5-cm orbital diameter, the range of power dissipation calculated in Erlenmeyer flasks remained similar to the values generally encountered in mechanically stirred bioreactors, around $20 \text{ W}\cdot\text{m}^{-3}$ [7]. It is worthwhile noticing that the use of cylindrical vessels promoted lower dissipations per unit of volume, around $10 \text{ W}\cdot\text{m}^{-3}$ at the critical agitation conditions, suggesting that this vessel geometry should be preferentially chosen for microcarrier cell culture. These values were closed to the ones reported at the complete suspension state in mechanically stirred bioreactors : [5] measured a power

dissipation of approximately 1 W.m^{-3} for a 45° pitched blade turbine and a Chemineer HE-3 hydrofoil while [6] reported values of 0.3 W.m^{-3} and 1.8 W.m^{-3} for ear-elephant and A315 impellers respectively. However, an important difference between stirred and shaken bioreactors may arise from the flow regime expected in the vessel. Indeed, the flow regime encountered may impact the heterogeneity of the hydromechanical stresses inside the bioreactor and thus the validity of the use of a global power dissipation per unit of volume P/V as a valuable criterion to predict possible hydrodynamic damage of microcarriers. In unbaffled Erlenmeyer shaken flask, [18] showed that, in the laminar/transition regime ($Re < 60,000$), it could be assumed that the maximum value of dissipation rate was similar to the mean value $\varepsilon_{max} \approx \langle \varepsilon \rangle$. Conversely, in mechanically stirred bioreactors operating at the fully-turbulent flow regime at the complete suspension state, a ten-fold increase of turbulent dissipation rate could be expected in the impeller region, for example for pitched-blade turbines [23]. Finally, unbaffled shaken bioreactors could be valuable systems for suspending microcarriers at low hydromechanical stress levels.

B.1.6 Conclusion

Shaken flasks are widely used in animal cell culture, especially at the laboratory scale. While these systems have been intensively characterized in terms of power dissipation, oxygen mass transfer and mixing times, no data concerning particle suspension, and in particularly microcarriers, could be found in literature. To fill this lack, our study proposed, on the basis of experiments and a dimensional analysis, a relationship predicting the critical agitation conditions required to ensure particle suspension in Erlenmeyer and cylindrical shaken flasks, with an excellent accuracy. The present work thus revealed that these critical conditions were mainly a function of the particle to liquid densities ratio, the geometry ratio d_0/d , the flask filling ratio α and, to a lesser extent, of the particle to flask diameter ratio. Moreover, using literature data, a link between particle suspension and the transition from in-phase to out-of-phase regime characterized by the occurrence of two counter-rotating vortices reaching the flask bottom, was suggested. Finally, shaken and, especially, cylindrical flasks, could be valuable systems for cell culture on microcarriers, as indicated by the levels of power dissipation per unit of volume calculated at the critical agitation rate required for particle complete suspension. Future work is provided to build a physical model characterizing flask hydrodynamics at complete particle suspension, for example by performing numerical simulations of the liquid-solid flow encountered.

B.1.7 Acknowledgements

The authors would like to sincerely thank Sabrina Bettray and Fabrice Blanchard for their valuable technical contribution and Pr. Rachid Raouhadj for his scientific expertise.

B.2 Large-Eddy Simulations of microcarrier exposure to potentially damaging eddies inside mini-bioreactors.

Marie-Laure Collignon^{*†‡§}, Angélique Delafosse^{*‡§}, Sébastien Calvo^{*}, Céline Martin^{‡§}, Annie Marc^{‡§},
Dominique Toye^{*}, Éric Olmos^{‡§}

Abstract :

Mechanically stirred vessel is a popular bioreactor technology finding many applications in microbial or cell culture processes. These vessels are equipped with rotating impellers generating heterogeneous transitional or turbulent flows. However, some cells as animal or human mesenchymal stem cells (hMSC) adhered on microcarriers, are reputed sensitive to hydromechanical stresses arising from stirring. Many publications, especially using Computational Fluid Dynamics, characterize spatial fields of velocity and turbulence inside bioreactors. However, the exposure frequency to these stresses is never taken into account in hMSC culture bioreactor description. To fill this gap, this study used both CFD Reynolds-Averaged and Large-Eddy Simulations to characterize the hydrodynamics inside 200 mL mini-bioreactors. Five impeller geometries were studied. From the velocity and turbulence fields calculated, a function EDC related to both frequency and intensity of potentially damaging hydrodynamic events for the cells was determined. Using this function, it was shown that the marine propeller operating in up-pumping mode was a priori the most adapted for hMSC culture as it exhibits low exposure frequency to acceptable turbulent dissipation rate intensity. From a general point of view, the new methodology proposed should be used in the future to screen the most adapted bioreactor geometry to biological constraints.

Keywords : Agitation, Bioreactor, Fluids mechanics, CFD Large-Eddy Simulation, Microcarrier, Human mesenchymal cell culture.

Published as : M-L COLLIGNON, Angélique DELAFOSSE, Sébastien CALVO, Céline MARTIN, Annie MARC, Dominique TOYE et Eric OLMOS. Large-Eddy Simulations of microcarrier exposure to potentially damaging eddies inside mini-bioreactors. *Biochemical engineering journal*, 108 :30–43, 2016

*. Laboratory of Chemical Engineering (LGC), Liège University, 11 allée du 6 Août, B4000 Liège, Belgium

†. F.R.S-FNRS, 11 rue d'Egmont, B1000 Bruxelles, Belgium.

‡. CNRS Laboratoire Réactions et Génie des Procédés, UMR 7274, 2 avenue de la forêt de Haye TSA 40602, Vandœuvre-lès-Nancy, F-54518, France.

§. Université de Lorraine, LRGP, CNRS UMR 7274, 2 avenue de la forêt de Haye TSA 40602, Vandœuvre-lès-Nancy, F-54518, France.

Notations

CFD	Computational Fluids Dynamics
EDC	Energy dissipation/circulation function
EE	Elephant Ear impeller
hMSC	Human Mesenchymal Stem Cells
LES	Large Eddy Simulation
MP	Marine Propeller
MRF	Multiple Reference Frame
MC	Microcarrier
RANS	Reynolds Averaged Navier Stokes
RT	Rushton Turbine
SM	Sliding Mesh
STR	Stirred tank bioreactor
$C_{\mu C}$	Microcarrier concentration (g.L ⁻¹)
$d_{EE,RT,MP}$	impeller diameter [m]
d_P	microcarrier diameter [m]
D	Bioreactor diameter [m]
$h_{EE,RT,MP}$	impeller height [m]
H_{liquid}	Liquid height in the bioreactor [m]
N	Impeller agitation rate [rpm or s ⁻¹]
N_H	Minimal impeller agitation rate from which microcarrier cloud expands through all the liquid height [rpm or s ⁻¹]
N_{js}	Minimal impeller agitation rate to keep microcarrier in just-suspension [rpm or s ⁻¹]
N_p	Impeller power number [-]
N_{qp}	Impeller pumping number [-]
P	Global power input [W]
Q_P	Pumping flowrate [m ³ .s ⁻¹]
r	Radial coordinate [m]
Re	Impeller Reynolds number [-]

S_{ij}	Strain rate magnitude computed from the spatial derivative of the instantaneous resolved velocity fields [s^{-2}]
t_C	Liquid circulation time [s]
$t_{C,\mu C}$	Microcarrier circulation time [s]
$t_{C,\mu C}(\lambda_k < d_p)$	Microcarrier circulation time in zones with ($\lambda_k < d_p$) [s]
t_M	Mixing time [s]
$u(t)$	Instantaneous liquid velocity [$m.s^{-1}$]
\bar{u}	Time averaged liquid velocity [$m.s^{-1}$]
v_{tip}	Impeller tip speed [$m.s^{-1}$]
$V_{\mu C}$	Liquid volume visited by the microcarrier cloud [m^3]
$V_{\mu C}(\lambda_k < d_p)$	Liquid volume of zones visited by microcarriers with ($\lambda_k < d_p$) [m^3]
ε	Turbulent dissipation rate [$m^2.s^3$]
$\varepsilon_{99-\mu C}$	Percentile 99 of the turbulent dissipation rate in zones visited by microcarriers [$m^2.s^3$]
$\langle \varepsilon \rangle$	Volume average turbulent dissipation rate [$W.kg^{-1}$]
λ_k	Kolmogorov scale [m]
μ	Fluid dynamic viscosity [Pa.s]
ν	Fluid kinematic viscosity [$m^2.s^{-1}$]
ν_T	Additional viscosity calculated by the subgrid scale model [$m^2.s^{-1}$]
ρ	Fluid density [$kg.m^3$]

B.2.1 Introduction

Industrial biotechnology widely uses stirred tank bioreactors (STR) to carry out fermentations or animal cell cultures [25]. At first glance, STR designs might seem quite straightforward as mixing, and consequently homogeneity (regarding substrates, temperature, or solid phase), is obtained *via* the pendulum rotation of one or several impellers. Because of their turbulent properties, flow and mixing within an STR are actually more complex processes than it appears. These hydrodynamic stimuli interact with biological material following several mechanisms that have been only partially deciphered [26–28]. Controlled process design, especially the successful scale-up from bench to pilot plant, demands for a multidisciplinary approach. The areas of expertise involved go from an “engineering” side, to accurately describe the flow and turbulent mixing in a bioreactor, to a “biological” side

studying how microorganisms and cells react to these stimuli. This paper focuses on the engineering issues encountered in bioprocess control.

In most industrial applications, fluid flows in STR are turbulent and may be described as a superposition of a time-averaged component (i.e. mean circulating flow) and of a turbulent fluctuating component. The mean circulation flow is made up of several recirculation loops whose position, rotation axis, and rotation direction, depends on the impeller and bioreactor designs [29]. The turbulent flow is generally described using Kolmogorov's theory of isotropic turbulence [30]. This theory suggests that energy generated by impeller rotation is transmitted to the fluid and accordingly generates large eddies. Under the combined influence of inertial and friction forces, these large eddies are split into smaller ones to which they transfer energy at a constant rate ε . Under a size threshold corresponding to the Kolmogorov scale, viscous forces takes up on inertial forces and energy is entirely dispersed as thermal energy. The Kolmogorov scale is calculated with :

$$\lambda_k = \left(\frac{v^3}{\varepsilon} \right)^{1/4} \quad (26)$$

Flow in a stirred tank bioreactor can thus be described, within each elementary volume of the fluid, as a superposition of recirculation loops with a wide range of eddies from large to small. Computational fluid dynamics (CFD) tools make it possible to numerically resolve the Navier-Stokes equations which govern flows. Turbulence is usually modelled with a RANS (Reynolds Averaged Navier Stokes) approach with the additional solving of two transport equations, in order to determine the turbulent kinetic energy value k and its turbulent dissipation rate ε . These tools are a way to simulate, for any bioreactor design, the spatial repartition of the mean circulating flow, while modelling the spatial repartition of several turbulence characteristics, such as k and ε [31–33]. Previous studies using this methodology have notably shed into light the heterogeneities in spatial distribution of the turbulent dissipation rate ε over several ranges, covering high value areas around the impeller(s), to low value areas, for instance close to the free liquid surface [34, 35]. Microorganisms or cells that follow the local flow in the bioreactor will hence encounter rapidly changing environments characterized by fluctuating physical properties.

This study applied an engineering approach using CFD to the particular case of a liquid-solid suspension where the solid phase was composed of polymer microbeads called microcarriers and the liquid phase was culture medium. This culture system is starting to be broadly used for the cultivation of human mesenchymal stem cell (hMSC) attached to 3D surfaces [36–38]. Today, hMSC attract interest

of the biopharmaceutical industry because of their abilities to differentiate in vitro into osteocytes, chondrocytes and adipocytes, and, for native hMSC infusion, to act as “multi-drug vehicles” responding to a body given injury by producing bioactive molecules regulating immunosuppressive, inflammatory responses and tissue regeneration [39, 40]. hMSC expansion in vitro is however necessary to procure a sufficient amount of biological material for therapeutic applications as cell numbers required for treatments (10^5 - 10^9 hMSC/dose, [41, 42]) are much higher than the quantities available from biopsies (1 hMSC among 10^4 marrow cells [41]). Starting from these low hMSC amount, culture processes up to several hundred liters are currently under development, but a key issue still has to be answered : how sensitive are hMSC to mechanical stresses created by the fluid flow and are these forces susceptible to inhibit cell growth or potency. To our knowledge, an extensive study focusing on understanding the impact of mixing levels on hMSC growth has to date not been undertaken, but a body of evidence points towards the fact that agitation might be crucial for hMSC process development and scale-up. Firstly, mechanical stresses are well-known to induce hMSC differentiation [43]. Secondly, as mammalian cell cultures on microcarriers in STR is already broadly used for vaccine production using immortalized cell lines, impact of mechanical stresses on adherent animal cell growth has already been proven by the work of Cherry and Papoutsakis [3, 44] and Croughan *et al.* [45, 46]. According to Kolmogorov’s theory of isotropic turbulence, these mechanical stresses comes from energy transmitted on microcarrier surface by eddies whose size were similar to microcarrier diameter. At usual agitation rates, the existence of this kind of eddies in multiple areas of the bioreactor can indeed be demonstrated if a local values of Kolomogorov scale are computed using relation 1 with local values of ϵ . Croughan *et al.* [47] also established a kinetic model for FS-4 cells cultured on Cytodex1™ microcarriers in spinner flasks :

