



**HAL**  
open science

# Evaluation de la contribution d'une hémoglobine marine dans la culture cellulaire et dans la cellularisation de substituts osseux et méniscaux par des cellules souches mésenchymateuses

Fiona Le Pape

## ► To cite this version:

Fiona Le Pape. Evaluation de la contribution d'une hémoglobine marine dans la culture cellulaire et dans la cellularisation de substituts osseux et méniscaux par des cellules souches mésenchymateuses. Biologie cellulaire. Université de Bretagne occidentale - Brest, 2016. Français. NNT : 2016BRES0002 . tel-02184573v1

**HAL Id: tel-02184573**

**<https://theses.hal.science/tel-02184573v1>**

Submitted on 16 Jul 2019 (v1), last revised 16 Jul 2019 (v2)

**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.

The logo for the University of Brittany Occidental (WBO) consists of the letters 'WBO' in a stylized, white, sans-serif font.

université de bretagne  
occidentale



**THÈSE / UNIVERSITÉ DE BRETAGNE OCCIDENTALE**

*sous le sceau de l'Université européenne de Bretagne*

pour obtenir le titre de

**DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE BRETAGNE OCCIDENTALE**

*Mention : Biologie - Santé*

**École Doctorale SICMA**

présentée par

**Fiona LE PAPE**

Préparée à Brest à l'Etablissement

Français du Sang - INSERM UMR 1078

Evaluation de la contribution  
d'une hémoglobine marine  
dans la culture cellulaire et  
dans la cellularisation de  
substituts osseux et  
méniscaux par des cellules  
souches mésenchymateuses

**Thèse soutenue le 21 Janvier 2016**

devant le jury composé de :

**Docteur Pascal DELEPINE**

Dr. Adjoint de laboratoire, EFS Brest - INSERM U1078 / *Examineur*

**Professeur Frédéric DUBRANA**

PU-PH, CHRU Brest / *Examineur*

**Professeur Jérôme GUICHEUX**

Directeur de recherche, LIOAD - INSERM U791 / *Président*

**Docteur Xavier HOLY**

Chef de département IRBA / *Examineur*

**Professeur Cédric LEMARECHAL**

PU-PH, CHRU de Brest- INSERM U1078 / *Directeur de thèse*

**Docteur Danièle NOEL**

Directrice de recherche, INSERM U1183 / *Rapporteur*

**Professeur Hervé PETITE**

Directeur de laboratoire, B2OA UMR 7052 / *Rapporteur*

**Docteur Franck ZAL**

Directeur scientifique, Hémarina SA / *Co-directeur de thèse*



*« La vie est comme un livre, ne jamais sauter aucun chapitre et continuer de tourner les pages... Tôt ou tard, on comprendra pourquoi chaque paragraphe était nécessaire. »*

**Bernard Werber**



## Remerciements

Je dédie cette partie à toutes celles et ceux qui ont marqué cette aventure de quelque manière que ce soit, en contribuant à sa réalisation et à son aboutissement.

Ce travail a été réalisé sous la codirection du Professeur Cédric Le Maréchal, du laboratoire de génétique moléculaire et du Docteur Franck Zal, de la société Hémarina. Je vous remercie tous deux chaleureusement d'avoir rendu possible la réalisation de cette thèse.

Je remercie particulièrement l'ANR pour avoir soutenu financièrement mes travaux de recherche par la convention CIFRE entre l'unité INSERM 1078 et la société Hémarina.

J'adresse également mes remerciements à toute l'équipe d'Hémarina et tout particulièrement à Lucie Cosnau-Kemmat pour m'avoir initiée à la culture des CSM.

Franck, je tenais à vous témoigner ma gratitude pour m'avoir permis d'arriver là où j'en suis maintenant. Au départ je manquais de confiance en moi et vous m'avez poussée à m'accrocher à des objectifs que je pensais irréalisables. Vous aviez raison, j'y suis arrivée. Merci de m'avoir fait confiance et d'avoir toujours été honnête envers moi. Je vous souhaite de concrétiser vos projets pour Hémarina.

Je tiens également à remercier le Docteur Elisabeth Leize-Zal, pour son aide dans la réalisation de ce projet. Vous m'avez apporté une réflexion scientifique constructive et permis de découvrir le passionnant domaine de la reconstruction osseuse en implantologie dentaire.

A présent je tiens à remercier le Docteur Pascal Delépine, qui, plus qu'un encadrant, m'a épaulée pendant ces trois années et m'a donnée l'occasion de prendre part à ce passionnant projet. Tu m'as permis de « grandir » tant sur le plan scientifique que sur le plan humain. Merci pour ta pédagogie et pour la confiance que tu as eu en moi et en mon travail. Les congrès où nous sommes allés ensemble (Nantes, Edimbourg, Reims), riches en partages scientifiques et gastronomiques, demeureront pour moi de très bons souvenirs! Bon courage pour la suite et merci pour tout.

Je tiens à exprimer mes plus sincères remerciements au Professeur Claude Férec, pour sa gentillesse et pour m'avoir accueillie au sein l'unité INSERM 1078. Vous avez su me montrer votre intérêt concernant l'avancée de mes travaux et me donner les moyens nécessaires à leur réalisation. Je tiens aussi à remercier Sophie Podeur pour sa gaîté et sa disponibilité.

Ce projet a donné lieu à plusieurs partenariats avec notamment le LIOAD de Nantes au sein duquel je remercie personnellement le Professeur Pierre Weiss et Sophie Sourice. Je suis reconnaissante envers le Professeur Jérôme Guicheux pour avoir bien voulu évaluer mon travail de thèse. Je remercie également le Professeur Emmanuelle Leize-Wagner, Nathalie Zorn et Marianne Ibrahim du LSMIS de Strasbourg. J'associe à ces remerciements le Docteur Raphaël Bardonnnet de BIOBank® et le Docteur Laurence Barnouin de TBF Génie Tissulaire, pour leur disponibilité et pour avoir répondu à nos besoins en substituts biologiques.

Merci à vous Philippe Elies et Gégard Sinquin de la plateforme PIMM pour les jolies images que nous avons prises ensemble et le temps que vous m'avez accordé.

Je remercie également le Professeur Frédéric Dubrana du CHRU de Brest, pour sa précieuse participation dans ce projet en nous procurant les prélèvements biologiques, mais aussi pour avoir accepté d'examiner mon travail.

Mes remerciements s'adressent aussi au docteur Xavier Holly de l'INSERM U972 pour avoir bien voulu évaluer cette thèse en acceptant d'être membre du jury.

Pareillement, je tiens à témoigner ma reconnaissance au Docteur Danièle Noël de l'INSERM U1183 et au Professeur Hervé Petite de B2OA, pour m'avoir fait l'honneur d'accepter d'être rapporteurs et membres du jury.

Depuis mon stage de master II je partage mon bureau avec toi Gaëlle Tanguy, tu as suivi et « subi » ma thèse avec ses hauts et ses bas sans broncher. Merci de m'avoir soutenue et pour m'avoir redonné goût aux loisirs créatifs.

Je remercie aussi les nombreux stagiaires qui ont travaillé avec moi : Baptiste, Gaëlle, Claire, Clotilde, Paul, Manu, Charlène, Julien, et Clara. J'en ai vu de toutes les couleurs avec vous et vous avez contribué chacun à votre manière à la réussite de ce projet.

Je tiens également à adresser ma sympathie à tout le personnel de l'EFS, même si après plus de 3 années à vos côtés certains prénoms m'échappent encore, votre bonne humeur quotidienne et les instants de partage, même brefs, me manqueront. Merci à Chandran, Julie, Arnaud et les autres pour m'avoir soutenue et pour votre joie de vivre. Merci Yann Fichou pour le temps que tu m'as accordé et pour toute l'aide précieuse que tu m'as apportée au travers de ton savoir scientifique.

J'exprime ma profonde reconnaissance à Gaëlle Richard, arrivée tardivement dans ce projet mais sans qui je n'aurais jamais pu finir dans les temps. Je te remercie pour ta gentillesse et ton écoute au quotidien. Tu as su te montrer extrêmement efficace en un temps record, je ne compte plus le nombre de manipulations que nous avons dû faire et refaire, ainsi que tous les problèmes que nous avons dû surmonter.

Je remercie amicalement toute la « team » de la fac de médecine : Réginald, Paul, Florentin, Marie-Laure, Angélique, Nawal, Flaria, Mohamed... et à tous les autres aussi. Merci à Nicolas Lebonvallet du LNB pour m'avoir appris à utiliser un microscope à fluorescence. Mention spéciale à Nathalie pour son aide dans la réflexion et la rédaction scientifique de la partie gel 2D de ce projet, ainsi que pour son soutien moral. Merci à toute l'unité INSERM 1078 !

Je ne pensais pas faire autant de rencontres en allant au bout du monde, la chaleur humaine et les innombrables sorties et soirées. Je suis heureuse de vous avoir rencontré les copains de la bande des « Brestois »: Adri, Mèl, PY, Julie, Pauline, Flo, Jérôme, les Audrey, Nina, Dam, Eric, Elise, Sylvain, Aurore, JB et bien sûr Laura et Ronan. Sans oublier les personnages hauts en couleurs issus du croisement LaTIM/INSERM et des quelques pièces rapportées ! Je vous remercie tous d'avoir été là, Caro, Thomas, Florent, Goulven, Taman, Johanna, Céline, Joël, Manon, Emeric et Julien. Merci à toi Mehdi pour ton amitié et ton écoute, je me rappellerai toujours de notre rencontre autour d'un gel 2D.

Je termine par une sincère et profonde pensée pour ma famille qui m'a soutenue malgré la distance. Je remercie mes parents et ma petite sœur Mélissa pour avoir toujours cru en moi. Le mot de la fin sera pour Damien, merci de m'avoir redressée quand je m'effondrais, d'avoir accepté que je passe plus de temps au travail que chez nous, merci d'avoir été là pour moi depuis le début de l'aventure.

## Liste des abréviations

|   |  |
|---|--|
| 2D: Bidimensionnel                                    | FACS: Fluorescence Activated Cell Sorting              |
| 3D: Tridimensionnel                                   | FDA: Food and Drug Administration                      |
| ACFM: Automatic Cell Factory™ Manipulator             | FDBA: Freeze-dried Bone Allograft                      |
| ACTB: actine beta                                     | Fe <sup>2+</sup> : Fer                                 |
| ADN: Acide Désoxyribonucléique                        | FITC: Isothiocyanate de fluorescéine                   |
| ANSM: Agence Nationale de la Sécurité des Médicaments | FVS: Fraction vasculaire stromale                      |
| AnV: Annexine V                                       | GAGs: Glycosaminoglycanes                              |
| ATC: Anatomical Therapeutic Chemical                  | GMP: Good Manufacturing Product                        |
| ATP: Adénosine Triphosphate                           | GVHD: Graft Versus Host Disease                        |
| ATPase: Adénosine Triphosphatase                      | H <sup>+</sup> : Hydrogène                             |
| BCP: composite particulaire biphasé                   | H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> : Peroxyde d'hydrogène   |
| bFGF: basic Fibroblast Growth Factor                  | HA: Hydroxyapatite                                     |
| BPF: Bonnes Pratiques de Fabrication                  | Hb: Hémoglobine  |
| BMP: Bone Morphogenic Proteins                        | HBOCs: Hemoglobin-Based Oxygen Carriers                |
| CAM : Cell Adhesion Molecules                         | HMDS: hexaméthylidisilazan                             |
| CD: Cellule dendritique                               | HE: Hématoxyline-Eosine                                |
| CFU-F: colony forming unit-fibroblast                 | HGF: Hepatocyte Growth Factor                          |
| CHO: Chinese Hamster Ovary                            | HIF: Hypoxia inductible factor                         |
| Cl <sup>-</sup> : Chlore                              | HJV: Hemagglutinating virus of Japan                   |
| CMH: Complexe Majeur d'Histocompatibilité             | HKG: housekeeping gene                                 |
| CMI: Collagen Meniscus Implant                        | HOCl: Hypochloride                                     |
| CMNMO : Cellules MonoNucléées de la Moelle Osseuse    | IDO: Indoleamine 2,3Dioxygenase                        |
| CO <sub>2</sub> : Dioxyde de carbone                  | IEF: Isoélectrofocalisation                            |
| CO <sub>2</sub> SC : CO <sub>2</sub> supercritique    | IFCB: Fédération Internationale de Biologie Cellulaire |
| CSE : Cellules Souches Embryonnaires                  | IGF-1: Insulin-like Growth Factor -1                   |
| CSH : Cellules Souches Hématopoïétiques               | IL: Interleukine                                       |
| CSM : Cellules Souches Mésoenchymateuses              | IP: Iodure de Propidium                                |
| CTSA: Centre de Transfusion Sanguine des Armées       | iPS: induced Pluripotent Stem cell                     |
| CV: Coefficient de Variation                          | ISCT: International Society of Cell Therapy            |
| DAPI: 4',6'-diamidino-2-phenylindole                  | LC: liquid chromatography                              |
| DBBF: bis (3,5-dibromosalicyl) fumarate               | LCA: Ligament Croisé Antérieur                         |
| DCPA: Phosphate dicalcique anhydre                    | LCL: Ligament Croisé Latéral                           |
| DCPD: Phosphate dicalcique dihydraté                  | LCM: Ligament Croisé Médial                            |
| DeoxyHb: DéoxyHémoglobine                             | LCP: Ligament Croisé Postérieur                        |
| DFDBA: Decalcified Freeze-Dried Bone Allograft        | LDH: Lactate Déshydrogénase                            |
| DMB: Demineralised Bone Matrix                        | LIF: Leukemia inhibitory factor                        |
| DMEM: Dulbecco's Minimum Essential Medium             | LNGFR: Low-affinity Nerve Growth Factor                |
| DMLA : Dégénérescence Maculaire Liée à l'Age          | LB: Lymphocyte B                                       |
| DTT: dithiothréitol                                   | LP: Lysat plaquettaire                                 |
| EHb: Extracellular Hemoglobin                         | LT: Lymphocyte T                                       |
| ESI-MS: ElectroSpray Ionization Mass Spectrometry     | MAPC: Multipotent Adult Progenitor Cells               |
| ET: Ecart type  | MCP-1 : monocyte chemoattractant protein-1             |
| EthD-1: Ethidium homoDimer-1                          | MCPA: Phosphate monocalcique anhydre                   |
|   | MEB: Microscope Electronique à Balayage                |
|   | MEC: Matrice extracellulaire                           |
|   | MEMα: Minimum Essential Medium alpha                   |
|   | MetHb: MethHémoglobine                                 |
|   | MO: Moelle Osseuse                                     |
|   | MS: Mass spectrometry                                  |



MTI : Médicaments de Thérapie Innovante  
N<sub>2</sub>: Diazote  
NADH: Nicotinamide Adénine Dinucléotide  
Hydrogène  
NaHCO<sub>3</sub> : Bicarbonate de sodium  
NGNA : Acide N-glycolyl neuramique  
NK: Natural Killer  
NO : oxyde nitrique  
NRVM: Neonatal rat ventricular myocytes  
O<sub>2</sub>: Dioxygène (le terme oxygène sera employé)  
OCP: Phosphate Octocalcique  
OGM : Organisme Génétiquement Modifié  
OMS: Organisation Mondiale pour la Santé  
OPG: Ostéoprotégérine  
OTR: Oxygen Transfert Rate  
OxyHb : OxyHémoglobine  
PAL: Phosphatase alcaline  
PCA: Principal composant analysis  
PCU: Polycarbonate d'Uréthane  
PDGF: Platelet-derived growth Factor  
PEG: Polyéthylène Glycol  
PFC: PerFluoroCarbone  
PGA: PolylacticoGlycolique Acide  
PGE2: Prostaglandine E2  
PHP: Pyridoxalated Hemoglobin  
Polyoxyethylene  
PLA: polyacide lactique  
pO<sub>2</sub>: Pression partielle en Oxygène  
PODXL: Podocalyxin-like protein 1  
POE: PolyOxyEthylene  
PRP: Platelet Rich Plasma  
PSM: Poste de Sécurité Microbiologique PTH:  
Parathormone  
PVA: Alcool de Polyvinyle  
RANKL: Receptor Activator of NF-κB Ligand  
RLP13A: Ribosomal Protein L 13a  
RANTES: regulated on activation, normal T-cell expressed and secreted  
ROS: Reactive Oxygen Species  
RPM: Rotation Par Minute  
SDS: Sodium Dodecyl Sulfate  
SOD: SuperOxyde Dismutase  
SUSD2: SUSHi Domain containing 2  
SVF: Sérum de Veau Fœtal  
TBF: Tissue Bank of France  
TCMP : Phosphate TétraCalcique Monoxyde  
TCP: Tri Calcique Phosphate  
TGF-β: Transforming Growth Factor beta  
TIC: Total Ion Chromatogram  
TNF-α: Tumor Necrosis Factor  
Treg: Lymphocyte T régulateur  
UE : Unité Enzymatique  
USSR : Union Socialiste Soviétique de Russie  
VEGF: Vascular Endothelial Growth Factor

VHb: Vitreoscilla Hemoglogin  
XIC: eXtracted Ion Chromatogram

# Sommaire

|   |           |
|---|-----------|
| <b>LISTE DES ABRÉVIATIONS</b> .....   | <b>7</b>  |
| <b>LISTE DES FIGURES</b> .....  | <b>13</b> |
| <b>LISTE DES TABLEAUX</b> .....   | <b>15</b> |
| <b>CHAPITRE I - L'OXYGÈNE DANS LES SYSTÈMES BIOLOGIQUES</b> .....                       | <b>21</b> |
| <b>1. L'OXYGÈNE AU TRAVERS DE L'ÉVOLUTION</b> .....                                     | <b>23</b> |
| 1.1. L'APPARITION DE L'OXYGÈNE SUR TERRE ET ADAPTATION .....                            | 23        |
| 1.2. LES SYSTÈMES RESPIRATOIRES .....   | 24        |
| 1.2.1. Généralités .....  | 24        |
| 1.2.2. Les systèmes respiratoires .....   | 24        |
| 1.3. LES PIGMENTS RESPIRATOIRES .....   | 27        |
| <b>2. EXEMPLES D'HÉMOGLOBINES</b> .....   | <b>28</b> |
| 2.1. L'HEMOGLOBINE D'ANNELIDES .....  | 28        |
| 2.1.1. Les Annelides polychètes : <i>Arenicola marina</i> et <i>Nereis virens</i> ..... | 29        |
| 2.1.2. L'hémoglobine d' <i>A. marina</i> et <i>N. virens</i> .....                      | 29        |
| 2.1.3. Propriétés des EHbs d' <i>A. marina</i> et <i>N. virens</i> .....                | 30        |
| 2.2. LE SANG, UN TRANSPORTEUR D'OXYGÈNE BIOLOGIQUE .....                                | 31        |
| 2.2.1. Généralités .....  | 31        |
| 2.2.2. Structure .....  | 32        |
| 2.2.3. Fonctionnalité .....   | 33        |
| <b>3. APPLICATIONS MÉDICALES ET THÉRAPEUTIQUES DES TRANSPORTEURS D'OXYGÈNE</b> .....    | <b>33</b> |
| 3.1. L'HEMOGLOBINE BACTÉRIENNE POUR BOOSTER LA BIOPRODUCTION .....                      | 33        |
| 3.2. TEST DE <i>LIMULUS</i> .....   | 34        |
| 3.3. LES TRANSPORTEURS D'OXYGÈNE THÉRAPEUTIQUES .....                                   | 34        |
| 3.3.1. Les perfluorocarbones .....  | 36        |
| 3.3.2. Hemoglobin Based Oxygen Carriers (HBOCs) .....                                   | 38        |
| 3.3.3. Les transporteurs d'oxygène d'Annelides marins .....                             | 43        |
| <b>CHAPITRE II - L'OXYGÈNE EN CULTURE CELLULAIRE</b> .....                              | <b>47</b> |
| <b>INTRODUCTION</b> .....   | <b>49</b> |
| <b>1. MÉTABOLISME CELLULAIRE</b> .....  | <b>51</b> |
| 1.1. L'OXYGÈNE COMME TRANSPORTEUR D'ÉLECTRONS .....                                     | 51        |
| 1.2. LE STRESS OXYDATIF ET DOMMAGES CELLULAIRES .....                                   | 53        |
| <b>2. LA CULTURE DE CELLULES ANIMALES</b> .....   | <b>54</b> |
| 2.1. LA CULTURE EN INCUBATEUR : « THE OXYGEN PARADIGM » .....                           | 54        |
| 2.2. LA CULTURE DE CELLULES ADHÉRENTES .....  | 56        |
| 2.3. CULTURE DE CELLULES NON-ADHÉRENTES .....   | 57        |
| <b>3. LES PROCÉDÉS INDUSTRIELS DE CULTURE CELLULAIRE</b> .....                          | <b>58</b> |
| 3.1. PRODUCTION DE PROTÉINES RECOMBINANTES ET DE BIOMÉDICAMENTS .....                   | 58        |
| 3.1.1. Les biomédicaments .....   | 58        |
| 3.1.2. Les systèmes d'expression .....  | 59        |
| 3.2. LES PROCÉDES DE CULTURE CELLULAIRE .....   | 66        |
| 3.2.1. Les bioréacteurs .....   | 66        |
| 3.2.2. Paramètres influents un procédé de production .....                              | 70        |
| 3.2.3. Méthode pour caractériser la mort cellulaire en bioréacteur .....                | 72        |
| 3.2.4. Comment lutter contre les contraintes liées à l'oxygénation ? .....              | 77        |
| 3.3. LA CULTURE DE CELLULES THÉRAPEUTIQUES .....  | 78        |
| 3.3.1. Exemple d'application en thérapie cellulaire .....                               | 78        |
| 3.3.2. Système pour la production de masse de cellules thérapeutiques .....             | 81        |
| 3.3.3. Les bonnes pratiques de fabrication .....  | 83        |
| <b>MATÉRIEL &amp; MÉTHODES</b> .....  | <b>85</b> |

|   |            |
|---|------------|
| <b>HEMOXCELL® .....</b>   | <b>87</b>  |
| 1. DE L'EXTRACTION AU PRODUIT FINAL .....                                   | 87         |
| 2. TEST DE PERFORMANCE SUR LA CROISSANCE DES CELLULES CHO-S .....           | 88         |
| 3. ANALYSE FONCTIONNELLE PAR SPECTROPHOTOMÉTRIE .....                       | 89         |
| <b>RÉSULTATS .....</b>  | <b>91</b>  |
| ARTICLE 1 .....   | 93         |
| <b>DISCUSSION .....</b>   | <b>95</b>  |
| <b>CHAPITRE III - LES CELLULES SOUCHES MÉSENCHYMATEUSES .....</b>           | <b>97</b>  |
| <b>INTRODUCTION.....</b>  | <b>99</b>  |
| <b>1. LES CELLULES SOUCHES MÉSENCHYMATEUSES .....</b>                       | <b>101</b> |
| 1.1. HISTORIQUE .....   | 101        |
| 1.2. DEFINITION .....   | 101        |
| 1.3. CARACTERISATION <i>IN VITRO</i> DES CSM .....                          | 102        |
| 1.3.1. <i>L'adhérence</i> .....   | 103        |
| 1.3.2. <i>Le phénotypage membranaire</i> .....                              | 104        |
| 1.3.3. <i>La plasticité cellulaire</i> .....                                | 106        |
| 1.4. LES CSM DE MOELLE OSSEUSE .....  | 107        |
| 1.4.1. <i>La moelle osseuse</i> .....                                       | 107        |
| 1.4.2. <i>Notion de niche</i> .....   | 108        |
| 1.5. CULTURE DES CSM DE MOELLE OSSEUSE.....                                 | 111        |
| 1.5.1. <i>Densité d'ensemencement</i> .....                                 | 112        |
| 1.5.2. <i>Passages et confluence</i> .....                                  | 112        |
| 1.5.3. <i>Milieu de culture</i> .....                                       | 113        |
| 1.5.4. <i>SVF vs LP</i> .....   | 114        |
| 1.5.5. <i>Influence de l'oxygène dans la culture des CSM in vitro</i> ..... | 116        |
| 1.6. FONCTIONNALITE DES CSM ET INTERETS THERAPEUTIQUES .....                | 117        |
| 1.6.1. <i>Soutien de l'hématopoïèse</i> .....                               | 117        |
| 1.6.2. <i>Propriétés immunorégulatrices</i> .....                           | 117        |
| 1.6.3. <i>Notions de « Homing »</i> .....                                   | 119        |
| 1.7. ESSAIS CLINIQUES .....   | 120        |
| <b>MATÉRIEL &amp; MÉTHODES.....</b>   | <b>123</b> |
| <b>1. ISOLEMENT ET CULTURE DES CELLULES SOUCHES MÉSENCHYMATEUSES .....</b>  | <b>125</b> |
| 1.1. MILIEUX DE CULTURE .....   | 125        |
| 1.2. PREPARATION DU LYSAT PLAQUETTAIRE HUMAIN.....                          | 126        |
| 1.3. ISOLEMENT DES CSM .....  | 126        |
| 1.4. CULTURE DES CSM.....   | 128        |
| 1.5. CARACTERISATION DES CSM <i>IN VITRO</i> .....                          | 128        |
| 1.5.1. <i>Adhérence au plastique</i> .....                                  | 129        |
| 1.5.2. <i>Caractérisation membranaire</i> .....                             | 129        |
| 1.5.3. <i>Tests de différenciation</i> .....                                | 129        |
| <b>2. ANALYSE DE L'IMPACT D'HEMOXCELL® DANS LA CULTURE DES CSM .....</b>    | <b>133</b> |
| 2.1. ANALYSE DE LA CROISSANCE CELLULAIRE.....                               | 133        |
| 2.2. ANALYSE DE LA CYTOTOXICITE .....                                       | 133        |
| 2.3. ANALYSE DE LA STABILITE CELLULAIRE .....                               | 134        |
| 2.4. ROLE DANS LE TRANSPORT DE L'OXYGENE EN SYSTEMES CLOS ET AERE .....     | 135        |
| 2.5. PROLIFERATION CELLULAIRE EN NORMOXIE VS. HYPOXIE .....                 | 136        |
| <b>RÉSULTATS.....</b>   | <b>137</b> |
| ARTICLE 2 .....   | 139        |
| STRUCTURE DES FILAMENTS D'ACTINE .....                                      | 141        |
| ANALYSE DE LA CYTOTOXICITE AVEC LE TEST CCK-8 .....                         | 142        |
| ANALYSE DE L'IMPACT DE L'HYPOXIE DANS LA PROLIFERATION DES CSM .....        | 143        |
| DOSAGE DE L'OXYGENE DISSOUS EN CONDITION ANAEROBIE OU AEREE.....            | 144        |

|   |            |
|---|------------|
| <b>DISCUSSION .....</b>   | <b>147</b> |
| <b>CHAPITRE IV – L'INGÉNIERIE TISSULAIRE : CAS DES TISSUS OSSEUX ET MÉNISCAUX.....</b>                    | <b>153</b> |
| <b>INTRODUCTION.....</b>  | <b>155</b> |
| <b>1. L'INGÉNIERIE TISSULAIRE .....</b>   | <b>157</b> |
| 1.1. DEFINITION .....   | 157        |
| 1.1.1. <i>Le substitut idéal</i> .....  | 158        |
| 1.1.2. <i>Les cellules candidates</i> .....   | 158        |
| 1.1.3. <i>Les conditions de culture</i> .....   | 158        |
| 1.2. LA CULTURE TRIDIMENSIONNELLE POUR SE RAPPROCHER DU VIVANT .....                                      | 160        |
| 1.3. EXEMPLES D'APPLICATIONS A PARTIR DE CSM ET ROLE DE L'OXYGENE .....                                   | 162        |
| <b>2. L'INGÉNIERIE TISSULAIRE DU TISSU OSSEUX .....</b>   | <b>163</b> |
| 2.1. DEFINITION .....   | 163        |
| 2.2. LES CELLULES DU TISSU OSSEUX .....   | 164        |
| 2.2.1. <i>Les ostéoblastes</i> .....  | 164        |
| 2.2.2. <i>Les ostéocytes</i> .....  | 164        |
| 2.2.3. <i>Les ostéoclastes</i> .....  | 165        |
| 2.2.4. <i>Les cellules bordantes</i> .....  | 166        |
| 2.3. LA MATRICE OSSEUSE.....  | 166        |
| 2.4. LE REMODELAGE OSSEUX.....  | 166        |
| 2.5. PERTES OSSEUSES EN IMPLANTOLOGIE DENTAIRE .....  | 168        |
| 2.5.1. <i>Généralités</i> .....   | 168        |
| 2.5.2. <i>Greffes osseuses</i> .....  | 170        |
| 2.6. GREFFONS OSSEUX .....  | 170        |
| 2.6.1. <i>Qualités requises</i> .....   | 170        |
| 2.6.2. <i>Origine du greffon</i> .....  | 172        |
| 2.6.3. <i>Origine synthétique</i> .....   | 174        |
| 2.7. REPARATION TISSULAIRE .....  | 176        |
| 2.7.1. <i>Cellules candidates</i> .....   | 176        |
| 2.7.2. <i>Reconstructions osseuses avec des CSM</i> .....   | 177        |
| 2.7.3. <i>La culture dynamique de CSM pour la reconstruction osseuse</i> .....                            | 178        |
| 2.7.4. <i>Rôle de l'oxygène</i> .....   | 179        |
| <b>3. L'INGÉNIERIE TISSULAIRE DU TISSU MÉNISCAL.....</b>  | <b>181</b> |
| 3.1. LE MENISQUE DU GENOU : GENERALITES.....  | 181        |
| 3.1.1. <i>Anatomie du genou</i> .....   | 181        |
| 3.1.2. <i>Fonctions des ménisques</i> .....   | 182        |
| 3.1.3. <i>Composition et ultrastructure</i> .....   | 183        |
| 3.1.4. <i>Contraintes mécaniques du ménisque du genou</i> .....   | 189        |
| 3.2. PHYSIOPATHOLOGIE MENISCALE .....   | 189        |
| 3.2.1. <i>Les causes</i> .....  | 189        |
| 3.2.2. <i>Les déchirures méniscales</i> .....   | 190        |
| 3.3. STRATEGIES THERAPEUTIQUES CONCERNANT LES LESIONS MENISCALES .....                                    | 191        |
| 3.3.1. <i>Les techniques chirurgicales</i> .....  | 191        |
| 3.3.3. <i>Les conséquences de la méniscectomie</i> .....  | 192        |
| 3.4. LA PRESERVATION MENISCALE.....   | 193        |
| 3.4.1. <i>L'allogreffe méniscale</i> .....  | 193        |
| 3.4.2. <i>Les substituts méniscaux</i> .....  | 194        |
| 3.5. INGENIERIE TISSULAIRE.....   | 199        |
| 3.5.1. <i>Les cellules candidates</i> .....   | 200        |
| 3.5.2. <i>Les CSM en réparation méniscale</i> .....   | 202        |
| 3.5.3. <i>Importance de l'oxygène dans la réparation méniscale</i> .....                                  | 204        |
| <b>MATÉRIEL &amp; MÉTHODES.....</b>   | <b>207</b> |
| <b>1. DÉVELOPPEMENT <i>IN VITRO</i> D'UN SUBSTITUT OSSEUX CELLULARISÉ .....</b>                           | <b>209</b> |
| 1.1. CHOIX DU SUPPORT .....   | 209        |
| 1.1.1. <i>Analyse en tomographie à rayon X de la densité minérale et de la porosité des poudres</i> ..... | 210        |
| 1.1.2. <i>Analyse en microscopie électronique à balayage</i> .....  | 211        |

|   |            |
|---|------------|
| 1.1.3. Analyse de l'adhérence et de la prolifération en microscopie électronique à balayage .....                       | 211        |
| 1.1.4. Analyse qualitative de la viabilité.....   | 212        |
| 1.2. CULTURE EN SUPPORT 3D BIOBANK® .....   | 212        |
| 1.2.1. Caractéristiques des substituts osseux BIOBank® .....  | 213        |
| 1.2.2. Procédé de traitement Supercrypt® .....  | 213        |
| 1.2.3. Développement de la culture 3D des CSM sur substituts osseux BIOBank® en conditions statiques et perfusées ..... | 214        |
| 1.2.4. Dosage de la phosphatase alcaline .....  | 217        |
| 1.2.5. Analyse de la cellularisation et de la morphologie cellulaire .....  | 217        |
| 1.2.6. Mise au point de la culture en perfusion à partir de poudre BIOBank® .....                                       | 219        |
| 1.2.7. Evaluation de la différenciation des CSM en ostéoblastes par PCR quantitative en temps réel .....                | 220        |
| <b>2. INGÉNIERIE TISSULAIRE DU MÉNISQUE.....</b>  | <b>224</b> |
| 2.1. GENERATION D'UN SUBSTITUT MENISCAL CELLULARISE <i>IN VITRO</i> .....   | 224        |
| 2.1.1. Design expérimental .....  | 224        |
| 2.1.2. Culture dynamique en système rotatif .....   | 225        |
| 2.1.3. Culture statique sur sections de substitut méniscal .....  | 227        |
| <b>RÉSULTATS.....</b>   | <b>229</b> |
| <b>1. OPTIMISATION DE LA CELLULARISATION D'UN SUBSTITUT OSSEUX <i>IN VITRO</i> AVEC UNE HÉMOGLOBINE MARINE.....</b>     | <b>231</b> |
| 1.1. CHOIX DU SUPPORT DE L'ETUDE.....   | 231        |
| 1.1.1. Analyse structurale des poudres inertes .....  | 231        |
| 1.1.2. Analyse de la prolifération et de la viabilité cellulaire .....  | 232        |
| 1.1.3. Validation des couples d'amorces .....   | 235        |
| 1.2. CULTURE EN PERFUSION.....  | 236        |
| <b>ARTICLE 3.....</b>   | <b>239</b> |
| <b>2. INGÉNIERIE TISSULAIRE DU MÉNISQUE.....</b>  | <b>241</b> |
| 2.2. OPTIMISATION DE LA CELLULARISATION D'UN SUBSTITUT MENISCAL.....  | 241        |
| 2.2.1. Culture dynamique en système rotatif .....   | 241        |
| 2.2.2. CULTURE STATIQUE DU SUBSTITUT MENISCAL CELLULARISE.....  | 244        |
| <b>DISCUSSION .....</b>   | <b>247</b> |
| <b>DISCUSSION SUR LA COLONISATION DES SUBSTITUTS TISSULAIRES .....</b>  | <b>249</b> |
| COLONISATION D'UN SUBSTITUT OSSEUX ALLOGENIQUE .....  | 249        |
| COLONISATION D'UN SUBSTITUT MENISCAL.....   | 250        |
| <b>CONCLUSION.....</b>  | <b>253</b> |
| <b>BIBLIOGRAPHIE.....</b>   | <b>259</b> |
| <b>ANNEXES .....</b>  | <b>287</b> |