$$\frac{dC}{dT} = \mu CL > L_C \quad (27)$$

$$\frac{dC}{dT} = \mu - q_1 CL \leq L_C \quad (28)$$

$$q_1 = K_e \left(\frac{\langle \epsilon \rangle}{\nu^3} \right)^{3/4} \quad (29)$$

where μ is the specific growth rate and q_1 is the specific death rate due to mechanical stresses. According to their model, the specific death rate is proportional to the volume of Kolmogorov eddies, estimated based on the spatial-averaged turbulent dissipation rate resulting from the global power dissipation equation, as no other flow characterization tools were available at that time. K_e and L_C are parameters adjusted on the growth curves obtained at different agitation rates. The former is a constant dependent on the reactor geometry and the second is a threshold value of the mean Kol-

mogorov scale (rel. 26) under which a decrease of the relative specific growth rate can be observed. Its value for FS-4 cells cultured on Cytodex1™ microcarriers ($d_p = 190 \mu\text{m}$) was found to be $130 \mu\text{m}$. Thirdly, Leung *et al.* [48] and Tseng *et al.* [49] respectively observed spontaneous differentiation of hMSC and embryonic stem cells cultured on microcarriers, but precisions regarding the agitation conditions used in these experiments were not specified. Finally, pioneering works [50, 51] have been undertaken to demonstrate the feasibility of cultivating hMSC on microcarriers in STR up to 50 L when the agitation rate is maintained at the minimal rate N_{js} allowing for a complete suspension of the microcarriers. In a paper by Jossen *et al.* [52] a very low growth rate of bone marrow hMSC was observed on microcarriers despite their single-use bioreactor Univessel SU 2 L (Sartorius) operates at N_{js} . Its impeller design is indeed showing two 30° pitched blades located relatively high up in the bioreactor, thus developing a poor capacity to drag microcarriers up to aet al. suspended state leading to high N_{js} values associated with intermediate turbulent dissipation rates ϵ (at 107 to 122 rpm depending on microcarrier concentrations). Changing this design to 45° pitched blades while lowering the impeller position on the pendulum axis allowed them to reduce N_{js} by almost half while lowering the turbulent dissipation rate by a factor of 3 to 4. Compared to the previous design, they increased cell growth rate during a 9 days culture and obtained overall 3.5 times more hMSC. This last study strongly points towards mechanical stresses resulting from fluid flow as having a probable impact on hMSC cultivated on microcarriers.

In order to fully describe and quantify this impact in the near future, a systematic study establishing growth rate of hMSC, from diverse origins, for various agitation levels, in multiple bioreactor designs, is of course necessary. Improving flow description in STR, especially characterization of mechanical stresses, is at least as important. Over the past five years, several studies have followed this path by describing fluid flows in STR with CFD tools while undertaking hMSC cultures in the vessel being characterized. For instance, let's mention the works of Kaisier *et al.* [53] in 100 mL spinner flask, the works of Kaiser *et al.* [54] in a 3 L single-use Mobius bioreactor, the works of Jossen *et al.* [52] in a 2 L single-use Univessel SU bioreactor and the works of Schirmaier *et al.* [55] in a 50 L single-use Biostat Cultibag STR. In all these studies, a unique operating condition for agitation was chosen and it corresponded to a just-suspended state where microcarriers started to move at the bottom of the tank. Similar studies for freely suspended animal cell culture have been performed as well, including the work of Nienow *et al.* [56], Odeleye *et al.* [57], and Sieck *et al.* [58]. In this case however, given the small size of single cells (10-20 μm), cultures are mostly impacted, when sparging is used, by the elevated stresses created by air bubbles bursting onto the free liquid surface, as demonstrated

by the experimental set-up of Oh *et al.* [59, 60] in bioreactors, or by the work of Chalmers [61, 62] and Morbidelli [63] teams using torture chambers. It is worth noticing that, for hMSC culture, head space aeration may be sufficient regarding oxygen demand of these cells. Amongst all these promising results, a correlation between engineering and biological data has shown itself to be quite difficult to find outside of semi-quantitative assessments. All these studies established maps showing a spatial repartition of the turbulent dissipation rate ε , currently considered the most relevant parameter to characterize mechanical stresses caused by turbulent flow. These studies thus only determined the range of ε where cell growth is observed.

One additional problem is that flow characteristics cannot all be simultaneously maintained during the process scale-up from bench to pilot scale. Scale-up is indeed generally holding to geometric similarity, but maintaining a second parameter would involve modifying all the others. For example, when the flow is described by a global value such as global power dissipation $\langle\varepsilon\rangle = P/\rho V$ the mixing time t_M and the average circulation time $t_C = V/Q_P$, given the dimensional relations coupling these parameters to impeller agitation rate N , impeller diameter d and their characteristic numbers N_p and N_{qp} :

$$\langle\varepsilon\rangle = \frac{P}{\rho V} = \frac{N_p N^3 d^5}{\pi \left(\frac{D}{2}\right)^2 D} \quad (30)$$

$$t_M = A \frac{1}{N} \frac{1}{N_p^{1/3}} \left(\frac{d}{D}\right)^{-2} \quad (31)$$

$$t_C = \frac{V}{Q_P} = \frac{\pi \left(\frac{D}{2}\right)^2 D}{N_{qp} N d^3} \quad (32)$$

a scale-up based on geometric similarity with a length ratio lr between bench and pilot scale at constant global power dissipation $\langle\varepsilon\rangle$ would lead to a decreased agitation rate proportionally to $lr^{-2/3}$ at pilot scale and an increase in mixing and circulation times by the same factor $lr^{-2/3}$ [64]. Therefore, characteristic times of hydrodynamical phenomena may evolve, while the ones of biological phenomena theoretically would have to stay unchanged to guaranty a successful scale-up. In more concrete terms, knowing that dissipation rate ε is heterogeneously spread with maxima surrounding the impeller, and that this turbulent parameter is directly linked to crucial phenomena such as micromixing and generation of mechanical stresses, microorganism or cell exposure frequencies ($1/t_C$) to maximum or minimum values of ε would thus vary depending on the scale of operation, thereby probably affecting the biological response. Conversely, a scale-up based on geometric similarity at constant agitation rate

N keeps unchanged the exposure frequency to maximum values of ϵ , but increases the magnitude of ϵ values encountered. Ultimately the same argument can also be made when the bioreactor geometry is changed (impeller or vessel designs) whether it be at equal or increased size of the tank. In this case, spatial distribution of ϵ and exposure frequency are simultaneously modified. Even with carefully chosen scale-up criteria, the impact of hydrodynamics on the biological responses may evolve between the laboratory and the industrial plant. To our knowledge, the literature has yet to address these issues in hMSC culture. Nonetheless, some works have been done with filamentous fungi to elucidate these mechanisms in bioreactors. Van Suijdam and Metz [65], Smith *et al.* [66] and Justen *et al.* [67] all have shown that *Penicillium chrysogenum* morphology was significantly impacted by circulation times in STR. Justen *et al.* [67] in particular demonstrated that hyphal fragmentation rate was correlated to $\frac{P}{kd^3} \frac{1}{t_c}$ in bioreactor.

In this paper, we propose an improvement to the engineering description of a bioprocess by quantifying the microcarrier and cell exposure to mechanical stresses. We intend to clarify this exposure with a spatial as well as a temporal outlook, because mechanical stresses quantified via ϵ are spatially heterogeneously distributed and microcarriers move in this heterogeneous field. hMSC attached to microcarrier surfaces are thus exposed over time to various fluctuating levels of mechanical stress depending on agitation conditions and bioreactor designs. In order to illustrate how this spatial and temporal approach may be used to quantify the mechanical stresses applied to hMSC cells cultivated on microcarriers, the local hydrodynamics inside 250 mL minibioreactors has been simulated by numerically solving Navier-Stokes equations using the ANSYS Fluent 14.5 software. Five distinct impeller geometries and various impeller agitation rates were thus studied. Turbulence was modeled using a Reynolds Averaged Navier-Stokes (RANS) realizable k - ϵ model and Moving Reference Frame (MRF) approach as preliminary screening study. Then, Large Eddy Simulation (LES) with Sliding Mesh (SM) methodology and Smagorinsky subgrid scale model were used for a thorough characterization of liquid flow heterogeneities. In parallel, a microcarrier suspension (Cytodex 1[®], GE Healthcare) was experimentally characterized at three concentration levels. To describe microcarrier exposure to mechanical stresses in the agitation conditions investigated, the spatial distribution of the turbulent dissipation rate ϵ was evaluated in a volume strictly limited to the area visited by microcarriers. The time and frequency exposures of microcarriers to high stress levels were evaluated from the liquid mean circulation flow rate computed from the time averaged velocity field. At last, flows within the five studied geometries were compared at agitation conditions characterized by the same mean dissipation rate ($10^{-3} \text{ W.kg}^{-1}$), in order to underline the importance of the temporal component to mechanical

stresses exposure. An equation similar to the one established by Justen *et al.* [67] correlation $\frac{P}{\rho d^3} \frac{1}{t_c}$ was established, and different values were obtained with each impeller geometry used.

B.2.2 Experimental set-up and numerical approaches

a- Bioreactor design

The bioreactor design used in this study is a 250 mL minibioreactor (Global Process Concept, La Rochelle, France) marketed as a platform to extensively study and optimize costly bioprocesses, like hMSC expansion, using a minimal amount of cells and raw material. Its geometrical ratios and power dissipations per unit of volume have been specifically chosen to mimic the values encountered in standard 1 to 10 L stirred-tank bioreactors. The bioreactor is composed of a cylindrical glass vessel ($D = 60$ mm) with three lateral ports to insert pH and pO_2 probes (Figure 9), a rounded bottom in stainless steel directly in contact with an heating plate coupled with a recirculating cooling system. Its maximum working volume is 200 mL (which corresponds to a liquid height $H_{liquid} = 74.5$ mm). The head plate is equipped with a stainless steel pocket for a temperature probe and ten ports for headspace aeration (air, oxygen, nitrogen inlets), pH control (CO_2 gas and NaOH inlets), feed additions and sterile sampling. No additional baffles need to be used as the two immersed tubes and the two side probes already act as such, and noticeably no vortex formation were observed with the agitation conditions investigated in this study. The bioreactor is stirred by a central pendulum impeller located at one third of the liquid height. Three impellers designs were selected (Figure 9) : a four-blade Rushton turbine RT ($d_{RT} = 20$ mm, $h_{RT} = 4$ mm), an Elephant Ear impeller EE ($d_{EE} = 24$ mm, $h_{EE} = 14.5$ mm) and a Marine propeller MP ($d_{MP} = 17$ mm, $h_{MP} = 8.7$ mm). As these latter axial impellers can operate either in up-pumping or down-pumping mode, five geometries were investigated in this study (RT, EEU, EED, MPU and MPD).

b- CFD simulations

The commercial CFD code ANSYS Fluent (version 14.5) was used to solve the governing equations of the liquid phase hydrodynamics produced by the 5 impellers inside the minibioreactor. Culture medium properties were assumed similar to water properties at $37^\circ C$ ($\rho = 998.2$ kg.m⁻³, $\mu = 0.000692$ Pa.s).

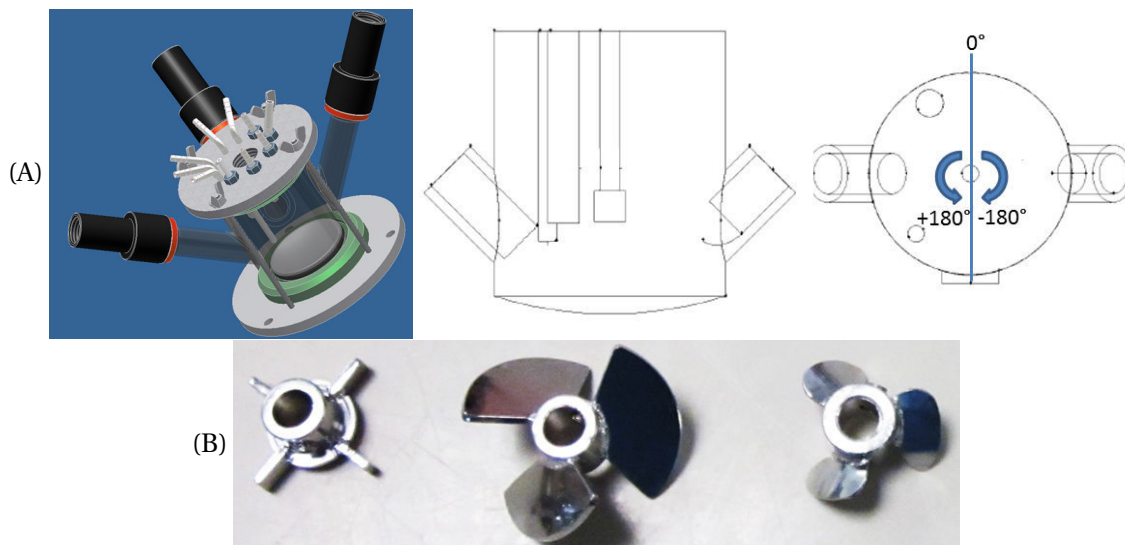


FIGURE 9 – (A) Bioreactor design. (B) Left to right : Design of the four-blade Rushton turbine (RT), the Elephant Ear impeller (EE) and Marine propeller (MP).

Two sets of simulations were conducted. First, a RANS approach was used to quickly estimate the turbulent flow in the mini-bioreactor for a large number of agitation conditions. Then, LES simulations were performed to refine these estimations for a limited set of operating conditions.

RANS simulations The first set of simulations was performed using the Reynolds-Averaged Navier-Stokes approach, wherein the mean velocities are solved but the turbulent quantities, such as the turbulent kinetic energy and the turbulent dissipation rate, are modeled using a turbulence closure model. Adequacies of several closure models were evaluated by verifying that the power input computed from the torque exerted on the impeller was close to its dissipation in the liquid flow. Accordingly, the k -epsilon realizable model was selected.

To be able to investigate a large number of agitation rates for each impeller in a reasonable time, the RANS simulations were realized in steady-state using the Moving Reference Frame (MRF) approach where the flow is resolved for only one angular position of the impeller.

The grid used for the RANS simulations was composed of around 900000 tetrahedral mesh cells with grid characteristic length between $50 \mu\text{m}$ and 1.2 mm . The independence of the simulation results was checked by comparing the mean turbulent dissipation rate solved as a function of the grid size (data not shown).

The simulations were performed in double precision with the pressure-based implicit solver. The

spatial discretization schemes used were the 2nd order Upwing schemes for continuity, momentum and turbulence equations. The Standard scheme is used for pressure and the pressure-velocity coupling is solved using the SIMPLE algorithm. At the end of each simulation, the convergence criteria were smaller than 10^{-6} for the momentum and continuity equations and 10^{-5} for turbulence modeling equations.

A RANS simulation usually lasted 24 hours on a 32-thread parallel computer and a total of 60 simulations were carried out for the five impellers investigated with agitation rates covering an extended range from 50 to 10000 rpm.

Large-Eddy Simulations The second set of simulations was performed using Large Eddy Simulation. The principle of Large Eddy Simulation is to solve directly the Navier–Stokes equations at large scale, while scales under a cut-off length are modeled by a turbulence model, assumed universal. In Fluent software, the filtering operation is based on the grid size : scales larger than the grid spacing are solved (*i.e.* filtered or solved scales) and smaller scales (*i.e.* subgrid scales) contributions are only modeled. In this study, the Smagorinski subgrid model was used with the Smagorinski constant set to $C_S = 0.2$, as prescribed in Delafosse *et al.* [31].

The accuracy of LES simulations significantly depends on grid size. Hence, special attention was paid to the mesh building. In order to accurately predict mean velocities and turbulent kinetic energy fields, it is necessary that the LES simulation directly solves the energy-containing turbulent eddies [68]. That is, the grid size should be of the same order of magnitude, or smaller, than the Taylor microscales. So, Taylor microscales have been computed from RANS simulations and the LES grid size has been adapted accordingly. Ultimately, this grid contained more than 1.8 million tetrahedral grid cells, with characteristic lengths between 50 μm and 1.2 mm.

Unsteady LES were performed using the Sliding Mesh approach to take the rotation of the impeller into account. The time step was chosen so that each impeller rotates of 0.5° per time step.

The spatial discretization scheme used for the momentum equations was the Bounded Central Differencing scheme. Pressure-velocity coupling was solved using the SIMPLE algorithm. The temporal discretization is the Bounded Second Order implicit scheme. At the end of each time step, the convergence criteria reached a value of 5×10^{-5} for the momentum equations.

One LES simulation lasted 3 weeks on a 32-thread parallel computer for around 30 seconds of real time. LES have been run at 308 rpm for MPD and MPU impellers, 173 rpm for RT impeller, 150 rpm

for EED and EEU impellers. All these agitation conditions correspond to the same global power input of $10^{-3} \text{ W.kg}^{-1}$. Simulations were also run at 88 rpm and 187 rpm for RT impeller and EEU impeller, respectively, in order to evaluate the impact of the impeller agitation rate N on hydrodynamics.

Data post-processing Results of LES simulations are instantaneous velocity fields $u(t)$, which are processed to compute time-averaged velocity fields \bar{u} and turbulent dissipation rate ε . A time-averaged velocity field is classically computed from the arithmetic mean of instantaneous velocity fields (t) :

$$\bar{u} = \sum_1^n \frac{u(t)}{n} \quad \text{where } n \text{ is the number of velocity fields} \quad (33)$$

As the turbulent dissipation ε occurs at the Kolmogorov scale which is below the cut-off length scale [69], ε is estimated from Smagorinsky turbulent model parameters via the relation [70] :

$$\varepsilon = 2\nu_t S_{ij} S_{ij} \quad (34)$$

where ν_t is the subgrid viscosity calculated by the subgrid model and S_{ij} is the strain rate magnitude computed from the spatial derivative of the instantaneous resolved velocity fields. These treatments are performed by a Matlab[®] code applied on data exported from Fluent at each simulation iteration step.

c- Experimental investigation of microcarrier suspension

The suspension of three concentrations of Cytodex 1[®] microcarriers (GE HealthCare LifeSciences) was experimentally investigated in the five geometries. Cytodex 1[®] microcarriers are beads composed of cross-linked dextran matrix with substituted positively charged N,N-diethylaminoethyl groups. Their mean diameter equals $190 \mu\text{m}$ and their mean density equals 1030 kg.m^{-3} . The microcarrier concentrations investigated in this study were 4, 8 and $12 \text{ g}_{drypowder} \cdot \text{L}^{-1}$. When in contact with phosphate buffer, Cytodex 1 microcarriers swell by a factor of $20 \text{ mL/g}_{drypowder}$, the investigated solid volume fractions in suspension were thus equal to 5, 10 and 15% respectively if a maximal 68% compacting factor is assumed for rigid sphere. For each condition, the minimal agitation rate that led to a complete suspension of microcarriers, N_{js} , was determined via the Zwietering methodology [4]. The microcarrier beads were first homogeneously suspended in the liquid medium by stirring the solid-liquid mixture at a high impeller agitation rate (500 rpm). The impeller agitation rate was then

set to a smaller value and the microcarriers behaviour on the bottom of the bioreactor was visually observed by the operator through the glass side wall. This procedure was repeated until the smallest impeller agitation rate for which no microcarrier stays motionless on the tank bottom more than 2-3 seconds was detected. The methodology precision was estimated to be ± 1 rpm. Microcarriers were stained by adding two drops of Rose Bengal dye to enhance the visual observation. It had been previously verified that dye addition did not modify N_{j_s} values (data not shown).

B.2.3 Results and discussion

This section is divided into three parts. In the first, results obtained from RANS and LES simulations are compared. Their uses are also discussed based on their respective assumptions, advantages, and limitations. In the second part, spatial heterogeneities inside the flow are analyzed by displaying the spatial distribution of liquid time-averaged velocities and turbulent dissipation rates ε for the five geometries investigated in this study. Spatial distribution of microcarriers at the just-suspended speed N_{j_s} is also qualitatively analyzed. Thirdly, data compiled from both CFD simulations and experimental characterization of the microcarrier suspension are used to determine microcarriers exposure to the highest values of ε .

a- Comparison of CFD RANS and LES simulations

In this study, the impeller diameters d were small (17-24 mm) and their range of agitation rate N was typically chosen between 50-500 rpm while performing hMSC culture. Thus, impeller Reynolds numbers Re corresponding to these agitation conditions varied between 469 and 6800, with :

$$\Re = \frac{\rho N d^2}{\mu} \quad (35)$$

These values indicate that the fully turbulent flow regime, for that range of agitation conditions, was probably not reached in the minibioreactor. As the establishment of the fully turbulent flow regime is one underlying hypothesis of the RANS model, using it in transitional flow regime may lead to an approximate prediction of the flow, because in this case all scales of the turbulent quantities are modeled. LES simulation should then generate more reliable data because larger turbulent scales, which are anisotropic and highly dependent of the design of the tank investigated, are directly solved from Navier-Stokes equations, while only smaller turbulent scales, which are isotropic and universal,

are modeled by the subgrid Smagorinski model. Moreover, several authors [31, 71, 72] demonstrated its significant better capacity to predict turbulent quantities in stirred tank when compared to a RANS model. However, LES simulation is highly time consuming (3 weeks of calculation time for 30 simulated seconds), requests all the resources of a powerful computer and data post-treatment is labor expensive as well.

To compare results obtained from RANS and LES models, Figure 10 and Figure 11 show the time-averaged velocity fields in one representative axial plane ($\Theta = 18^\circ$, Figure 9) and the simulated volumetric distributions of ε in log-scale when the EED impeller rotates at 150 rpm ($Re = 2613$). Both models predicted similar time averaged flow structure and velocity magnitude fields. However, additional liquid recirculation loops were highlighted by Large-Eddy Simulations, due to a finer mesh grid and better resolution of the numerical solution. On the contrary, each model did not lead to the same results concerning turbulent quantities because of the differences between shapes of the two volumetric distributions of $\log(\varepsilon)$. The secondary peaks appearing with the RANS model may not be attributed to the use of an MRF approach, wherein flow is resolved for a single impeller angular position. One Unsteady-RANS simulation taking into account impeller rotation by using the Sliding Mesh approach has been performed for this agitation condition to confirm it. Figure 11 (left) shows the mean volumetric distribution of $\log(\varepsilon)$ computed from these data. This simulation included two impeller rotations with a time step of 1° . The volumetric distribution of $\log(\varepsilon)$ with the LES model (Figure 11, right) was smooth and close to a normal distribution, thereby indicating more reliable results. Indeed, Mollet *et al.* [73] also obtained a bell-shaped volumetric distribution of $\log(\varepsilon)$ by using Particle Tracking Velocimetry measurements at an equivalent Reynolds number to ours ($Re = 2510$) in a 1.6 L cylindrical and partially baffled stirred tank equipped with a 6-blade Rushton turbine. Therefore, the spatial and numerical distributions shown and analyzed in the next sections of this study are exclusively established from LES simulations. Despite their different shapes, ε distributions from RANS and LES models predicted similar volume averaged values of ε . Thus, RANS simulation can be used as a reliable screening tool to establish the relationships between global power dissipation and impeller parameters (design, agitation rate and pumping direction). Results from 60 RANS simulations summarized in Figure 12 show the evolution of the global power dissipation P , expressed via the impeller power number N_p , as a function of the agitation conditions expressed via the Reynolds number Re . N_p is defined as :

$$N_p = \frac{P}{\rho N^3 d^5} \quad (36)$$

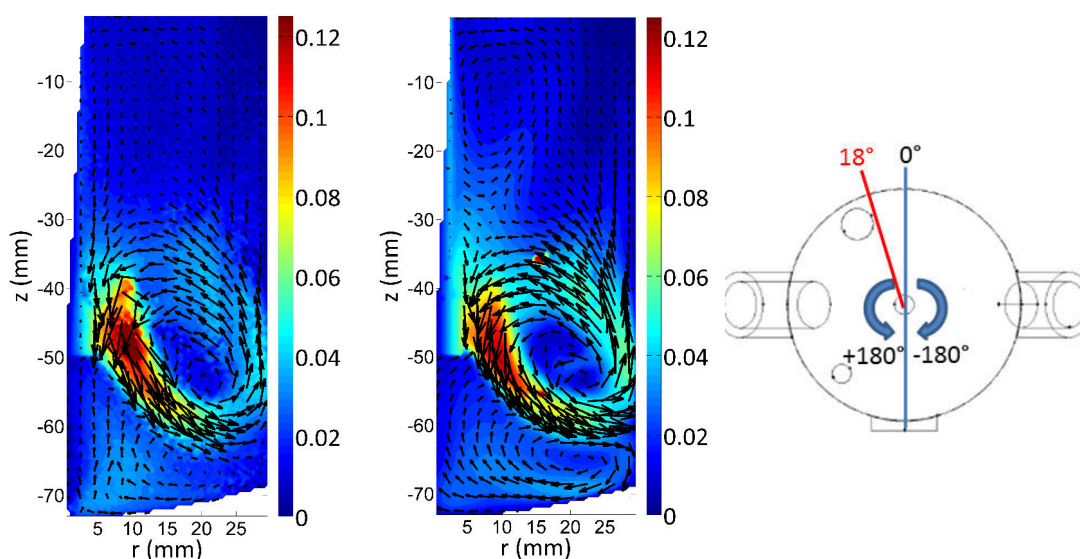


FIGURE 10 – Time averaged velocity fields in the axial plane $\Theta=18^\circ$ obtained from (Left) RANS simulation with an MRF approach, (Right) LES simulation with a sliding mesh approach with an EED impeller rotating at 150 rpm. Color bars indicate the velocity magnitude ($\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$).