## Liste des figures

- Figure 1 - Les modes de respiration chez les animaux.
- Figure 2 - Photos de *A. marina* et *N. virens* dans leurs biotopes
- Figure 3 - Structure tridimensionnelle de l'Hb de *A. marina* (1.) et organisation polypeptidique (2.).
- Figure 4 - Représentation tridimensionnelle de la structure quaternaire de l'hémoglobine humaine et de la structure chimique d'un hème.
- Figure 5 - Les différents types de transporteurs d'oxygène.
- Figure 6 - Formule chimique de perfluorocarbone.
- Figure 7 - Nature et sites de modification d'HBOCS en développement clinique.
- Figure 8 - Exemples de modifications chimiques de l'Hb.
- Figure 9 - Analyse de la fonction rénale chez le porc après transplantation.
- Figure 10 - La respiration mitochondriale.
- Figure 11 - Voies de formation des radicaux libres de l'oxygène.
- Figure 12 - Les jonctions d'adhérence cellulaires.
- Figure 13 - Domaines d'application des protéines recombinantes.
- Figure 14 - Schéma représentatif de structures N-glycanniques, caractéristiques des différents systèmes d'expression.
- Figure 15 - Exemple d'un système de production de peptides thérapeutiques à partir de *Lemna minor*, une plante aquatique transgénique.
- Figure 16 - Exemples de bioréacteurs de laboratoire, pilote et industriel.
- Figure 17 - Les modes de culture en bioréacteurs.
- Figure 18 - Schématisation d'une courbe de croissance cellulaire en mode batch.
- Figure 19 - Représentation schématique des différentes étapes du processus (Upstream) du développement de la culture à grande échelle « Scale-up ».
- Figure 20 - Paramètres d'un processus de culture cellulaire pouvant affecter l'interaction des cellules avec leur environnement et donc la performance et la qualité de la production.
- Figure 21 - Exemple de marquage nucléaire au DAPI.
- Figure 22 - Principe de la réaction du dosage de l'activité LDH
- Figure 23 - Exemple de réaction caspase-dépendante impliquée dans le processus apoptotique.
- Figure 24 - Formule pour le calcul de la diffusion de l'oxygène : « Oxygen Transfer Rate ».
- Figure 25 - Exemples de systèmes de culture pour la production à grande échelle de cellules adhérentes.
- Figure 26 - Conformation de l'hémoglobine pour le test de fonctionnalité.
- Figure 27 - Portrait de A.J. Friedenstein.
- Figure 28 - La plasticité des CSM de moelle osseuse.
- Figure 29 - Représentation schématique de la composition d'une niche de cellules souches.
- Figure 30 - Le microenvironnement de la niche hématopoïétique et isolement des CSM.
- Figure 31 - Actions immuno-régulatrices des CSM.
- Figure 32 - Phases cliniques des essais réalisés à partir de CSM en 2014 et sources tissulaires correspondantes.
- Figure 33 - Etapes du protocole d'isolement des cellules souches mésenchymateuses.
- Figure 34 - Plan de plaque PCR Array.
- Figure 35 - Structure du cytosquelette d'actine des CSM induites en adipocytes et ostéoblastes.
- Figure 36 - Analyse de la viabilité et de la prolifération en plaque 96 puits avec le test CCK-8.
- Figure 37 - Analyse de la croissance des CSM en présence d'HEMOXCell® à 21% et 5% O<sub>2</sub>.
- Figure 38 - Analyse du potentiel oxygénant d'HEMOXCell® en fonction des conditions de culture.
- Figure 39 - Courbe de saturation d'HEMOXCell® en fonction des conditions de culture.
- Figure 40 - Exemples de bioréacteurs utilisés en ingénierie tissulaire.
- Figure 41 - Morphologie des CSM en culture 2D et 3D.

Figure 42 - Exemples d'utilisation des CSM en ingénierie tissulaire des tissus squelettiques et types de biomatériaux associés.

Figure 43 - Photographies de coupes histologiques d'os compact.

Figure 44 - Principales cytokines ou facteurs de croissance impliqués dans le remodelage osseux.

Figure 45 - Exemples d'ostéointégration d'un implant dans un tissu sain et d'une greffe osseuse d'apposition.

Figure 46 - Augmentation osseuse d'une crête mandibulaire.

Figure 47 - Articulation du genou en position fléchie montrant les ménisques externe et interne entre le plateau tibial et la tête fémorale.

Figure 48 - Représentation schématique de la capsule articulaire du genou.

Figure 49 - Microvascularisation méniscale.

Figure 50 - Organisation des fibres de collagène au sein du ménisque.

Figure 51 - Composition d'un protéoglycane.

Figure 52 - Morphologie et localisation des cellules méniscales.

Figure 53 - Analyse structurale d'un ménisque bovin

Figure 54 - Classification des lésions méniscales verticales de TRILLAT.

Figure 55 - Exemples de substituts méniscaux synthétiques.

Figure 56 - Exemples de substituts méniscaux d'origine biologique.

Figure 57 - Système de culture en perfusion des CSM sur cylindres BIOBank®.

Figure 58 - Techniques utilisées pour la réalisation des coupes histologiques.

Figure 59 - Prototype de culture en perfusion de la poudre osseuse.

Figure 60 - Représentation schématique des marqueurs ostéoblastiques exprimés au cours de la différenciation osseuse.

Figure 61 - Design expérimental de la culture en agitation rotative avec le système CELLROLL®.

Figure 62 - Analyse microstructurale des poudres de substituts osseux en tomographie à rayons X et en MEB.

Figure 63 - Analyse de l'adhérence et de la prolifération des CSM sur les poudres de biomatériaux au MEB.

Figure 64 - Analyse de la viabilité cellulaire sur poudres de substituts osseux.

Figure 65 - Analyse de la spécificité d'amplification des amorces pour l'analyse de la différenciation ostéoblastique.

Figure 66 - Coloration histologique de la poudre BIOBank® cultivée en perfusion.

Figure 67 - Analyse de l'efficacité d'ensemencement.

Figure 68 - Analyse en microscopie confocale de la viabilité et de la densité cellulaire.

Figure 69 - Analyse histologique de la distribution cellulaire au travers du substitut méniscal.

Figure 70 - Photographies des échantillons acellulaires et cellularisés en MEB.

Figure 71 - Analyse histologique de la cellularisation du substitut MENISC-T® en statique.

Figure 72 - Analyse de la viabilité cellulaire à 4 et 8 semaines de culture 3D sur substitut méniscal en condition statique.

Figure 73 - Schéma récapitulatif de la libération d'oxygène par HEMOXCell® en culture cellulaire, en fonction de la pO<sub>2</sub> dans le milieu de culture.

Figure 74 - Principe de l'analyse du potentiel fibrochondrocytaire des CSM..

Figure 75 - Aperçu des données et sélection du gène de ménage pour l'analyse en PCR Array.

Figure 76 - Diagramme de Venn représentant les intersections entre les profils de PCR quantitative obtenus.

Figure 77 - Approche protéomique par électrophorèse bidimensionnelle pour la caractérisation cellulaire

Figure 78 - Exemples de Master Gel et d'un résumé d'identification entre deux groupes de réplicats.

Figure 79 - Exemple de présentation d'un rapport d'analyses (tableau/figure).

Figure 80 - Approche protéomique par couplage LC-MS pour la caractérisation cellulaire.

Figure 81 - Méthodes d'analyses « label-free » MS1 et Spectral Count.

Figure 82 - Exemples de présentation pour l'analyse de spectres MS (tableau/figure).

Figure 83 - Exemple de calcul de croisement de données "Label-free" MS1 et Spectral Count.

Figure 84 - Résumé des résultats obtenus après croisement des méthodes MS1 et Spectral Count.

Figure 85 - Analyse CPA réalisée sur les 9 échantillons.

## Liste des tableaux

Tableau 1 - Classification et localisation des différents pigments respiratoires au travers des embranchements animal et végétal.

Tableau 2 - Exemples de biomédicaments obtenus à partir d'animaux transgéniques dans les années 90.

Tableau 3 - Exemples de produits biologiques produits en lignées CHO et dont la commercialisation est approuvée par la FDA.

Tableau 4 - Avantages et inconvénients des systèmes de production.

Tableau 5 - Exemples de produits de thérapie cellulaire approuvés par la FDA.

Tableau 6 - Les critères minimaux de caractérisation des CSM *in vitro*.

Tableau 7 - Les principaux marqueurs des CSM.

Tableau 8 - Nouveaux marqueurs identifiés, exprimés à la surface des CSM.

Tableau 9 - Facteurs solubles et récepteurs des CSM retrouvés *in vitro*.

Tableau 10 - Facteurs impliqués dans la variabilité des CSM.

Tableau 11 - Comparaison entre la composition en facteurs de croissance du SVF et du hPL.

Tableau 12 - Composition des milieux de différenciation.

Tableau 13 - Propriétés des différents biomatériaux utilisés en reconstruction osseuse.

Tableau 14 - Les principales biocéramiques à base de phosphate de calcium.

Tableau 15 - Evaluation des différentes catégories de substituts méniscaux selon trois critères.

Tableau 16 - Composition d'un mix réactionnel pour la PCRq.

Tableau 17 - Paramètres d'amplification des PCRq.

Tableau 18 - Séquences des amorces utilisées pour la PCRq.

Tableau 19 - Synthèse des résultats de PCR quantitative.

Tableau 20 - « Fold-regulation » de tous les transcrits analysés.

Tableau 21 - Alignement des échantillons de la seconde injection avec le logiciel Proteinscape™.





# **Avant-propos**



---

## Avant-propos

---

Les cellules qui composent les différents systèmes biologiques ont besoin d'oxygène (O<sub>2</sub>) pour survivre, *in vivo* mais aussi *ex-vivo*. Les pigments respiratoires assurent le transport de l'oxygène dans les organismes vivants. Chez l'homme, l'hémoglobine permet le transport de 4 molécules d'O<sub>2</sub> *via* la circulation sanguine, alors que dans certaines espèces d'invertébrés, comme les Annélides, elle est extracellulaire et non-immunogène, avec une capacité de transport de l'oxygène 40 fois supérieure à celle de l'humain. Ces différentes caractéristiques ont permis d'envisager son utilisation comme transporteur d'oxygène en culture cellulaire, mais aussi pour des applications thérapeutiques, notamment dans le domaine de la médecine régénérative.

L'ingénierie tissulaire est un domaine émergent qui a su gagner l'intérêt de la communauté scientifique. Cette discipline œuvre à améliorer ou remplacer la fonction d'un tissu ou d'un organe, en associant des cellules du patients à un substitut biocompatible. Parmi les tissus cibles, les tissus osseux et cartilagineux, comme le ménisque, constituent des cibles de choix. Des biomatériaux d'origines biologique ou synthétique, sont utilisés pour combler un volume ou pour remplacer le tissu pathologique. Le substitut doit permettre le recouvrement de la fonction biomécanique du tissu d'origine, avec la formation d'un nouveau tissu fonctionnel, ainsi qu'une intégration biologique sur le long terme. Cependant, la biointégration est souvent longue et incomplète, en raison d'un manque de diffusion de l'oxygène et de la formation de divers gradients (pH, cellules,...) de l'extérieur vers l'intérieur des supports.

Les équipes de recherche travaillent sur l'amélioration de l'intégration des greffons, en les dynamisant en préimplantatoire avec des cellules autologues, pour *in fine* permettre une meilleure reprise de fonctions. Les cellules souches mésenchymateuses s'imposent comme les candidates idéales pour ce type d'applications, en raison de leurs capacités de différenciation en cellules cartilagineuses et osseuses, mais aussi pour leurs propriétés immunorégulatrices et pro-angiogéniques. Elles sont également facilement isolables à partir de sources telles que la moelle osseuse et le tissu graisseux, et présente une forte capacité proliférative *in vitro*. De nombreuses études se focalisent sur leur utilisation en médecine régénérative et tentent de déterminer des conditions idéales pour améliorer leur survie et leur différenciation.

Pour tenter de solutionner le problème d'oxygénation des greffons et ainsi favoriser la survie cellulaire, nous avons choisi d'étudier la possibilité d'utiliser les propriétés de l'hémoglobine de l'Annélide *Nereis virens*, dans la culture de cellules souches mésenchymateuses (CSM) issues de moelle osseuse humaine. Une nouvelle technologie dérivée de cette hémoglobine, appelée HEMOXCell®, a été développée à cet effet.

Dans le cadre du présent projet, nous avons focalisé notre attention sur les problématiques liées à l'oxygénation des milieux, en évaluant l'apport d'HEMOXCell® comme transporteur d'oxygène en culture cellulaire. Dans cette étude, nous avons mis au point une démarche articulée autour d'axes de recherche différents et complémentaires, pour tester l'efficacité de cette nouvelle molécule.

Nous avons tout d'abord évalué son impact dans un modèle cellulaire utilisé en bioproduction, la lignée CHO-S. Dans un second temps, nous avons réalisé une démarche identique avec les CSM, afin de mieux appréhender les conditions d'utilisation d'HEMOXCell® avec ces dernières. Pour finaliser cette étude, nous avons évalué son aptitude à promouvoir la colonisation de substituts méniscaux et osseux, au travers de systèmes de culture statiques et dynamiques. Un intérêt particulier a été porté au développement d'approches pour la caractérisation des cellules méniscales, les fibrochondrocytes, mais aussi dans l'analyse de l'impact des médiateurs sécrétés par ces cellules, sur le profil transcriptomique des CSM, dans un système de co-culture indirecte.

# CHAPITRE I

## L'oxygène dans les systèmes biologiques

---

*Résumé*: Ce premier chapitre a pour but de décrire l'importance de l'oxygène dans les systèmes biologiques. Dans un premier temps, les fondements des premiers systèmes respiratoires seront brièvement évoqués, de la simple bactérie, aux organismes plus évolués. Après avoir décrit les différents pigments respiratoires ainsi que leurs propriétés, une attention particulière sera portée à l'hémoglobine d'Annélides marins et à l'hémoglobine humaine. Nous clôturerons ce premier chapitre introductif, en évoquant diverses applications thérapeutiques et industrielles, développées à partir des spécificités pigmentaires. Parmi celles-ci, les différentes techniques pour substituer l'hémoglobine humaine, ainsi que plusieurs applications utilisant l'hémoglobine de vers, seront développées.

---



---

# 1. L'oxygène au travers de l'évolution

---

## 1.1. L'apparition de l'oxygène sur terre et adaptation

Il y a 4 milliards d'années, l'atmosphère et la température terrestre ne permettaient aucune forme de vie (de Duve, 1996). La température avoisinait les 300 °C, la pression atmosphérique était de 30 bars et l'air était exempt d'oxygène (O<sub>2</sub>), et quasiment exclusivement constitué de gaz carbonique (CO<sub>2</sub>). Les premiers organismes sur Terre firent leur apparition 500 000 ans plus tard. Il s'agissait de procaryotes. Le soleil étant une source d'énergie inépuisable, des bactéries synthétisèrent de la chlorophylle comme substrat énergétique et développèrent la photosynthèse comme processus bioénergétique, ce sont les cyanobactéries. La résultante de cette forme de respiration était la formation d'oxygène, présent à l'état de traces mais néanmoins toxique pour les autres organismes.

Pour survivre, certaines bactéries ont développé des molécules antioxydantes, comme la vitamine C, la superoxyde dismutase et la peroxydase. Cette dernière est une enzyme fortement exprimée par les bactéries anaérobies strictes. Il s'agit d'une protéine héminique possédant une structure appelée hème, constituée d'un atome de Fer capable de fixer l'oxygène. Ce type de structure serait à l'origine des premières hémoglobines (Frey *et al.*, 2011). *Vitreoscilla* Sp. est une bactérie Gram négatif vivant dans des environnements hypoxiques. Son hémoglobine (VHb) est la première à avoir été découverte et est l'une des hémoglobines (Hbs) les plus étudiées. En effet, cette dernière possède une action désoxygénante qui favorise la survie bactérienne en milieu micro aéré (Frey *et al.*, 2011). Un autre exemple, celui des plantes de la famille des Fabacées, plantes dicotylédones, et la symbiose entre la bactérie *Rhizobium* et les nodules de la plante qui est rendue possible grâce à la leghémoglobine. Il s'agit de l'association de l'hème bactérien avec la globine de la plante. Ce processus offrait un habitat anaérobie à la bactérie et un enrichissement des sols en azote pour la plante. Ce partenariat est d'une importance économique de taille pour ce type de culture qui ne nécessite pas d'engrais azoté. De manière générale, les protéines héminiques sont intimement liées avec des réactions chimiques de l'oxygène. On les retrouve dans les cytochromes qui sont des transporteurs d'O<sub>2</sub>, ainsi que dans les pigments respiratoires des



animaux, comme l'hémoglobine (Hb) et la myoglobine.

Par ailleurs, certains microorganismes firent l'acquisition de la chaîne respiratoire. Ils étaient dépendants des bactéries photosynthétiques colonisant les océans. L'évolution suivit son cours et ce fut l'apparition des premiers organismes pluricellulaires eucaryotes, les métazoaires. Ces derniers développèrent une sorte de respiration par diffusion de l'oxygène de cellule à cellule. L'oxygène se faisant de plus en plus présent sur Terre, jusqu'à atteindre les 21 % actuel, les organismes ont dû s'adapter et ce fut l'apparition des systèmes respiratoires anatomiques (Gargaud, 2005).

## **1.2. Les systèmes respiratoires**

### **1.2.1. Généralités**

Les organes et les tissus ne sont pour la plupart pas en contact direct avec l'O<sub>2</sub>, c'est pourquoi les échanges gazeux peuvent se faire selon deux processus : la diffusion et la convection. La diffusion correspond au passage de l'O<sub>2</sub> du milieu où il est le plus concentré vers celui où il l'est le moins. C'est un phénomène qui s'établit selon la pression partielle en gaz et uniquement sur des petites distances. Cependant, l'oxygène ne diffuse pas avec la même aisance selon le milieu considéré, il sera donc beaucoup moins abondant sous forme libre dans un liquide que dans un environnement gazeux. Pour des distances plus importantes, c'est le phénomène de convection qui entre en jeu, l'O<sub>2</sub> va alors être véhiculé dans un fluide comme le sang. Ces deux processus interviennent au cours de la circulation sanguine et de la respiration par l'intermédiaire des pigments respiratoires (Lance, 2013)

### **1.2.2. Les systèmes respiratoires**

Il existe quatre systèmes respiratoires si l'on ne tient pas compte de la diffusion précédemment citée. Ils dépendent de l'habitat mais aussi de la complexité de l'organisme considéré.

#### **1.2.2.1. La respiration branchiale**

Les organismes aérobies vivant sous l'eau utilisent la respiration aquatique. Ils captent l'oxygène dissous dans l'eau à l'aide de leurs branchies (Figure 1 (1.)). Un flux inverse entre les capillaires sanguins des branchies et l'eau, va charger l'hémoglobine en

oxygène plus efficacement qu'au cours de la respiration pulmonaire. La diffusion du gaz va alors s'effectuer entre l'eau et le sang. Cette respiration nécessite plus d'énergie que les autres car il y a peu d'oxygène dissous dans l'eau.

### 1.2.2.2. La respiration pulmonaire

L'échange gazeux s'effectue entre les poumons et la circulation sanguine (Figure 1 (2.)). Cette respiration est utilisée par les oiseaux et les mammifères. Il s'agit d'un phénomène de diffusion d'un gaz au travers de la membrane alvéolaire des poumons. Il s'occasionne au cours de la ventilation pulmonaire, c'est-à-dire les mouvements « d'inspiration » et « d'expiration ». L'O<sub>2</sub> va diffuser vers le sang et inversement, le sang va permettre le passage du CO<sub>2</sub> résultant de la respiration cellulaire, vers les poumons. Une fois dans le sang, l'oxygène se fixe à l'hémoglobine contenue dans les globules rouges (95% de l'O<sub>2</sub> sanguin). L'hémoglobine va ensuite se désaturer à proximité des capillaires pour oxygéner les muscles et autres tissus et se charger en CO<sub>2</sub>.

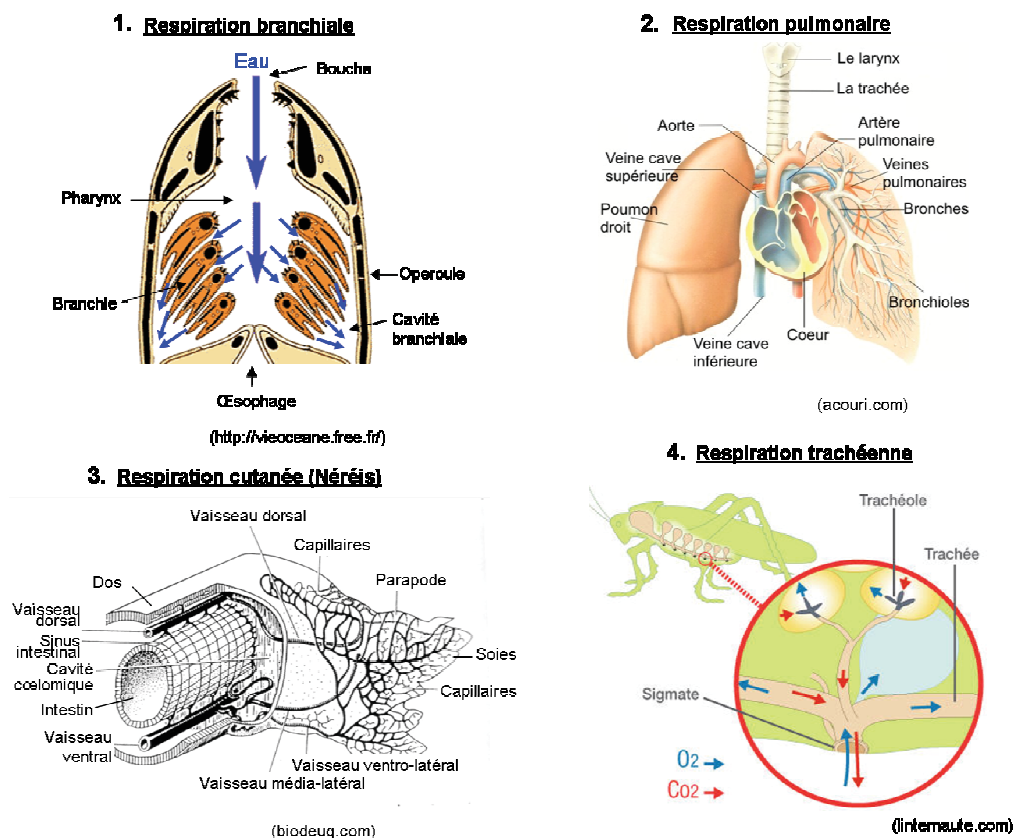


Figure 1 - Les modes de respiration chez les animaux.

Au niveau musculaire, l'O<sub>2</sub> sera capté par une molécule proche de l'hémoglobine, la myoglobine. Cette dernière possède une forte affinité pour l'oxygène (P<sub>50</sub> = 2.8 mmHg, millimètre de mercure) et va assurer le stockage mais aussi la diffusion de l'oxygène dans la cellule, pour atteindre la «centrale énergétique» cellulaire, la mitochondrie (Kamga *et al.*, 2012).

#### 1.2.2.3. La respiration cutanée

Certaines espèces de salamandres et de grenouilles ne possèdent pas de poumons. La finesse de leur peau est telle, qu'elle permet des échanges gazeux directs entre la surface cutanée et la circulation sanguine (Lance, 2013). Cette respiration est souvent un complément de la respiration branchiale ou pulmonaire. Elle est aussi pratiquée par les Annélides au travers d'un appareil circulatoire rudimentaire (Figure 1 (3.)). Ce dernier est composé de deux vaisseaux médians qui fonctionnent en système clos. Cette respiration cutanée se fait au niveau des parapodes du polychète (*i.e.*, expansions abdominales) qui sont riches en capillaires. Certaines Annélides sont néanmoins dotés de branchies et dans les deux cas, le sang circule à contre sens du tronc ventral.

#### 1.2.2.4. La respiration trachéenne

Chez les insectes il s'agit d'un tout autre système qui permet un échange direct entre l'environnement gazeux de l'air ambiant et les organes, par l'intermédiaire de petites trachées ramifiées, parcourant l'intégralité de leur corps d'où son nom de respiration trachéenne (Lance, 2013) (Figure 1 (4.)). Ce mode de respiration est uniquement possible car les insectes sont de petite taille et de ce fait, les surfaces d'échanges sont très proches.

Ces quatre systèmes respiratoires reposent sur la présence de la circulation sanguine pour véhiculer le sang. Chez certains invertébrés, les mouvements du fluide ne s'effectuent pas par l'action d'organes moteurs mais par des mouvements de contractions péristaltiques des vaisseaux (contraction des muscles segmentaires), comme c'est le cas chez les Annélides. Le sang est mélangé à la lymphe, liquide interstitiel des tissus, d'où l'appellation d'hémolymphe. Cependant ce n'est pas la seule différence entre l'Homme et les invertébrés. La réelle différence se situe au niveau des pigments respiratoires.

### 1.3. Les pigments respiratoires

Pour la majorité des organismes le transport de l'O<sub>2</sub> est réalisé par l'Hb érythrocytaire grâce à la circulation sanguine. L'hémoglobine est le principal pigment respiratoire représenté dans toutes les espèces. Les hématies des mammifères sont les seules à être anucléées, alors que celles des autres vertébrés (poissons, amphibiens, volatiles ou reptiles) possèdent un noyau. Il semblerait qu'au cours de l'évolution, les êtres supérieurs aient perdu la nécessité de conserver ce noyau lors de la dernière étape de maturation de l'hématie, pour à la fois faciliter le passage des globules rouges vers les capillaires, mais aussi pour leur permettre de stocker un maximum d'hémoglobines et ainsi optimiser les échanges gazeux. Chez les invertébrés, les pigments respiratoires peuvent être intracellulaires ou extracellulaires (Tableau 1).

**Tableau 1 - Classification et localisation des différents pigments respiratoires au travers des embranchements animal et végétal.** (Zal & Rousselot, 2014)

| Pigment (Localisation)   | Embranchement   | M <sub>r</sub> <sup>a)</sup> (Da)  | Sites actifs                                       | N <sup>b)</sup> |
|--|---|--|--|-----------------|
| <b>Intracellulaire</b><br>Hémerythrine   | <b>Sans hème</b><br>Siponcles<br>Brachiopodes<br>Annélides<br>Priapulides               | 40-110 x 10 <sup>3</sup>   | 2 atomes de Fe                                     | 2               |
| <b>Extracellulaire</b><br>Hémocyanine  | Arthropodes<br>Mollusques   | 4 x 10 <sup>5</sup> à 3 x 10 <sup>6</sup><br>3 x 10 <sup>6</sup> à 9 x 10 <sup>6</sup> | 2 atomes de Cu                                     | 6-48<br>70-160  |
| <b>Intracellulaire</b><br>Hémoglobine (sens strict)<br>Hémoglobine d'invertébrés extracellulaire | <b>Avec hèmes</b><br>Vertébrés<br>Mollusques<br>Echinodermes<br>Annélides<br>Echiuriens | 65 x 10 <sup>3</sup><br>17-130 x 10 <sup>3</sup>                                       | 1 atome de Fer                                     | 4<br>1-8        |
| <b>Hémoglobine cytoplasmique</b><br>Myoglobine   | Vertébrés<br>Invertébrés  |  |  | 1<br>1          |
| Hémoglobine<br>Leghémoglobine<br>Neurhémoglobine   | Bactéries<br>Plantes légumineuses<br>Annélides  |  | 1 atome de Fer<br>1 atome de Fer<br>1 atome de Fer | 1<br>1<br>1     |
| <b>Extracellulaire</b><br>Hémoglobines   | Plathelminthes<br>Némathelminthes<br>Némertes<br>Mollusques<br>Arthropodes              | 17 x 10 <sup>3</sup><br>à<br>12 x 10 <sup>6</sup>                                      |  | 1 à 8           |
| Erythrocrutine   | Annélides<br>Vestimentifères<br>Pogonophores  | 4 x 10 <sup>5</sup><br>à<br>4 x 10 <sup>6</sup>  |  | >8              |
| Chlorocrurine  | Annélides   | 3 x 10 <sup>6</sup> à 4 x 10 <sup>6</sup>  |  | >8              |

a) Mr, masse moléculaire relative, b) Nombre de sites actifs capable de lier une molécule d'oxygène

Généralement les Hbs intracellulaires sont plus petites et dépendent de la taille et de l'activité métabolique de l'animal. Les Hbs dissoutes quant à elles, sont dépendantes de son habitat naturel (température, salinité, disponibilité de l'O<sub>2</sub> dissous). Ces hémoglobines naturellement extracellulaires (EHbs) sont notamment retrouvées chez les Annélides marins et terrestres (Zal & Rousselot, 2014).

Il existe différentes catégories de pigments respiratoires: **les hémoglobines**, de couleur rouge, sont présentes dans tous les embranchements (phyla) des organismes vivants. La myoglobine est composée d'une unique chaîne d'acides aminés présentant de très fortes similitudes avec la sous-unité bêta de l'Hb, suggérant un ancêtre commun.

Un composé proche de l'Hb, **la chlorocruorine**, est de couleur verte lorsqu'elle est diluée et rouge lorsqu'elle est concentrée. Elle possède une faible affinité pour l'oxygène et est retrouvée uniquement à l'état dissous dans certaines familles d'Annélides polychètes. **L'hémocyanine** est un pigment bleu présent chez certains mollusques et arthropodes. Elle présente la particularité de fonctionner à des pH très basiques et d'avoir du cuivre à la place du fer dans ses sites actifs. Pour terminer, **l'hémérythrine** est un pigment violet intracellulaire, retrouvé dans un petit nombre d'organismes comme les Annélides polychètes et les brachiopodes.

---

## 2. Exemples d'hémoglobines

---

### 2.1. L'hémoglobine d'Annélides

Ces dernières années, de nombreuses études s'intéressant aux propriétés des Hbs d'Annélides ont vu le jour. Cette molécule possède la particularité d'être extracellulaire et est retrouvée chez les Annélides polychètes, oligochètes et achètes (Rousselot *et al.*, 2006; Chabasse *et al.*, 2006). Cette Hb est de taille relativement importante par comparaison à celles des autres organismes (3 000 – 4 000 kDa) et correspond à l'assemblage de pas moins de 200 chaînes polypeptidiques de 6 à 7 types différents. En 2014, les travaux menés par Alexander D. Roth et son équipe, ont consisté à comparer l'impact de trois types d'Hb (humaine, bovine et d'Annélides terrestres) dans la culture de cellules cancéreuses de gliome sur des nanofibres

alignées de poly( $\epsilon$ -caprolactone). L'Hb d'Annélides est ici choisie pour sa résistance à l'oxydation. D'après leurs résultats, l'Hb humaine ne semble pas être appropriée aux cultures en environnement tumoral (hypoxie), alors que celles d'Annélides et de bœuf ont présenté un effet positif sur la croissance et cela même à 1% d'O<sub>2</sub> (Roth *et al.*, 2014).

### 2.1.1. Les Annélides polychètes : *Arenicola marina* et *Nereis virens*

*Arenicola marina* (*A. marina*) est un Annélide polychète marin sédentaire, très présent sur les côtes de l'Atlantique nord. Il s'agit d'un Annélide qui colonise le sable de la zone intertidale (*i.e.*, zone de balancement des marées) et signale sa présence par des tourbillons de sable (Figure 2). *Nereis virens* (*N. virens*) est quant à lui un Annélide polychète errant, vivant sous les roches et le sable humide des zones côtières. Il se déplace à l'aide des parapodes qu'il arbore de part et d'autre de son corps (Figure 2).