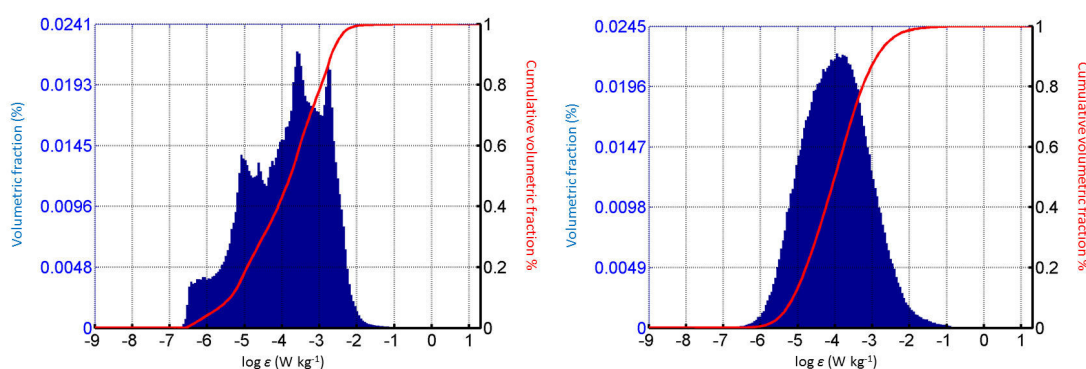


FIGURE 11 – Volumetric distributions of turbulent dissipation rate ε expressed in log scale ($\log (\text{W}\cdot\text{kg}^{-1})$) obtained from (Left) unsteady RANS simulation with a sliding mesh approach, (Right) LES simulation with a sliding mesh approach for an EED impeller rotating at 150 rpm.

In typical agitation conditions used for hMSC culture (marked out by the blue frame), the flow in the minibioreactor was transitional, meaning the impeller power number is not constant and depends on the Reynolds number. Therefore, without this abacus, it could not have been possible to directly predict the global power dissipation P from agitation conditions *via* relation 11, as the value of N_p would have been unknown. This information was thus crucial to wisely select the agitation conditions at which the limited set of LES simulations had to be performed. RANS simulations were also performed at very high impeller agitation rates ($N > 1000$ rpm) to compare the constant turbulent power number predicted with data from the literature (Table 6). A good agreement was observed for RT and EE

impellers, considering especially that the minibioreactor baffles are actually probes and not standardly designed. No conclusion could be drawn for MP impeller as its shape is also not standardized and more similar to a pitched blade turbine.

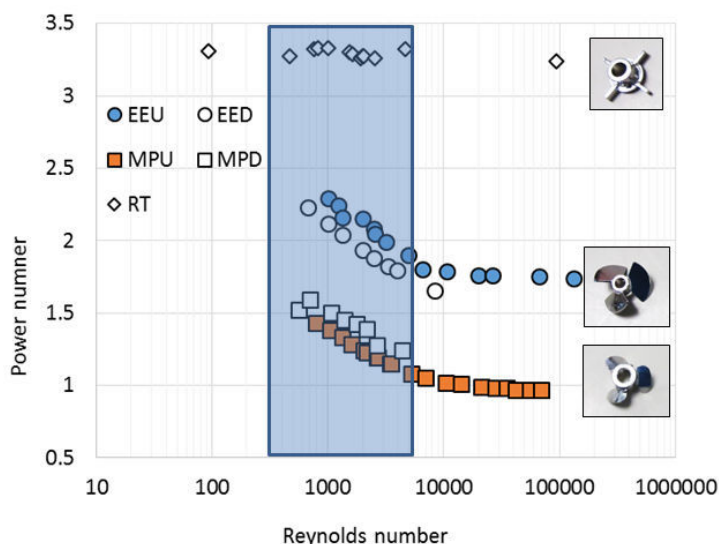


FIGURE 12 – Power curves of the various impellers studied. CFD-RANS simulations. Blue frame corresponds to typical agitation conditions for hMSC culture.

TABLEAU 6 – Comparison of asymptotic turbulent power number N_p obtained in the study by RANS simulations with literature values.

Power number in fully-turbulent regime ($Re \sim 10^5$)		
Impellers	RANS simulations (this work)	Literature data
EE	1.7	1.7-2.1 [56, 74]
RT	3.3	4 [75]
MP	1.0	0.37-0.5 for Marine propeller 0.7-1.7 for profiled pitched blade turbine [75]

b- Description of spatial heterogeneities of minibioreactor hydrodynamics

To describe microcarrier exposure to mechanical stresses, it is important to quantify the flow circulation within the bioreactor and the spatial distribution of these mechanical stresses. Whereas flow circulation may be characterized *via* the description and quantification of the time averaged velocity field, mechanical stresses may be related to the distribution of the turbulent dissipation rate ϵ . Indeed, according to the Kolmogorov theory, the flow in stirred tank results from a superposition of eddies with various sizes ranging from few millimeters to hundred micrometers. All these eddies generate velocity

gradients at their scale. The consequence is that turbulent stresses, acting on microcarriers when they are carried in the turbulent flow field, either in the viscous or the inertial subrange, should be related to the turbulent dissipation rate [76].

On Figures 16 and 17, time-averaged velocity field and spatial distribution of turbulent dissipation rates have been shown in a unique axial plane (here $\Theta = 18^\circ$) despite the structure of the flow did not exhibit a strict axial symmetry due to the tank shape and the presence of probes. Indeed, even if minor differences on velocity fields could be observed in Figure 13, all axial planes shared the same global flow structure (number and localization of recirculation loops) and the same range of velocity magnitude. In a more quantitative way, Figure 14 shows that the time averaged velocity magnitude, computed in various axial planes, exhibited very similar axial profiles in the impeller discharge stream.

Time averaged velocity fields (Figure 16) and spatial distributions of ε (Figure 17) for the five geometries investigated in this study, were made dimensionless by dividing them by the impeller tip speed, $v_{tip} = \pi N d$, and by $N^3 d^2$, respectively. Indeed, despite the occurrence of the transitional flow regime, these dimensionless spatial distributions seemed representative of the whole range of impeller agitation rates investigated here (*i.e.* 88 - 340 rpm) as no modification in their structure or intensity were observed from LES simulations performed for EEU and RT impellers at two agitation levels. Figure 15 shows, for instance, the very good overlapping of the volumetric distribution of the dimensionless turbulent dissipation rate ($\varepsilon / N^3 d^2$) expressed in log-scale when these distributions are computed from LES simulations performed with RT impeller rotating at 88 rpm and 173 rpm. The dimensionless time averaged velocity fields (Figure 16) generated by the five geometries exhibited some common characteristics but also several notable differences. The five geometries should thus have distinct performances regarding liquid pumping and circulation. Indeed, just a glance at the flow structure and background colors highlights that all impellers generated three recirculation loops in axial planes and shared the same range of dimensionless velocity magnitude with a maximum value around 0.5-0.6 v_{tip} in the impeller discharge stream and values around 0-0.2 v_{tip} outside it. However, depending on the geometry, orientation and width of the discharge stream, localization of recirculation loops and the velocity magnitude inside these loops, greatly differed from one to an other. As expected, RT impeller generated a radial flow while others produced more axial ones. It is also interesting to note that the EE impeller induced a larger discharge stream than other geometries. This may probably not only be explained by its bigger diameter (24 mm versus 17-20 mm), but by its geometry as well. Indeed, its dimensionless pumping number N_{qp} (Relation 12), which quantifies the impeller intrinsic capacity

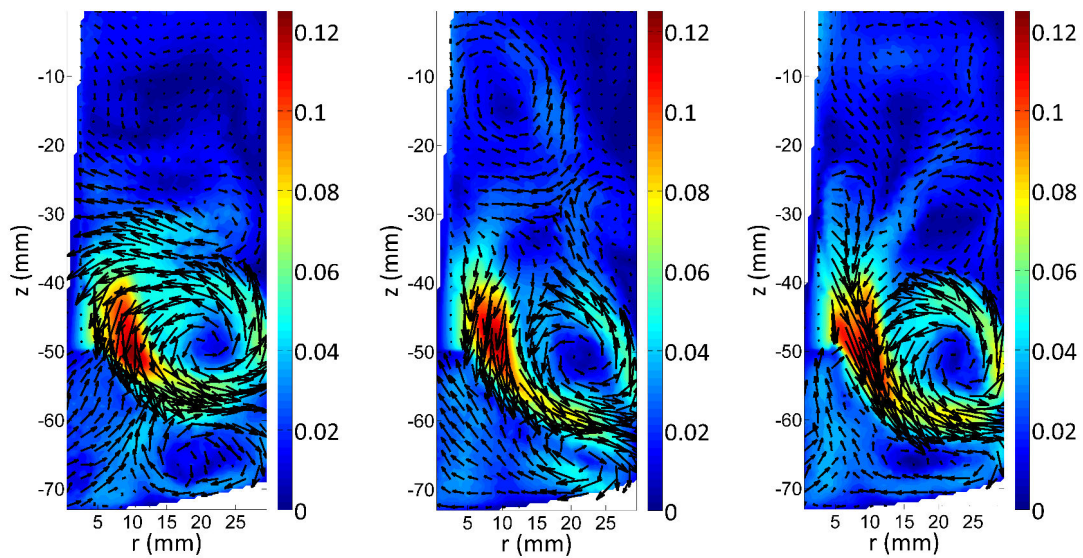


FIGURE 13 – Illustration of deformations generated by the two side probes and the two immersed tubes on the structure of the time averaged velocity fields generated by the EED impeller rotating at 150 rpm. Color bars indicate velocity magnitude ($\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$). The angular coordinate of the left figure is -160° , 60° in the middle figure and 120° in the right figure. As shown in Figure 9, these axial planes are either close to no probe, to the temperature and pH probes, or to the pH probe and sampling tube.

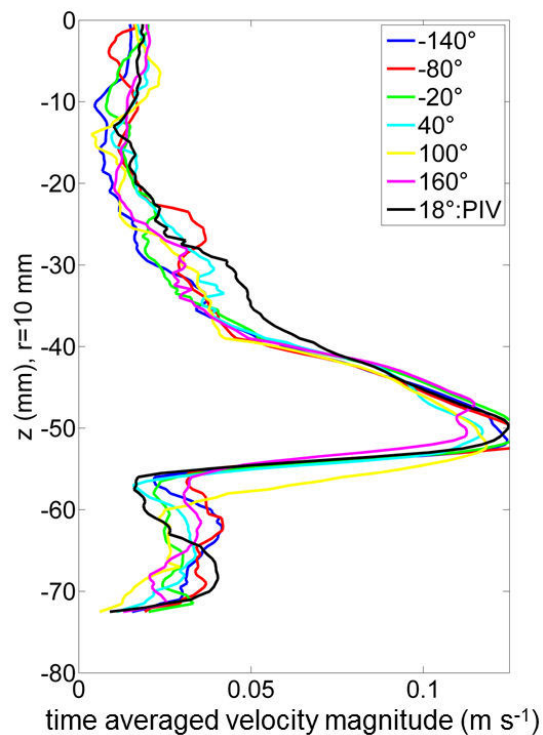


FIGURE 14 – Comparison of the axial profiles of time averaged velocity magnitude ($\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$) at the radial coordinate $r = 10 \text{ mm}$ calculated in various axial planes. The radial coordinate selected corresponds to the discharge stream of the EED impeller ($N = 150 \text{ rpm}$).

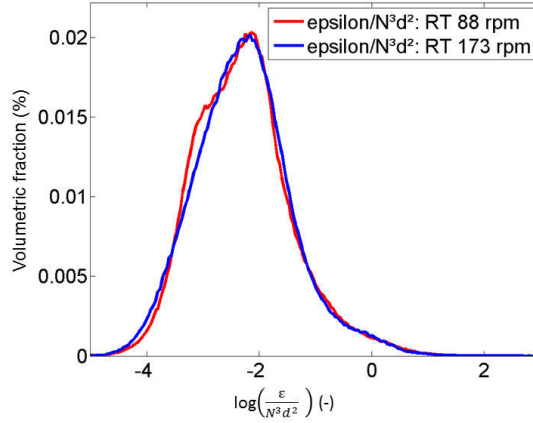


FIGURE 15 – Volumetric distribution of the dimensionless turbulent dissipation rate ($\epsilon/N^3 d^2$) expressed in log scale when these distributions are computed from LES simulations performed with RT impeller rotating at 88 rpm and 173 rpm.

to generate pumping, is more or less twice as high as for the other impellers (Table 7). These pumping numbers have been estimated by :

$$N_{Q_P} = \frac{Q_P}{N d^3} \quad (37)$$

where the pumping flowrate $Q_P(\text{m}^3 \cdot \text{s}^{-1})$ is classically computed from the integration of the axial and radial velocity components on the three surfaces forming the smallest cylinder containing the impeller blades. Fluid motion in the three recirculation loops was also disparate for all the geometries. With RT impeller or down-pumping EE and MP impellers, fluid motion seemed more pronounced, as velocity vectors were longer, in the bottom and middle recirculation loops while being much less intensive in the upper part of the tank. With up-pumping EE and MP impellers, fluid motion seemed only pronounced in the main recirculation loop in the middle. In addition, this loop was located higher in the tank when the impellers were pumping upward compared to a down pumping mode. The

TABLEAU 7 – Impeller pumping number N_{qp} (-) computed in this study using LES.

Impeller	EEU	EED	MPU	MPD	RT
N_{qp}	0.71	0.95	0.41	0.42	0.42

dimensionless spatial distributions of the turbulent dissipation rate $\epsilon/(N^3 d^2)$ (Figure 17) generated by the five geometries have some common characteristics but also have some divergent ones. The *a priori* intrinsic impact of mechanical stresses in the five geometries should thus be different. In all configurations, intensity of the dimensionless $\epsilon/(N^3 d^3)$ was very widely distributed as it covered five orders of magnitude ranging from 10^{-4} to 10^1 . Maximal values were observed on the impeller blades

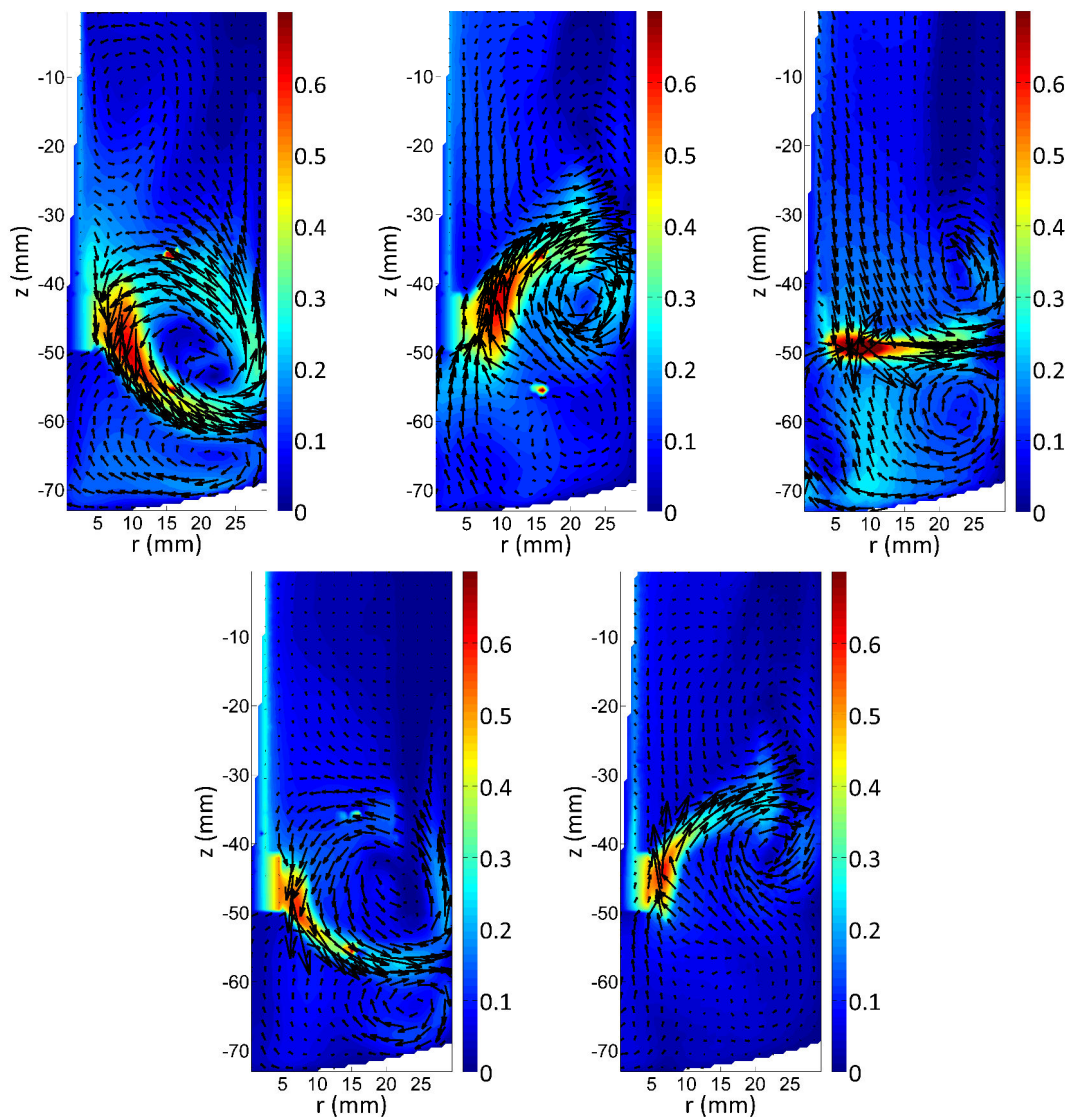


FIGURE 16 – Dimensionless time averaged velocity fields normalized by the impeller tip speed in the axial plane $\Theta = 18^\circ$ simulated by LES for (left to right and up to down) : EED, EEU, RT, MPD, MPU impellers.

and in the impeller discharge stream, where their intensity was about the same for the five geometries. Outside this area however, the distribution of the dimensionless ε differed from one geometry to another. As highlighted by the blue and green color dominances, values were significantly lower with the MP impeller compared to the others.

As the five geometries did not have the same intrinsic characteristics concerning mean circulation flow and level of turbulence in the liquid phase, especially in the bottom half of the tank, it was expected that agitation rates for microcarriers just-suspended state would also differ. Indeed, current theories [77] relate solid suspension conditions to both of these parameters. The suspension of Cytodex 1™,

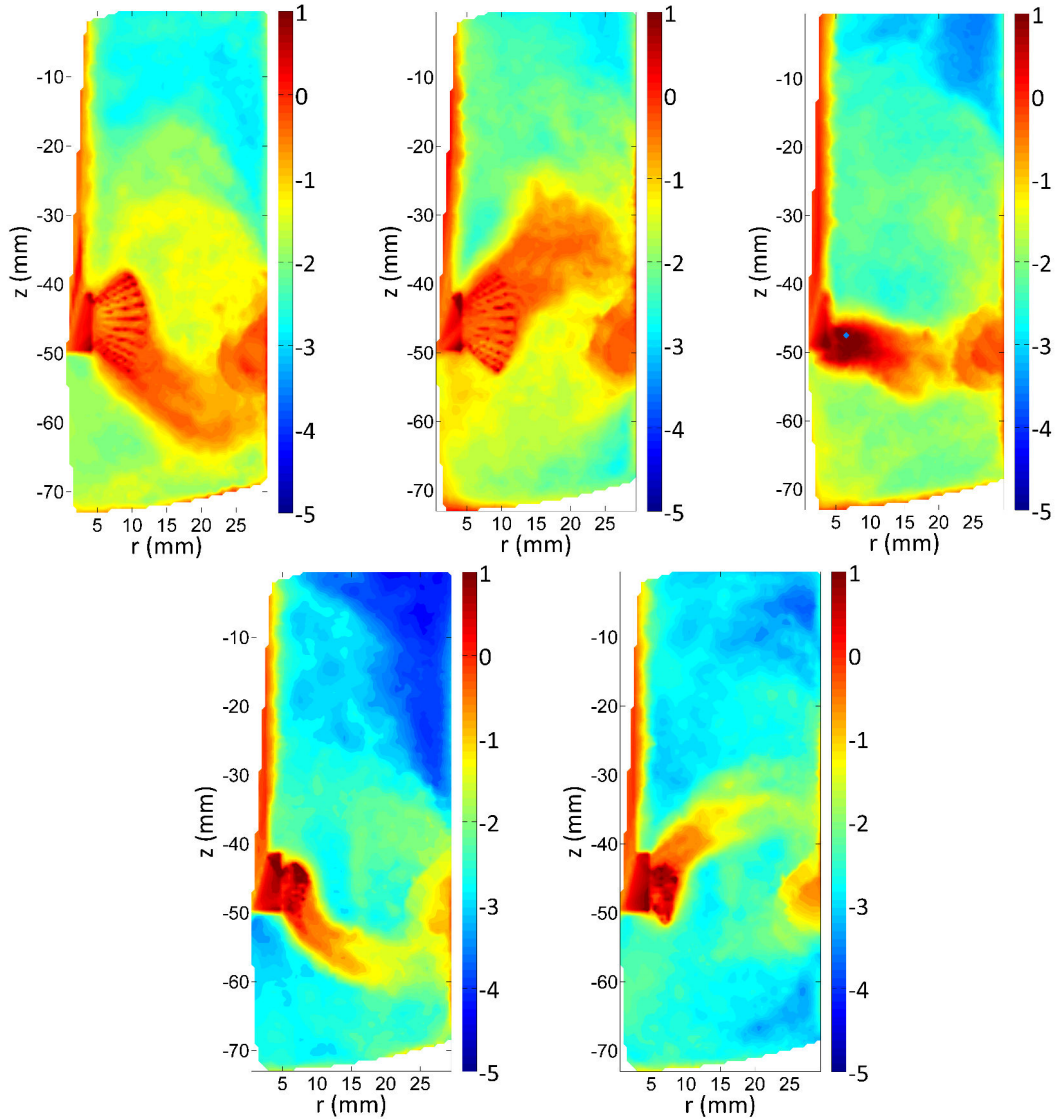


FIGURE 17 – Dimensionless spatial distributions of the logarithm of turbulent dissipation rate $\varepsilon/N^3 d^2$ in the axial plane $\Theta = 18^\circ$ simulated by LES for (left to right and up to down) : EED, EEU, RT, MPD, MPU impellers.

which is classically used for adherent-dependent MSC cell lines [2, 78] was experimentally investigated by visual observations. Minimum agitation rates leading to a complete suspension of microcarriers, N_{js} , were determined for the five geometries and three levels of microcarrier concentrations. As shown in table 3, N_{js} greatly varied between geometries as the minimum value is 75 rpm for EED impeller and the maximum one is 340 rpm for MPU impeller. N_{js} values were largely unaffected by microcarrier concentration, but the tank volume visited evolved. For EED, MPD and RT impellers rotating at their respective N_{js} , no microcarrier reached the upper part of the tank, as shown on Figure 18 and 19. For these three configurations, the minimum impeller agitation rate for which the microcarrier cloud

expanded through all the liquid height, named here N_H , was also experimentally determined. Values are summarized in Table 8 and show that N_H varied with geometries and microcarrier concentrations.

Even though no quantitative conclusions can be drawn, as this complex subject requires further

TABLEAU 8 – Minimum impeller agitation rates N_{js} to keep various concentrations (4 g.L^{-1} , 8 g.L^{-1} and 12 g.L^{-1}) of Cytodex 1™ in complete suspension. Minimum impeller agitation rates N_H from which the Cytodex 1™ cloud expands through all the liquid height.

		EEU	EED	MPU	MPD	RT
N_{js} (rpm)		75 ± 5	130 ± 2	140 ± 2	340 ± 2	163 ± 5
N_H (rpm)	4 g.L^{-1}	110	< 130	220	< 340	198
	8 g.L^{-1}	135		342		223
	12 g.L^{-1}	150		362		268

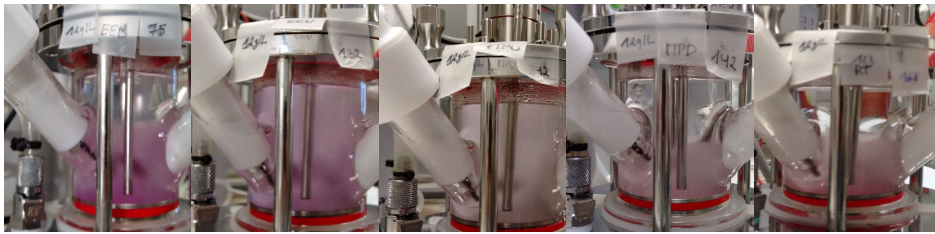


FIGURE 18 – Spatial distributions of a Cytodex 1™ suspension (12 g.L^{-1}) when the impeller is rotating at N_{js} for EED, EEU, MPU, MPD and RT (from left to right).

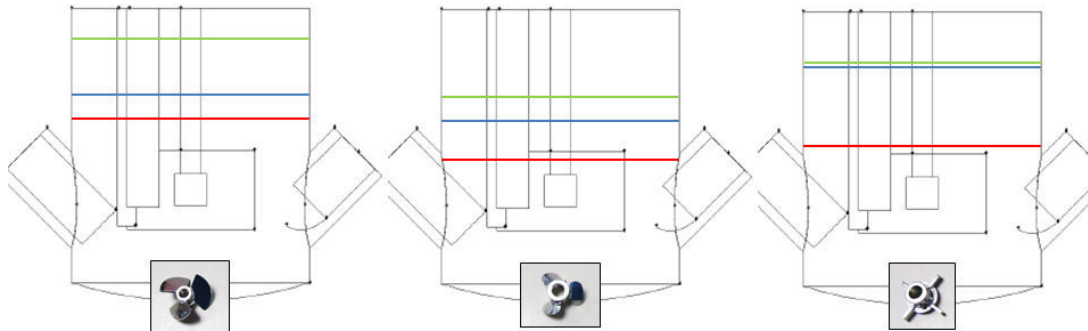


FIGURE 19 – Illustrations of the Cytodex 1™ cloud height expansion for EED, MPD or RT impellers rotating at N_{js} . The green, red and blue lines correspond respectively to Cytodex 1™ concentrations equal to 4 , 8 and 12 g.L^{-1} .

studies, it is interesting to qualitatively relate the results from the experimental microcarrier suspension determinations to the liquid phase LES simulations. Firstly, EED impeller, which rendered the lowest N_{js} at 75 rpm , is also the geometry with the highest intrinsic pumping capacities, a good fluid recirculation in the bottom loop, and the highest dimensionless ϵ value in this area. Among the three geometries leading to microcarriers segregation in the lower part of the tank (EED, MPD, RT), EED

also allowed the most important expansion of the microcarrier cloud at almost all concentrations. Secondly, a clear link appeared between N_{js} values and flow properties in the lowest third of the tank when up-pumping and down-pumping configurations of the same impeller were compared. Indeed, as dimensionless time averaged velocity and ε were significantly smaller in this area with up-pumping designs, microcarriers were kept in just-suspended state for a significantly higher impeller agitation rate. Finally, the RT impeller that exhibited intermediate intrinsic properties in this area, did also have an intermediate value of N_{js} .

c- A case study : Comparison of microcarrier exposure to potentially damaging zones for the various designs operating at the same volume averaged turbulent dissipation rate.