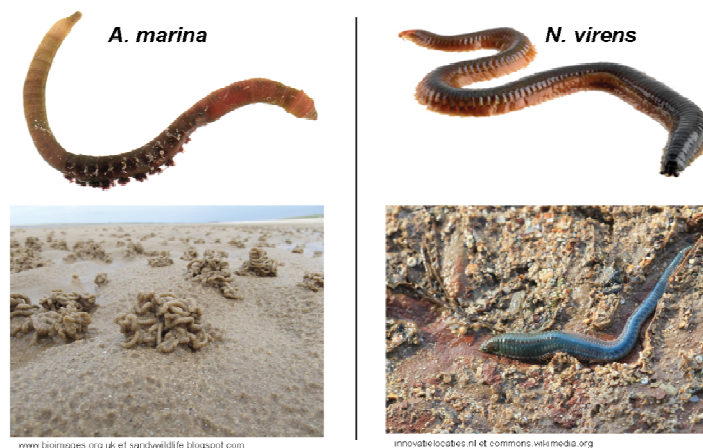
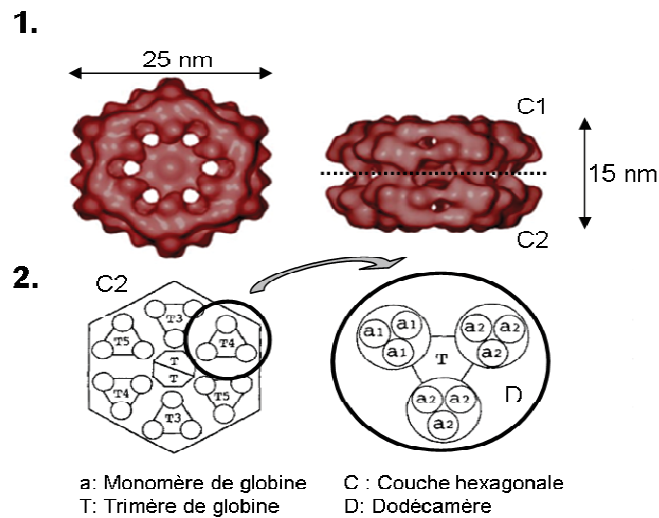


Figure 2 - Photos de *A. marina* et *N. virens* dans leurs biotopes.

### 2.1.2. L'hémoglobine d'*A. marina* et *N. virens*

L'EHb d'Annélides en général possède une structure tridimensionnelle caractéristique en bicouche hexagonale (Figure 3 ci-après), dont un modèle structural a été proposé par le docteur Zal et son équipe (Zal *et al.*, 1997b, 1997a). Ces données ont été obtenues en partie par analyse en spectrométrie de masse utilisant une ionisation par électro spray (Electrospray ionization mass spectrometry, ESI-MS) de l'EHb. Chaque hexagone est composé d'une partie centrale, assemblage de deux trimères de globine liés entre eux par des ponts disulfures, et d'une partie périphérique constituée de 6 dodécamères de globine. Un dodécamère est

constitué d'un trimère de globine central et de 9 sous unités de globine liées de façon non covalentes.



**Figure 3 - Structure tridimensionnelle de l'Hb de *A. marina* (1.) et organisation polypeptidique (2.).** (d'après Zal et al. 1997)

Ce qui constitue un total de 108 monomères et 16 trimères pour une molécule d'EHB, soit 156 chaînes de globine reliées entre elles par 42 linkers, et donc 198 chaînes polypeptidiques (Zal *et al.*, 1997a). L'ensemble possède une masse de 3,6 MDa.

### 2.1.3. Propriétés des EHbs d'*A. marina* et *N. virens*

Chaque globine est associée à un hème qui constitue le site actif du pigment respiratoire. Au centre de chaque hème se trouve un noyau tétrapyrrolique (4 pyrroles) et un atome de Fer ( $Fe^{2+}$ ). Comme l'Hb humaine, ce dernier peut fixer réversiblement l' $O_2$ . Les Hbs d'Annélides polychètes possèdent de propriétés favorables à leur utilisation en clinique que n'ont pas les autres hémoglobines.

#### 2.1.3.1. Fixation et relargage de l' $O_2$

L'hémoglobine d'Annélides possède un nombre très important de globines qui lui permettent de fixer une grande quantité d' $O_2$  (156 globines = 156 molécules d' $O_2$ ). Le passage d'un état oxyHb à deoxyHb se fait selon un simple gradient de pression partielle en  $O_2$ . En effet, la coopérativité entre les différentes globines dans le processus de fixation de l' $O_2$ , n'implique pas d'effecteur allostérique comme le 2,3DPG. L'Hb *A. marina* possède une forte affinité pour l' $O_2$  avec une  $P_{50}$  de 2,6 mmHg (pression partielle de l'oxygène nécessaire pour atteindre 50 % de saturation) dans les conditions physiologiques de l'Annélide et de 7 mmHg

en conditions physiologiques humaines. Elle est de ce fait plus sensible aux variations de  $pO_2$  que l'Hb humaine libre, qui possède une  $P_{50}$  de 11.6 mmHg (37°C, pH 7,4) (Rousselot *et al.*, 2006). Tandis que pour *N. virens* elle est de 37 mmHg, c'est-à-dire plus élevée que dans les érythrocytes (28 mmHg).

### 2.1.3.2. Immunogénicité

Cette EHb est circulante dans le corps de l'Annélide, il n'est donc pas nécessaire de pratiquer les étapes d'extraction cellulaire et de purification, ce qui permet aussi d'écartier les risques liés aux résidus membranaires susceptibles d'induire une réaction immunitaire. Cette macromolécule est naturellement polymérisée et de taille importante ( $\approx 3\ 600$  kDa), c'est-à-dire 250 fois plus petite que l'hématie et 50 fois plus grosse qu'un tétramère d'Hb humaine (64 kDa), ce qui réduit considérablement sa clairance. A tout cela s'ajoute le fait qu'elle est non glycosylée et donc incapable d'induire des incompatibilités de groupes sanguins telles que les groupes ABO (Rousselot *et al.*, 2006). Cette dernière caractéristique permet d'envisager un jour sa potentielle utilisation en tant que transporteur d'oxygène thérapeutique.

### 2.1.3.3. Stress oxydatif

Ces deux Hb d'Annélides restent stables et conservent leur fonctionnalité dans une gamme de températures allant de 4 à 37°C. Leur activité SOD (Superoxyde dismutase) est supérieure à celle retrouvée au niveau des globules rouges humains, ce qui leur confère une résistance à l'oxydation et limite aussi la formation de radicaux libres dans l'environnement où elles se trouvent.

## 2.2. Le sang, un transporteur d'oxygène biologique

### 2.2.1. Généralités

Le sang est un liquide biologique vital qui circule dans tout l'organisme pour approvisionner les différents tissus et organes en oxygène et nutriments. Il est à plus de 50 % constitué de plasma, un milieu aqueux riche en protéines dont la principale est l'albumine. Trois types cellulaires baignent dans le plasma. Il y a tout d'abord les globules blancs, qui vont jouer un rôle dans la défense de l'organisme, les plaquettes, qui sont des cellules indispensables à la coagulation et enfin il y a les globules rouges, appelés érythrocytes. Leur

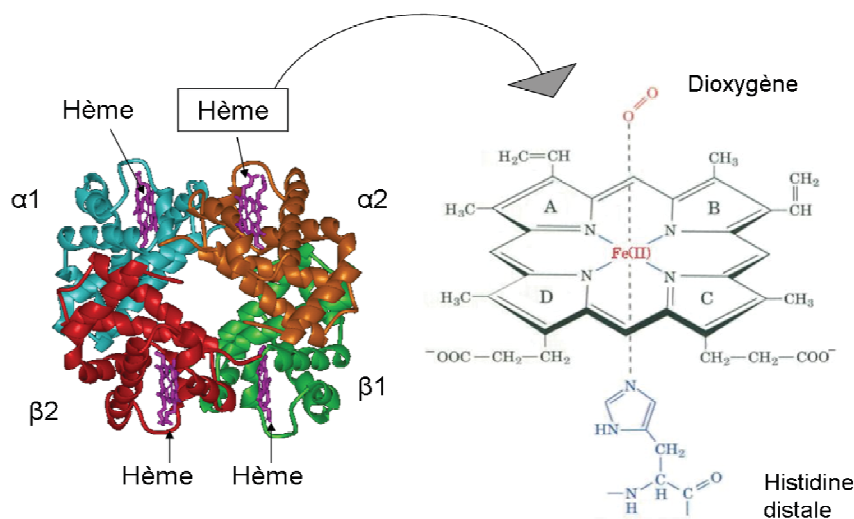


rôle est d'acheminer l'O<sub>2</sub> des poumons vers les tissus puis de se charger en CO<sub>2</sub> pour l'éliminer de l'organisme *via* la respiration.

### 2.2.2. Structure

L'hémoglobine (Hb) est un transporteur d'oxygène spécialisé qui est le principal constituant des globules rouges. La structure tridimensionnelle de cette polyprotéine a été découverte par des analyses en cristallographie en 1962 par Max Perutz et John Kendrew (Dickerson, 2008). Ils avaient initié leurs travaux sur la myoglobine qui est une protéine proche de l'Hb mais constituée d'une seule chaîne polypeptidique.

L'Hb est une hémoprotéine de 68 kDa constituée de 4 molécules d'hèmes et de 4 chaînes de globines. Il existe trois types d'hémoglobine chez l'homme : l'HbA (97%), HbA2 (<1%) et l'HbF, cette dernière représente 80% de l'Hb foetale et est présente à l'état de traces à l'âge adulte. Ces trois Hb sont des hétérotétramères ou hétéroprotéines. Dans cet exposé, nous parlerons uniquement de l'Hb la plus représentée, possédant deux chaînes de globine  $\alpha$  et deux chaînes de globine  $\beta$ , qui s'assemblent en deux dimères stables  $\alpha/\beta$  (Figure 4).



**Figure 4 - Représentation tridimensionnelle de la structure quaternaire de l'hémoglobine humaine et de la structure chimique d'un hème.** (adaptée du lien <http://www.ccbb.pitt.edu/CCBBResearchDynHemRel.htm>)

La sous-unité  $\alpha$  est constituée de 141 acides aminés et la chaîne  $\beta$  de 146 acides aminés. Elles partagent 40% d'homologie. L'hème est une structure protoporphyrrique qui contient un atome de Fer pouvant lier un gaz diatomique comme l'O<sub>2</sub>. Le complexe formé par l'hème et l'atome de Fer est responsable de la couleur rouge du sang, laquelle apparait rouge vive lorsqu'il est oxygéné et plus foncée à l'état désoxygéné.

### 2.2.3. Fonctionnalité

L'Hb qui a fixé de l'oxygène est appelée oxyhémoglobine. Cette fixation se fait par l'intermédiaire de l'atome de Fer situé au centre de l'hème qui peut établir 6 liaisons : 4 liaisons pour son maintien dans l'hème, 1 pour l'interaction de l'hème avec la globine et une dernière qui va permettre de lier de petites molécules comme l'O<sub>2</sub> et ainsi stabiliser la structure avec l'histidine distale (voir figure 4). La fixation de l'O<sub>2</sub> par l'Hb se fait coopérativement entre les différentes sous-unités. La fixation de la première molécule d'oxygène va modifier la conformation de l'Hb, favorisant la fixation de l'oxygène par les autres sous-unités. Il en va de même pour la dissociation de l'O<sub>2</sub>, l'Hb sera alors sous forme désoxygénée. Dans l'organisme la fixation de l'O<sub>2</sub> par l'hémoglobine se fait par simple pression partielle en O<sub>2</sub> (pO<sub>2</sub>), c'est pourquoi dans les poumons, là où la pression en O<sub>2</sub> est importante (environ 100 mmHg), l'Hb va plus facilement fixer de l'O<sub>2</sub> (Huheey *et al.*, 2000).

---

## 3. Applications médicales et thérapeutiques des transporteurs d'oxygène

---

### 3.1. L'hémoglobine bactérienne pour booster la bioproduction

L'hémoglobine de *Vitreoscilla* Sp. (VHb) possède une structure et une fonction qui ont suscité l'intérêt de la recherche à des fins industrielles et biopharmaceutiques. Dans le domaine de la bioproduction, il apparaît un ralentissement de la croissance cellulaire et une augmentation de la consommation en oxygène des cellules transformées. Plusieurs essais de génie génétique ont été réalisés, pour la plupart chez *E. coli*, afin de faire exprimer VHb par la bactérie. L'objectif commun était de combattre les limitations liées à l'oxygène. Les bactéries aérobies et anaérobies transformées pour exprimer VHb, ont montré une augmentation de leur prolifération, de leur viabilité et de leur taux de protéines synthétisées. Ce phénomène serait lié à une amélioration de la production énergétique du métabolisme bactérien. Les différentes propriétés de cette hémoglobine ont permis d'envisager sa potentielle utilisation pour la fermentation alcoolique, avec la production d'éthanol chez *E. coli*, dans la production d'antibiotiques par des souches de *Streptomyces*, ainsi que dans le traitement de

l'inflammation grâce à ses propriétés antioxydantes. De plus, son expression a aussi permis d'observer une augmentation du taux de germination chez les plantes et une augmentation de la production d' $\alpha$ -amylase chez *Bacillus licheniformis* (Frey *et al.*, 2011). D'autres résultats encourageants ont été obtenus concernant le rendement de production de gomme gellane, un gélifiant utilisé en agroalimentaire d'origine microbienne (Wu *et al.*, 2011).

### **3.2. Test de *Limulus***

La pharmacopée recommande que tous les produits destinés à un usage thérapeutique qui entrent en contact avec la circulation sanguine doivent être apyrogènes et donc exempts d'endotoxines bactériennes. La limule (*Limulus polyphemus*) est utilisée pour réaliser un test de détection d'endotoxines (< 5 UE). En effet, elle possède dans son hémolymphe des cellules, les amébocytes, dont le lysat est capable de coaguler en présence d'endotoxines. Ce test est appelé LAL pour Lysat d'Amébocytes de Limules. Il est réalisé à 37°C et permet d'obtenir un résultat en 1h. La sensibilité de ce test s'étend de 0,03 à 0,5 UE (Unité enzymatique, quantité d'enzyme pour traiter une micromole de substrat) (Tsuji *et al.*, 1980). La pharmacopée américaine a autorisé l'utilisation de ce test en remplacement de la méthode de référence, qui utilise le lapin pour mesurer la présence de pyrogènes. L'élévation de la température de 3 lapins doit être inférieure à 1,15°C pour que le produit soit considéré comme « endotoxin-free ».

### **3.3. Les transporteurs d'oxygène thérapeutiques**

Dans de nombreuses situations médicales ou accidentelles, les pertes sanguines sont telles, qu'il est nécessaire de restaurer le plus rapidement possible l'oxygénation des tissus sous peine d'occasionner des séquelles irrémédiables pouvant entraîner la mort. Les incompatibilités retrouvées entre les donneurs et les receveurs de sang ont été décrites en 1900 par le docteur Landsteiner. Alors qu'il effectuait des recherches sur la coagulation, il mit en évidence les groupes sanguins ABO. Quarante années plus tard, il découvrit le système Rhésus (Aymard, 2012). Les guerres furent de puissants stimulants de la recherche en hématologie et c'est au cours de la première guerre mondiale que la première transfusion directe fut réalisée, en Octobre 1914 (Aymard, 2012).

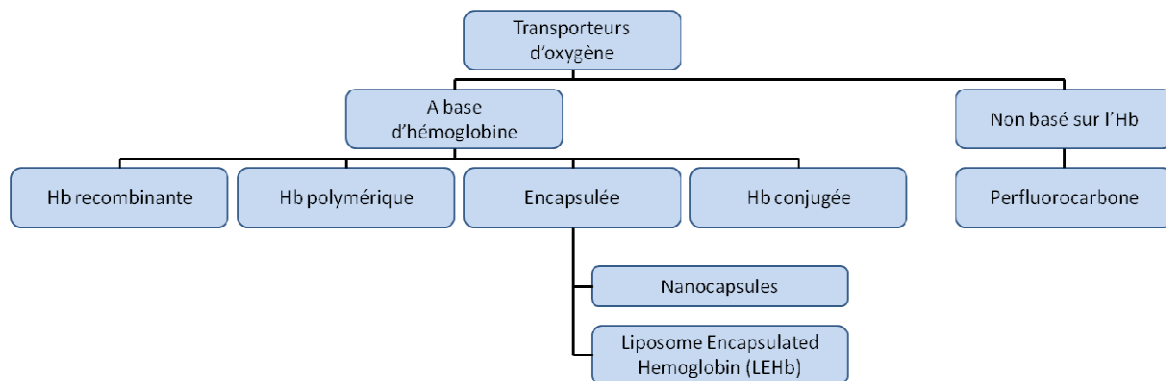
La transfusion sanguine bien que bénéfique comporte son lot de risques, liés notamment à la transmission de germes pathogènes tels que les virus, les prions et les bactéries (Aguzzi & Glatzel, 2004). L'affaire du sang contaminé en fut la preuve avec plusieurs milliers de receveurs contaminés par les virus du SIDA et de l'hépatite C entre 1980 et 1990. La sécurité transfusionnelle devint une priorité et des mesures sécurisantes, comme la déleucocytation (1998), furent imposées. Les concentrés de globules rouges se conservent 42 jours à 4°C, leur stockage va nécessiter des chambres réfrigérées et ce temps de conservation relativement court, favorise les pénuries de sang. A partir des années 80, pour faire face aux risques évoqués précédemment et à l'augmentation des besoins en produits sanguins, il est alors devenu primordial de trouver des stratégies pour substituer les globules rouges. Selon l'OMS la pénurie est estimée à 100 millions de litre/an dans le monde.

Ces substituts érythrocytaires doivent répondre à un cahier des charges précis pour être irréprochables en termes d'innocuité et d'efficacité. La FDA (Food and Drug Administration) a établi la liste des critères à respecter pour pouvoir être qualifié d'« oxygen therapeutic » (Guidance for industry, 2004) :

- Pure, sans débris membranaires
- Stable sur le long terme et facile à conserver
- Transport gazeux efficace
- Innocuité cardiaque, rénale et gastro-intestinale
- Sans endotoxines et apyrogène
- Pas d'induction de stress oxydant
- Vasoactivité maîtrisée
- Viscosité similaire à celle du sang

Des essais furent réalisés à partir de lysats érythrocytaires en solution saline par Amberson dans les années 40, lesquels furent des échecs en terme d'innocuité (Amberson *et al.*, 1949). Ils déclenchèrent une forte toxicité rénale et hépatique, une augmentation de la pression sanguine et de la fièvre. Cependant, ils démontrèrent aussi la capacité d'oxygénation de ce type de préparation. La priorité fut alors de purifier les solutions et de les débarrasser de toutes traces de membranes. Des modifications chimiques ont aussi permis de stabiliser l'Hb et de diminuer sa toxicité. Par ailleurs, d'autres approches focalisées sur l'Hb ont été

développées comme c'est le cas des transporteurs d'oxygène à base d'hémoglobine, les HBOCs (Hemoglobin-based oxygen carriers). D'autres équipes ont en parallèle cherché à substituer l'Hb en utilisant des émulsions de perfluorocarbones (PFCs). La Figure 5 ci-dessous synthétise les sous-catégories de ces deux grandes familles de transporteurs d'oxygène.



**Figure 5 - Les différents types de transporteurs d'oxygène.** (d'après hboc.osu.edu)

### 3.3.1. Les perfluorocarbones

#### 3.3.1.1. Généralités

Il s'agit de molécules hydrocarbonées de 8 à 10 carbones, pour lesquelles l'hydrogène a été remplacé par du fluor ou du brome. Contrairement à l'hémoglobine, ils n'établissent pas de liaison avec l'oxygène mais l'emprisonne dans l'émulsion. Ils ne sont pas considérés comme des transporteurs au sens strict du terme, mais comme une solution capable de dissoudre une grande quantité d'O<sub>2</sub> en fonction de la pO<sub>2</sub> environnante. Leur découverte date de 1966, avec l'observation qu'une souris immergée dans un fluorocarbure liquide pouvait survivre plusieurs heures grâce à l'O<sub>2</sub> dissous dans la solution (Clark & Gollan, 1966). Parmi ces composés il y a le bromure de perfluoro-octyle, le perfluoro-octyléthane et le perfluorodichloro-octane (Figure 6).

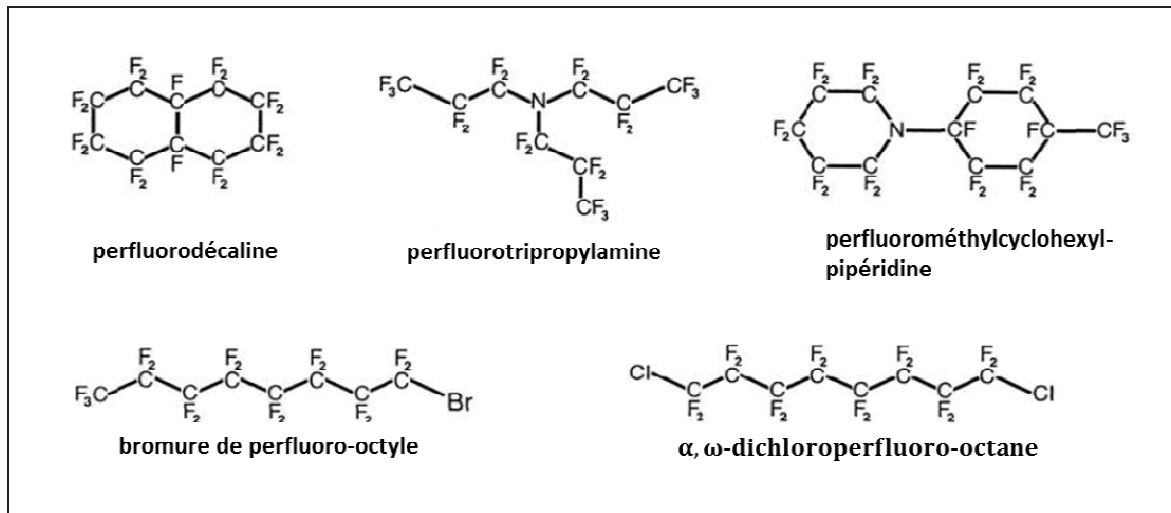


Figure 6 - Formule chimique de perfluorocarbones. (Riess, 2006)

**Avantages :** Ils présentent plusieurs propriétés : ils sont non miscibles à l'eau en raison de leur densité deux fois supérieure, ils sont chimiquement inertes et ont une solubilité pour les gaz approximativement 20 fois supérieure à celle de l'eau (Tremper, 2002). Ils sont produits à partir de matériaux totalement synthétiques, ils présentent donc un minimum de risques infectieux et une faible immunogénicité.

**Inconvénients :** Cependant l'émulsion présente des contraintes de stabilisation et les particules sont de tailles hétérogènes, ce qui peut induire une réaction inflammatoire. De plus, ils sont rapidement éliminés de la circulation (en moins de 24h) et fixent peu d' $O_2$  à une  $pO_2$  physiologique (Stowell *et al.*, 2001). Par ailleurs, des effets secondaires de type œdème, ont été observés chez des patients en raison de la difficulté de leur élimination par l'organisme.

### 3.3.1.2. Utilisations cliniques

Le premier PFC utilisé en clinique et préclinique a été développé au Japon sous le nom de Fluosol-DA. Il fut testé chez le rat pour traiter des lésions pulmonaires et démontra un effet anti-inflammatoire. En clinique, un essai réalisé pour traiter l'anémie critique n'a pas démontré de changements significatifs dans les valeurs de consommation en oxygène, d'index cardiaque ou de pression partielle artérielle. Dans le cas de l'anémie sévère, de meilleurs résultats furent observés. Ils étaient cependant de courtes durées en raison de la rapidité d'élimination du Fluosol-DA par l'organisme (Spence *et al.*, 1990). Son utilisation en clinique fut autorisée par la FDA en 1989 pour l'oxygénation des tissus au cours d'angioplasties, car il permettait d'observer une amélioration notable de l'oxygénation du myocarde et des fonctions

ventriculaires (Kerins, 1994). Parmi ces PFCs dits de première génération, l'Oxypherol™ (Green Cross Corp) présentait des effets bénéfiques en tant qu'anticoagulant mais son temps de rétention dans l'organisme était excessif. Le Perftoran™ (Ftorosan), s'est montré efficace contre l'ischémie et l'artériosclérose, dans le modèle rongeur. Il fut autorisé en Russie pour le traitement du choc hémorragique, cependant des complications pulmonaires ont été reportées. Il présentait un temps de rétention important et sa conservation à 4°C était limitée.

De nouvelles générations de PFCs ont vu le jour, présentant une meilleure affinité pour l'O<sub>2</sub> que le Fluosol-DA. Ils se différenciaient de la première génération par le contenu et la nature de la phase fluorocarbonée, de la nature de l'émulsifiant et par leurs conditions de stockage (pas de congélation). L'Oxydent™ (Alliance Pharmaceutical) fut testé en essai clinique de phase III. Une augmentation de l'incidence d'accident vasculaire cérébral chez les patients ayant subi un pontage coronarien fut décelé. L'Oxyfluor™ (HemaGen Diagnostics) présentait des effets secondaires similaires à l'Oxydent™.

En raison des problèmes liés aux PFCs, tels que la biodistribution, la clairance et les multiples effets secondaires, des efforts considérables ont été déployés pour le développement d'HBOCs acellulaires comme alternative.

### **3.3.2. Hemoglobin Based Oxygen Carriers (HBOCs)**

L'Hb libre est un transporteur d'oxygène naturel, elle constitue donc une candidate idéale pour être utilisée comme substitut sanguin. Les HBOCs sont des transporteurs d'oxygène à base d'Hb possédant de nombreux avantages par rapport au sang humain, parmi lesquels leur disponibilité, leur compatibilité, et leur longue durée de conservation.

#### **3.3.2.1. Hémoglobine d'origine humaine**

Elle est extraite de poches de sang périmées provenant des banques de sang. On considère que 5 à 10% de ce sang périmé aurait été destiné à la production d'HBOCs (Goodnough 1999).

**Avantages :** Elle possède naturellement une forte capacité de fixation de l'O<sub>2</sub> et du CO<sub>2</sub>, et fonctionne efficacement à des pO<sub>2</sub> physiologiques. Elle est stable et efficace à de fortes pressions oncotiques. L'avancée des procédés de purification a éliminé le risque de

transmission de maladies infectieuses et aussi le risque de déclencher une réaction immunitaire, en raison de l'élimination de la membrane érythrocytaire.

**Inconvénients :** Dans l'hématie l'Hb est protégée de la méthémoglobine réductase, enzyme responsable de son oxydation en méthémoglobine. Elle y est présente à une concentration de 5 mM alors qu'en dehors du globule rouge, elle se retrouve fortement diluée et ne peut conserver sa structure tétramérique. Elle se scinde alors en deux dimères  $\alpha/\beta$ . Le faible poids moléculaire des dimères (32 KDa) favorise leur clairance rénale et est associé à la perte du 2,3Diphosphoglycerate (2,3DPG). Cela a pour effet de diminuer la P50 de l'Hb de 27 mmHg à environ 13 mmHg. Le 2,3DPG est un effecteur allostérique exerçant un rôle dans la stabilisation du tétramère de globine et donc dans la coopérativité du processus de fixation de l'oxygène (Alayash, 2014). L'Hb libre possède donc une très forte affinité pour l'O<sub>2</sub>, ce qui implique des niveaux d'O<sub>2</sub> plus faibles pour obtenir un effet oxygénant. En plus de sa demi-vie plasmatique très courte et de sa rapide élimination, elle va avoir tendance à s'accumuler pouvant atteindre des doses néphrotoxiques. L'oxyde nitrique (NO), appelé aussi monoxyde d'azote, est un antioxydant qui joue un rôle prépondérant dans la régulation de la tension vasculaire. Sous forme de dimères, l'Hb va capter l'NO ce qui va provoquer un effet hypertenseur et donc une vasoconstriction.

### 3.3.2.2. Hémoglobine d'origine bovine

**Avantages :** L'hémoglobine des bovidés, ainsi que celle d'autres espèces, ne nécessite pas de 2,3DPG et conserve ainsi une P50 d'environ 30 mmHg en intra et extracellulaire. La fixation et le relargage de l'O<sub>2</sub>, sont assurés par les ions chlorure présents dans le plasma. Elle va donc céder plus facilement de l'O<sub>2</sub> et bénéficie aussi d'un prix plus avantageux et d'une forte disponibilité.

**Inconvénients :** L'utilisation d'Hb non humaine peut néanmoins poser des problèmes car elle présente un risque de transmission de pathogènes bovins associé aux maladies à prions comme la maladie de Creutzfeld-Jacob, l'encéphalopathie spongiforme bovine. De plus il y a des difficultés liées à sa purification et des risques de réactions immunogènes, mais surtout des risques liés à son effet hypertenseur, c'est pourquoi son développement a été arrêté. Cependant, les processus de production actuellement utilisés (ex : Biopure), inactivent efficacement le modèle prion.



### 3.3.2.3. Hémoglobines recombinantes

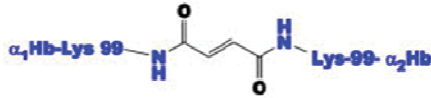
Les pénuries de dons de sang peuvent affecter la disponibilité en produits issus de poches périmées. La production d'Hb recombinantes apparaît comme étant une bonne alternative. Cependant, produire ce type d'Hb en un minimum de temps avec un coût réduit demeure un véritable challenge sur le plan technique.

La production d'hémoglobines recombinantes consiste à faire exprimer des sous-unités de globine ( $\alpha/\beta$ ) par différents organismes hôtes. Les premiers essais ont été réalisés chez *E. coli* avec la production d'Hb humaine native et non modifiée (Hoffman *et al.*, 1990; Shen *et al.*, 1993). Des essais ont par la suite été pratiqués chez la levure (*S. cerevisiae* et *P. pastoris*), le champignon (*A. niger*), mais aussi chez le porc transgénique et chez la plante. La production en système végétal utilise principalement *Nicotiana tabacum*, la plante de tabac et *Agrobacterium tumefaciens*, une bactérie de la famille des Rhizobium (Křenek *et al.*, 2015). L'Hb recombinante, Optro™ (Somatogen), était la seule à utiliser la technologie recombinante (Figure 7 (4.)). Elle fut produite chez *E. coli* après transfection du gène humain. Un dérivé, la « dialpha » Hb (rHb1.1) obtenue par mutagénèse dirigée, était aussi exprimée chez cet hôte avec la particularité d'avoir les deux chaînes  $\alpha$  exprimées l'une derrière l'autre (mutation Presbyterian) rendant ainsi la molécule indissociable (Looker *et al.*, 1992). Cet assemblage était rendu possible par insertion d'une glycine entre le C-terminal d'une des deux chaînes alpha et le N-terminal de l'autre. Par ailleurs, l'asparagine en position 108 de la chaîne  $\beta$  était remplacée par une lysine.

**Avantages :** Ces systèmes de production possèdent un fort rendement ainsi que d'autres avantages, notamment celui d'être modulable et ainsi permettre la production d'Hb modifiées de manière à réduire les limites de l'Hb libre.

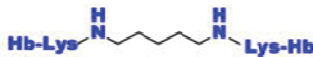
**Inconvénients :** Comme tous les produits issus de la bioproduction, les Hbs recombinantes sont coûteuses et le développement d'un procédé robuste pour des productions à une échelle industrielle est très difficile à mettre en place. De plus, il persiste des difficultés concernant l'obtention de produits homogènes ce qui peut potentiellement occasionner des néphropathies et une vasoconstriction.

1. **HemAssist® (DCLHB)**, *Baxter* (Liaisons intramoléculeaires  $\alpha\alpha$ - avec le bis (3,5 dibromosalicyl)-fumarate)



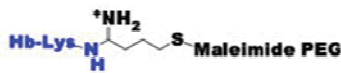
M. Wt. = 64 kDa;  
 $P_{50}$  = 30 mmHg

2. **Hemopure®**, *Biopure* (Liaisons intra/intermoléculeaires avec le glutaraldéhyde)



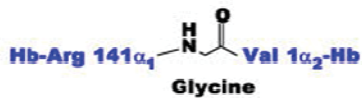
M. Wt. = 130-500 kDa;  
 $P_{50}$  = 34 mmHg

3. **Hemospan®**, *Sangart* (traitement de surface au PEG « activé »)



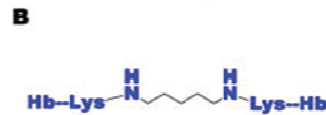
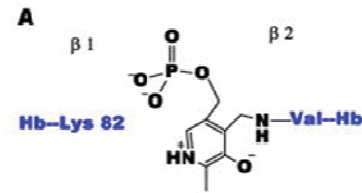
M. Wt. = 90 kDa;  
 $P_{50}$  = 5.4 mmHg

4. **Optro®**, *Somatogen* (Liaisons  $\alpha\alpha$ - intramoléculeaires entre l'Hb Presbyterian et la glycine (Asn 108  $\beta \rightarrow$  Lys))



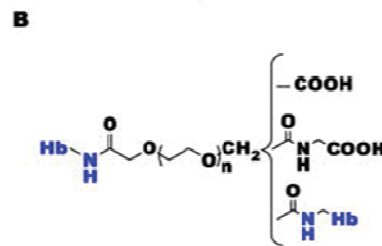
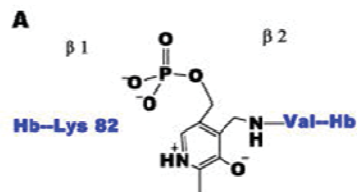
M. Wt. = 64 kDa;  
 $P_{50}$  = 17.2 mmHg

5. **PolyHeme®**, *Northfield Lab* (Liaisons intramoléculeaires avec le PLP (A) et intermoléculeaires avec le glutaraldéhyde (B))



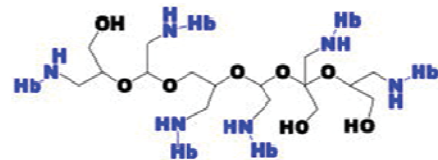
M. Wt. = 130-250 kDa;  
 $P_{50}$  = 28-30 mmHg

6. **Pyridoxylated Hb (PHP)**, *Apex Bioscience* (Liaisons intramoléculeaires avec le PHP (A) et conjugaison avec le POE (B))



M. Wt. = 100 kDa;  
 $P_{50}$  = 20.4 mmHg

7. **Hemolink® (O-R-PolyHb)**, *Hemosol* (Liaisons inter et intramoléculeaires avec du O-raffinose  $\beta$  activé)

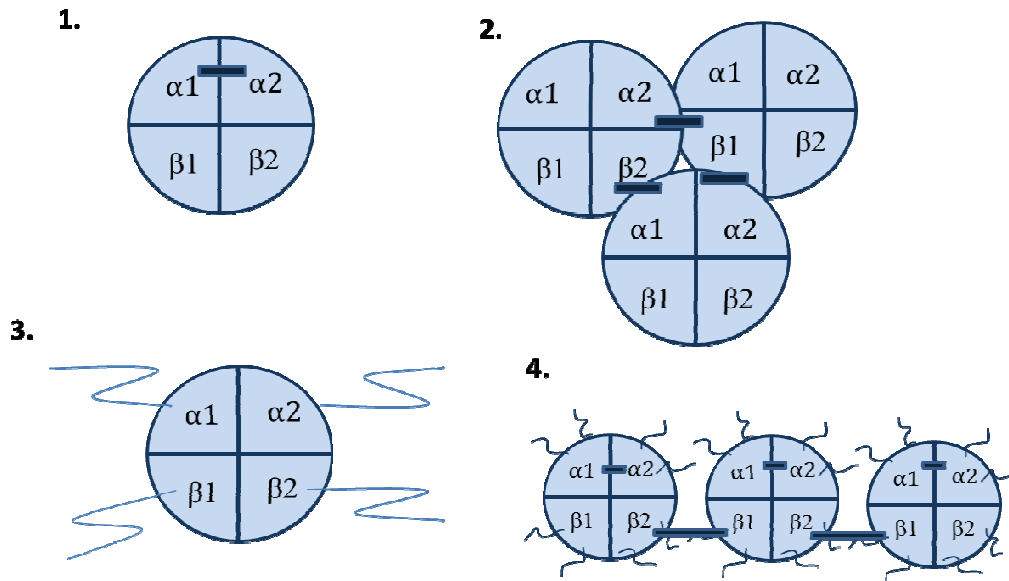


M. Wt. = 64 kDa;  
 $P_{50}$  = 34 mmHg

**Figure 7 - Nature et sites de modification d'HBOCS en développement clinique. (POE : Polyoxyethylene)**

### 3.3.2.4. Modifications de l'hémoglobine pour augmenter la rétention vasculaire

Les avancées technologiques permettent de réaliser de multiples modifications chimiques des protéines afin d'en améliorer la fonctionnalité et/ou la stabilité. Des stratégies ont donc été développées pour modifier les HBOCS d'origines humaine ou bovine, dans le but d'augmenter leur stabilité dans le plasma tout en conservant leur propriété de transporteur d'O<sub>2</sub> (Figure 8).



**Figure 8 - Exemples de modifications chimiques de l'Hb.** (1.) Le pontage ; (2.) La polymérisation ; (3.) La conjugaison ; (4.) Modifications multiples : conjugaison/ polymérisation. (Smani *et al.*, 2007)

**Modification de la surface :** Pour ce type de modifications, l'Hb est conjuguée à des molécules de tailles importantes comme le dextrane et le polyéthylène glycol (PEG) ce qui va avoir comme conséquence de prolonger la rétention de l'Hb dans la circulation. La surface de l'Hb est riche en résidus qui sont favorables à ce type d'interactions. Le PHP (pyridoxalated hemoglobin polyoxyethylene) est une Hb humaine modifiée dans le but de diminuer son affinité pour l'oxygène (Figure 7 (6.)). La FDA l'autorisa pour un premier essai clinique en 1992, elle fut par la suite reprise par Apex Bioscience (Smani *et al.*, 2007).

**Pontage covalent des globines :** Il s'agit d'un pontage intramoléculaire des sous-unités de globine empêchant la dissociation en dimères de la polyprotéine et n'affectant pas la masse moléculaire. Par exemple, une liaison covalente entre les deux dimères  $\alpha/\beta$  *via* une Glycine permet d'assurer la liaison et stabilise la molécule (Optro<sup>TM</sup>, Baxter, paragraphe 3.3.2.3.) ou

encore le pontage des chaînes  $\alpha$  avec du bis (3,5-dibromosalicyl) fumarate (DBBF) (HemAssist<sup>TM</sup>, Baxter) (Figure 7 (4. & 1.)) (Chen, Scerbo, and Kramer 2009). Cette dernière a été développée par l'armée des États-Unis pour sa durée de rétention et son affinité pour l'O<sub>2</sub>, qui sont proches de celles de l'Hb native. Toutefois l'utilisation de HemAssist<sup>TM</sup> fut arrêtée prématurément car les résultats obtenus étaient insuffisants et il persistait des problèmes liés aux risques sanitaires. Baxter a finalement mis fin à son programme sur les HBOCs (Chen, Scerbo, and Kramer 2009).

**La polymérisation :** La polymérisation de l'Hb est réalisée par des pontages intermoléculaires, ce qui va permettre d'augmenter considérablement la masse moléculaire de la structure. Dans la préparation de PolyHeme<sup>TM</sup> et d'Hemopure<sup>TM</sup> (HBOC-201) (Figure 7 (5. & 2.)), les pontages sont réalisés avec du glutaraldéhyde par l'intermédiaire de ses fonctions aldéhydes.

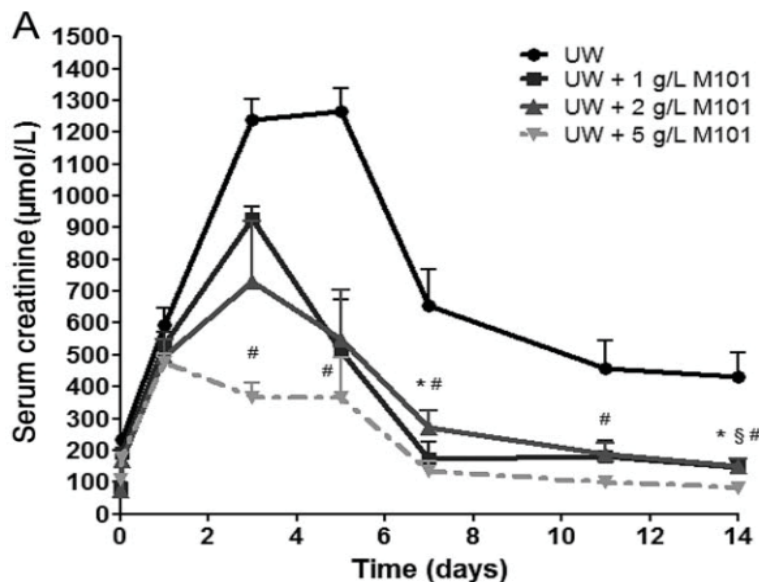
**Combinaison de plusieurs modifications :** Le substitut Hemolink<sup>TM</sup> est non seulement ponté mais aussi polymérisé à l'aide de l'O-raffinose. Cette molécule permet l'interaction intermoléculaire entre les chaînes  $\beta$  pour former une Hb stable (64 kDa) et permet l'interaction entre plusieurs tétramères (128 à 600 kDa) grâce aux acides aminés de surface de ces derniers (Figure 7 (7.)).

### 3.3.3. Les transporteurs d'oxygène d'Annélides marins

Plusieurs groupes de recherche se sont intéressés à l'EHb de ces Annélides marins. En France, ce fut celle du Pr. André Toulmond localisée à Roscoff en Bretagne en 1993. C'est à la même période que pendant son doctorat, Franck Zal entama les travaux sur l'*A. marina* et réalisa une description détaillée de la structure de son Hb. Elle répondait aux critères des « oxygen therapeutics » et permettait aussi d'entrevoir son utilisation en tant que substitut sanguin universel. En 2007 l'entreprise HEMARINA fut créée, sous la direction du Dr. Zal et de sa doctorante de l'époque Morgane Rousselot, avec pour ambition commune d'exploiter les propriétés de l'Hb d'arénicole afin de développer la production de produits à usages thérapeutiques. En fonction des applications développées, l'Hb d'*A. marina* (M101) ou de *N. virens* (M201) a été déclinée en plusieurs produits protégés par plus de 50 brevets.

### 3.3.3.1. Pour la préservation d'organes

Les organes destinés à la transplantation perdent rapidement en qualité dès le moment où ils sont prélevés. Le nombre de patients en attente de greffe est en constante augmentation et la disponibilité en greffons viables est limitante. Les stratégies actuelles s'attardent à étendre la durée de conservation des organes, c'est-à-dire leur viabilité *ex vivo*, afin de limiter les effets délétères de l'ischémie froide (conservation à froid). Les solutions de préservation ont pour rôle de maintenir la pression osmotique extracellulaire pour prévenir les problèmes d'acidose et de détérioration, occasionnés au cours de la reperfusion. C'est à cet effet et en tenant compte de la stabilité et de l'efficacité de l'Hb d'*A. marina* à basses températures, que HEMARINA développa le produit HEMO<sub>2</sub>life®. Les essais réalisés sur un modèle porcin de greffe rénale ont donné de probants résultats. Le greffon maintenu en solution de préservation de l'Université du Wisconsin (UW), Custodiol, contenant de l'HEMO<sub>2</sub>life® recouvrait une efficacité fonctionnelle plus rapidement que dans une solution standard (Mallet *et al.*, 2014). La figure 9 ci-dessous, représente les résultats du dosage de la créatinine sérique dans le sang de porcs préalablement transplantés avec des reins maintenus dans le milieu de préservation seul ou supplémenté avec différentes doses de M101. Ce type de résultats devrait en théorie être transposable à d'autres organes dont la conservation est limitée, tels que le cœur, le foie, le pancréas et les poumons.



**Figure 9 - Analyse de la fonction rénale chez le porc après transplantation.** Le dosage de la créatinine a été réalisé pendant 14 jours post-greffe. Les reins ont été conservés 24h à froid dans la solution UW +/- M101 de 1 à 5 g/L. Un taux de créatinine élevé indique une fonction rénale défaillante (Mallet *et al.*, 2014).

Un essai clinique multicentrique, OxyOp, va prochainement débiter. Il inclura une cohorte de 60 patients en attente d'une greffe rénale

### 3.3.3.2. Transporteur d'oxygène universel

Comme tout HBOCs, le sang d'Annélides est envisagé comme substitut sanguin. Celui développé par la start-up morlaisienne présente les avantages des HBOCs sans les inconvénients. Il serait d'un grand intérêt pour prévenir l'anémie en cas de situations d'urgence, telles que des pertes sanguines brutales et importantes, accidentelles ou survenues en temps de guerre. Des administrations intraveineuses d'HEMOXYCarrier® (M101, HEMARINA SA) ont montré une oxygénation rapide et efficace dans des modèles animaux, sans occasionner d'effets secondaires (Rousselot *et al.*, 2006; Tsai *et al.*, 2012)

Des tests ont été réalisés chez la souris par injection intraveineuse d'HEMOXYCarrier®. A cet effet M101 a été taguée avec un marqueur fluorescent rouge qui a révélé une rapide diffusion de la molécule dans la totalité du corps de l'animal, avec une rétention de plusieurs heures sans effets secondaires notables. De plus, cette étude a démontré la capacité de M101 à délivrer de l'oxygène dans des tissus peu vascularisés comme les tumeurs sous-cutanées induites chez le modèle murin, permettant d'envisager son application en thérapeutique (Le Gall *et al.*, 2014). En effet, un tel produit offre la possibilité d'oxygéner des zones hypoxiques localisées, parfois inaccessibles pour l'hématie humaine qui est plus volumineuse. Il pourrait aussi répondre à d'autres besoins tels que l'oxygénation de l'organisme en situation de choc hémorragique.

### 3.3.3.3. Pansement oxygénant

Un autre produit actuellement en développement, HEMHealing® (M101), a été mis au point pour soigner les plaies hypoxiques chroniques comme les ulcères du pied diabétique. Il s'agit d'un pansement universel développé à partir de l'Hb de *A. marina* pour favoriser le processus de cicatrisation.

### 3.3.3.4. Transporteur d'oxygène en culture cellulaire et production de protéines recombinantes

L'approvisionnement en O<sub>2</sub> constitue encore l'un des paramètres difficile à maîtriser dans la culture de cellules standard ou pour la production de protéines recombinantes, pouvant impacter le rendement et le produit lui-même. La technologie HEMOXCell® a été

développée à partir de M201 afin d'être utilisée comme additif dans le milieu de culture et ainsi délivrer de l'oxygène en fonction des besoins cellulaires. Son activité anti-oxydante naturelle va avoir une action protectrice sur les cellules et booster la productivité en apportant l'oxygène dissous sans passer par l'intermédiaire du bullage jugé trop agressif. Son utilisation en culture cellulaire sera détaillée par la suite dans les parties expérimentales des chapitres II, III et IV de ce manuscrit.

# CHAPITRE II

## L'oxygène en culture cellulaire

---

*Résumé : Dans ce second chapitre nous aborderons l'importance de l'oxygène au niveau cellulaire, à l'échelle du laboratoire et à l'échelle industrielle. En ce sens, un rappel sur le métabolisme cellulaire et sur les différents aspects de la culture de cellules adhérentes et non adhérentes, sera effectué. Puis les différents systèmes de culture à grandes échelles, pour la production de cellules et de protéines thérapeutiques, seront détaillés. Satisfaire les besoins en oxygène des cellules étant l'un des challenges actuels, nous clôturerons ce chapitre sur le développement de procédés de culture cellulaire utilisant comme additif l'hémoglobine de Nereis virens (HEMOXCell®) pour véhiculer l'oxygène. A cet effet, la lignée productrice CHO sera utilisée pour en valider l'utilisation.*

---





**- Chapitre II -**

## **Introduction**



---

# 1. Métabolisme cellulaire

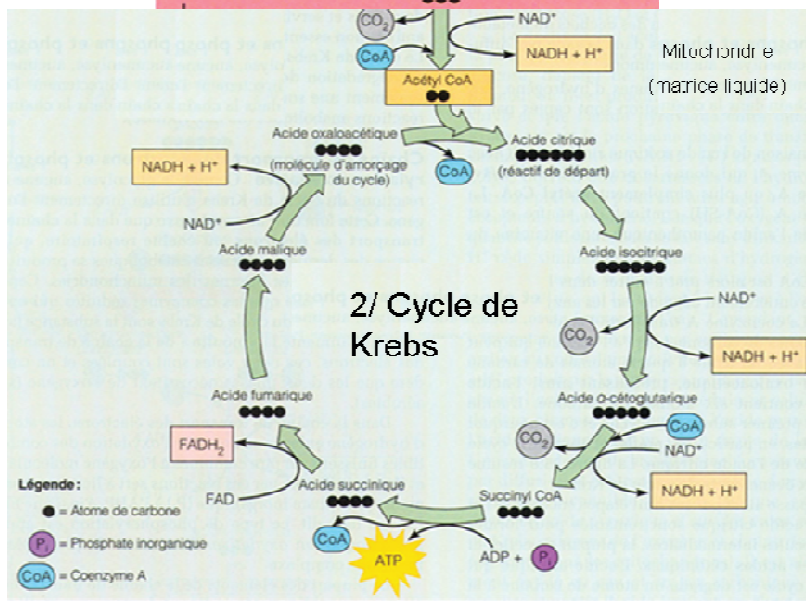
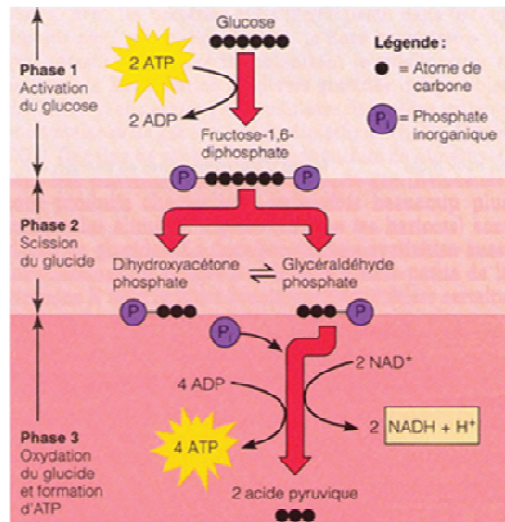
---

## 1.1. L'oxygène comme transporteur d'électrons

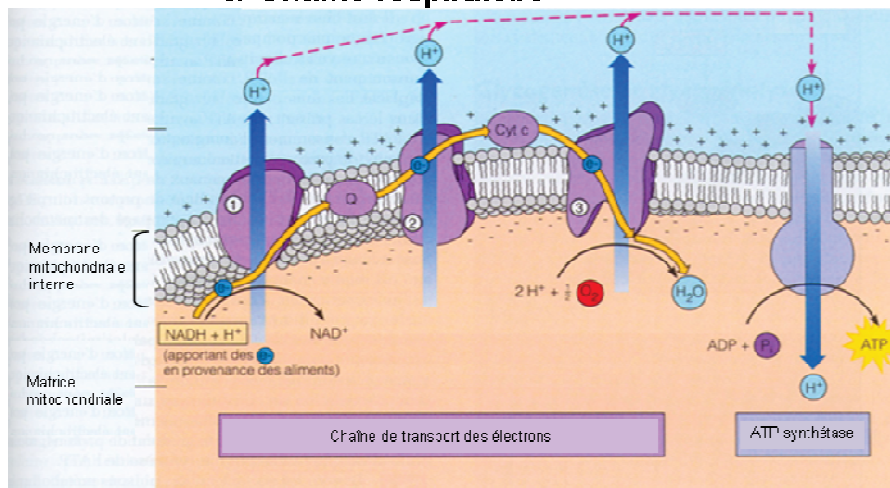
Au cours de la vie aérobie, le dioxygène (O<sub>2</sub>) apparaît comme étant le principal accepteur final d'électrons au cours des réactions et voies métaboliques, comme la chaîne respiratoire. Dans les cellules de mammifères, ces différentes voies vont conduire à la production d'énergie sous la forme d'ATP, Adénosine 5'-triphosphate. Le glucose est le principal glucide retrouvé dans le sang et est le seul à être utilisé par la cellule pour la production d'ATP. La respiration cellulaire débute dans le cytoplasme cellulaire avec la glycolyse (Figure 10). Cette voie catabolique est initiée par la dégradation d'une molécule de glucose pour générer deux molécules de pyruvate. En absence d'oxygène, au niveau des cellules musculaires, le pyruvate est fermenté en lactate par la lactate déshydrogénase (LDH), avec la production de 2 ATP et du cofacteur NADH oxydé, permettant ainsi le maintien de la glycolyse aérobie.

Lors du métabolisme du glucose en aérobie, le pyruvate va être modifié dans la mitochondrie au cours des étapes du cycle de Krebs permettant la libération de 2 ATP et de dioxyde de carbone (CO<sub>2</sub>). Le cycle de Krebs répond en grande partie aux besoins énergétiques de la cellule en formant des coenzymes réduits (NADH, H<sup>+</sup>) nécessaires au fonctionnement de la chaîne de transporteurs d'électrons située dans la membrane interne mitochondriale. Elle est constituée de 4 complexes protéiques, parmi lesquels le complexe IV qui permet la réalisation de réactions d'oxydations phosphorylantes au niveau de l'enzyme cytochrome oxydase.

Cette dernière étape de la respiration cellulaire va nécessiter de l'oxygène comme accepteur final d'électrons pour générer de l'eau avec libération de calories selon l'équation :  $O_2 + 4 H^+ + 4 e^- \rightarrow 2 H_2O$  (e<sup>-</sup> : électrons). Le rôle de la chaîne respiratoire va consister à produire de l'énergie sous forme d'ATP, en consommant 6 molécules d'O<sub>2</sub> et des produits des précédentes étapes d'oxydoréduction pour générer 12 molécules d'eau. Le bilan de la respiration cellulaire correspond à l'équation suivante :  $C_6H_{12}O_6 + 6 O_2 + 36 ADP + 36 Pi \rightarrow 6 CO_2 + 6 H_2O + 36 ATP$ .



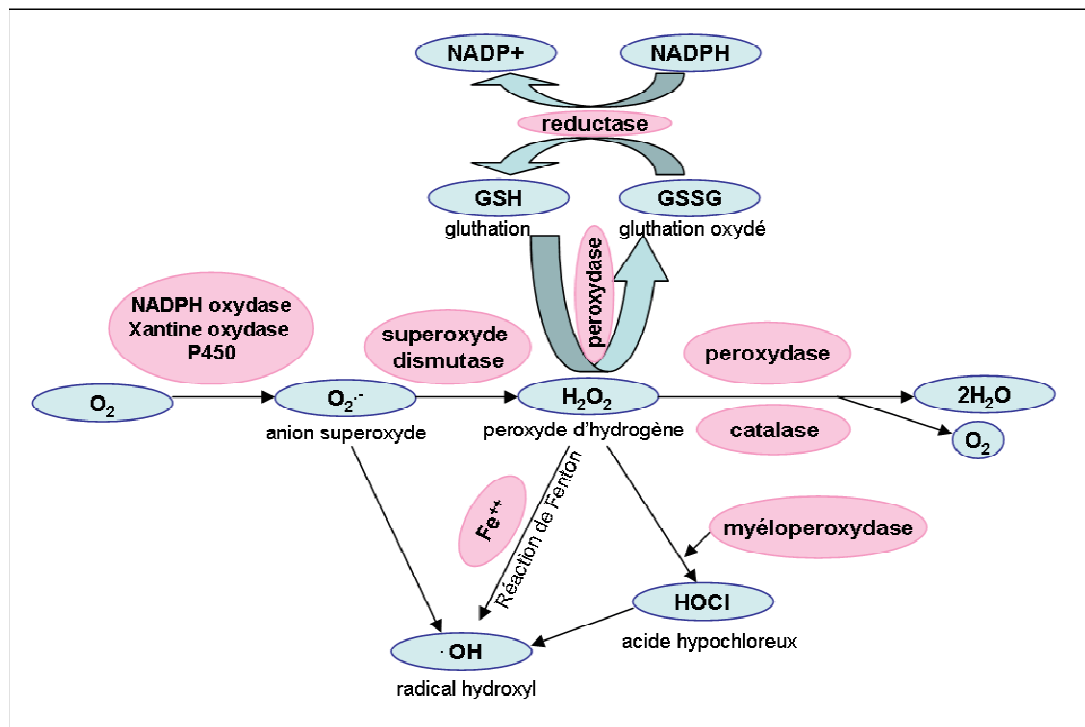
### 3/ Chaîne respiratoire



**Figure 10 – Représentation détaillée des différentes étapes de la respiration cellulaire.** (adapté de Badeau 2006)

## 1.2. Le stress oxydatif et dommages cellulaires

Bien que l'oxygène soit nécessaire au métabolisme, les radicaux libres qu'il génère en permanence peuvent dans certains cas être néfastes pour l'organisme. Des expériences menées sur le rongeur ont montré que l'exposition à une pression en oxygène plus élevée que la normale (*i.e.*, >21% O<sub>2</sub>) d'environ 90% induisait une inflammation en 30 minutes puis avait un effet dévastateur en seulement 90 minutes sur les poumons, notamment en induisant des lésions souvent létales du tissu fonctionnel pulmonaire (Valença *et al.*, 2007). Ces observations reflétaient un effet toxique de l'oxygène qui serait la conséquence d'un déséquilibre entre les enzymes anti- et pro-oxydantes (*i.e.*, les déshydrogénases, les oxydases et les réductases) qui vont agir respectivement sur les acteurs du métabolisme protecteur et la production de dérivés réactifs de l'oxygène (Gille & Joenje, 1992). Ces derniers sont appelés espèces réactives de l'oxygène (ROS pour Reactive Oxygen Species) et sont générés lorsque les enzymes anti-oxydantes ne suffisent plus à neutraliser les médiateurs oxygénés (Auten & Davis, 2009). Les principaux ROS sont l'anion superoxyde (O<sub>2</sub><sup>-</sup>), le peroxyde d'hydrogène (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), le radical hydroxyle (OH<sup>·</sup>) ou encore l'acide hypochloreux (HOCl) (Richter *et al.*, 1995) (Figure 11).



**Figure 11 - Voies de formation des radicaux libres de l'oxygène.** Le stress oxydatif se manifeste par un déséquilibre entre les radicaux libres (éléments oxydants) et les molécules antioxydantes. (adapté de <http://titan.medhyg.ch/mh/formation/art/30761.html>)

Au niveau cellulaire, la surproduction de ces radicaux libres va entraîner de nombreux phénomènes pathologiques du métabolisme de l'oxygène, tels que la perte de l'intégrité membranaire, des mutations de l'ADN, la peroxydation lipidique et la dénaturation de protéines impliquées dans des phénomènes d'apoptose caspase dépendante et de nécrose cellulaire (Janssen *et al.*, 1993; Ischiropoulos & Al-Mehdi, 1995). Il est donc important de contrôler le niveau d'oxygène notamment dans les domaines travaillant avec des cellules comme matière première.

---

## 2. La culture de cellules animales

---

La culture cellulaire, appelée culture *in vitro*, est une discipline dont le but est de reproduire au laboratoire les conditions définies, dans un environnement aseptique, nécessaires à la prolifération de cellules en dehors de l'organisme, qu'elles soient végétales ou animales. Le chapitre intitulé « *Basic Techniques in Mammalian Cell* » de Katy Phelan et Kristin M. May, regroupe habilement les principales techniques de manipulation, allant de la composition des milieux de culture en passant par les techniques de dénombrement et d'entretien des cultures (Phelan & May, 2015). Ces principes sont applicables à différentes catégories de cellules, parmi lesquelles il y a les « lignées » cellulaires provenant de cellules cancéreuses ou de cellules immortalisées, qui sont des cellules transformées de manière à rester stables tout au long des cultures. Les cellules cultivées à partir d'explants de tissus (après dissociation enzymatique du tissu ou migration naturelle des cellules) sont appelées cellules primaires, elles sont moins stables que les lignées mais présentent l'avantage d'être plus représentatives du vivant. A partir de leur premier repiquage on parlera de culture secondaire. Du point de vue respiratoire, les cellules animales sont aérobies strictes et vont donc avoir besoin d'oxygène pour fonctionner, d'où la nécessité de posséder le matériel approprié à leur maintien dans des conditions adaptées.

### 2.1. La culture en incubateur : « The oxygen paradigm »

Dans la plupart des laboratoires, la culture des cellules animales est réalisée en incubateur à CO<sub>2</sub> possédant un environnement calibré à 5% de CO<sub>2</sub> gazeux, 20% d'O<sub>2</sub> et une température de 37°C. Ces conditions sont considérées comme étant de la « Normoxie » mais en

réalité la plupart des tissus de notre organisme sont confrontés à de faibles teneurs en O<sub>2</sub> (hypoxie) (Ivanovic, 2009). Le niveau d'oxygène va jouer un rôle essentiel dans le maintien des fonctions cellulaires, mais il va aussi avoir un rôle au niveau de la croissance et de la différenciation (Mohyeldin *et al.*, 2010; Hung *et al.*, 2012; Zhang *et al.*, 2013; Farrell *et al.*, 2015; Beegle *et al.*, 2015). Ces phénomènes sont largement référencés par Zoran Ivanovic particulièrement pour les cellules souches pour lesquelles il emploie le terme de *Oxygen stem cell paradigm*. Dans les étuves de culture à 21% O<sub>2</sub>, les cellules sont confrontées à une suroxygénation (hyperoxie), qui va dans certains cas être impliquée dans la production de ROS perturbant la physiologie cellulaire. La culture en faible teneur en O<sub>2</sub> est réalisable en incubateur, en diminuant le pourcentage d'O<sub>2</sub> ambiant et en le remplaçant par du diazote (N<sub>2</sub>), mais aussi en utilisant des chambres à hypoxie. Dans le cadre d'un système de culture dit semi-clos, les bouchons sont dotés de filtres qui vont permettre les échanges gazeux tout en maintenant des conditions de stérilité. La surface de culture et le volume de milieu doivent être réfléchis pour permettre une surface d'échange gazeux optimale.

Les milieux de culture utilisés sont généralement définis pour se rapprocher au plus près des conditions *in vivo* afin de satisfaire les exigences nutritives des cellules en culture (source de carbone, d'énergie, de vitamines, d'acides aminés, de facteurs de croissance, etc.). L'ajout de suppléments nutritifs est nécessaire, le plus commun étant le sérum de veau fœtal (SVF) utilisé dans un rapport volumétrique de 10%. Une tendance grandissante tend à utiliser du lysat de plaquettes humaines ou de milieu sans sérum « serum-free », en tant que substituts au SVF pour la culture de cellules primaires humaines (Capelli *et al.*, 2007; Bieback *et al.*, 2009; Naaijken *et al.*, 2012; Rubio-Azpeitia & Andia, 2014). Les milieux de culture conventionnels contiennent un système tampon avec indicateur de pH, le Rouge de Phénol qui va être rosé/rouge en neutralité, tendre vers le violet si le pH augmente et vers le jaune si le milieu devient trop acide. En dessous d'un pH de 6,6 de nombreux types cellulaires ne survivent pas plus de 24h (Cook & Fox, 1988). La diminution du pH est attribuée à la sécrétion d'acide lactique et autres déchets par les cellules en culture. Le système tampon fait intervenir le couple CO<sub>2</sub>/HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>, qui est en équilibre à 5 % CO<sub>2</sub> (pH 7,4) selon l'équation  $\text{CO}_2 + \text{H}_2\text{O} \leftrightarrow \text{HCO}_3^- + \text{H}^+$ .

La respiration cellulaire entraîne une production de CO<sub>2</sub> en faveur d'une diminution de pH, le NaHCO<sub>3</sub> (bicarbonate de sodium) contenu dans le milieu permet de rétablir l'équilibre. Cependant, ce dernier va s'épuiser au cours de la croissance cellulaire, c'est pour cela que le milieu de culture doit être renouvelé au moins deux fois par semaine. Cela va permettre de



réapprovisionner les cellules en nutriments devenus limitant au cours de la culture. Ce phénomène est retrouvé dans les cultures d'organes (cultures organotypiques) et dans les cultures tridimensionnelles de tailles importantes (plusieurs millimètres). En effet, l'accessibilité de la zone centrale par les nutriments et l'oxygène étant limitée, il va se créer une anoxie conduisant irrémédiablement à une nécrose au centre de l'explant. L'association du trio oxygène-nutriments-pH est alors nécessaire à la survie cellulaire (Bibby & Urban, 2004).

## 2.2. La culture de cellules adhérentes

Les cellules de mammifères sont pour la plupart des cellules adhérentes, sauf quelques cellules comme les cellules sanguines circulantes, certaines cellules de la moelle osseuse, des cellules des organes lymphoïdes et les cellules anormales (cancéreuses ou transformées).

Elles sont cultivées sur tous les types de supports permettant un maximum de surface de contact, afin qu'elles puissent se développer sur le fond du contenant. Lorsque la monocouche cellulaire va atteindre la confluence, il va y avoir un arrêt de la croissance par un phénomène d'inhibition de contact. A partir de ce stade les conditions de culture sont perturbées aussi bien au niveau génétique que protéique (Ren *et al.*, 2015). C'est pourquoi, il est préférable de « passer » les cellules lorsque la confluence est proche des 70-80%, par action mécanique (grattoir) ou enzymatique (trypsine). Il s'agit ici de décoller l'intégralité des cellules du support pour pouvoir les réensemencer, diluées dans du milieu « neuf ». Les cellules subissent alors un passage, il est important de bien tenir compte du passage particulièrement pour les cultures secondaires car ces dernières vont évoluer au fur et à mesure des passages laissant place à des populations de plus en plus résistantes, partiellement altérées et de moins en moins représentatives du tissu d'origine (Huang *et al.*, 2010; Cui *et al.*, 2012a).