The microcarrier exposure to potentially damaging zones was evaluated when all geometries operated at the same volume averaged turbulent dissipation rate $\langle\varepsilon\rangle$. This global hydrodynamic parameter is often used in the literature as a good indicator of the mean hydrodynamic stress encountered in bioreactors because it can be easily estimated from the global power input P or more directly from impeller operating conditions (N , d) when the impeller power number N_p is known applying the relation 5. Therefore, performances of various impellers are frequently compared at same $\langle\varepsilon\rangle$ [79] and scale-up of many cell culture processes in stirred tank bioreactor are often performed by keeping this value constant [7].

To compare geometries, $\langle\varepsilon\rangle$ was fixed to 10^{-3} W.kg $^{-1}$ as it is a typical agitation condition for animal cell culture. From the abacus established by RANS simulation (Figure 14), impeller agitation rates used for LES were estimated using relation 11. However, *a posteriori* results showed that, despite EED (150 rpm), EEU (150 rpm) and MPU (308 rpm) LES simulations predicted the targeted $\langle\varepsilon\rangle$ values, fairly different values of 0.94×10^{-3} and 1.24×10^{-3} W.kg $^{-1}$ were obtained for the RT impeller rotating at $N_1 = 173$ rpm and for the MPD impeller rotating at 308 rpm respectively. It was then estimated that LES simulation should have respectively been performed at $N_2 = 182$ rpm and 295 rpm to reach a $\langle\varepsilon\rangle$ value equal to 10^{-3} W.kg $^{-1}$. However, as these impeller agitation rates were close to the first set of values, it was decided not to perform these additional LES simulations and, instead, to scale the ε distributions and the time averaged velocity fields computed from the two existing LES simulations by a factor of $(N_1/N_2)^3$ and N_1/N_2 , respectively. Indeed, it was demonstrated in the previous section that these quantities have a scalable dimensionless spatial distribution within the range of impeller agitation rates investigated in this study. The bioreactor volume covered by the microcarrier cloud was

also determined experimentally at these five agitation conditions. As shown in Table 9 (column 2), the cloud expanded through the whole liquid volume except for the RT impeller and MPD impeller. To describe actual microcarrier exposure to mechanical stresses, the volumetric distribution of $\log(\varepsilon)$ was computed by only taking into account the part of the flow visited by microcarriers (Figure 20, right, $C_{\mu C} = 12 \text{ g.L}^{-1}$). For comparison, the volumetric distribution of $\log(\varepsilon)$ in the whole liquid volume is also shown (Figure 20, left).

Bell shaped distributions did not have the same spreading from one impeller to another even if they all seemed approximately centered on the same value. The blue and red curves especially, corresponding to EED and EEU impellers, were above others curves in the area of larger ε values (10^{-3} - $10^{-2} \text{ W.kg}^{-1}$). As already observed in Figure 17, this means that bioreactor volume percentages with large ε values are higher for these two impellers than for others. Percentile 99 summarized in Table 9 (column 3) also revealed that RT impeller has the highest maximum ε value compared to other geometries.

However, this analysis took only into account the distribution of ε and not the exposure frequency or exposure duration to these ε values. These parameters still had to be elucidated to fully characterize microcarrier exposure to potential damages. From the postulate that mechanical stresses potentially harming hMSC growth and quality corresponded to the highest ε values near the impeller and its discharge stream, microcarrier exposure frequency was easily evaluated by dividing the impeller pumping flow rate Q_P computed from time averaged velocity field by the volume of the area visited by microcarriers (Table 9, column 4). To evaluate microcarrier exposure frequency, a range of ε values had to be selected. We decided to select values beyond an arbitrary threshold of $\varepsilon = 2.59 \cdot 10^{-4} \text{ W.kg}^{-1}$. This threshold value corresponds to a Kolmogorov scale λ_k (relation 7) equal to the mean Cytodex 1™ microcarrier diameter d_p of $190 \mu\text{m}$. This arbitrary choice was inspired from the work of Croughan *et al.* [45–47] and Cherry and Papoutsakis [3, 44] which highlighted a sharp decrease in the specific growth rate of continuous animal cell line cultivated on microcarrier when the volume averaged $\langle \varepsilon \rangle$ exceeded a value corresponding to the occurrence in the flow of eddies with a size smaller than the microcarrier. As a reminder from the Kolmogorov's isotropic turbulence theory, these eddies generate high shear stresses at microcarriers surface because they transfer their energy on it. This choice, based on physical assumptions only, is however arbitrary because the actual threshold should probably also depends on biological cell properties as well as their mechanical resistance and their adherence level to microcarriers. As no data is available in the literature to evaluate the actual threshold

for hMSC, it could not be possible to get more precise threshold value. If the flow is supposed perfectly mixed in the zone visited by microcarriers, their probability of presence in each elementary volume is identical, because the number of visits and time spent in this visited elementary volume are both inverse functions of the local circulation flow. Along the duration of an hMSC culture for example, the fraction of the total time spent in a specific zone is thus equal to the volume fraction of this zone. Figure 20 hence gives not only the volumetric distribution of $\log(\varepsilon)$, but the fraction of the total time spent by microcarriers in a specific range of ε values as well.

Microcarrier exposure frequencies $1/t_{C,\mu C}$ and volume fractions (equivalent to temporal fractions) exposed to dissipation rates $\varepsilon > 2.59 \times 10^{-4} \text{ W.kg}^{-1}$ (*i.e.* $\lambda_k < d_p$) are respectively detailed in columns 4 and 5 of table 4. The EED and EEU impellers showed a temporal fraction of exposure to critical zones 2 to 3 times higher than others impellers, whose characterizations are similar to one another. However, the MPU impeller has the double advantage of having a low exposure frequency to maximum mechanical stress area (0.055 s^{-1}) and the lowest temporal fraction of exposure to these zones (22.5%).

To combine intensity and exposure frequency to hydrodynamical stresses, a function similar to the one suggested by Justen *et al.* [67] for filamentous fungi cultures ($\frac{P}{kd^3} \frac{1}{t_c}$) was also established. The first term of the previous equation is equivalent to the mean power dissipation per volume unit in the zone swept by the impeller. Drawing from this, we decided to evaluate the mean power dissipation per volume unit in the critical zone where the Kolmogorov scale was smaller than the microcarriers average size. This result was obtained by integrating dissipation rate values ε in this critical zone. These results are shown in column 6 of table 4. Two comments can be made there. Firstly, this calculation evidences that a very high fraction, 95 to 96%, of the power (expressed as W) was dissipated in the critical zone for all the impellers studied. Secondly, as the critical volume varies depending on impeller designs, it was logical to observe a lower mean volumetric power for EE impellers compared to the others. Regarding the RT impeller, it had a higher mean volumetric power due to its maximum values of ε , as already indicated by its percentile 99. Finally, the product of exposure frequency by mean volumetric power in the critical zone (column 7 table 4) varied strongly between impellers, even though they operated in agitation conditions at the same global power dissipation $\langle \varepsilon \rangle$. It might be possible to a priori identify the impeller that is most adequate for hMSC cultures by reasoning logically as it is probably the impeller getting the lowest value through the function $EDC = \frac{1}{t_{C,\mu C}} \frac{\rho}{V_{\mu C}(\lambda_k < d_p)} \cdot \iiint_{V_{\mu C}(\lambda_k < d_p)} \varepsilon dV$. In our case, it was the MPU impeller which exposed microcarriers to the lowest mechanical stresses exposure frequency at a moderate mean volumetric power. This approach remains to be validated by cell culture results

in the future, as the relative weights of the “intensity” and “frequential” contributions are currently unknown and were thus considered here as equivalent. In other words, it has still to be determined if hMSC exposure to high level of mechanical stresses at low frequency might be more or less deleterious compared their exposures to lower levels stress at an higher frequency.

This case study anyway demonstrated that selecting agitation condition solely based on global power dissipation ϵ may be inadequate as it can cause microcarriers to be exposed to mechanical stresses *via* various scenarios characterized by various spatial repartition, frequency, and duration. Finally, we invite the authors of published results that included spatial distribution of ϵ as well as hMSC growth kinetics to reanalyze these results following this methodology in order to hopefully obtain a more quantitative correlation between engineering and biological data, thereby establishing scale-up rules adapted to hMSC cultures.

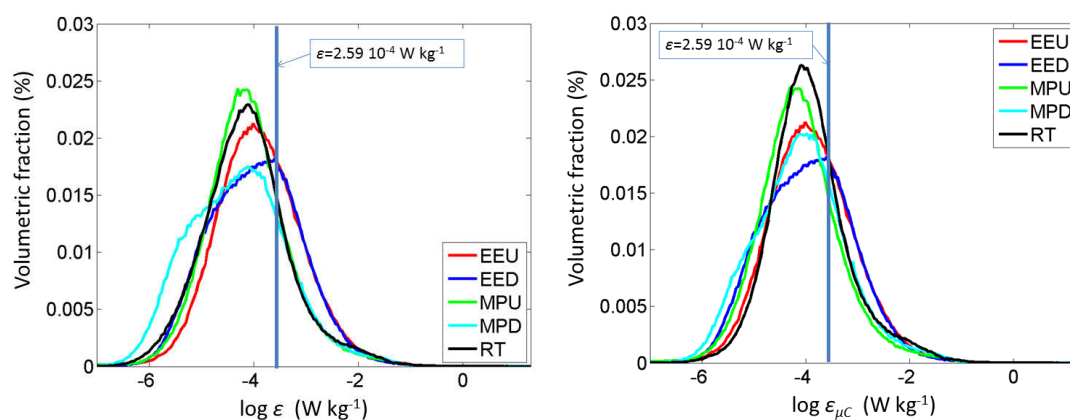


FIGURE 20 – Distributions in volume of logarithm of the turbulent dissipation rate ϵ , (Left) based on all the liquid volume, (Right) based on the area visited by the microcarrier cloud (12 g.L^{-1}), when all impellers dissipated the same global power input equal to $10^{-3} \text{ W.kg}^{-1}$

B.2.4 Conclusion

The aim of this study was to establish a new methodology to improve the characterization of microcarrier exposure to fluctuating mechanical stresses generated inside a stirred tank bioreactor. With this goal in mind, both spatial distribution of the turbulent dissipation rate ϵ in the bioreactor and the exposure frequency computed from the time averaged velocity field were taken into account. Large-Eddy Simulations using Sliding Mesh methodology and Smagorinsky subgrid model were used to calculate velocity and turbulence fields in a 200 mL minibioreactor operating with five different impeller geometries. Cytodex 1™ microcarrier suspension was also experimentally characterized

TABLEAU 9 – Comparison of the quantitative properties of distribution in volume of $\log(\varepsilon)$ in the zones visited by the microcarrier cloud (12 g.L^{-1}), at the same power input equal to $10^{-3} \text{ W.kg}^{-1}$.

Impeller and agitation rate	Volume visited by μC	Percentile 99 of ε for μC	Frequency of μC exposure to critical zones ($\lambda_k < d_p$)	Time and volume fraction of μC exposure to critical zones ($\lambda_k < d_p$)	Volume average dissipation in the critical zones $V_{\mu C}(\lambda_k < d_p)$	EDC = energy dissipation/circulation function
	$V_{\mu C}$ (mL)	$\varepsilon_{99-\mu C}$ (W.kg^{-1})	$1/t_{C,\mu C} = Q_P/V_{\mu C}$ (s^{-1})	$V_{\mu C}(\lambda_k < d_p)/V_{\mu C} = t_{C,\mu C}(\lambda_k < d_p)/t_{C,\mu C}$ (%)	$\frac{\rho}{V_{\mu C}(\lambda_k < d_p)} \cdot \iiint_{V_{\mu C}(\lambda_k < d_p)} \varepsilon dV$ (W.m^3)	$\frac{1}{t_{C,\mu C}} \frac{\rho}{V_{\mu C}(\lambda_k < d_p)} \cdot \iiint_{V_{\mu C}(\lambda_k < d_p)} \varepsilon dV$ ($\text{W.m}^3 \cdot \text{s}^{-1}$)
EEU 150 rpm	200	9.62×10^{-2}	0.117	34.8	3.03	0.357
EED 150 rpm	200	7.59×10^{-2}	0.156	34.6	2.73	0.425
MPU 380 rpm	200	7.59×10^{-2}	0.055	22.5	4.71	0.257
MPD 295 rpm	162	8.55×10^{-2}	0.0625	27.2	4.68	0.354
RT 182 rpm	158	13.7×10^{-2}	0.062	28.7	5.12	0.317

for three levels of concentrations at various impeller agitation rates. The comparison of the five geometries at a same volume averaged turbulent dissipation rate $\langle \varepsilon \rangle$ revealed the importance of characterizing not only the hydrodynamics of the liquid phase, which is commonly done in the literature, but also the temporal exposure to potentially damaging zones inside the bioreactor. Indeed, these exposure dynamics can be significantly different from one impeller to another and should also evolve during a process scale-up. Drawing from the work of Justen *et al.* [67] a function integrating spatial heterogeneities and exposure frequency to mechanical stresses was proposed. Our results thus showed that a MPU impeller might allow microcarriers to be less damaged by mechanical stresses by reducing their exposure to both frequency and intensity of turbulent dissipation.