A la différence des cellules non-adhérentes, elles expriment de nombreuses molécules d'adhérence cellulaire (Cell Adhesion Molecules, CAM). Il s'agit de protéines membranaires, parmi lesquelles il y a les intégrines et les cadhérines. Les intégrines vont permettre l'adhérence au support en créant un pont entre le cytosquelette cellulaire et la matrice extracellulaire (MEC) (protéoglycanes et glycosaminoglycanes), tandis que les cadhérines vont être impliquées dans les interactions cellule-cellule *via* les caténines cytoplasmiques. Ces interactions sont essentielles aux cellules adhérentes et vont jouer un rôle important dans

le développement embryonnaire, la réparation tissulaire et la croissance cellulaire (Hynes, 2013).

*In vitro*, l'adhérence est dépendante du type cellulaire cultivé, il est parfois nécessaire d'avoir recourt à des revêtements spécifiques (coating) avec des protéines matricielles pour favoriser l'adhérence (collagène, fibronectine...etc.). La figure 12 ci-dessous illustre les différents types de molécules d'adhérence.

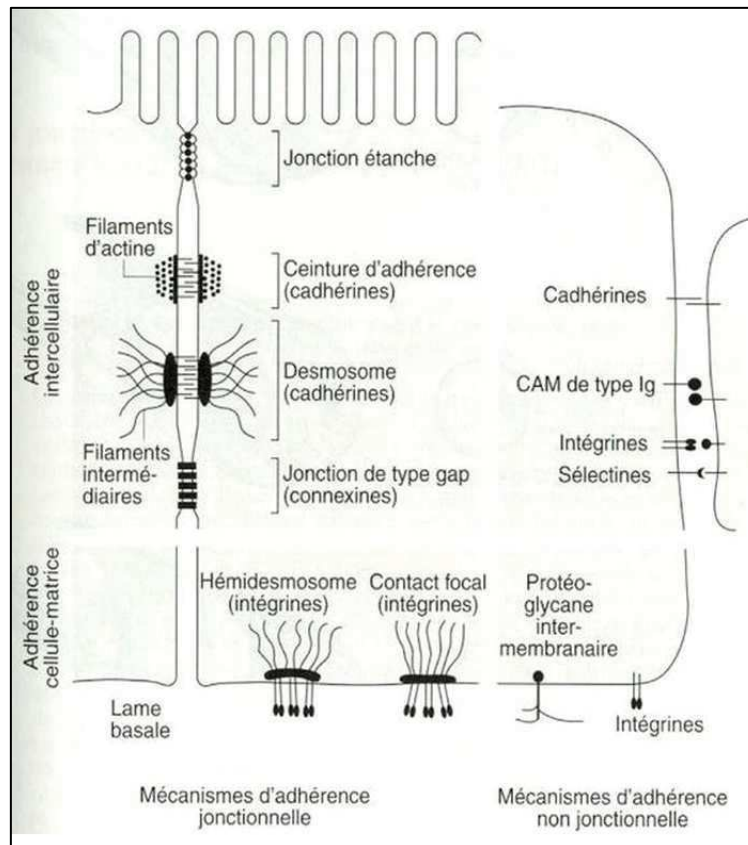


Figure 12 - Les jonctions d'adhérence cellulaires. (Source : [www.lookfordiagnosis.com](http://www.lookfordiagnosis.com))

### 2.3. Culture de cellules non-adhérentes

Les cellules non-adhérentes vivent et prolifèrent en suspension dans le milieu de culture et ne sont pas concernées par le phénomène d'inhibition de contact. En laboratoire il s'agit généralement de lignées modifiées, elles sont cultivées sous agitation pour optimiser les échanges gazeux, dans des contenants ne nécessitant pas de traitements adhésifs. Elles vont pouvoir pousser dans l'intégralité du milieu et ainsi générer un rendement cellulaire plus conséquent que leurs homologues adhérentes ( $1.10^5/cm^2$  vs.  $2.10^6/mL$ ) (ATCC Guideline). A l'état naturel il existe peu de cellules non-adhérentes à l'exception des cellules souches

hématopoïétiques et de quelques cellules d'organes lymphoïdes, telles que les lymphocytes. Elles constituent les candidates idéales pour la culture en masse associée à la production de protéines médicaments. Les premières utilisées dans ce but étaient les lymphocytes avec le système hybridome. Il s'agit d'une technique de production d'anticorps monoclonaux à partir de cellules issues de la fusion d'une lignée myéломatoïde et de lymphocytes B. Mise au point par George Köler et César Milstein en 1975, cette découverte leur valut un prix Nobel de médecine en 1985 (Köhler & Milstein, 1975).

---

### **3. Les procédés industriels de culture cellulaire**

---

#### **3.1. Production de protéines recombinantes et de biomédicaments**

##### **3.1.1. Les biomédicaments**

Un biomédicament se définit comme un médicament produit à partir des cellules ou de la totalité d'un organisme vivant. Plus précisément, il s'agit d'une substance présentant des propriétés préventives et/ou curatives à l'encontre de maladies. Elle est produite grâce à des procédés de génie génétique parmi lesquels on peut citer les méthodes à base d'hybridomes, pour la production d'anticorps monoclonaux et la technologie de l'ADN recombinant. Le principe de cette dernière est relativement simple, il s'agit d'induire la production d'une protéine aux vertus thérapeutiques par insertion du gène codant cette dernière dans un vecteur, puis d'induire son expression dans un organisme hôte. Dans la pratique, cette technologie est complexe et coûteuse à développer (Chartrain & Chu, 2008).

En Mai 2014, 173 biomédicaments ont été commercialisés en France. Ils sont classés selon le système ATC (Anatomical Therapeutic Chemical) de l'OMS (Organisation Mondiale pour la Santé) qui répertorie les médicaments en fonction de leurs propriétés en 14 groupes distincts. Parmi ces 173 médicaments, ils étaient principalement regroupés en deux catégories : 1/ les anti-infectieux à usage systémique et les anticancéreux, et 2/ les immunomodulateurs. Au niveau du marché des protéines médicaments, plus de 70% des protéines recombinantes sont actuellement produites à partir de cellules de mammifères, bien que le coût de production soit plus élevé que les systèmes levurien et bactérien (Birch &

Racher, 2006). Cependant d'autres protéines sont produites à partir du génie génétique telles que les facteurs de croissance, l'insuline ou encore des enzymes, et sont destinées à des domaines d'application variés (Figure 13).

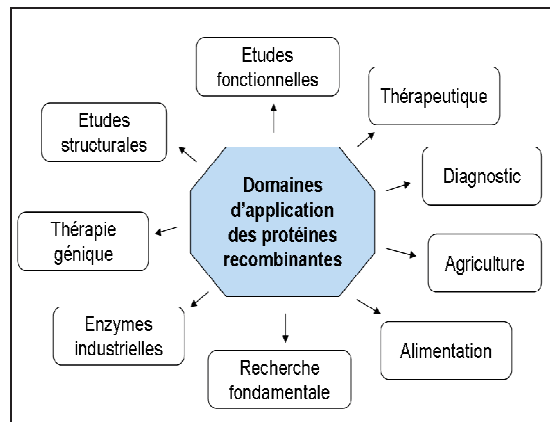


Figure 13 - Domaines d'application des protéines recombinantes.

### 3.1.2. Les systèmes d'expression

Pour tous les systèmes confondus le schéma est le même. Il faut disposer de l'ADN codant la protéine d'intérêt et l'insérer dans un hôte permettant son expression de façon contrôlée. Selon l'organisme génétiquement modifié, le produit pharmaceutique est sécrété dans le milieu ou accumulé dans l'hôte, il faudra alors être en capacité d'extraire et de purifier les protéines biologiquement actives. La production devra être en accord avec les bonnes pratiques de fabrication (BPF). Les différents systèmes diffèrent dans leur aptitude à réaliser des modifications post-traductionnelles complexes des protéines synthétisées (Figure 14).

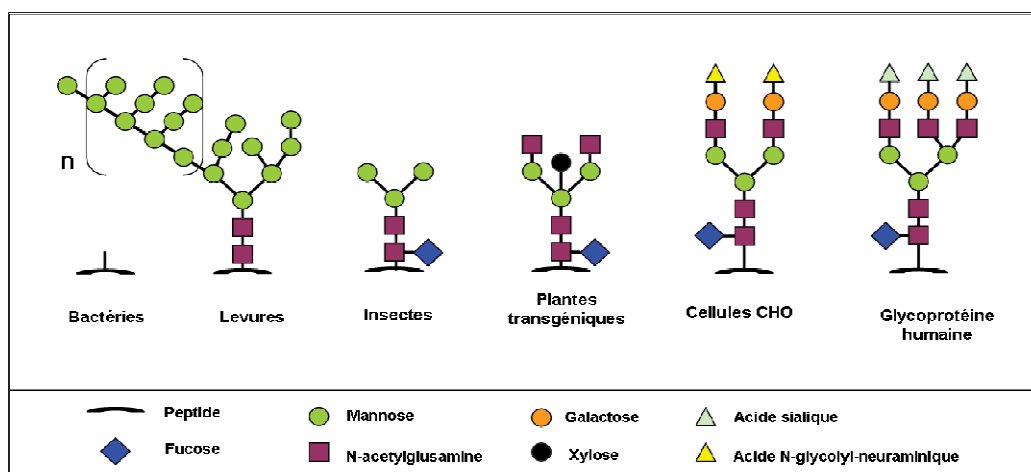


Figure 14 - Schéma représentatif de structures N-glycanniques, caractéristiques des différents systèmes d'expression (Olivier & Mehtali, 2009). Les bactéries sont incapables de glycosyler les protéines recombinantes de mammifères, les levures ont tendance à hyper-mannosyler, les plantes et insectes produisent des glycoprotéines avec des résidus 1,3-fucose et xylose tandis que les cellules CHO permettent d'obtenir des glycosylations complexes, proches de celles retrouvées chez l'homme.

### 3.1.2.1. Les systèmes bactériens

Dans les années 90, les bactéries constituaient l'hôte le plus utilisé pour la production de protéines recombinantes, en particulier *Escherichia coli* (*E. coli*). A partir de cet hôte, l'insuline fut produite par clonage en 1978 par la société Genentech et constitua la première protéine recombinante humaine.

**Avantages :** *E. coli* est un hôte génétiquement bien connu et caractérisé, facile à cultiver en fermenteur et peu coûteux. Il existe de nombreux outils pour son étude et il permet un haut rendement de purification de protéines non complexes pouvant atteindre plusieurs grammes par litre. Comme par exemple un taux de production de 5,2 g/L pour la phosphatase alcaline. L'accumulation de protéines hétérologues peut atteindre jusqu'à 50% de son poids sec (Adrio & Demain, 2014). En routine les souches les plus utilisées sont *E. coli* BL21 et K12 ainsi que leurs dérivés.

**Inconvénients :** Les bactéries (*E. coli*) présentent néanmoins un faible potentiel de sécrétion (plus élevé chez *Bacillus subtilis* et *Streptomyces*) (Fischer *et al.*, 1993). Un des problèmes majeur que l'on retrouve chez *E. coli* est son incapacité à synthétiser et à assembler correctement des protéines complexes. Ces dernières nécessitent des modifications post-traductionnelles telles que les glycosylations et sont inappropriées pour l'expression de protéines possédant des ponts disulfures comme les immunoglobulines. Pour toutes ces raisons son utilisation est restreinte à la production de fragments d'anticorps ne nécessitant pas de modifications particulières et destinés à une utilisation en tant que réactifs de recherche (Arbabi-Ghahroudi *et al.*, 2005).

### 3.1.2.2. Les levures et champignons filamenteux

La levure est un champignon eucaryote unicellulaire utilisé dans de nombreux processus industriels tels que la panification et la fabrication de boissons alcoolisées. *Saccharomyces cerevisiae*, et *Pichia pastoris* (*P. pastoris*) sont les deux espèces de levures les plus couramment utilisées en tant qu'organismes hôtes (Byrne, 2015). Les levures sont actuellement utilisées pour la production de protéines simples, telle que l'insuline, par des entreprises biopharmaceutiques et industrielles. *Aspergillus niger* (*A. niger*) ainsi que son homologue *Trichoderma reesei*, sont des champignons filamenteux utilisés pour la production d'enzymes recombinantes par les industries du textile et agroalimentaires.

**Avantages :** De la même manière que les bactéries, ces systèmes présentent une forte productivité et leur culture est peu coûteuse. Toutefois, certaines souches, comme *P. pastoris* et *A. niger*, disposent de la machinerie permettant la N-glycosylation de protéines complexes, nécessaire à la production d'anticorps monoclonaux (Byrne, 2015).

**Inconvénients :** Les protéines sont généralement cytosoliques et leur extraction va nécessiter une étape de lyse cellulaire. L'efficacité de production est avérée pour des protéines de petite taille comme l'insuline, mais elle est moindre pour des protéines complexes (Gerngross, 2004). La levure produit des N-glycane et des O-glycane différents de ceux obtenus avec les processus de glycosylation mammaliens. Certaines souches humanisées ont été développées comme GlycodExpress<sup>TM</sup> et YAC-Express<sup>TM</sup> (GLYCODE, France) et d'autres sont en cours de développement pour les rendre utilisables en thérapeutique humaine (Arico *et al.*, 2013).

### 3.1.2.3. Les cellules d'insectes

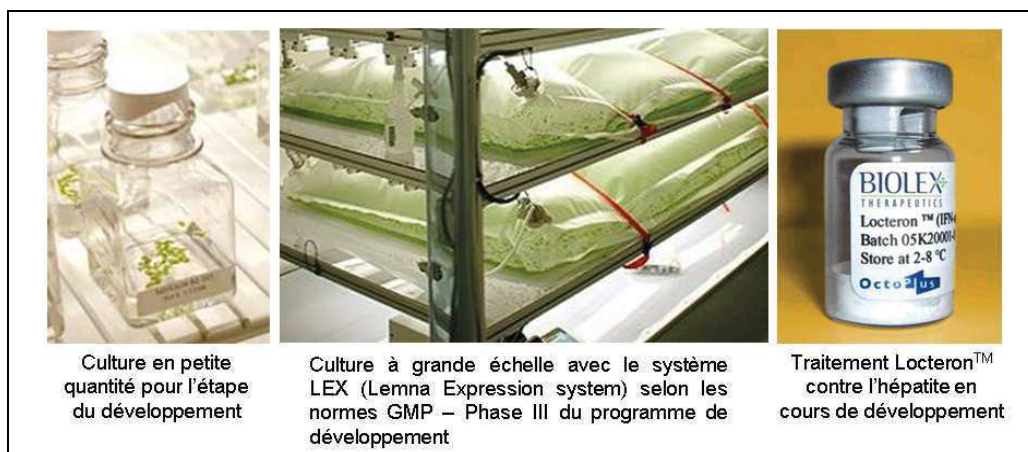
L'utilisation des cellules d'insectes à des fins de bioproduction est appelée « système Baculovirus-cellules d'insectes » puisqu'elle emploie le génome du Baculovirus comme vecteur d'expression. Dans ce système, le gène viral de la polyhédrine, qui représente 50% des protéines totales produites, est remplacé par le gène d'intérêt. Le virus est ensuite utilisé pour infecter les cellules d'insectes comme le lépidoptère (Lignée Sf9, *Spodoptera frugiperda*) (Osz-Papai *et al.*, 2015)

**Avantages :** Il s'agit d'un système populaire pour la production à petite échelle car il permet l'obtention de protéines naturellement glycosylées dans un minimum de temps et biologiquement actives. De plus, il constitue un système non pathogène pour l'homme, affichant des niveaux d'expression élevés, de plusieurs milligrammes par litre (Osz-Papai *et al.*, 2015).

**Inconvénients :** Les glycosylations effectuées par les cellules d'insectes peuvent porter des résidus immunogènes pour l'homme. Le baculovirus est un virus lytique ce qui signifie que son utilisation pour une production à l'échelle industrielle nécessite des quantités importantes de virus. Les cellules d'insectes quant à elles, possèdent une activité protéasique importante pouvant constituer un risque d'altération de l'activité biologique de la protéine produite. Alternativement des systèmes ont vu le jour au travers d'une infection réalisée directement chez la larve d'insecte.

### 3.1.2.4. Les systèmes végétaux

Envisagé comme un système de production économique avec une génétique facilement modifiable, l'utilisation des plantes transgéniques pour la production d'anticorps monoclonaux a fait son apparition dans les années 1989. Initialement à partir de feuilles de *Nicotiana tabacum*, d'autres essais ont été réalisés à partir du riz, du soja, de la luzerne ou encore de la laitue (Gomord *et al.*, 2005). Par ailleurs, dans le but de limiter les problèmes inhérents à la culture de plantes transgéniques, comme la transmission du transgène, la bioproduction végétale a été développée en fermenteur avec des systèmes tels que les cellules végétales, les microalgues ou encore les lentilles d'eau. Ce dernier est actuellement exploité par la société Biorex Therapeutics, pour la production de produits thérapeutiques en vue d'un traitement de maladies infectieuses, notamment les hépatites B et C ainsi que certains types de cancer (Figure 15).



**Figure 15 - Exemple d'un système de production de peptides thérapeutiques à partir de *Lemna minor*, une plante aquatique transgénique.** Le Lacteron™, développé par la société Biorex Therapeutics (Caroline du Nord, USA), est un interféron alpha. Les lentilles d'eau sont cultivées dans un système en accord avec les normes GMP appelé système LEX.

(Source : <http://www.pharmaceutical-technology.com/projects/biorex/>)

**Avantages :** La culture végétale est simple, peu coûteuse et reproductible. De plus, les cellules végétales sont des cellules eucaryotes et disposent donc d'un système leur permettant de réaliser les modifications post-traductionnelles requises à la production de protéines thérapeutiques, complexes et fonctionnelles (Buyel *et al.*, 2015).

**Inconvénients :** Bien que la production à partir de cellules végétales présente des avantages, les rendements de production demeurent encore limités par comparaison à ceux des plantes transgéniques. Dans les deux cas il persiste une polémique liée à leur nature d'OGM

(Organismes Génétiquement Modifiés) et les sucres complexes synthétisés par les végétaux ne sont pas identiques à ceux des protéines animales.

### 3.1.2.5. Les animaux transgéniques

En 1980 furent créés les premiers animaux transgéniques, il s'agissait de souris modifiées pour produire l'hormone de croissance (Somatotropine) à un niveau sub-physiologique ( $> 50 \mu\text{g/ml}$ ) dans leur sérum. Cette expérience fut la preuve qu'il était possible de produire des protéines médicaments dans les fluides organiques d'origine animale (Soler *et al.*, 2006). L'intérêt de ce système est d'utiliser comme fermenteur un organe réalisant naturellement des glycosylations complexes. Cependant, la production au niveau sanguin étant relativement restreinte, les techniques se sont développées pour s'adapter à des animaux de taille plus conséquente. La production jusqu'alors limitée au sang fut réalisée dans le lait des animaux d'élevage, comme ce fut le cas chez le lapin, le mouton et la chèvre (Cooper *et al.*, 2015) (Tableau 2).

**Tableau 2 - Exemples de biomédicaments obtenus à partir d'animaux transgéniques dans les années 90.** Inspiré de « Principe de génie génétique » par Sandy Primrose et Richard Twyman (Primrose & Twyman, 2004)

| Système        | Espèce productrice | Produit                               | Espèce d'origine du produit | Année |
|----------------|--------------------|---------------------------------------|-----------------------------|-------|
| Lait           | Souris             | Lactoglobuline- $\beta$               | Mouton                      | 1987  |
|                |                    | Hormone de croissance                 | Humain                      | 1987  |
|                |                    | Fibrinogène                           | Humain                      | 1996  |
|                |                    | Facteur de croissance neurale (NGF)   | Humain                      | 1999  |
|                |                    | Soie d'araignée                       | Araignée                    | 1999  |
|                | Lapin              | Erythropoïétine                       | Humain                      | 1996  |
|                | Mouton             | A <sub>2</sub> -antitrypsine          | Humain                      | 1991  |
| Sérum          | Chèvre             | Activateur tissulaire du plasminogène | Humain                      | 1991  |
|                | Lapin              | A <sub>2</sub> -antitrypsine          | Humain                      | 1991  |
|                | Porc               | Anticorps recombinants                | Humain                      | 1991  |
| Urine          | Souris             | Hormone de croissance                 | Humain                      | 1998  |
| Fluide séminal | Souris             | Hormone de croissance                 | Humain                      | 1999  |

Actuellement seulement trois systèmes sont utilisés : le lait, le blanc d'œuf d'oiseaux et la soie de vers à soie. Le premier médicament OGM autorisé en Europe, la protéine recombinante humaine antithrombine III, reçut une autorisation de mise sur le marché Européen en 2006. Elle fut produite dans le lait de chèvres transgéniques et commercialisée sous le nom d'ATryn (GTC Bioterapeutics). Le second exploite des poules transgéniques pour la production d'anticorps monoclonaux et d'interferon- $\beta$ 1 dans le blanc d'œuf (Lillico *et al.*,



2007). Le dernier est idéal pour produire des protéines destinées à une utilisation en chirurgie réparatrice comme le fibrinogène et le collagène.

**Avantages :** Ce système permet l'obtention de protéines recombinantes de conformations identiques à celles produites chez l'homme et ne présente pas de risques environnementaux comme les plantes (Vázquez-Salat & Houdebine, 2013).

**Inconvénients :** La culture animale à grande échelle coûte très cher et l'obtention d'animaux transgéniques est relativement longue. Par ailleurs, à la différence des plantes transgéniques, il existe de nombreux problèmes d'ordre éthique concernant l'ingénierie génétique animale (Ormandy *et al.*, 2011).

#### 3.1.2.6. Les cellules animales

Actuellement les cellules de mammifères sont majoritairement utilisées pour la production de vaccins et de protéines recombinantes à usages thérapeutiques et diagnostiques. La plus grande difficulté de l'utilisation de ce système pour la production à grande échelle, est de pouvoir faire face à la pression de sélection et ainsi réussir à obtenir une souche stable permettant l'expression de protéines recombinantes de qualité, en quantité suffisante afin d'en limiter le coût de production (Swiech *et al.*, 2015).

La première compagnie à exploiter le filon de l'ADN recombinant avec des lignées animales fut la société Genentech. Ils commercialisèrent en 1987 l'Activase®, un activateur de plasminogène humain obtenu à partir de cellules de mélanome humain (Primrose & Twyman, 2004). Parmi les lignées les plus utilisées il y a les lignées NS0, PER.C6® et CHO. Il s'agit respectivement de cellules de myélome murin, de cellules rétinales embryonnaires humaines et des cellules d'ovaire d'hamster chinois (Chinese Hamster Ovary) (Li *et al.*, 2010). La lignée NS0 est non-sécrétrice d'anticorps et auxotrophe au cholestérol, ce qui nécessite son ajout dans le milieu de culture. Toutefois, des variants non-auxotrophes au cholestérol ont été développés. La lignée NS0, comme les autres lignées murines, produit de l'acide sialique NGNA (Acide N-glycolyl neuramique). Ce dernier n'est pas retrouvé chez l'être humain et présente de ce fait un risque immunogène. Cependant il a été démontré que les cellules CHO produisaient des quantités moindres de NGNA et que les produits obtenus à partir de cette lignée étaient plutôt bien tolérés par l'être humain (Tangvoranuntakul *et al.*, 2003). C'est en partie pour cette raison que cette lignée s'attira les faveurs des industriels et qu'actuellement de nombreux produits obtenus à partir de cet hôte sont commercialisés

(Tableau 3). Cette lignée représente à elle seule plus de 70% du marché des anticorps monoclonaux.

**Tableau 3 - Exemples de produits biologiques produits en lignées CHO et dont la commercialisation est approuvée par la FDA.** (Jayapal *et al.*, 2007; Li *et al.*, 2010)

|                                       | Produit                                | Indication                       | Compagnie                      | Année d'autorisation (FDA) |
|---------------------------------------|--|----------------------------------|--------------------------------|----------------------------|
| <b>Anticorps monoclonaux</b>          | Rituximab (Rituxan™)                   | Leucémie lymphocytaire chronique | Genentech (Roche), Biogen Idec | 1997                       |
|                                       | Trastuzumab (Herceptin™)               | Cancer du sein                   | Genentech (Roche)              | 1998                       |
|                                       | Alemtuzumab (Campath™)                 | Leucémie lymphocytaire chronique | Genzyme                        | 2001                       |
|                                       | Omalizumab (Xolair™)                   | Asthme allergique                | Genentech (Roche)              | 2003                       |
|                                       | Bevacizumab (Avastin™)                 | Cancer colorectal                | Genentech (Roche)              | 2004                       |
|                                       | Panitumumab (Vectibix™)                | Cancer colorectal                | Amgen                          | 2006                       |
|                                       | Tocilizumab (Actemra™)                 | Arthrite rhumatoïde              | Chugai/Roche                   | 2010                       |
| <b>Autres produits thérapeutiques</b> | Activateur de plasminogène (Activase™) | Infarctus aigu du myocarde       | Genentech                      | 1987                       |
|                                       | Erythropoïétine (Epogen/Procrit™)      | Anémie                           | Amgen/Ortho Biotech            | 1989                       |
|                                       | Interféron $\beta$ (Avonex™)           | Sclérose en plaques              | Biogen Idec                    | 1996                       |
|                                       | Factor VIII (ReFacto™)                 | Hémophilie A                     | Wyeth                          | 2000                       |
|                                       | Erythropoïétine (Aranesp™)             | Anémie                           | Amgen                          | 2001                       |
|                                       | Hormone lutéinisante (Luveris™)        | Infertilité                      | Serono                         | 2004                       |

**Avantage :** Les cellules animales permettent l'obtention de protéines complexes et parfaitement glycosylées car elles possèdent la machinerie nécessaire à la réalisation des modifications post-traductionnelles humaines. De plus elles sont parfaitement adaptables à la culture en masse et leur physiologie est bien connue (Omasa *et al.*, 2010).

**Inconvénients :** La culture de cellules animales coûte cher, tant au niveau de son développement qu'au niveau des consommables utilisés. Les cellules mammaliennes sont exigeantes et nécessitent le maintien de conditions constantes (température, pH, O<sub>2</sub> dissous, etc.) et des milieux de culture de composition complexe. Les rendements demeurent moins importants que ceux obtenus avec les bactéries et les levures, de l'ordre de 5 à 10 mg/L mais de nouvelles techniques ont permis d'améliorer plus de 20 fois le rendement de production (Almo & Love, 2014).

Chaque système possède ses avantages et ses inconvénients lesquels sont résumés dans le tableau 4 ci-contre.

**Tableau 4 - Avantages et inconvénients des systèmes de production.** (d'après Olivier and Mehtali 2009)

|                         | Temps de génération du clone producteur | Capacité de production | Glycosylation | Activité ADCC | Sécurité biologique |
|-------------------------|---|------------------------|---------------|---------------|---------------------|
| Bactéries               | ++++                                    | +                      | -             | -             | ++++                |
| Levures                 | ++++                                    | ++                     | +             | -             | ++++                |
| Champignons filamenteux | ++                                      | ++                     | +             | -             | ++++                |
| Cellules d'insectes     | ++                                      | +                      | ++            | +             | ++++                |
| Plantes transgéniques   | +                                       | ++++                   | ++            | ++            | ++++                |
| Animaux transgéniques   | +                                       | ++++                   | +++           | ++++          | +++                 |
| Cellules aviaires       | ++                                      | ++                     | ++++          | ++++          | ++++                |
| Cellules de mammifères  | ++                                      | +++                    | ++++          | ++            | +++                 |

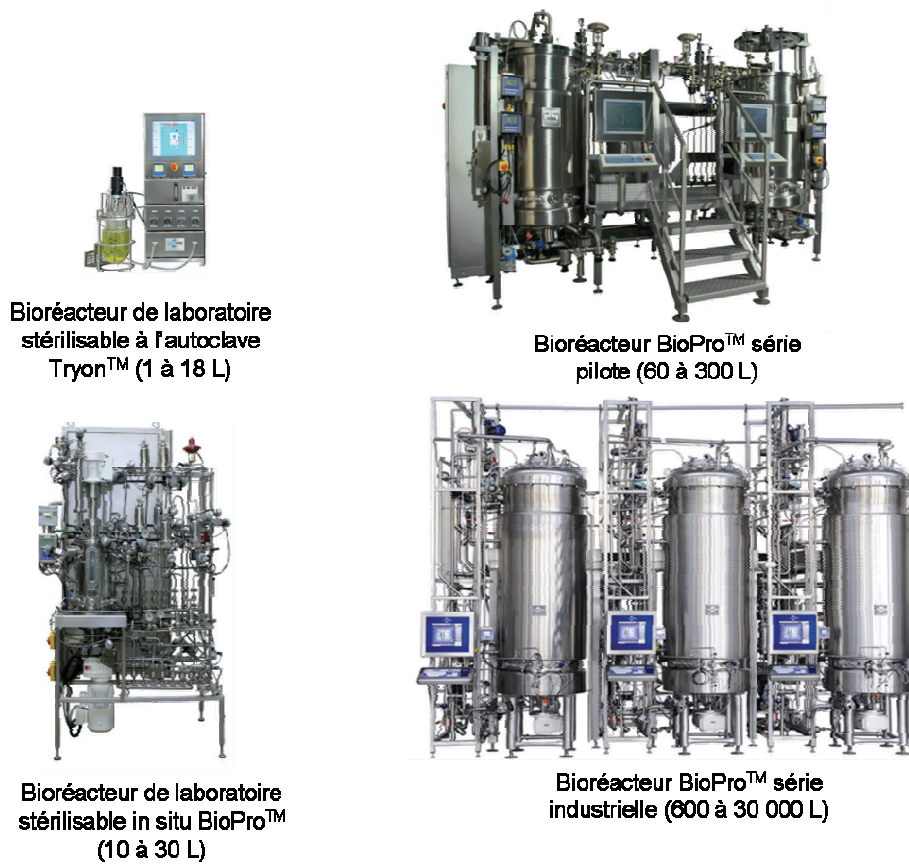
## 3.2. Les procédés de culture cellulaire

Des cultures en bioréacteurs à grande échelle ont été développées pour satisfaire la demande en cellules (biomasse), en protéines recombinantes et en métabolites cellulaires, afin de produire plus vite et à moindre coût, tout en améliorant la qualité de la production (Olivier & Mehtali, 2009). Aujourd'hui ils sont presque exclusivement basés sur des systèmes de production mammaliens.

### 3.2.1. Les bioréacteurs

Un bioréacteur constitue l'unité de production de prédilection des industriels. Le plus souvent ils sont en verre pour une utilisation à la paille, mais pour des productions plus conséquentes ils sont en inox. Dans une plateforme de production, son instrumentation est complexe et doit permettre le contrôle des différents paramètres de culture, tels que la température, le taux d'oxygène dissous, le pH ou encore le débit d'alimentation (Zhu, 2012 p.20). Il existe différents types de bioréacteurs pour la bioproduction qui sont en perpétuelle évolution, afin de diminuer les impacts négatifs des cultures à grande échelle sur les cellules et les produits d'intérêts.

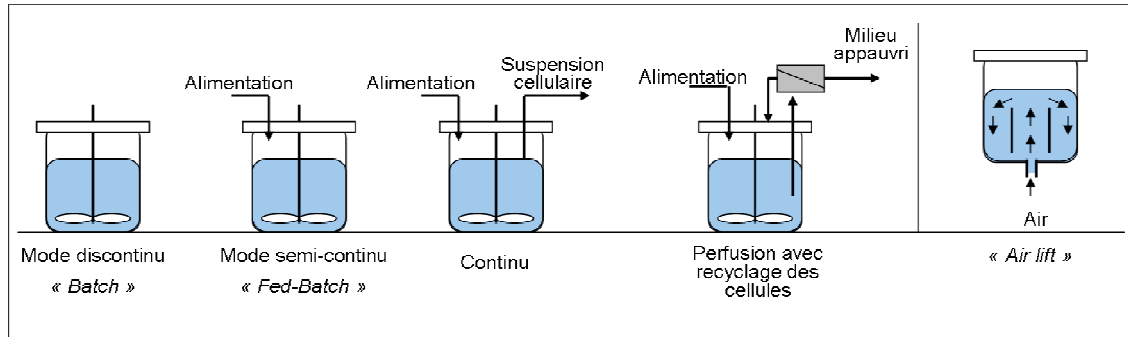
La figure 16, représente des exemples de bioréacteurs en fonction de l'échelle de travail.



**Figure 16 - Exemples de bioréacteurs de laboratoire, pilote et industriel.** (d'après <https://cdn.reseau-canope.fr/archivage/valid/156608/156608-23236-29416.pdf>)

Les industriels travaillent notamment sur l'optimisation des échanges gazeux et sur l'amélioration de la composition des milieux, et tentent de limiter l'accumulation des déchets cellulaires. Il est par ailleurs préférable d'utiliser des milieux définis avec une composition connue, que des milieux à base de sérum. Ces derniers contiennent des mélanges de protéines variables d'un lot à l'autre et constituent un risque de contaminations par des mycoplasmes ou par des virus (Wessman & Levings, 1998). Le choix du modèle cellulaire va aussi être primordial, c'est pour cela que les plateformes de production s'orientent vers l'utilisation d'organismes cultivables en suspension afin d'optimiser la surface cultivable et diminuer le coût de production.

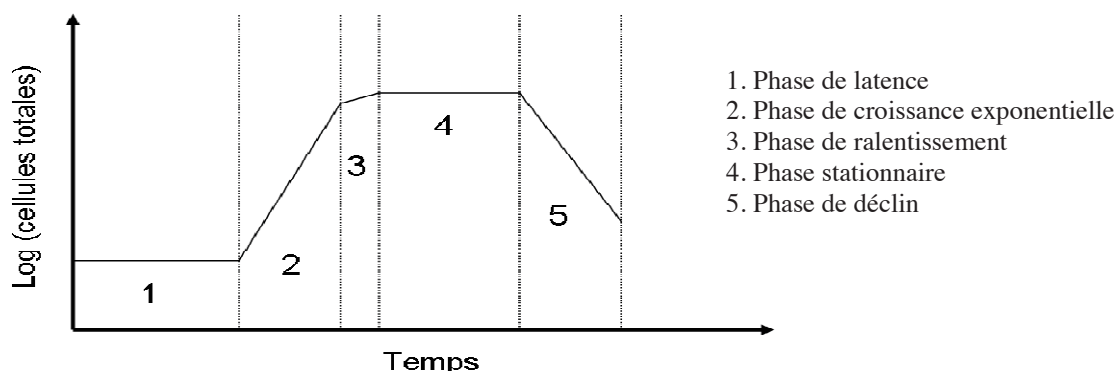
Différents systèmes de culture en agitation ont été développés pour la mise au point du procédé de production et pour l'industrialisation (Figure 17). Ils diffèrent notamment par leur type d'alimentation en substrat mais aussi par leur mode d'agitation.



**Figure 17 - Les modes de culture en bioréacteurs** (Adapté de “Improving Productivity in Bioreactors | GEN Magazine Articles” 2015)

### 3.2.1.1. Les modes d'alimentation des bioréacteurs à pâles

**La culture en batch :** Il s'agit d'un mode de culture en milieu non renouvelé. C'est le plus simple des procédés de culture en bioréacteurs qui présente aussi l'avantage d'être peu coûteux. Le milieu est ajouté dans le bioréacteur avec les cellules et rien n'est prélevé ou ajouté pendant la culture. Cela présente un important désavantage car il ne va pas y avoir d'apport en nutriments mais plutôt une accumulation des déchets cellulaires qui peuvent s'avérer toxique pour les cellules (Kretzmer, 2002). Avec ce mode de culture le profil des courbes de croissance cellulaire est caractéristique pour les bactéries, les levures, les cellules animales et végétales, avec 5 phases bien distinctes (Figure 18).



**Figure 18 - Schématisation d'une courbe de croissance cellulaire en mode batch.**

Pour ce type de culture, on observe une phase de latence après l'ensemencement, qui correspond à la période nécessaire aux cellules pour s'adapter à leur environnement et commencer la synthèse d'enzymes nécessaires à l'assimilation du substrat. Ensuite la

population cellulaire va croître de façon exponentielle en fonction du temps, pour atteindre son maximum appelé  $\mu$  max, puis ralentir. S'en suit la phase stationnaire pendant laquelle la population cellulaire va stagner par compensation entre les cellules qui meurent et celles qui se multiplient, les ressources énergétiques s'amointrissent et les déchets cellulaires s'accumulent jusqu'à atteindre des doses létales qui vont se traduire par une mortalité cellulaire accrue (phase de déclin).

Cette méthode de culture est principalement utilisée pour la mise au point et le développement des systèmes de production (*i.e.*, efficacité de transfection, stabilité du clone, productivité). Elle va aussi servir de tremplin pour le développement de plateformes de production de biomasse cellulaire.

**La culture Fed-batch :** Au début du processus, le volume de culture est réduit par rapport à la culture en batch et va être augmenté proportionnellement à la croissance cellulaire pour que le substrat ne soit jamais limitant. Avec cette technique la croissance reste exponentielle jusqu'à atteindre le volume maximal de la cuve. Cette alimentation semi-continue permet une composition du milieu au cours de la culture (Lubiniecki, 1990). Elle est utilisée en biotechnologie pour la production de cellulases par des souches de champignons filamenteux.

**Les cultures chémostat et perfusion :** Il s'agit de procédés de culture en « continu ». Pour le chémostat, lorsque la concentration cellulaire définie est atteinte (phase stationnaire), du milieu va être ajouté et retiré à un débit équivalent afin de maintenir un volume constant. Avec ce dispositif il n'est donc pas nécessaire de vider la cuve. Il demeure néanmoins un risque de survenue de mutations et/ou de contaminations nécessitant une vidange complète de la cuve. Cependant cela n'en reste pas moins un procédé productif.

Un dérivé de cette technique, le procédé en perfusion, entretient un changement de milieu perpétuel tout en recyclant la biomasse (Lubiniecki, 1990). Il va présenter l'avantage de limiter la possible toxicité des protéines produites mais aussi d'éviter la dégradation du produit lui-même. Pour des productions importantes, les modes en continu constituent les procédés de choix.

Chaque système de production présente des avantages et des inconvénients. Le choix d'un système en particulier se fera donc en fonction du type cellulaire, et de la faisabilité sur les plans économique et technique. Le système idéal doit être rentable, fiable et contrôlé ; il doit aussi favoriser le développement de la biomasse avec une forte viabilité, et pour finir il

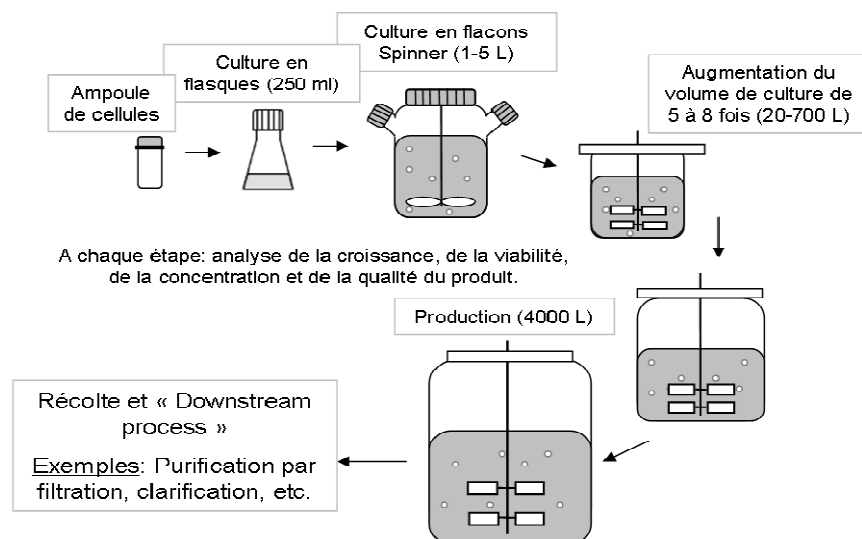
doit permettre d'obtenir un produit de haute qualité, avoir un fort rendement (Kretzmer, 2002).

### 3.2.1.2. Les bioréacteurs « Airlift »

Ces bioréacteurs permettent de cultiver les cellules dans un milieu simultanément agité et aéré, à l'aide d'un flux d'air injecté par le fond de la cuve. Pour que ce système assure un bon transfert d'oxygène, le diamètre de la cuve doit être inférieur à sa hauteur. Les cultures Air lift sont principalement réalisées avec des cellules d'insectes ou des cellules de mammifères (Molina Grima *et al.*, 1997). Ce système est cependant moins couramment utilisé que les systèmes agités.

### 3.2.2. Paramètres influents un procédé de production

Afin de pouvoir répondre à la demande mondiale, les industriels doivent être en mesure d'établir rapidement le processus de production à grande échelle. En général il s'agit d'une production en masse à partir de bio-fermenteurs de taille importante de 2000 à 25000 litres avec des productions menées en parallèle à des échelles moins importantes pour prévenir d'éventuelles contaminations (Chartrain & Chu, 2008). Le développement d'un procédé de production repose sur trois points principaux : 1/ la recherche au laboratoire avec l'optimisation du système de production hôte/produits d'intérêt, 2/ Le changement d'échelle « scale-up » puis 3/ la production (Figure 19).



**Figure 19 - Représentation schématique des différentes étapes du processus (Upstream) du développement de la culture à grande échelle « Scale-up ».** (adapté de Omasa, Onitsuka, and Kim 2010)

### 3.2.2.1. Paramètres physicochimiques

**Le pH :** Pour cultiver les cellules dans de bonnes conditions elles doivent être cultivées à un pH identique à celui retrouvé *in vivo*. Par exemple les levures sont cultivées à un pH compris entre 4,6 et 6 alors que les cellules animales, comme les CHO, préfèrent un pH aux alentours de 7,2. L'activité métabolique cellulaire va induire des variations de pH qui vont pouvoir être régulées par ajout de solutions basiques et acides dans le milieu ou bien par bullage de CO<sub>2</sub>.

**Le dioxyde de carbone dissous :** Le quotient de respiration, moles de CO<sub>2</sub> produites par moles d'O<sub>2</sub> consommées, des cellules de mammifères serait entre 0,9 et 1,2. Des pressions en CO<sub>2</sub> (pCO<sub>2</sub>) entre 150-200 mm Hg sont retrouvées dans des cultures oxygénées, ce qui est environ cinq fois supérieur à celles retrouvées dans l'organisme. De telles concentrations en CO<sub>2</sub> auraient un impact sur la prolifération et la production des hybridomes et des cellules animales CHO, NS0, BHK et les cellules d'insectes (deZengotita *et al.*, 2002; Li *et al.*, 2010). En solution, le CO<sub>2</sub> permet de réguler le pH en l'acidifiant *via* la réaction :  $\text{CO}_2 + \text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{H}_2\text{CO}_3 \rightarrow \text{HCO}_3^- + \text{H}^+ \rightarrow \text{CO}_3^{2-} + 2\text{H}^+$

Le CO<sub>2</sub> dissous peut-être mesuré à l'aide d'une sonde de type InPro 500 (INGOLD) qui permet une mesure en continue. Son principe repose sur la mesure de variation de pH occasionnée par le CO<sub>2</sub> qui réagit avec les ions bicarbonates situés dans la sonde. L'équilibre va s'établir avec libération d'ion H<sup>+</sup> excédentaires qui vont acidifier le corps interne de la sonde et dont la mesure est effectuée à l'aide d'une électrode pH.

**L'oxygène dissous :** Le maintien d'un niveau d'oxygène dissous constant est indispensable pour la survie des cellules dans un fermenteur. Il doit cependant être ajouté dans le milieu avec précaution car il peut être responsable d'un déséquilibre acido-basique cellulaire conduisant à la formation de ROS (Heidemann *et al.*, 1998). Pour des procédés de production en grande quantité il est difficile d'oxygéner le milieu de manière homogène car l'oxygène est un gaz peu soluble. Si le taux d'oxygène dissous est trop faible cela conduit à la formation de lactate en quantité cytotoxique et une quantité trop élevée peu, en plus d'être toxique pour les cellules, détériore le produit lui-même. Afin de répartir l'oxygène apporté par le bullage, les bioréacteurs sont équipés de systèmes d'agitation radiale ou axiale. L'oxygène disponible pour les cellules va être sensiblement lié à la taille et à la quantité des bulles.



**L'osmolarité :** La plupart des milieux de culture sont préparés pour avoir une osmolarité comprise entre 270 et 330 mOsm/Kg (nombre de millimoles de particules à activité osmotique par Kg de solution). L'osmolarité de la culture est un paramètre mesuré en routine à l'aide d'un osmomètre qui va mesurer le point de congélation. Des appareils sont commercialisés à cet effet. Une osmolarité trop importante peu limiter la croissance cellulaire et donc affecter la productivité (deZengotita *et al.*, 2002).

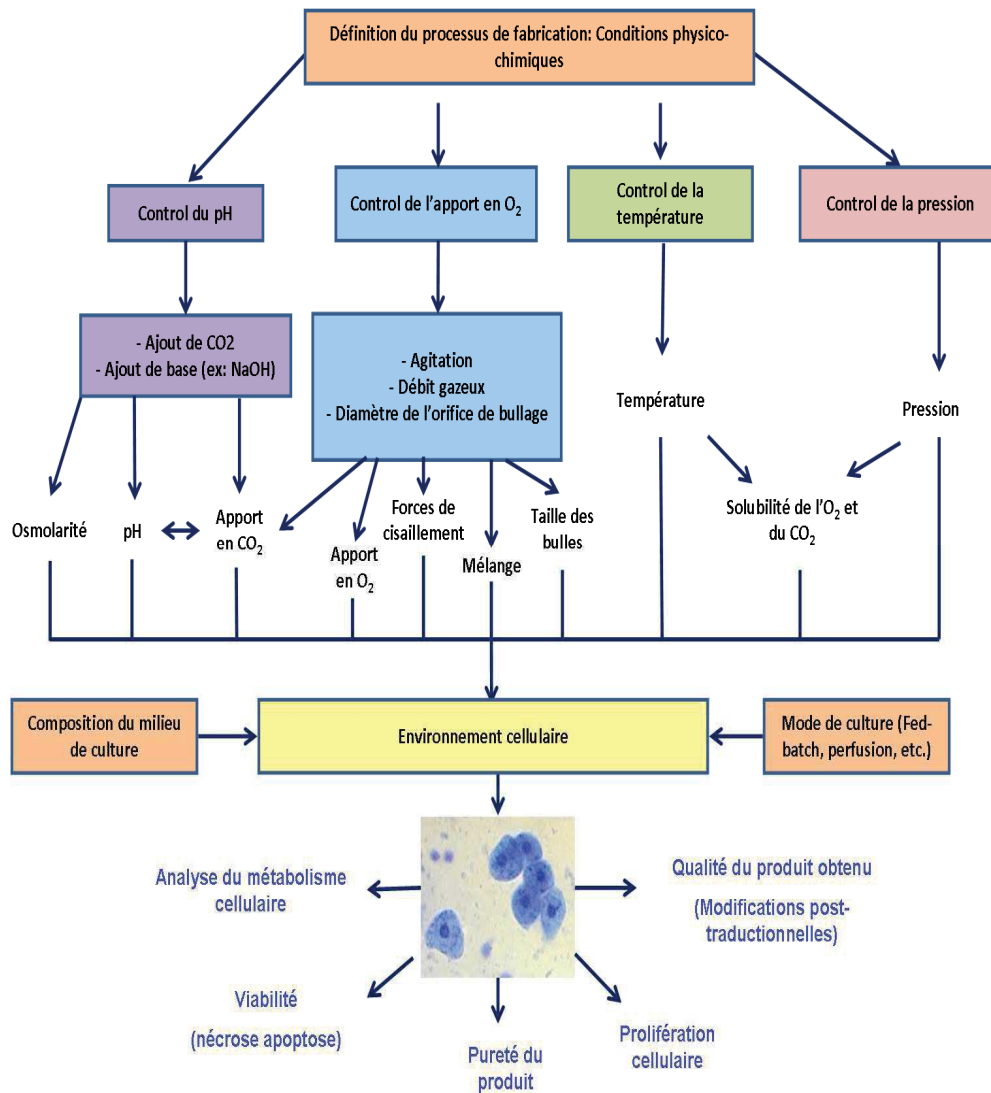
**La température :** La température de culture est dépendante du type cellulaire, par exemple il est préférable de cultiver les CHO à une température de 37°C alors que pour les levures il est préférable de se placer aux alentours de 26°C. La température est maintenue constante à l'aide de capteurs directement reliés à un régulateur thermique. Une variation doit pouvoir être corrigée dans les plus brefs délais pour ne pas impacter la biomasse. Car une température trop faible ou trop forte va respectivement ralentir la croissance ou tuer les cellules.

**Le stress hydrodynamique :** L'agitation de la suspension cellulaire va induire un stress hydrodynamique aux conséquences néfastes pour les cellules (Barbouche, 2015. Th.D). Le plus souvent les dispositifs utilisent un système d'agitation à turbine ou à hélice. L'utilisation d'un système de turbine permet une agitation radiale à laquelle les cellules animales sont sensibles. Il est plutôt utilisé pour des systèmes bactériens tandis que l'agitation à hélice (axial) est préférable pour les systèmes mammaliens. L'objectif de ces dispositifs est de favoriser la diffusion des gaz (O<sub>2</sub> et CO<sub>2</sub>) et des nutriments dans l'intégralité de la cuve en évitant la formation de gradients de concentrations et en maintenant une suspension cellulaire homogène. L'efficacité de la turbine à disperser le débit d'air injecté sous forme de bulles de la plus petite taille possible doit être évaluée afin d'éviter un manque ou un engorgement gazeux.

### **3.2.3. Méthode pour caractériser la mort cellulaire en bioréacteur**

Au cours de la production à grande échelle, il n'est pas rare de devoir faire face au problème de la mort cellulaire. Les différents paramètres cités précédemment peuvent en être la cause. Il faut réussir à identifier le ou les paramètres impliqués pour pouvoir limiter ce phénomène. Cependant il s'agit en général d'un épuisement en ressource énergétique, une accumulation des sous-produits métaboliques, un stress physique ou une quantité d'O<sub>2</sub> dissous inadéquat. Quoi qu'il en soit il faut pouvoir identifier à quelle étape du processus l'un de ces

paramètres devient létal (Figure 20). La culture en mode fed-batch et celle en perfusion ne sont pas concernées par le manque de nutriments puisqu'il y a un apport de milieu pendant la culture qui va aussi réguler le pH.



**Figure 20 - Paramètres d'un processus de culture cellulaire pouvant affecter l'interaction des cellules avec leur environnement et donc la performance et la qualité de la production.**

De nombreuses techniques sont utilisées pour caractériser la mort cellulaire au cours de la culture dont certaines sont brièvement présentées ci-après :

**Colorant d'exclusion :** Il s'agit d'une technique de microscopie qui consiste à incuber la suspension cellulaire avec un colorant vital, le bleu Trypan, qui est exclu des cellules saines mais qui va pouvoir pénétrer dans les cellules altérées et apoptotiques. Il va ainsi les colorer en bleu tandis que les cellules viables vont rester incolores. Les cellules sont ensuite

observées et dénombrées le plus souvent à l'aide d'une cellule de numération de type Mallassez ou Thoma. Ce colorant présente une cytotoxicité qui implique de réaliser cette analyse dans un temps réduit sous peine de biaiser le résultat. De plus, cette technique permet uniquement de distinguer les cellules vivantes des cellules mortes.

**Méthode nucléaire au « Dapi » :** Le DAPI (4',6'-diamidino-2-phenylindole) est un agent fluorescent couramment utilisé pour marquer les noyaux cellulaires en microscopie à fluorescence. Il permet de pouvoir visualiser les cellules en se fixant aux Adénosine-Thymidine de l'ADN et aussi d'observer la conformation du noyau lequel apparaît fragmenté en corps nucléaire en cas d'apoptose (Figure 21). Cette méthode est uniquement qualitative et très peu utilisée pour chiffrer la viabilité.



**Figure 21 - Exemple de marquage nucléaire au DAPI**

**Cytométrie en flux :** C'est une technique multiparamétrique qui permet d'identifier différentes populations cellulaires au sein d'une suspension en se basant sur la taille, la granulosité et des marquages fluorescents. Elle est couplée à des lasers qui vont permettre d'évaluer quantitativement la présence de marqueurs membranaires présents pour une population donnée. A cet effet, la suspension cellulaire est préalablement incubée avec des anticorps couplés à des fluorochromes. Pour l'analyse de la mort cellulaire il y a le système qui utilise un marquage à l'iodure de propidium (IP) et à l'Annexine V couplée à l'Isothiocyanate de fluorescéine (AnV-FITC). L'IP est un agent intercalant de l'ADN qui fluoresce dans le rouge (Excitation/Emission : 536nm/617nm) et le FITC, un fluorochrome qui fluoresce dans le vert (Excitation/Emission : 495nm/519nm). Dans le principe, l'Annexine V va se lier spécifiquement aux motifs Phosphatidylsérines qui sont externalisés à la membrane des cellules en apoptose ou en nécrose précoce. L'IP va se fixer spécifiquement à l'ADN des cellules qui ont perdu leur intégrité membranaire, considérées comme étant en phase tardive d'apoptose ou en nécrose. Les cellules AnV-/IP- sont considérées comme

vivantes, AnV+/IP- comme en début d'apoptose et AnV+/IP+ comme en nécrose (ou apoptose avancée).

**Dosage de la lactate déshydrogénase :** La lactate déshydrogénase (LDH) est une enzyme de la classe des oxydoréductases qui catalyse la conversion du lactate en pyruvate. Elle est généralement utilisée comme marqueur des dommages tissulaires et est excrétée dans le système sanguin dans certains types de pathologies comme le cancer. *In vitro*, elle permet de quantifier en même temps les cellules nécrotiques et les cellules apoptotiques, par mesure de la quantité de LDH libérée dans le milieu.

Pour doser l'activité LDH, un échantillon de milieu est prélevé puis incubé avec le substrat de l'enzyme, l'acide lactique. La LDH va réduire ce dernier en pyruvate avec formation de NADH, H<sup>+</sup> (Nicotinamide adénine dinucléotide). Cette coenzyme est un agent de réduction qui va pouvoir réagir avec la seconde réaction en réduisant le réactif coloré (jaune) en sa forme réduite (rouge) (Figure 22). La mesure d'absorbance est réalisée avec un spectrophotomètre, à une longueur d'onde comprise entre 450 et 500 nm. Cette technique présente l'avantage de prendre en compte aussi bien les cellules apoptotiques que les cellules mortes et éclatées. Cependant, la demi-vie de l'enzyme est d'environ 10h dans le milieu de culture et il faut tenir compte de la perte d'activité lors de l'analyse des résultats s'il s'agit d'une analyse portant sur plusieurs jours (Minor, 2006).

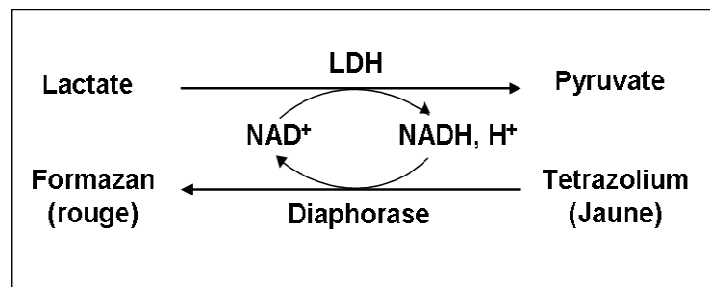
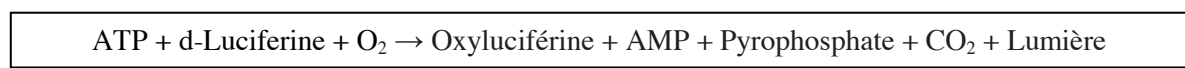


Figure 22 - Principe de la réaction du dosage de l'activité LDH

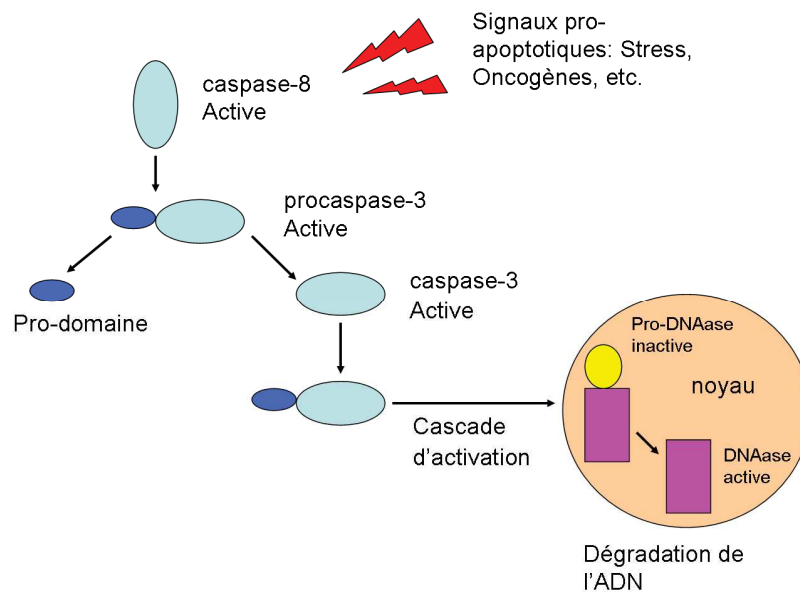
**Mesure de l'ATP cellulaire :** Lorsque les cellules perdent leur intégrité membranaire elles perdent aussi leur aptitude à synthétiser de l'ATP. Le dosage de l'ATP cellulaire à un instant T va donc permettre d'évaluer la viabilité cellulaire car seules les cellules vivantes produisent de l'ATP. Les ATPases endogènes auront détruit la totalité de l'ATP des cellules apoptotiques.

Cette méthode utilise la luciférase pour catalyser la réaction de dosage suivante :



La luminescence est mesurée à 560 nm. L'ATP cellulaire doit être extraite préalablement à l'analyse, par lyse cellulaire. Ce dosage est rapide et très sensible (Fan & Wood, 2007).

**Dosage de l'activité caspase :** Les caspases (Cysteine-dépendant Aspartate-cleaving Proteases) sont des protéases impliquées dans les mécanismes de régulation de la mort cellulaire programmée, l'apoptose. Elles sont regroupées en sous familles en fonction de leurs fonctions et de leurs structures. Le plus souvent au laboratoire c'est l'activité de la caspase 3 (groupe III) qui est mesurée pour la mise en évidence de l'apoptose. Cependant il est aussi possible d'étudier l'activation des caspases 8 ou 9 pour préciser les voies apoptotiques activées, intrinsèques ou extrinsèques. La caspase 3 est une caspase dite effectrice comme le sont également les caspases 6 et 7. Elle est impliquée dans la mise en place de la signalisation apoptotique. Ce sont les caspases initiateuses qui vont permettre en amont, d'activer les caspases du groupe III afin qu'elles puissent agir sur des protéines kinases impliquées par exemple dans la réparation de l'ADN, la régulation du cycle cellulaire ou l'apoptose (Figure 23).



**Figure 23 - Exemple de réaction caspase-dépendante impliquée dans le processus apoptotique.** La caspase-8 (initiatrice) va cliver le prodomaine de la caspase-3 et ainsi la rendre active. Cette dernière va engendrer l'activation en cascade de protéases aboutissant à l'activation de DNases nucléaires qui vont dégrader l'ADN et jouer un rôle dans l'induction du processus apoptotique.

L'activité caspase peut être mise en évidence par western blot ou par mesure de l'activité enzymatique, en ajoutant des substrats fluorescents.

### 3.2.4. Comment lutter contre les contraintes liées à l'oxygénation ?

L'un des principaux challenges pour les industriels consiste actuellement à trouver des stratégies d'aération pouvant satisfaire la demande en oxygène tout en limitant les dommages cellulaires causés par le bullage. Pour augmenter le transfert de l'oxygène il est possible d'accélérer le débit d'aération, d'augmenter la solubilité de l'O<sub>2</sub> dissous ou d'accélérer la vitesse d'agitation des pales. Le taux de transfert en oxygène (OTR pour Oxygen Transfer Rate) au sein du bioréacteur est un paramètre essentiel pour évaluer l'efficacité de l'oxygénation (Figure 24).

The diagram shows the formula  $OTR = K_L a (C^* - C_L)$  in a box, with units  $mmol L^{-1} h^{-1}$  to its right. Below the box, two groups of factors are listed with arrows pointing to the  $K_L a$  term. The left group includes: Géométrie du récipient, Propriétés du fluide, Taille des bulles, and Agitation. The right group includes: Température, Pression, and [sels]. Below these are definitions for  $K_L a$ ,  $C^*$ , and  $C_L$ .

**OTR =  $K_L a (C^* - C_L)$   $mmol L^{-1} h^{-1}$**

Géométrie du récipient  
Propriétés du fluide  
Taille des bulles  
Agitation

Température  
Pression  
[sels]

**$K_L a$  = Coefficient volumique de transfert de l'O<sub>2</sub> ( $h^{-1}$ )**  
( $K_L$ : Coefficient de transfert  $cm.h^{-1}$ ;  $a$ : Rapport surface volume  $cm^2/cm^3$ )

**$C^*$  = Concentration en O<sub>2</sub> à l'interface gaz-liquide (mole O<sub>2</sub>/L)**

**$C_L$  = Concentration en O<sub>2</sub> dans l'eau (mole O<sub>2</sub>/L)**

Figure 24 - Formule pour le calcul de la diffusion de l'oxygène : « Oxygen Transfer Rate ».

La dissolution de l'oxygène dans le milieu est relativement lente et dépend notamment de la surface de l'interface gaz/liquide. Pour améliorer la diffusion de l'O<sub>2</sub> dans un bioréacteur, il va être injecté en fines bulles dans le milieu en agitation.

Bien que les systèmes d'agitation soient nécessaires à la diffusion de l'oxygène dans le bioréacteur, ils présentent néanmoins des inconvénients. Lorsqu'elle est pratiquée dans un milieu de culture oxygéné, l'agitation va produire de la mousse qui va dans certains cas entraîner un débordement et donc une perte de biomasse et de produits. Des agents anti-mousses peuvent alors être utilisés mais ils vont limiter le transfert d'oxygène (ex : Le propylène glycol et le silicone). Dans une étude de 1990, Kurano et son équipe ont mis en évidence pour leur lignée de CHO non-adhérente, que le pH ainsi que l'O<sub>2</sub> dissous étaient les deux paramètres les plus déterminants pour la survie, la prolifération et la productivité cellulaire (Kurano *et al.*, 1990).

Actuellement le pH n'est plus un facteur limitant pour la production de cellules ou de protéines puisqu'il est facilement contrôlé. Cependant, les techniques visant à améliorer la diffusion de l'oxygène sans altérer les cellules ne sont pas encore suffisamment développées.

L'idéal serait d'utiliser un système qui serait moins létal que l'injection par bullage et qui serait sensible naturellement aux variations d'oxygène dissous. Des tentatives d'encapsulation de gaz dans des polymères ont été initiées mais se sont finalement avérées insatisfaisantes car les particules oxygénées fixaient massivement les protéines sécrétées (Seth *et al.*, 2006). L'idéal serait de pouvoir alimenter les bioréacteurs par gradient d'oxygène en fonction des besoins cellulaires sans altérer le rendement et la viabilité cellulaire. Les transporteurs d'oxygènes de type hémoglobines semblent remplir ce cahier des charges.

### **3.3. La culture de cellules thérapeutiques.**

#### **3.3.1. Exemple d'application en thérapie cellulaire**

La thérapie cellulaire est un domaine qui utilise des cellules souches ou des cellules différenciées, pour soigner un tissu ou un organe endommagé. Il s'agit d'une greffe de cellules ayant pour rôle de remplacer ou d'assister les cellules lésées.

Il y a 4 grandes catégories de cellules candidates :

1/ **Les cellules souches adultes**, comme les cellules souches mésenchymateuses (CSM) et les cellules souches hématopoïétiques (CSH), sont les plus utilisées. Les CSM peuvent régénérer le cartilage, l'os, le foie ou encore les muscles. Elles sont directement issues du patient puis cultivées *in vitro* pour être réinjectées. La société Israélienne Pluristem Therapeutics, a développé des produits thérapeutiques à base de sang placentaire, les cellules PLX (PLacenta eXpanded). Ils utilisent une technologie permettant d'amplifier les cellules souches placentaires en système 3D en absence de sérum. Trois essais cliniques sont en cours, pour le traitement de maladies de l'artère périphérique, pour l'hypertension artérielle et les blessures musculaires.

Le produit Prochymal® (Mesoblast) est le tout premier médicament à base de cellules souches humaines à avoir reçu une autorisation de mise sur le marché. Il est actuellement en essai clinique de phase III pour la réaction aigüe du greffon contre l'hôte, avec des résultats très encourageants. Un second essai de phase III est en cours pour la maladie de Crohn ainsi que deux autres essais de phase II, pour le diabète de type I et l'infarctus aigu du myocarde (Dodson & Levine, 2015). Prochymal® est composé de cellules souches de moelle osseuse de

donneurs sains. Après amplification *in vitro*, 10 mille doses peuvent être générées à partir d'un seul don (Pollack, 2012). L'unité de thérapie cellulaire du Centre de Transfusion Sanguine des Armées (CTSA, France) a associé l'injection de cellules souches mésenchymateuses au traitement classique des brûlures par irradiation. Les résultats obtenus ont démontré la capacité des CSM à favoriser l'intégration du greffon et à limiter la nécrose tissulaire. En stimulant les CSM, ils obtinrent 180 millions de cellules en 14 jours à partir d'un prélèvement de moelle de 10 ml, qu'ils injectèrent en complément de l'autogreffe de peau (Bey *et al.*, 2010).