The present study also brings new information regarding literature data, as, to the best author's knowledge, it is the first time that Large-Eddy simulations have been used in small-scale bioreactor operating in moderate agitation conditions corresponding to a transitional flow regime. This hydrodynamic regime is especially frequently met at small scale in partially baffled spinner flasks, which is a commonly used bioreactor for hMSC expansion on microcarrier.

Moreover, as each impeller exhibits specific hydrodynamics, especially in terms of microcarrier exposure to mechanical stresses, our study also revealed that the minibioreactors platform studied is an interesting polyvalent tool to further study the impact of duration of mechanical stresses on hMSC grown on microcarriers.

Finally, as for filamentous fungi cultures, the EDC function might be a potentially interesting criterion for scale-up of hMSC culture on microcarriers. In order to validate this criteria nevertheless, this function would have to be confronted to data obtained from hMSC growth kinetics, in multiple geometries and sizes of bioreactors that still have to be determined.

Acknowledgements

We acknowledge the FRS-FNRS (National Fund for Scientific Research of Belgium) for its financial support *via* M.-L. Collignon's postdoctoral researcher grant (research agreement 1206614F).

B.3 References

- [1] E OLMOS et al. Critical agitation for microcarrier suspension in orbital shaken bioreactors : Experimental study and dimensional analysis. *Chemical engineering science*, 122 :545–554, 2015.
- [2] C FERRARI et al. Limiting cell aggregation during mesenchymal stem cell expansion on microcarriers. *Biotechnology progress*, 28(3) :780–787, 2012.
- [3] R S CHERRY et al. Physical mechanisms of cell damage in microcarrier cell culture bioreactors. *Biotechnology and bioengineering*, 32(8) :1001–1014, 1988.
- [4] T ZWIETERING. Suspending of solid particles in liquid by agitators. *Chemical engineering science*, 8(3–4) :244–253, 1958.
- [5] S IBRAHIM et al. Suspension of Microcarriers for Cell Culture with Axial Flow Impellers. *Chemical engineering research and design*, 82(9) :1082–1088, 2004.
- [6] M-L COLLIGNON et al. Axial impeller selection for anchorage dependent animal cell culture in stirred bioreactors : Methodology based on the impeller comparison at just-suspended speed of rotation. *Chemical engineering science*, 65(22) :5929–5941, 2010.
- [7] A W NIENOW. Reactor engineering in large scale animal cell culture. *Cytotechnology*, 50(1-3) :9–33, 2006.
- [8] J BÜCHS. Introduction to advantages and problems of shaken cultures. *Biochemical engineering journal*, 7(2) :91–98, 2001.
- [9] M STETTLER et al. Novel orbital shake bioreactors for transient production of CHO derived IgGs. *Biotechnology progress*, 23(6) :1340–1346, 2007.
- [10] S TISSOT et al. Determination of a scale-up factor from mixing time studies in orbitally shaken bioreactors. *Biochemical engineering journal*, 52(2-3) :181–186, 2010.
- [11] X ZHANG et al. Efficient oxygen transfer by surface aeration in shaken cylindrical containers for mammalian cell cultivation at volumetric scales up to 1000 l. *Biochemical engineering journal*, 45(1), 2009.
- [12] M ZLOKARNIK. *Stirring : theory and practice*. John Wiley & Sons, 2008.
- [13] S GHNIMI et al. Design and performance evaluation of an ohmic heating unit for thermal processing of highly viscous liquids. *Chemical engineering research and design*, 86(6) :626–632, 2008.
- [14] A G PEDERSEN et al. Rheological characterization of media containing *Penicillium chrysogenum*. *Biotechnology and bioengineering*, 41(1) :162–164, 1993.
- [15] N MEHMOOD et al. Relation between pristinamycins production by *Streptomyces pristinaespiralis*, power dissipation and volumetric gas–liquid mass transfer coefficient, k_L a. *Process biochemistry*, 45(11) :1779–1786, 2010.
- [16] W WEHELIYE et al. On the fluid dynamics of shaken bioreactors- flow characterization and transition. *Aiche journal*, 59(1) :334–344, 2013.
- [17] T SZIRTES. *Applied dimensional analysis and modeling*. Butterworth-Heinemann, 2007.
- [18] C P PETER et al. Hydromechanical stress in shake flasks : Correlation for the maximum local energy dissipation rate. *Biotechnology and bioengineering*, 93(6) :1164–1176, 2006.

- [19] G DELAPLACE et al. Dimensional analysis for planetary mixer : Mixing time and Reynolds numbers. *Chemical engineering science*, 62(5) :1442–1447, 2007.
- [20] Y KATO et al. Mixing time and power consumption for a liquid in a vertical cylindrical vessel, shaken in a horizontal circle. *Chemical engineering research & design*, 74(4) :451–455, 1996.
- [21] J BÜCHS et al. Power consumption in shaking flasks on rotary shaking machines : II. Nondimensional description of specific power consumption and flow regimes in unbaffled flasks at elevated liquid viscosity. *Biotechnology and bioengineering*, 68(6) :594–601, 2000.
- [22] W KLÖCKNER et al. Power input correlation to characterize the hydrodynamics of cylindrical orbitally shaken bioreactors. *Biochemical engineering journal*, 65 :63–69, 2012.
- [23] A GABRIELE et al. Use of angle resolved PIV to estimate local specific energy dissipation rates for up- and down-pumping pitched blade agitators in a stirred tank. *Chemical engineering science*, 64(1) :126–143, 2009.
- [24] M-L COLLIGNON et al. Large-Eddy Simulations of microcarrier exposure to potentially damaging eddies inside mini-bioreactors. *Biochemical engineering journal*, 108 :30–43, 2016.
- [25] A AMANULLAH et al. Mixing in the Fermentation and Cell Culture Industries. In E L PAUL et al., éditeurs, *Handbook of Industrial Mixing*, pages 1071–1170. John Wiley & Sons, Inc., 2003.
- [26] M AL-RUBEAI et al. Cell cycle and cell size dependence of susceptibility to hydrodynamic forces. *Biotechnology and bioengineering*, 46(1) :88–92, 1995.
- [27] E DREVETON et al. Influence of fermentation hydrodynamics on gellan gum physico-chemical characteristics. *Journal of fermentation and bioengineering*, 82(3) :272–276, 1996.
- [28] J D FOWLER et al. Effects of reactant heterogeneity and mixing on catabolite repression in cultures of *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnology and bioengineering*, 33(8) :1039–1046, 1989.
- [29] Z JAWORSKI et al. The Effect of Size, Location and Pumping Direction of Pitched Blade Turbine Impellers on Flow Patterns : LDA Measurements and CFD Predictions. *Chemical engineering research and design*, 79(8) :887–894, 2001.
- [30] A N KOLMOGOROV. Dissipation of energy in locally isotropic turbulence. In *Dokl. Akad. Nauk SSSR*. Tome 32, 1941, pages 16–18.
- [31] A DELAFOSSE et al. LES and URANS simulations of hydrodynamics in mixing tank : Comparison to PIV experiments. *Chemical engineering research and design*, 86(12) :1322–1330, 2008.
- [32] B N MURTHY et al. Assessment of standard, RSM and LES turbulence models in a baffled stirred vessel agitated by various impeller designs. *Chemical engineering science*, 63(22) :5468–5495, 2008.
- [33] T KUMARESAN et al. Effect of impeller design on the flow pattern and mixing in stirred tanks. *Chemical engineering journal*, 115(3) :173–193, 2006.
- [34] G ZHOU et al. Impact of tank geometry on the maximum turbulence energy dissipation rate for impellers. *Aiche journal*, 42(9) :2476–2490, 1996.
- [35] M MICHELETTI et al. On Spatial and Temporal Variations and Estimates of Energy Dissipation in Stirred Reactors. *Chemical engineering research and design*, 82(9) :1188–1198, 2004.

-
- [36] C J HEWITT et al. Expansion of human mesenchymal stem cells on microcarriers. *Biotechnology letters*, 33(11) :2325–2335, 2011.
- [37] F dos SANTOS et al. Toward a Clinical-Grade Expansion of Mesenchymal Stem Cells from Human Sources : A Microcarrier-Based Culture System Under Xeno-Free Conditions. *Tissue engineering. part c, methods*, 17(12) :1201–1210, 2011.
- [38] D E KEHOE et al. Scalable Stirred-Suspension Bioreactor Culture of Human Pluripotent Stem Cells. *Tissue engineering part a*, 16(2) :405–421, 2009.
- [39] A I CAPLAN et al. The MSC : an injury drugstore. *Cell stem cell*, 9(1) :11–15, 2011.
- [40] Z GAMIE et al. Skeletal tissue engineering using mesenchymal or embryonic stem cells : clinical and experimental data. *Expert opinion on biological therapy*, 14(11) :1611–1639, 2014.
- [41] A J WANT et al. Large-scale expansion and exploitation of pluripotent stem cells for regenerative medicine purposes : beyond the T flask. *Regenerative medicine*, 7(1) :71–84, 2011.
- [42] M SZCZYPKA et al. Single-Use Bioreactors and Microcarriers. *Bioprocess international*, 12 :3, 2014.
- [43] T M MAUL et al. Mechanical stimuli differentially control stem cell behavior : morphology, proliferation, and differentiation. *Biomechanics and modeling in mechanobiology*, 10(6) :939–953, 2011.
- [44] R S CHERRY et al. Growth and death rates of bovine embryonic kidney cells in turbulent microcarrier bioreactors. *Bioprocess engineering*, 4(2) :81–89, 1989.
- [45] M S CROUGHAN et al. Hydrodynamic effects on animal cells grown in microcarrier cultures. *Biotechnology and bioengineering*, 29(1) :130–141, 1987.
- [46] M S CROUGHAN et al. Effects of microcarrier concentration in animal cell culture. *Biotechnology and bioengineering*, 32(8) :975–982, 1988.
- [47] M S CROUGHAN et al. Viscous reduction of turbulent damage in animal cell culture. *Biotechnology and bioengineering*, 33(7) :862–872, 1989.
- [48] H W LEUNG et al. Agitation can Induce Differentiation of Human Pluripotent Stem Cells in Microcarrier Cultures. *Tissue engineering part c : methods*, 17(2) :165–172, 2010.
- [49] P TSENG et al. Spontaneous osteogenesis of MSCs cultured on 3d microcarriers through alteration of cytoskeletal tension. *Biomaterials*, 33(2) :556–564, 2012.
- [50] Q A RAFIQ et al. Culture of human mesenchymal stem cells on microcarriers in a 5 l stirred-tank bioreactor. *Biotechnology letters*, 35(8) :1233–1245, 2013.
- [51] V JOSSEN et al. Mass Production of Mesenchymal Stem Cells — Impact of Bioreactor Design and Flow Conditions on Proliferation and Differentiation. In D EBERLI, éditeur, *Cells and Biomaterials in Regenerative Medicine*, pages 119–174. InTech, 2014.
- [52] V JOSSEN et al. Modification and qualification of a stirred single-use bioreactor for the improved expansion of human mesenchymal stem cells at benchtop scale. *Pharmaceutical bioprocessing*, 2(4) :311–322, 2014.

- [53] S KAISER et al. Fluid Flow and Cell Proliferation of Mesenchymal Adipose-Derived Stem Cells in Small-Scale, Stirred, Single-Use Bioreactors. *Chemie ingenieur technik*, 85(1-2) :95–102, 2013.
- [54] S C KAISER et al. Engineering characteristics of a single-use stirred bioreactor at bench-scale : The Mobius CellReady 3l bioreactor as a case study. *Engineering in life sciences*, 11(4) :359–368, 2011.
- [55] C SCHIRMAIER et al. Scale-up of adipose tissue-derived mesenchymal stem cell production in stirred single-use bioreactors under low-serum conditions. *Engineering in life sciences*, 14(3) :292–303, 2014.
- [56] A W NIENOW et al. The physical characterisation of a microscale parallel bioreactor platform with an industrial CHO cell line expressing an IgG4. *Biochemical engineering journal*, 76 :25–36, 2013.
- [57] A O O ODELEYE et al. On the fluid dynamics of a laboratory scale single-use stirred bioreactor. *Chemical engineering science*, 111 :299–312, 2014.
- [58] J B SIECK et al. Adaptation for survival : Phenotype and transcriptome response of CHO cells to elevated stress induced by agitation and sparging. *Journal of biotechnology*, 189 :94–103, 2014.
- [59] S K W OH et al. The effects of agitation intensity with and without continuous sparging on the growth and antibody production of hybridoma cells. *Journal of biotechnology*, 12(1) :45–61, 1989.
- [60] S K W OH et al. Further studies of the culture of mouse hybridomas in an agitated bioreactor with and without continuous sparging. *Journal of biotechnology*, 22(3) :245–270, 1992.
- [61] Ruben GODOY-SILVA et al. Evaluation of the effect of chronic hydrodynamical stresses on cultures of suspended CHO-6e6 cells. *Biotechnology and bioengineering*, 102(4) :1119–1130, 2009.
- [62] R M SHENKMAN et al. Effects of Energy Dissipation Rate on Islets of Langerhans : Implications for Isolation and Transplantation. *Biotechnology and bioengineering*, 103(2) :413–423, 2009.
- [63] B NEUNSTOECKLIN et al. Determination of the maximum operating range of hydrodynamic stress in mammalian cell culture. *Journal of biotechnology*, 194 :100–109, 2015.
- [64] A W NIENOW. On impeller circulation and mixing effectiveness in the turbulent flow regime. *Chemical engineering science*, 52(15) :2557–2565, 1997.
- [65] J C van SUIJDAM et al. Influence of engineering variables upon the morphology of filamentous molds. *Biotechnology and bioengineering*, 23(1) :111–148, 1981.
- [66] J J SMITH et al. The effect of agitation on the morphology and penicillin production of *Penicillium chrysogenum*. *Biotechnology and bioengineering*, 35(10) :1011–1023, 1990.
- [67] P JÜSTEN et al. A mathematical model for agitation-induced fragmentation of *Penicillium chrysogenum*. *Bioprocess engineering*, 18(1) :7–16, 1997.
- [68] E M MARSHALL et al. Computational Fluid Mixing. In E L PAUL et al., éditeurs, *Handbook of Industrial Mixing*, pages 257–343. John Wiley & Sons, Inc., 2003.
- [69] J J DERKSEN. Numerical simulation of solids suspension in a stirred tank. *Aiche journal*, 49(11) :2700–2714, 2003.
- [70] P SAGAUT. *Introduction a la simulation des grandes échelles pour les écoulements de fluide incompressible*. Springer Science & Business Media, 1998.