Au niveau Européen, le produit Holoclar® (Holostem Advanced Therapies) est le premier produit thérapeutique à base de « cellules médicaments » à avoir été autorisé sur le marché. Il est commercialisé depuis février 2015. Ce dernier est indiqué pour soigner la cornée et est composé de cellules épithéliales de cornée obtenues après expansion et différenciation *ex vivo* de cellules souches limbiqes du patient (<http://www.ema.europa.eu/>).

Les CSH peuvent être utilisées pour soigner des maladies malignes du sang ou encore des déficiences immunitaires. Elles sont administrées par greffe de moelle osseuse totale depuis les années 80. Elles peuvent aussi être infusées en autologue ou allogénique pour rétablir les fonctions hématopoïétiques défectueuses des patients. Ces cellules souches sont généralement issues de sang de cordon, de moelle osseuse ou de sang circulant (Passweg *et al.*, 2010).

2/ **Les cellules souches embryonnaires (CSE)** sont aussi très intéressantes car elles peuvent être induites en toutes sortes de tissus. Le centre de recherche et de développement spécialisé en thérapie cellulaire, l'I-STEM, produit des CSE de grade clinique. Il réalisa en 2014 un essai clinique sur la régénération de l'épiderme et en 2015 il a lancé un nouvel essai clinique pour régénérer la rétine dans le cas de dégénérescence maculaire liée à l'âge (DMLA). La société américaine Ocata Therapeutics œuvre elle aussi à soigner cette maladie et travaille par ailleurs sur la différenciation en cellules épithéliales pigmentaires de la rétine pour la dystrophie maculaire de Stargardt. Une autre boîte Américaine, ViaCyte, utilise les CSE pour générer des cellules de pancréas productrices d'insuline.

3/ **Les cellules souches pluripotentes induites**, iPS pour induced pluripotent stem cells, sont des cellules adultes (ex : fibroblastes) génétiquement reprogrammées en cellules



pluripotentes. Ces dernières sont encore peu utilisées en thérapie en raison des modifications génétiques occasionnées, qui présentent un risque sanitaire. Un essai pilote a été mené avec succès au Japon sur une patiente de 70 ans atteinte de DMLA. Les iPS administrées dérivait de cellules de la rétine de la patiente (Chen *et al.*, 2014).

4/ Les cellules différenciées peuvent être utilisées comme alternative aux cellules souches. Elles sont administrées en autologue ou en allogénique (Tableau 5). La FDA a autorisé la mise sur le marché de produits thérapeutiques à base de cellules issues de biopsie effectuée chez le patient lui-même. Les cellules sont cultivées *in vitro* et greffées telles quelles (Epicel®, Vericel) ou insérées dans une matrice (Carticel®, vericel).

**Tableau 5 - Exemples de produits de thérapie cellulaire approuvés par la FDA.** (d’après Dodson & Levine 2015)

| Produit     | Société       | Type de greffe | Source cellulaire   | Indication clinique                               |
|-------------|---------------|----------------|---|---|
| Epicel®     | Vericel       | Autologue      | Peau  | Brûlures dermiques profondes                      |
| Carticel®   | Vericel       | Autologue      | Cartilage   | Défauts cartilagineux                             |
| Provenge®   | Valeant       | Autologue      | Cellules immunitaires   | Cancer avancé de la prostate                      |
| Apligraf®   | Organogenesis | Allogénique    | Cellules de peau dérivées de fibroblastes néonataux de prépuce  | Ulcères veineux de la jambe et du pied diabétique |
| Dermagraft® | Organogenesis | Allogénique    | Cellules de peau dérivées de fibroblastes néonataux de prépuce  | Ulcères du pied diabétique                        |
| Osteocel®   | NuVasive      | Allogénique    | Cellules souches mésenchymateuses & cellules ostéoprogénitrices | Régénération osseuse                              |
| Prochymal®  | Mesoblast     | Allogénique    | Cellules souches mésenchymateuses de moelle osseuse             | La réaction du greffon contre l’hôte (GVH)        |

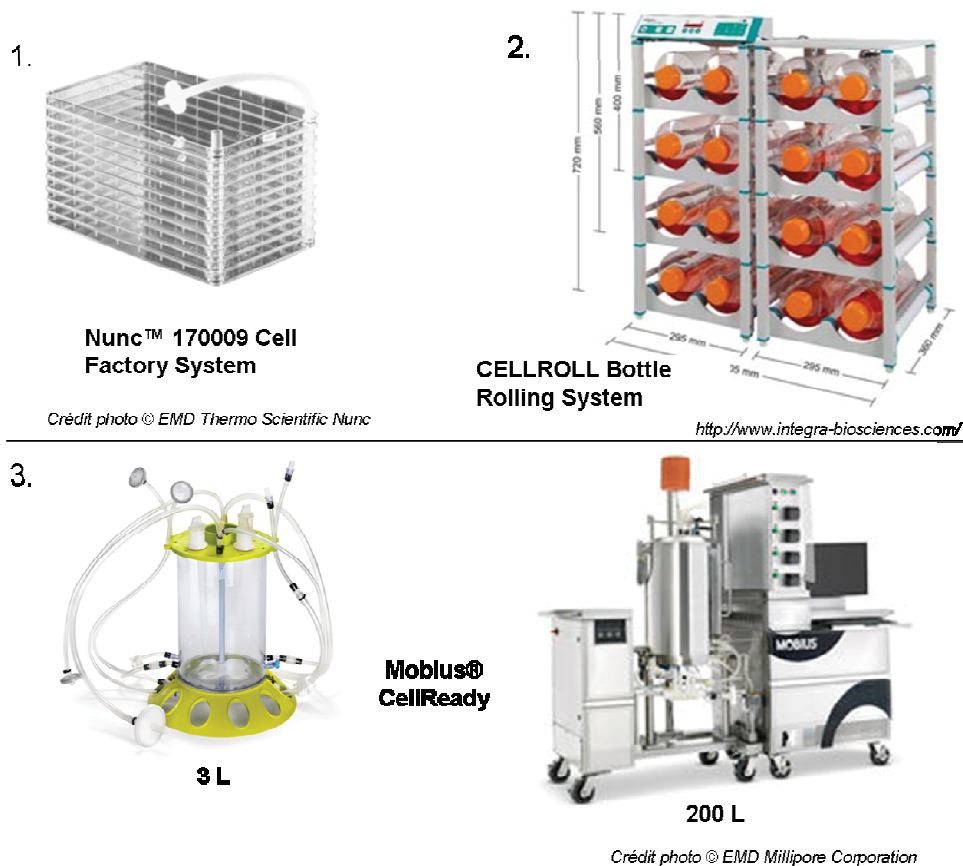
Certaines greffes allogéniques sont administrées en spray à partir d'un mélange de fibroblastes et de kératinocytes provenant de prépuces de nouveau-nés après circoncision, combinés à du collagène bovin (Apligraf® et Dermagraft®, Organogenesis®) (Dodson and Levine 2015). Le greffon Cartipatch® (TBF Génie Tissulaire), est actuellement en essai clinique de phase III. Il s'agit d'une autogreffe de chondrocytes cultivés dans un hydrogel associé à de l'agarose et de l'alginate. Les cellules sont extraites d'un prélèvement de cartilage de 200 mg et amplifiées jusqu'à obtenir une concentration de 10 millions de cellules par millilitre. L'hydrogel est stérilisé et mélangé à une suspension cellulaire puis moulé avant d'être implanté dans le défaut articulaire (Neyret *et al.*, 2007).

### **3.3.2. Système pour la production de masse de cellules thérapeutiques**

Les cellules thérapeutiques sont pour la plupart des cellules adhérentes. Cela nécessite d'avoir un matériel cellulaire de départ suffisant. Il faut alors être en mesure d'amplifier suffisamment les cellules en un minimum de temps. La culture des cellules adhérentes à grande échelle possède quelques inconvénients, dont les deux principaux sont l'espace nécessaire à l'obtention d'une biomasse suffisante et les contraintes liées à l'agitation, limitant les volumes de culture.

#### **3.3.2.1. Culture sur supports statiques**

Les premières cultures à grande échelle ont été réalisées en culture statique dans des systèmes de culture dérivés des classiques flasques en polystyrène, comme par exemple les systèmes CellSTACK® (Corning®) et CellFactory® (Nunc®). Il s'agit de flasques de culture (ou chambres) composées de plusieurs étages (Figure 25 (1.) ci-contre). Elles permettent d'obtenir un rendement cellulaire égal à celui obtenu pour des cultures réalisées dans plusieurs flasques standards (pour un volume égal) ce qui présente un avantage pour le manipulateur, optimise la surface de culture pour un échantillon donné et limite les risques de contaminations liés aux changements de milieu (Bartmann *et al.*, 2007). Bien que ce type de système limite les contaminations, il n'élimine cependant pas le risque lié aux changements de milieu réguliers. Un système comparable a été développé, le ACFM (Automatic Cell Factory™ Manipulator System, Nunc®), permettant de cultiver de manière stérile et automatisée 4 flasques à 40 étages.



**Figure 25 – Exemples de systèmes de culture pour la production à grande échelle de cellules adhérentes.** (1.) Système de culture statique en flasque multi-étages. La surface de culture est de 6320 cm<sup>2</sup> répartis sur 10 étages sur la photo. (2.) Le système CELLROL (Integra) permet de réaliser la culture de cellules adhérentes en agitation rotative (0,5 à 6 RPM (Rotation Par Minute)). La vitesse de rotation des bouteilles est réglée à l'aide d'un moniteur et est régulée par la rotation d'un seul roller, l'autre étant en rotation libre. Une bouteille de culture de 29 cm de long possède une surface de culture de 850 cm<sup>2</sup>. (3.) Exemples de bioréacteurs à usage unique pouvant être utilisés pour la culture de cellules adhérentes sur microporteurs (ou billes).

### 3.3.2.2. Culture sur supports agités

Des techniques de culture ont été développées pour augmenter la surface utile telle que la culture en bouteilles sur Rollers et la culture utilisant des micro-transporteurs (microbilles).

**Système de culture rotative :** Le système de flacons rollers a été développé par George Gey en 1933 (Hanks & Bang, 1971). Il est largement utilisé pour la culture en masse de cellules adhérentes avec des bouteilles de culture de surface allant de 490 à 4250 cm<sup>2</sup>. Il consiste à cultiver les cellules dans des bouteilles ou flacons de culture en position allongée dans le système (Figure 25 (2.)). Cette culture présente l'avantage de limiter la consommation de milieu, laissant à chaque rotation une fine couche de liquide sur la monocouche cellulaire. De

plus elle permet d'optimiser la surface de culture et évite la formation de gradients au sein du milieu, tout en favorisant les échanges gazeux. Cependant, elle nécessite de grands incubateurs et comporte les mêmes risques de contamination que le système CellFactory® classique.

**Culture sur microporteurs :** Pour cette technique les cellules sont cultivées sur des billes ou des microporteurs, le plus souvent en suspension dans un bioréacteur. La culture en agitation va permettre d'améliorer l'homogénéité de la culture et d'éviter la formation de gradients de concentration. Ce système offre l'avantage d'augmenter le ratio surface d'adhérence/volume de milieu de culture par rapport aux systèmes statiques. Les bioréacteurs Mobios® sont adaptables à ce type de culture et permettent d'obtenir des rendements supérieurs à 300 millions de CSM par litre de milieu consommé (Figure 25 (3.)). Plusieurs études se sont penchées sur l'utilisation de la culture sur microporteurs pour la culture de cellules souches pluripotentes (cellules souches embryonnaires) et multipotentes (CSM). L'optimisation des systèmes repose sur le coating de surface, les milieux de culture et le système d'agitation (Lam *et al.*, 2015). Le développement de plateformes pour ce type de culture nécessite une première étape d'expansion en flasque statique avant de passer en culture 3D sur microporteurs, avec une étape en flasque Spinner (5 L) qui servira d'inoculum pour l'ensemencement de bioréacteurs contrôlés, de volumes plus conséquents (Chen *et al.*, 2013).

### **3.3.3. Les bonnes pratiques de fabrication**

Pour qu'un produit thérapeutique soit de « grade clinique » il devra impérativement répondre aux exigences des bonnes pratiques de fabrication (GMP pour Good Manufacturing Practices) et aux normes de conservation imposées par des organismes tels que l'agence européenne de la médecine ou l'agence nationale de la sécurité des médicaments (ANSM). Ces normes sont identiques à celles des médicaments et impliquent l'évaluation de tous les produits et matériaux engagés dans le processus de fabrication, appelé PTA pour Produits Thérapeutiques Annexes. Concernant les Médicaments de Thérapie Innovante (MTI), la culture cellulaire doit suivre un protocole fiable et reproductible, de l'étape d'extraction à celle de réadministration.

Pour des produits biologiques, la validation des procédés est plus compliquée que celle de produits synthétiques. Il existe une variabilité inter-individuelle qui se répercute entre les

lots de production. Il faut pouvoir démontrer la robustesse du processus de fabrication ainsi que la stabilité et l'innocuité du produit final. Dans l'idéal il faut travailler avec des milieux de composition définie, exempts de sérum.

Si l'on prend l'exemple des CSM, les critères minimums pour la caractérisation cellulaire admis par l'ISCT (International Society of Cell Therapy) sont insuffisants pour pallier aux différences retrouvées entre différents lots. D'où la nécessité de mettre en place une standardisation de la production, qui sur le plan technique comprendra le matériel de départ, la densité d'ensemencement, le nombre de doublement de population et le milieu de culture utilisé. Les sources les plus évidentes pour des applications cliniques sont la moelle osseuse et le tissu graisseux, car ils sont accessibles et faciles à collecter selon des processus standardisés (Sensebé *et al.*, 2013). Ménard et ses collaborateurs ont réalisé une comparaison de l'impact de 3 milieux de culture de grade clinique dans la culture des CSM. D'un milieu à un autre et en fonction de la source tissulaire, le phénotype membranaire et les capacités d'immunorégulation étaient variables (Menard *et al.*, 2013). C'est pour cette raison que les procédures de culture doivent être standardisées en fonction des applications. Cela implique la réalisation systématique de tests fonctionnels, du suivi de la viabilité et de la croissance cellulaire.

**- Chapitre II -**

## **Matériel & Méthodes**



---

## HEMOXCell®

---

L'Annélide polychète *Nereis virens* possède comme pigment respiratoire une hémoglobine extracellulaire de taille importante (3.6 MDa). Les diverses propriétés des pigments respiratoires de *N virens* et de son homologue *Arenicola marina*, sont évoquées dans le Chapitre I (sous partie 3.3.3). L'extraction de ces pigments circulants est réalisée dans les locaux d'HEMARINA, à Morlaix. Le produit obtenu est appelé M201 pour *N. virens*. Ce dernier va subir des étapes de purification permettant d'obtenir le composé commercial du nom d'HEMOXCell®.

L'approvisionnement en vers est essentiellement assuré par la Hollande, toutefois HEMARINA a d'ores et déjà amorcée un projet de création d'une ferme marine à Noirmoutier.

### 1. De l'extraction au produit final

Les étapes de la production ne seront pas détaillées dans ce manuscrit pour préserver la confidentialité de ces renseignements mais ils y seront évoqués.

La production d'un lot commercial s'étend sur une semaine. Elle débute par une étape d'extraction à froid à partir de poches de vers congelés. La décongélation va entraîner un éclatement des vers libérant ainsi l'intégralité de leur contenu. S'en suit des étapes de filtration et de purification, ponctuées par des analyses de conformités. Le produit final est dilué dans une solution de stabilisation puis dosé avant d'être aliquoté. Les échantillons sont ensuite délivrés en présence des certificats attestant leur stérilité, l'absence d'OGM, de mycoplasmes et d'endotoxines, mais aussi l'absence d'ADN étranger résiduel. Pour une conservation optimale, il doit être stocké à -80 °C. Sa stabilité est alors estimée à 24 mois. Avant de pouvoir être utilisé comme produit de recherche, chaque lot devra être validé à l'aide d'un test d'efficacité réalisé sur cellules CHO. Il pourra par la suite être utilisé dans une échelle de température allant de 4 °C à 37 °C. Avant chaque utilisation, les échantillons doivent être décongelés sur glace.



## 2. Test de performance sur la croissance des cellules CHO-S

L'analyse de l'efficacité du produit M201 est réalisée selon un mode opératoire validé qui s'inscrit dans le suivi de contrôle qualité de la molécule. Il s'agit d'un modèle *in vitro* permettant de valider de façon reproductible l'augmentation de la biomasse cellulaire en présence de la molécule à 0.5 g/L. Cette concentration a été déterminée au cours d'une précédente étude qui vous est détaillée dans l'article *Advance in recombinant protein production using a marine oxygen carrier to enhance oxygen transfer in a CHO-S cell line* (Article 1), figurant dans la partie résultat de ce chapitre (Le Pape *et al.*, 2015).

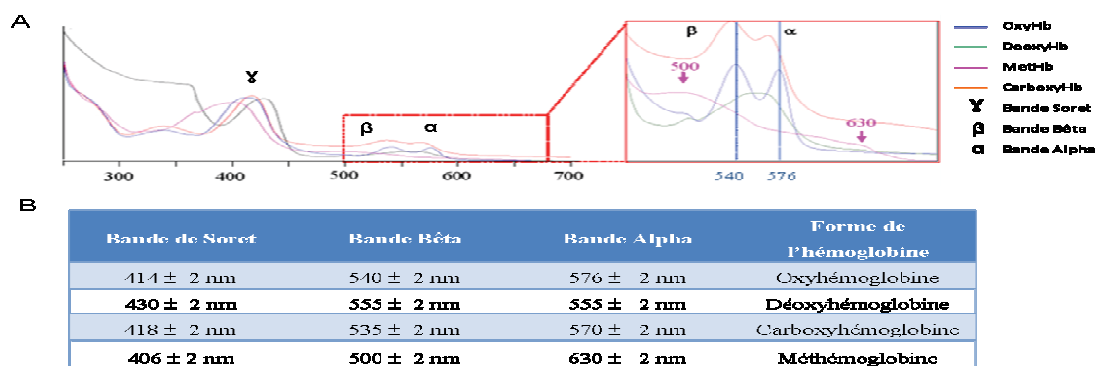
Pour ce test, les réactifs proviennent de chez Invitrogen. La lignée utilisée est la lignée d'ovaires d'hamster chinois CHO-S, modifiée et non adhérente. Elle est cultivée dans du milieu CD-CHO complémenté.

Pour chaque test de performance 3 conditions sont analysées (2 erlenmeyers / condition) : une condition contrôle permettant de calculer l'évolution de la biomasse cellulaire sans HEMOXCell®, une condition standard qui consiste à évaluer l'évolution de la biomasse en présence d'un lot validé de M201 à 0.5 g/L, et la condition test, réalisée avec le lot à tester à 0.5 g/L. Les erlenmeyers sont transférés en incubateur à CO<sub>2</sub> (21% O<sub>2</sub>, 37°C) pendant 1h. Les bouchons sont ensuite fermés hermétiquement à l'aide de Parafilm™ et les erlenmeyers sont incubés sous agitation orbital (120 RPM) à 37°C pendant 4 jours. Les cultures sont placées 1h par jour à l'incubateur CO<sub>2</sub> pour rétablir l'équilibre acido-basique du milieu.

Pour chaque dénombrement, 2 aliquots de 500 µL sont prélevés et 2 dilutions au 1/20<sup>ème</sup> sont réalisées à partir de chaque aliquot dans une solution de bleu Trypan à 0,2%. Le dénombrement est réalisé à l'aide d'une cellule de Malassez. La moyenne des différents dénombrements ainsi que le coefficient de Bravais-Pearson sont calculés (*i.e.*, coefficient de corrélation entre deux variables). Ce dernier doit être inférieur à 1 pour poursuivre l'interprétation des résultats. Le coefficient de variation (CV en %) des cellules vivantes est ensuite calculé pour un même prélèvement et devra être inférieur à 10. Si c'est le cas, la densité de cellules vivantes par millilitre pourra être déterminée. Seuls les lots permettant une augmentation de la biomasse cellulaire d'un facteur supérieur à 4 seront validés.

### 3. Analyse fonctionnelle par spectrophotométrie

Comme toutes les hémoglobines, HEMOXCell® possède une signature spectrophotométrique caractéristique de son état d'oxydation et d'oxygénation. L'analyse de cette signature est réalisée dans le laboratoire de biochimie analytique à HEMARINA, à l'aide d'un spectrophotomètre (UV-Vis SAFAS). C'est à partir du spectre d'absorption UV-Visible entre 370 et 640 nm, d'une solution diluée de M201 ( $\approx 0,7$  mg/mL), que cette analyse fonctionnelle est réalisée. Elle permet d'évaluer qualitativement l'état dans lequel se trouve la molécule, mais aussi de définir le pourcentage de méthémoglobine (MetHb) contenu dans la solution. Une signature non conforme est caractéristique d'une hémoglobine oxydée à plus de 50%. Seuls les lots conformes ( $\% \text{MetHb} < 50\%$ ) pourront poursuivre les tests. L'état de l'Hb, Oxyhémoglobine, Déoxyhémoglobine ou Carboxyhémoglobine, est déterminé à partir des maxima des longueurs d'ondes obtenus pour les bandes Soret, Alpha et Bêta (Figure 26). Les valeurs sont entrées dans un fichier automatisé qui indiquera la forme principal de l'Hb dans l'échantillon analysé.



**Figure 26 - Conformation de l'hémoglobine pour le test de fonctionnalité.** (A) Spectre d'absorption UV-visible entre 250 et 700 nm de M101 dans différentes configurations. M101 correspond à l'hémoglobine de l'Annélide *A. marina*, il présente un spectre similaire à celui de *N. virens*. (B) Tableau récapitulatif des différentes conformations de l'Hb en fonction des maxima d'absorption.

Le pourcentage de MetHb est ensuite déterminé à partir de la forme réduite de la molécule (0% MetHb), en utilisant un antioxydant, l'acide ascorbique (0.3 M) (Prolabo), et de la forme oxydée (100% MetHb) en utilisant un oxydant, le peroxyde d'hydrogène ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ). Les spectres d'absorbance sont ensuite réalisés en duplicat pour chaque solution : la solution test

Hb%, la 0% et la 100% de MetHB. La comparaison des 3 spectres à 540 et 576 nm est ensuite réalisée. A cet effet, les absorbances A<sub>540</sub> et A<sub>576</sub> sont additionnées et notées **A<sub>0</sub>** pour 0%MetHb, **A<sub>Hb</sub>** pour la solution testée et **A<sub>100</sub>** pour 100%MetHb. Le **%MetHb** de la solution testée est calculé selon la formule suivante :

$$\% \text{MetHb} = 100 - (([A_{Hb} - A_{100}] \times 100) / (A_0 - A_{100}))$$

La dernière partie de l'analyse fonctionnelle consiste à évaluer la capacité de l'Hb à se déoxygéner et à se réoxygéner. Pour cela, l'Hb est déoxygénée par bullage d'azote (Alpha Gaz N<sub>2</sub>) et réoxygénée à l'air. Le bullage d'azote est réalisé pendant environ 15 minutes, directement dans une cuve du spectrophotomètre contenant la solution à tester et scellée par du parafilm. La réoxygénation est réalisée par plusieurs allers-retours à la pipette. Les spectres entre 370 et 640 nm sont réalisés en duplicat pour les solutions oxydées (Oxy), déoxydées (DeOxy) et réoxydées (ReOxy). Les 3 spectres obtenus pour un même aliquot sont normalisés puis superposés. Les profils d'une solution fonctionnelle doivent permettre une superposition pour Oxy et ReOxy, mais pas avec le spectre DeOxy (voir Figure 26).

Avant toute utilisation d'un nouveau lot, il faut commencer par déterminer la concentration de travail, c'est-à-dire la concentration permettant d'obtenir le meilleur rapport dose/réponse. Ce point sera abordé dans la partie qui va suivre avec comme modèle cellulaire, les cellules souches mésenchymateuses.

## - Chapitre II -

# Résultats

---

*Les résultats du chapitre II concerneront le développement des tests de fonctionnalité sur cellules CHO, ils seront présentés sous la forme d'un article. Ce travail constitue actuellement la base de la validation fonctionnelle du produit.*

**Article 1: “Advancement in recombinant protein production using a marine oxygen carrier to enhance oxygen transfer with a CHO-S cell line.”**

Fiona Le Pape, Morgane Bossard, Delphine Dutheil, Morgane Rousselot, Valérie Polard, Claude Férec, Elisabeth Leize, Pascal Delépine et Franck Zal - *Artificial Cells, Nanomedicine, and Biotechnology*.

---



## **Article 1**

**“Advancement in recombinant protein production using a marine oxygen carrier to enhance oxygen transfer with a CHO-S cell line.”**



## Advancement in recombinant protein production using a marine oxygen carrier to enhance oxygen transfer in a CHO-S cell line

Fiona Le Pape<sup>1,2</sup>, Morgane Bossard<sup>2</sup>, Delphine Dutheil<sup>2</sup>, Morgane Rousselot<sup>2</sup>, Valérie Polard<sup>2</sup>, Claude Férec<sup>1,4,5</sup>, Elisabeth Leize<sup>1,3</sup>, Pascal Delépine<sup>1,5</sup> & Franck Zal<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Functional Genetics Department, INSERM Research Unit 1078, University of Western Brittany, European Brittany University, 46 Rue Félix Le Dantec, CS51819, 29218 Brest Cedex 02, France, <sup>2</sup>HEMARINA SA, Aeropole Center, Biotechnopole, 29600 Morlaix, France, <sup>3</sup>Protesis Department, Regional University Hospital Center of Brest, Research and Formation Unit of Odontology, Brest F29238, France, <sup>4</sup>Functional Genetics Department, Regional University Hospital Center of Brest, Brest, France, and <sup>5</sup>French Blood Service - Brittany, Brest site, 46 Rue Félix Le Dantec, CS51819, 29218 Brest Cedex 02, France

### Abstract

Recombinant proteins, particularly proteins used as therapeutics, are widely expressed for bioprocessing manufacturing processes. Mammalian cell lines represent the major host cells for bioproduction, according to their capacities of post-translational modifications and folding of secreted proteins. Many parameters can affect cell productivity, especially the rate of oxygen transfer. Dissolved oxygen, in high or low proportions, is a crucial parameter which can affect cell viability and thus productivity. HEMARINA has developed a new technology, commercially proposed as HEMOXCell<sup>®</sup>, to improve cell culture at a large production scale. HEMOXCell<sup>®</sup> is a marine oxygen carrier having properties of high oxygen sensitivity, to be used as an oxygen additive during cell culture manufacturing. In this study, we investigated the effects of HEMOXCell<sup>®</sup> on the culture of the commonly used CHO-S cell line. Two main objectives were pursued: 1) cell growth rate and viability during a batch mode process, and 2) the determination of the effect of this oxygen carrier on recombinant protein production from a CHO-transfected cell line. Our results show an increase of CHO-S cellular growth at a rate of more than four-fold in culture with HEMOXCell<sup>®</sup>. Moreover, an extension of the growth exponential phase and high cell viability were observed. All of these benefits seem to contribute to the improvement of recombinant protein production. This work underlines several applications using this marine-type oxygen carrier for large biomanufacturing. It is a promising cell culture additive according to the increasing demand for therapeutic products such as monoclonal antibodies.

**Keywords:** bioprocessing, cell growth rate, cell viability, CHO-S cells, CHO shear stress, marine oxygen additive, Oxygen carrier, oxygen transfer rate, recombinant-protein

### Introduction

Biotechnology has gained interest over the last several decades, particularly in the field of recombinant proteins. The

need for recombinant proteins is continuously increasing, both in fundamental research as well as for clinical applications. Indeed, the demand for the production of recombinant proteins by pharmaceutical companies served a global market of \$32 billion in 2003 and reached \$108 billion in 2010 (Pavlou and Reichert 2004, Wuest et al. 2012). Among the different existing production systems, mammalian cells are the more advantageous and represent developing new technology for biopharmaceutical companies. Although their cultivation is more expensive and takes longer than the other production systems, they are the only host cells that have the capacity to secrete proteins with proper folding, assembly, and post-translational modifications. About 50–60% of recombinant proteins for therapeutic use (and up to 80% for monoclonal antibodies (mAb)) are produced in mammalian cell systems (Omasa et al. 2010, Walsh 2006).

Immortalized Chinese Hamster Ovary (CHO) cell lines currently constitute the most-used expression system for large-scale production of recombinant proteins (Hu and Aunins 1997). Indeed, CHO cells have been widely studied and characterized through decades of research, and nowadays they represent a large database for bioproduction. Their suitability has led to safe production of numerous recombinant therapeutics for humans, like mAb production (Birch and Racher 2006, Kelley 2009). Other advantages of these cells are their fast growth properties, their ease of transfection, their adaptability to serum-free medium, and their ability to perform complex post-translational modifications required for biological activity and compatibility with humans (Almo and Love 2014, Omasa et al. 2010, Rita Costa et al. 2010). However, the growth of mammalian cells is slower than that of the microbial host systems, the cultivation processes are longer, and the engineering selection and construction of a mammalian cell line is more complex.

Generation time (or population doubling time (PDT)) is an important parameter for the evaluation of culture



expansion. It was mentioned that the typical growth rate of mammalian systems is about  $0.02$  to  $0.05\text{ h}^{-1}$ , which is less than the microbial growth rate ( $0.4$  to  $0.6\text{ h}^{-1}$  for yeast and  $1$  to  $3\text{ h}^{-1}$  for bacteria) (Muller et al. 2006, Omasa et al. 2010).

The demand for biopharmaceutical proteins is continuously growing, hence the necessity to optimize production processes in order to reduce production time and increase productivity. Moreover, for CHO cells and other mammalian cell lines, the yields of recombinant protein are rather low. The process to scale-up production from cell bank to bioreactor at a production-scale (cell thawing, cell cultivation in bioreactors of sizes increasing by 5–8-fold until large production-scale cultivation) usually takes several weeks to months. Another disadvantage of mammalian cell cultivation is the low cell density, with a typical cell concentration of about  $1$  to  $10 \times 10^6$  cells/ml (Omasa et al. 2010, Wurm 2004). Over the past two decades, significant improvements have been made, contributing to dramatic increase in cell density and subsequently cell productivity. Culture conditions like stirring speed, osmolarity, temperature, partial pressure of oxygen, and pH variations can influence CHO cell growth. In a 1990 study, Kuranto and his team analyzed these different parameters and determined that pH and concentration of dissolved oxygen were the parameters with the most influence in the culture of the CHO non-adherent cell line (Kurano et al. 1990). Culture conditions can also affect the glycosylation potential of these mammalian cells (Jenkins et al. 1996). The use of serum-free media with a defined composition of amino acids seems to be a good substitute to serum-supplemented media, and provides a stable and xenogeneic-free environment (Costa et al. 2013; deZengotita et al. 2002).

It is therefore important to maintain a sufficient cell density in order to enhance productivity, and that is why cell engineering targets cell viability. Cell death in the batch culture mode can have several origins; stirring and sparged bubbles can induce stresses and lead to apoptosis, as well as nutrient starvation, lack of oxygen, and waste products (Dhanasekharan et al. 2005, Krampe and Al-Rubeai 2010). To delay stress-induced cell death, antiapoptotic engineering technologies were developed with the aim to overexpress antiapoptotic factors and suppress proapoptotic factors like the Bcl-2 and Bcl-xL proteins (Dorai et al. 2010, Figueroa et al. 2007, Lee et al. 2013, Majors et al. 2008, Meents et al. 2002).

Recent research has been aimed at finding a way to replace the addition of oxygen by bubbling with a less lethal system for cells. Indeed, this process has created two major problems: (i) oxidative damages; (ii) shear stress-generated sparging air or pure oxygen. It was proposed that gases can be encapsulated in a thin polymer and can be released when the oxygen pressure decreases. This system does not induce cell death, but the oxygen-loaded particles present an inconvenience in the absorption of a significant quantity of secreted proteins (Seth et al. 2006). In addition, an overlay intensive supply of oxygen can induce oxidative stress, leading to a secretion of reactive oxygen species (ROS) which can cause significant cellular damage like protein degradation (Cacciuttolo et al. 1993, Oller et al. 1989).

HEMARINA, a french company, has developed HEMOX-Cell<sup>®</sup>, as an oxygen carrier to bypass existing issues to transfer

oxygen to cells. HEMOXCell<sup>®</sup> is a hemoglobin extracted from a marine worm, *Nereis virens*, with a high oxygen affinity (Chabasse et al. 2006, Rousselot et al. 2006). The binding and release of oxygen from this carrier occurs by simple diffusion along oxygen partial pressure gradients, according to the cellular needs. This oxygen carrier has a high molecular weight, natural extracellular properties, and the ability to be used within a wide temperature range. Other original characteristics of this oxygen carrier are its intrinsic SOD-like activity and its ability to bind over one hundred oxygen molecules at the same time (Franck Zal and Rousselot 2014).