-
- [71] J B JOSHI et al. CFD simulation of stirred tanks : Comparison of turbulence models (Part II : Axial flow impellers, multiple impellers and multiphase dispersions). *The canadian journal of chemical engineering*, 89(4) :754–816, 2011.
- [72] S L YEOH et al. Numerical Simulation of Turbulent Flow Characteristics in a Stirred Vessel Using the LES and RANS Approaches with the Sliding/Deforming Mesh Methodology. *Chemical engineering research and design*, 82(7) :834–848, 2004.
- [73] M MOLLET et al. Bioprocess Equipment : Characterization of Energy Dissipation Rate and Its Potential to Damage Cells. *Biotechnology progress*, 20(5) :1437–1448, 2004.
- [74] H ZHU et al. Mixing studies in a model aerated bioreactor equipped with an up- or a down-pumping ‘Elephant Ear’ agitator : Power, hold-up and aerated flow field measurements. *Chemical engineering research and design*, 87(3) :307–317, 2009.
- [75] Michel ROUSTAN. Agitation. Mélange Caractéristiques des mobiles d’agitation. *Techniques de l’ingénieur. génie des procédés*, JB4(J3802), 2005.
- [76] C COUFORT et al. Flocculation related to local hydrodynamics in a Taylor–Couette reactor and in a jar. *Chemical engineering science*, 60(8–9) :2179–2192, 2005.
- [77] I AYRANCI et al. Effect of geometry on the mechanisms for off-bottom solids suspension in a stirred tank. *Chemical engineering science*, 79 :163–176, 2012.
- [78] C FERRARI et al. Investigation of growth conditions for the expansion of porcine mesenchymal stem cells on microcarriers in stirred cultures. *Applied biochemistry and biotechnology*, 172(2) :1004–1017, 2014.
- [79] M J H SIMMONS et al. Mixing in a Model Bioreactor Using Agitators with a High Solidity Ratio and Deep Blades. *Chemical engineering research and design*, 85(5) :551–559, 2007.

Liste des Abréviations

α-MEM	milieu essentiel minimum de modification α
AA	acide aminé
ABM	Agence de la Biomédecine
Ac	anticorps
ADN	acide désoxyribonucléique
ADNc	acide désoxyribonucléique complémentaire
ALA	alanine
ANR	Agence Nationale de la Recherche
AP	apuriniques-apyrimidiques
ARG	arginine
ARN	acide ribonucléique
ARP	sonde aldéhyde-biotine ; <i>aldehyde reactive probe</i>
ASN	asparagine
ASP	aspartate
ATCC	American Type Culture Collection
ATP	adénosine-5'-triphosphate
BMP4	protéine morphogénétique de type 4 ; <i>bone morphogenetic protein 4</i>
BPF	bonnes pratiques de fabrication
BSA	albumine de sérum bovin ; <i>bovine serum albumine</i>
Calcéine AM	acéto-methoxy-ester calcéine
CAM	molécules d'adhésion cellulaire ; <i>cellular adhesion molecules</i>
CD	clusters de différenciation
CDK	kinases cycline-dépendantes
CFD	mécanique des fluides numériques ; <i>computational fluid dynamic</i>
CFU	unités formant une colonie ; <i>colony forming unit</i>
CHO	lignée cellulaire fibroblastique d'ovaire d'hamster chinois ; <i>chinese hamster ovary</i>
CIH	Conférences Internationales sur l'Harmonisation de l'enregistrement des médicaments à usage humain
CMH	complexe majeur d'histocompatibilité
CO₂	dioxyde de carbone
C_q	cycle de quantification
CS	cellules souches
CSA	cellules souches adultes
CSE	cellules souches embryonnaires
CSH	cellules souches hématopoïétiques

CSM	cellules souches mésenchymateuses ou cellules stromales multipotentes
CSP	cellules souches périvasculaires
CSPi	cellules souches pluripotentes induites
DEAE	diéthylaminoéthyl
DMEM	milieu essentiel minimum de Dulbecco ; <i>Dulbecco's Minimal Essential Medium</i>
DMLA	dégénérescence maculaire liée à l'âge
DMF	N-N-diméthylformamide
DMSO	di-méthyl sulfoxyde
dNTP	désoxynucléotide triphosphate
DOE	plan d'expériences ; <i>design of experiment</i>
DPBS	tampon phosphate salin de Dulbecco ; <i>Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline</i>
EthD1	ethidium homodimer-1
EDTA	éthylène diamine tétra acétique
EE	mobile en oreille d'éléphant
EGF	facteur de croissance épidermique ; <i>epidermal growth factor</i>
EPO	érythropoïétine
EtOH	éthanol
ESB	encéphalopathie spongiforme bovine
FAD	flavine adénine dinucléotide
FGF2	facteur de croissance fibroblastique 2 ; <i>fibroblastic growth factor 2</i>
FGF7	facteur de croissance des kératinocytes ; <i>fibroblastic growth factor 7</i>
FITC	isothiocyanate de fluorescéine
FMN	flavine mononucléotide
GFP	protéine fluorescente verte ; <i>green fluorescent protein</i>
GLN	glutamine
GLU	glutamate
GLY	glycine
GvHD	maladie du greffon contre l'hôte ; <i>graft versus host disease</i>
HCl	acide chlorhydrique
HEPES	acide 4-(2-hydroxyéthyl)-1-pipérazine éthane sulfonique
HIS	histidine
HLA	antigènes des leucocytes humains ; <i>human leukocyte antigen</i>
HM	mobile en hélice marine
HPLC	chromatographie liquide haute performance
HRP	peroxydase de raifort ; horseradish peroxydase
HUVEC	cellules endothéliales de veine ombilicale humaine ; <i>human umbilical vein endothelial cells</i>
IDO	indoléamine 2,3-dioxygénase
IFN	interféron
Ig	immunoglobuline
IGF1	somatomédine C ; <i>insuline-like growth factor</i>
IL	interleukine
ILE	isoleucine
IMDM	milieu de Dulbecco modifié selon Iscove ; <i>Iscove modified Dulbecco's medium</i>
IRM	imagerie par résonance magnétique

ISCT	Société Internationale de Thérapie Cellulaire ; <i>International Society for Cell Therapy</i>
ITCD	intégrale de la densité cellulaire totale ; <i>integral total cell density</i>
LDH	lactate déshydrogénase
LDL	lipoprotéines de basse densité
LEU	leucine
LES	simulation des grandes échelles ; <i>large eddy simulation</i>
LPH	lysats humains de plaquettes
LRGP	Laboratoire Réactions et Génie des Procédés
LYS	lysine
MEC	matrice extra-cellulaire
MET	méthionine
MTS	3-(4,5-diméthylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxyméthoxyphényl)-2(4-sulfonyl)-2H-tétrazolium
MTT	sel de tétrazolium ; bromure de 3-(4,5-diméthylthiazol-2-yl)-2,5-diphényl tétrazolium
MHRA	Agence de régulation des médicaments et produits de santé ; <i>Medicines and Healthcare products Regulatory Agency</i>
NAD	nicotinamide adénine dinucléotide
NADP	nicotinamide adénine dinucléotide phosphate
NaOH	hydroxyde de sodium ; soude
NCBI	Centre national pour l'information en biotechnologie ; <i>National Center for Biotechnology Information</i>
NH₄	ion ammonium
N_{js}	vitesse minimale de mise en suspension
N₂	diazote
O₂	dioxygène
OPA	<i>o</i> -phtalaldéhyde
P	passage
PCRq	amplification quantitative en chaîne par polymérase ; <i>quantitative polymerase chain reaction</i>
PDGF	facteur de croissance dérivé des plaquettes ; <i>platelet-derived growth factor</i>
PE	phycoérythrine
PGE2	prostaglandine E2
PHE	phénylalanine
PID	régulateur à action Proportionnelle - Intégrale - Dérivée
PLS	régression des moindres carrés partiels ; <i>partial least square regression</i>
PMEDSAH	poly[2-(méthacryloyloxy)éthyl diméthyl-(3-sulfopropyl)ammonium hydroxyde]
RANS	moyennage au sens de Reynolds appliqué aux équations de Navier-Stokes ; <i>Reynolds Averaged Navier Stokes</i>
rpm	rotations par minute
R	turbine Rushton
RFU	unité de fluorescence relative ; <i>relative fluorescence unit</i>
RGD	arginine-glycine-acide aspartique
ROS ou radicaux libres	espèces réactives de l'oxygène ; <i>reactive oxygen species</i>
RP	phase stationnaire ; <i>reverse phase</i>
RT	transcriptase inverse ; <i>retrotranscriptase</i>

SCF	facteur de croissance des cellules souches ; <i>stem cell factor</i>
SDS	sodium dodécyl sulfate
SER	sérine
SR	sénescence réplivative
SVF	sérum de veau fœtal
TEP	tomoscintigraphie par émission de positons
TEMP	tomographie d'émission monophotonique
hTERT	télomérase ; <i>human telomerase reverse transcriptase</i>
TGFβ	facteur de croissance transformant β ; <i>transforming growth factor β</i>
TLR	récepteur de type Toll ; <i>toll-like receptor</i>
TMB	tétraméthylbenzidine
TNF	facteur de nécrose tumorale ; <i>tumor necrosis factor</i>
THR	thréonine
Tris-HCl	trishydroxyméthylaminométhane hydrochloride
TRP	tryptophane
TSG-6	protéine du gène 6 stimulée par le TNF
TYR	tyrosine
VAL	valine
VEGF	facteur de croissance de l'endothélium vasculaire ; <i>vascular endothelial growth factor</i>
X-Gal	5-bromo-4-chloro-3-indolyl-beta-D-galactopyranoside

Résumé

L'essor des thérapies régénératives au cours des 10 dernières années a entraîné un effort de recherche important, mais l'obtention des cellules souches humaines en quantité suffisante reste cependant encore problématique, notamment concernant les cellules souches mésenchymateuses (CSM). Ces travaux ont donc mis en œuvre une approche à la croisée de la biologie et du génie des procédés afin d'identifier les verrous limitant la croissance des CSM. L'étude des méthodes d'intensification de culture a été entreprise grâce à l'utilisation de microporteurs et d'une plateforme de minibioréacteurs de 200 mL. Puis le développement d'un milieu de culture sans sérum a été testé dans le but de maximiser la croissance cellulaire dans des conditions biochimiques contrôlées. Les CSM humaines en tant que modèle type en thérapie cellulaire ont été démontrées comme extrêmement sensibles aux phases de congélation/décongélation, aux variations de température, à un vieillissement prématuré et nécessitant un milieu de culture complexe riche en facteurs de croissance et d'adhérence. Suite à cette étude, plusieurs écueils pourront être évités lors de la montée en échelle d'un procédé de culture de CSM afin d'intégrer leurs paramètres biologiques intrinsèques aux paramètres d'ingénierie des bioréacteurs (transfert de chaleur, contraintes hydrodynamiques, surface d'adhérence).

Mots-clés: cellule souche mésenchymateuse humaine, procédé d'amplification cellulaire, microporteurs, bioréacteurs, milieu de culture sans sérum.

Abstract

Progress in regenerative medicines over the past ten years have led to an important research mobilisation, but obtaining a sufficient amount of human stem cells remains nonetheless problematic, especially for mesenchymal stem cells (MSC). Hence, this work developed an approach coupling biology and process engineering to identify barriers limiting MSC growth. The study of scaled-up amplification methods was performed using microcarriers and a 200 mL minibioreactors platform. In order to maximise MSC growth in a biochemically controlled environment, a serum free medium development was tested as well. Human MSC as model cell type for cellular therapies have thus been demonstrated as extremely sensitive to freeze/thaw cycles, temperature variations, subject to premature aging and needing a complex medium enriched in multiple growth and adherence factors. Following this study, several pitfalls might be avoided during MSC process scale-up by integrating the cells biology into the bioreactors' process engineering parameters (heat transfer, hydrodynamic stress, adhesion surface).

Keywords: human mesenchymal stem cell, cell expansion process, microcarriers, bioreactors, serum free medium.