The feasibility of using HEMOXCell<sup>®</sup> as an oxygen carrier to supply oxygen in a bubbling-free batch culture system was investigated. The CHO-S non-adherent cell line, derived from the parental CHO-K1 cell line, was chosen as the mammalian cell model for this study. The benefits of HEMOXCell<sup>®</sup> supplementation in serum-free medium was considered in terms of cell growth and cell viability, and for its ability to promote recombinant protein production in CHO-S transfected with Enhanced Green Fluorescent Protein (EGFP). The aim of this study was to find a bioprocess adaptable to high scale-up of protein production, limiting cell apoptosis, and increasing the amount of cell density and productivity.

## Material and method

### HEMOXCell<sup>®</sup>

The extracellular hemoglobin M201 has been used to create the product designated as HEMOXCell<sup>®</sup> (HEMARINA SA, Morlaix, France). This molecule is extracted from the marine lugworm *Nereis virens*. The extraction process is realized under gentle agitation of frozen worms at  $4^{\circ}\text{C}$ , followed by a purification step and a conditioning process. HEMOXCell<sup>®</sup> has been developed to replace the way oxygen is traditionally supplied to cells from early stage R&D studies to process development and finally production of recombinant proteins at commercial scale.

## Cell culture methods

### Culture conditions of cell lines

The CHO-S cell line was purchased from GIBCO<sup>®</sup> (GIBCO<sup>®</sup>, Invitrogen<sup>™</sup>, Fisher Bioblocks Scientific, Illkirch, France). The CHO-EGFP cell line was obtained by stable transfection of CHO-S cells with the expression vector pEGFP-N3 (Clontech, Saint-Germain-en-Laye, France) containing the improved reporter gene GFP (e-GFP). Both cell lines were cultured in CD-CHO medium supplemented with  $8\text{ mM}$  L-glutamine,  $100\text{ }\mu\text{M}$  sodium hypoxanthine, and  $16\text{ }\mu\text{M}$  thymidine (GIBCO<sup>®</sup>) in Erlenmeyer flasks with a vent cap (Corning, Chorges, France). Cultures were maintained in a humidified atmosphere with  $5\%$   $\text{CO}_2$  at  $37^{\circ}\text{C}$  until they reached a density of  $2 \times 10^6$  cells/mL, and they were reseeded twice a week by dilution at a density of  $2 \times 10^5$  cells/mL.

### Transfection of CHO-S cells

CHO-S cells were plated at  $3 \times 10^5$  cells/mL on 6-well plates (Nunc<sup>™</sup>, Rochester, NY, USA) for 15 h, and cells were transfected by lipofection with the linearized plasmid vector

pEGFP-N3. According to the manufacturer's instructions, a ratio per well of 5 µg of DNA to 25 µL of Lipofectamine LTX (Invitrogen™) was diluted in 250 µL of Opti-MEM (Invitrogen™). After 48 h, transiently transfected cells were grown in a culture medium supplemented with 500 µg/mL G418. The enrichment step of the stably transfected cells—the CHO-GFP cells—was performed for 11 days. The selection pressure was then maintained at 250 µg/mL of G418 in the growth medium.

### Experimental conditions

For experimental studies, CHO-S and CHO-GFP cells were seeded at a density of  $2 \times 10^5$  cells/mL in 30 mL of supplemented growth medium dispensed in a 125-mL shaking flask (Costar™, Burladingen, Germany). The growth medium was also supplemented with various concentrations of HEMOX-Cell™ (from 0 to 2 mg/mL). The cultures were maintained under orbital stirring at 120 rpm in an incubator (IG 150, Thermo Scientific) with 5% CO<sub>2</sub> at 37°C. They were maintained and studied until total loss of cell viability.

### Parameters studied

#### Cell growth and cell viability

Cell quantification was carried out by two different methods: a manual counting performed with a Malassez hemocytometer and an optical microscope (Olympus, Hamburg, Germany); and an automated counting performed with Cellometer™ Auto T4 cell counter (Nexcelom Bioscience, Lawrence, Canada) coupling to the Cellometer™ Auto Counter software (Nexcelom Bioscience).

Cell viability was determined by the trypan blue exclusion method. PDT was calculated during the exponential growth phase using the following formula:  $t_D = \ln 2 / \mu_{\max}$  with  $\mu_{\max} = \ln(N_t - N_0) / \Delta t$ , where  $t_D$  is the value of PDT (hour),  $\mu_{\max}$  is the maximum growth rate (hour<sup>-1</sup>),  $N_t$  is the cell density at the end of the exponential phase (cells/mL), and  $N_0$  is the cell density at the beginning of the exponential phase (cells/mL).

#### Cell death

##### Apoptosis detection assay

Cell death was evaluated using a co-staining procedure based on a commercial detection kit (Annexin V-FITC Kit, Miltenyi Biotec, Paris, France). Briefly,  $1.10^6$  cells were washed and resuspended in 100 µL of binding buffer 1X according to the manufacturer's instructions. Subsequently, cells were incubated with 10 µL of Annexin-V conjugated to FITC (AV-FITC) for 1 h in the dark and at room temperature. Then, cells were washed with 1 mL of binding buffer 1X and centrifuged at 300 g for 10 min. The cell pellet was resuspended in 200 µL of washing buffer. The fluorescence was measured using a microplate fluorescent reader (Safire2™, Tecan, Lyon, France) coupled to the Magellan® software (Tecan) (excitation/emission wavelengths: 488 nm/530 nm). Then, 0.5 µg of propidium iodide (PI) was added to each well and fluorescence was again measured (excitation/emission wavelengths: 535 nm/620 nm). Control cells were included in

each set of experiments. The fluorescence intensity obtained for each condition was expressed as relative fluorescence unit (RFU).

##### Caspase activity

Measurement of caspase-3 activity was carried out using the Caspase-3 Fluorometric Assay Kit, according to manufacturer's instructions (R&D Systems Europe, Abingdon, UK). Briefly,  $1.10^6$  cells were analyzed in each condition. The cells were centrifuged at 250 g for 10 min and resuspended in 100 µL of lysis buffer with protease inhibitors (Roche, Meylan, France). The suspension was then incubated for 10 min at 4°C and stocked at -20°C until assay. The caspase-3 substrate was added for the measure of activity. The resultant fluorescence was quantified with Safire2™ (excitation/emission wavelengths: 400 nm/550 nm) and analyzed with Magellan® software. The results were expressed as percentage of caspase-3 activity in cells during culture *vs* before experimentation.

##### GFP expression

The specific fluorescence of CHO-S cells transfected with EGFP was determined by fluorometry. Two hundred microliters of cell suspension were transferred to a 96-well plate. The fluorescence was collected using Safire2™ (excitation/emission wavelengths: 485 nm/515 nm). The background fluorescence of the cell culture medium and/or of non-transfected cultures was subtracted from each value, to give the RFU.

##### Gel filtration analysis

The structure of HEMOXCell® was analyzed by gel filtration using Fast Protein Liquid Chromatography (FPLC) (Ultimate® 3000, Dionex, Saint-Quentin-en-Yvelines, France). Briefly, an aliquot of CHO-S cells cultured with 0.75 g/L HEMOXCell® was taken each day during 10 days of culture and centrifuged at 10,000 g for 10 min, and the supernatant was conserved at -80°C until use. Gel filtration was performed on a Superose six column (Superose TM 6, 10 × 300 nm; GE Healthcare, Velizy, France), with a fractional range of 5 to 5000 kDa and an elution flow rate of 0.5 mL/min. The separation was performed using the elution buffer composed of 10 mM TrisBase, 145 mM sodium chloride (NaCl), 4 mM potassium chloride (KCl), 0.2 mM magnesium chloride (MgCl<sub>2</sub>), and 2.5 mM calcium chloride (CaCl<sub>2</sub>). Chromatographic data were collected and processed using the Chromeleon® software (Dionex) for two wavelengths—280 nm and 414 nm. Kinetics were realized with a daily measurement with GraphPad® software.

##### UV-visible absorption spectrophotometry

The functionality of HEMOXCell® was defined by its capacity to reversibly bind dioxygen molecules. The functional state of Hb may be determined by the relative decrease in the intensity of the alpha and beta bands over time (Table I). An aliquot of CHO-S cells cultured with 0.75 g/L HEMOXCell® was taken at various time-points during culture, during a period of 10 days. The cell suspension was centrifuged at 10,000 g for 10 min and supernatant was conserved at -80°C until use.

Table I. Summary table of Hb conformations according to the characteristic absorption peaks. The Hb spectral signature contains three characteristic peaks: the alpha band and beta band are characteristic of the absorption of the complex consisting of the nucleus—heme, iron, and dioxygen; the Soret band is characteristic of the absorption of the heme nucleus and polypeptide chain complex.

| Soret band | beta band  | alpha band | Hb conformation   |
|------------|------------|------------|-------------------|
| 414 ± 2 nm | 540 ± 2 nm | 576 ± 2 nm | Oxyhemoglobin     |
| 430 ± 2 nm | 555 ± 2 nm | 555 ± 2 nm | Deoxyhemoglobin   |
| 418 ± 2 nm | 535 ± 2 nm | 570 ± 2 nm | Carboxyhemoglobin |
| 406 ± 2 nm | 500 ± 2 nm | 630 ± 2 nm | Methemoglobin     |

For analysis, samples were placed in a 96-well plate (Nunc™). Functional study was conducted by UV-visible spectrometry on wavelengths ranging from 250 nm to 700 nm using the spectrophotometer Synergy™ 2 (BioTek, Colmar, France) coupled to Gen 5™ software (BioTek). After acquisition, the percentage of oxidized HEMOXCell® was determined with UV-visible spectra normalized at 523 nm, the isoelectric point of the HEMOXCell®. Oxidation percentage was calculated using the following formula: Oxidized %HEMOXCell® = 100 - [AHb-A100] × 100/A0-A100, where AHb = A<sub>540</sub> + A<sub>576</sub> for the HEMOXCell® sample, A0 = A<sub>540</sub> + A<sub>576</sub> of 0% oxidized HEMOXCell®, and A100 = A<sub>540</sub> + A<sub>576</sub> of 100% oxidized HEMOXCell®.

## Statistical analyses

Data were expressed as means ± SD of three to four independent experiments, using the paired Student's t-tests and the non-parametric Dunnett's test to identify significant differences between experimental groups and control conditions. Statistical significance is achieved if  $p < 0.05$ . Statistics were generated using InStat® version 3.10 (GraphPad Software(r), La Jolla, USA).

## Results

### HEMOXCell® boosts cell growth

The growth of CHO-S cells showed four characteristic phases (Figure 1A): the lag phase until day 1, where cells grew slowly and adapted their metabolism to cell culture conditions; the exponential phase between day 1 and day 4, where cell growth was optimal, with the PDT of the culture calculated along this period being 24.1 h; the stationary phase, between day 5 and day 7, where cell growth had slowed and reached a plateau; and finally, the death phase, from day 8.

The culture of CHO-S in presence of the oxygen carrier storage buffer was similar to that of control cells (Figure 1B). No significant changes in cell density were observed, and the PDT was equivalent.

The addition of HEMOXCell® during cell culture had no effect on the lag phase (Figure 1 C–H). However, HEMOXCell® significantly amplified the exponential phase: it lasted two more days than control, and cell density was increased. Cell density was amplified in a dose-dependent manner from 0.125 to 0.500 g/L, in a ratio from 2.5 to 4.6, respectively (Figure 2). Conversely, when using higher concentrations than the effective dose of HEMOXCell®, it was found that the cell growth rate was decreased (Figures 2C–2H). Indeed, cell density was

similar at 0.750 g/L, and a slight decrease was drawn at 1 g/L, which was confirmed at 2 g/L. However, cell growth at these concentrations was still more potent than in the control conditions. Over this period, HEMOXCell® consequently reduced the PDT of the culture, which was decreased to 20.3 h at 0.500 g/L and remained unchanged at 0.750 g/L (Figure 1).

Then, from day 7, cell cultures showed a sharply declined process without going through a stationary phase, and no more cells were counted after day 8.

### HEMOXCell® maintains cell viability

To ensure that the addition of HEMOXCell® did not negatively impact cell culture, we determined cell viability in batch culture using the trypan blue dye exclusion method. Firstly, the cell viability of control cells was maintained above 95% until day 5, that is, during the lag phase and the exponential phase of cell culture (Figure 3A). After the 5th day, viability decreased to below the 95% value and reached a value of around 80% on day 7 and less than 20% on day 10. No significant changes in cell viability were observed when cells were cultured with the storage buffer.

In the presence of HEMOXCell®, viability was maintained above 95% until day 6. On day 7, viability with 0.125 to 1 g/L HEMOXCell® was about 75–80%, slightly under that of the control cells. Then, the viability rapidly dropped and all cells were dead on day 8. Cell response with 2 g/L HEMOXCell® was different since viability decreased more slowly and was 60% on day 8, and more than 20% of cells on day 10 were still viable.

### HEMOXCell® does not impact the cell death process

HEMOXCell® showed benefit on cell culture growth and viability. However, the decline phase and the loss of viability were evident. To ensure that HEMOXCell® did not negatively impact cell culture, we decrypted the cell death process. We chose to drive this study at HEMOXCell® levels of 0.250 and 0.500 g/L.

As shown in Figure 4, AV-FITC and PI staining were low until day 5. Then, the intensity of AV-FITC fluorescence increased from day 6 to day 7, whereas the increase of PI staining was delayed at day 7. This suggests an apoptotic process that began at day 6, followed by a necrotic process at day 7. No connection between cell viability and HEMOXCell® concentration can be established. This was confirmed with caspase-3 activity, that exploded at day 7 (Figure 3B). Moreover, the apoptotic process occurring during cell culture was not modified with HEMOXCell®; the occurrence and the intensity were similar to the control conditions.

### HEMOXCell® boosts cell production

Protein production has been determined in CHO-S transfected with EGFP. The EGFP protein differs from the native protein by a few amino acids that ensure high purity and maximal GFP fluorescence. Fluorescence intensity reflects the production of recombinant proteins by the cells, and was measured at day 0 and day 7 of batch culture (Figure 5). Here, we show that HEMOXCell® does not induce a non-specific fluorescence signal at day 0. At day 7, analysis

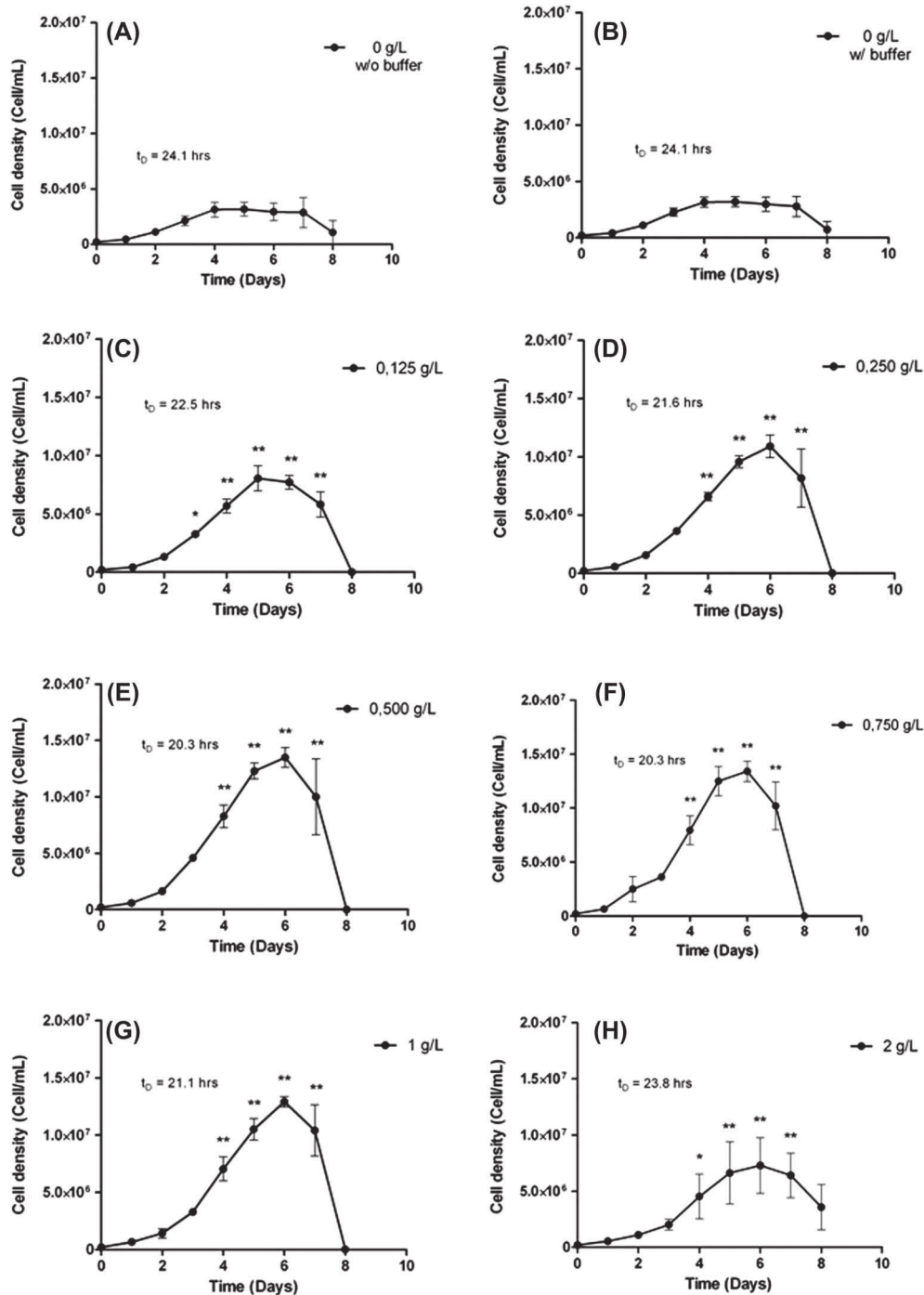


Figure 1. Analysis of the impact of HEMOXCell<sup>®</sup> concentration with CHO-S. CHO-S cells were cultivated in suspension for 8 days in the absence (A: 0 g/L without buffer) or with different concentrations of HEMOXCell<sup>®</sup> (B: 0 g/L; C: 0.125 g/L; D: 0.250 g/L; E: 0.500 g/L; F: 0.750 g/L; G: 1 g/L; H: 2 g/L) in the presence of the conditioning buffer. Cell density (cells/mL) was calculated for each condition during 8 days, PDT ( $t_D$ ) was determined during the exponential growth phase. The results correspond to the mean  $\pm$  SD ( $n = 3$  or 4 per group).  $P$ -value was calculated to control. \* $P < 0.05$ ; \*\* $P < 0.01$ .

revealed that HEMOXCell<sup>®</sup> significantly boosts recombinant protein production in the CHO-EGFP batch culture compared to the culture without the carrier. We can observe an increase of 70% of recombinant protein production in 0.250 g/L HEMOXCell<sup>®</sup>-supplemented medium ( $P = 0.006$ ), and more than 80% with 0.500 g/L HEMOXCell<sup>®</sup> ( $P = 0.017$ ). It seems that this increased fluorescence was relative to the tested concentration, and no significant difference was found; however, fluorescence appeared higher at 0.500 g/L than at 0.250 g/L.

#### Functional and structural analysis of HEMOXCell<sup>®</sup>

In order to characterize the functional evolution of HEMOXCell<sup>®</sup> during batch culture, we performed a functional analysis by UV-visible spectrometry and a structural analysis by fast protein liquid chromatography (FPLC). A spectral signature of 0.750 g/L HEMOXCell<sup>®</sup> solution was determined by UV-visible spectrometry using wavelengths ranging from 250 to 700 nm (Figure 6B). Data indicated that between day 0 and day 7, the maximum absorption ranged between 414 and 416 nm for the Soret band

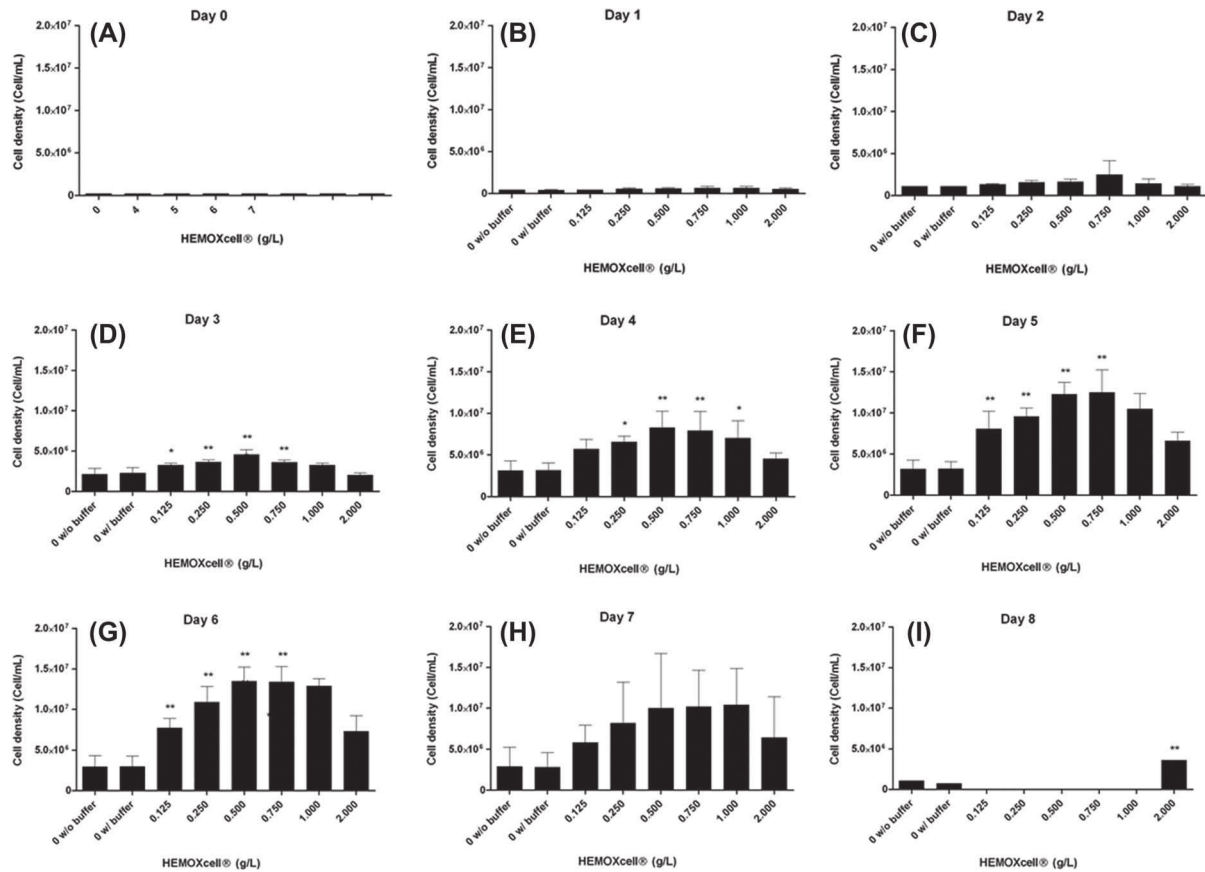


Figure 2. Analysis of CHO-S cell density with HEMOXCell<sup>®</sup>. CHO-S cells were cultivated with different concentrations of HEMOXCell<sup>®</sup> (from 0 to 2 g/L) during 8 days. Two culture conditions were performed without HEMOXCell<sup>®</sup>, with or without the storage buffer to control its safety. The results correspond to the mean  $\pm$  SD ( $n = 3$  or 4 per group).  $P$ -value was calculated to control: \* $P < 0.05$ ; \*\* $P < 0.01$ .

(characteristic of the absorption of the heme nucleus and polypeptide chain complex), between 539 and 541 nm for the alpha band, and between 574 and 575 nm for the beta band. The alpha and beta bands are characteristic of the complex heme nucleus/iron/dioxygen absorption. However we can note a diminution of the intensity of each peak over time, which underlines the oxidation of a part of the HEMOXCell<sup>®</sup>, as is evident on the UV-visible absorption spectra of HEMOXCell<sup>®</sup> under its different conformations (Figure 6A). The spectrum obtained at day 10 showed an

offset of the maximum absorption for the Soret band at 460 nm. This observation indicates that molecules contained in HEMOXCell<sup>®</sup> are in a methemoglobin state and therefore unfunctional, and the disappearance of alpha and beta bands confirms this idea.

Concerning the structural evolution of 0.750 g/L HEMOX-Cell<sup>®</sup> solution over time, the analysis was performed by FPLC with two chromatograms. The first was performed at 280 nm and represented all the proteins contained in the medium, and the other at 414 nm was specific for hemic-proteins.

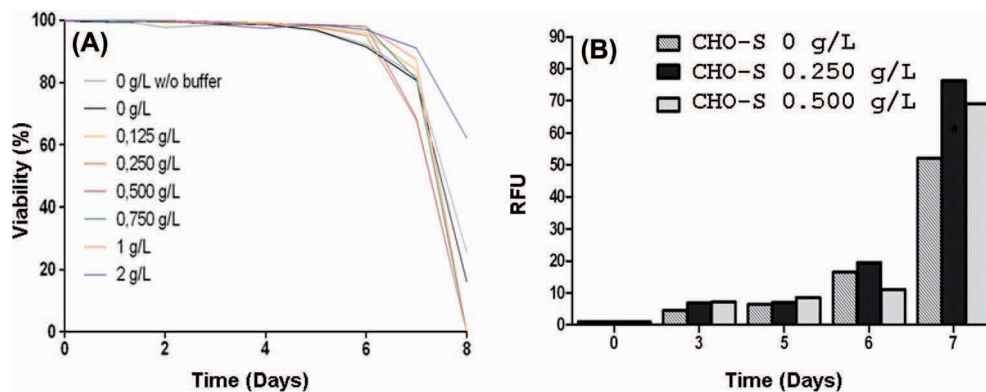


Figure 3. Profiles of cell viability and caspase-3 activation of CHO-S cells. (A) Viability of CHO-S cells was analyzed at various HEMOXCell<sup>®</sup> concentrations. CHO-S cells were cultured during 8 days, with HEMOXCell<sup>®</sup> concentrations ranging from 0.125 to 2 g/L. Viable cells were distinguished from dead cells using the trypan blue dye exclusion method. Results are expressed as mean  $\pm$  SD of 3 or 4 independent experiments. (B) Caspase-3 activation in CHO-S cells. Caspase-3 activation was determined using fluorescent staining against cleaved caspase-3. Caspase-3 is an intracellular cysteine protease activated during the cascade of events associated with apoptosis. Caspase-3 activation was observed between days 6 and 7 after kinetic start. Results are expressed in relative fluorescence units (RFU) during 7 days of culture with three HEMOXCell<sup>®</sup> concentrations (0 g/L, 0.250 g/L, and 0.500 g/L). Results are expressed as mean  $\pm$  SD of 2 independent experiments.

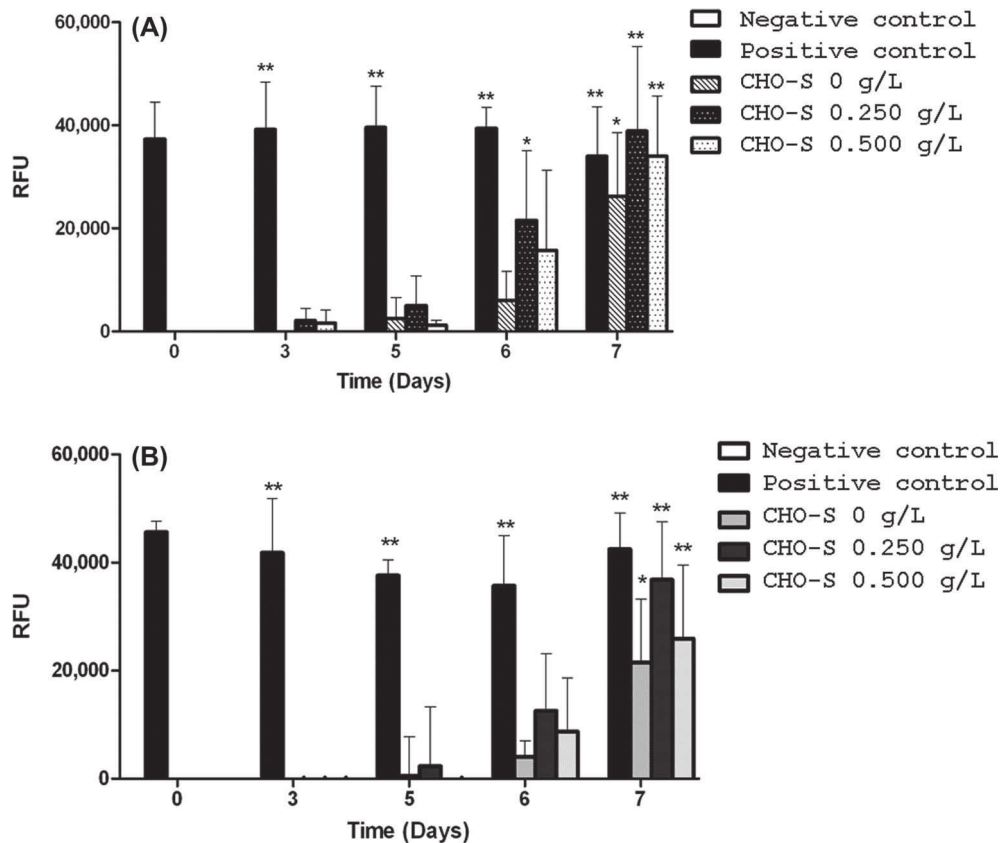


Figure 4. Apoptosis *vs.* necrosis detection. Fluorescent signals of annexin V (top) and propidium iodide (bottom) were measured in CHO-S cells cultivated with three HEMOXCell<sup>®</sup> concentrations (0 g/L, 0.250 g/L, and 0.500 g/L). Annexin V staining was used to detect translocation of phosphatidylserine (PS) from the internal to the external surface of the cell membrane, and propidium iodide (PI) was used to reveal necrotic cells. A positive control was obtained with an incubation of CHO-S cells with 100  $\mu$ M valinomycin for 5 h, to induce cell death. Significant annexin V and PI staining were seen at the beginning of days 6 and 7 after kinetics began, respectively. The results corresponded to the mean  $\pm$  SD ( $n = 3$  or 4 per group). *P*-value was calculated to control: \* $P < 0.05$ ; \*\* $P < 0.01$ .

The chromatogram evolution at 280 nm allows measurement of HEMOXCell<sup>®</sup> degradation, and that at 414 nm was used to determine the proportion of dissociation product containing heme, and thus the potentially functional molecules (Table I). Chromatograms obtained during the 10-day culture were superposed for both wavelengths, and the percentage of functional molecules was calculated, which has been represented Figure 7. A characteristic retention time of 17 min was obtained for the native state of the molecule (HEMOXCell<sup>®</sup> diluted at 0.750 g/L in storage buffer) (data

not shown), associated with 100% of functional molecules (Figure 7). The percentage of functional molecules decreases from 80% at day 0 to 51% at day 3, and remains stable until day 7. In parallel, 64% of HEMOXCell<sup>®</sup> molecules are structured in the CD-CHO medium, and over the culture period, a decrease of 4% of the structured molecule was observed at day 10.

## Discussion

This study consisted of investigating the effect of HEMOX-Cell<sup>®</sup> in a reference mammalian cell line, the CHO-S cell line (Hu and Aunins 1997, Wurm 2004). CHO cells have thereafter been largely used in pharmaceutical and medical purposes for the production of therapeutic proteins and antibodies for diagnostic purposes (Birch and Racher 2006, Kaneko et al. 2010, Kelley 2009). The strong demand for recombinant biomolecules, such as monoclonal antibodies, requires optimized processes in order to produce a higher amount of recombinant proteins, save time, and finally achieve a reduction in the manufacturing cost. This study revealed that HEMOXCell<sup>®</sup> promotes the growth of a large number of cells per unit volume, with an enhanced productivity, using a simple and effective oxygen supply. The latter constitute the most important properties required for an efficient process and its scale-up. For this purpose, HEMOXCell<sup>®</sup> was selected due to its numerous advantages

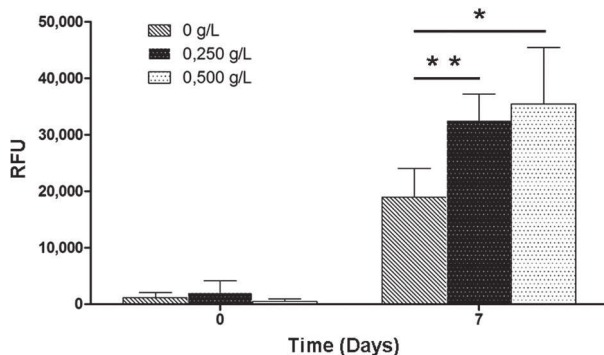


Figure 5. Impact of HEMOXCell<sup>®</sup> for production of EGFP with CHO-EGFP cells. Transfected CHO-EGFP were cultured during 7 days with three HEMOXCell<sup>®</sup> concentrations (0 g/L, 0.250 g/L, and 0.500 g/L). EGFP-specific fluorescence was analyzed at day 0 and day 7 as relative fluorescence units (RFU). Results are expressed as mean  $\pm$  SD of 4 experiments. *P*-value was calculated to control. \* $P < 0.05$ ; \*\* $P < 0.01$ .

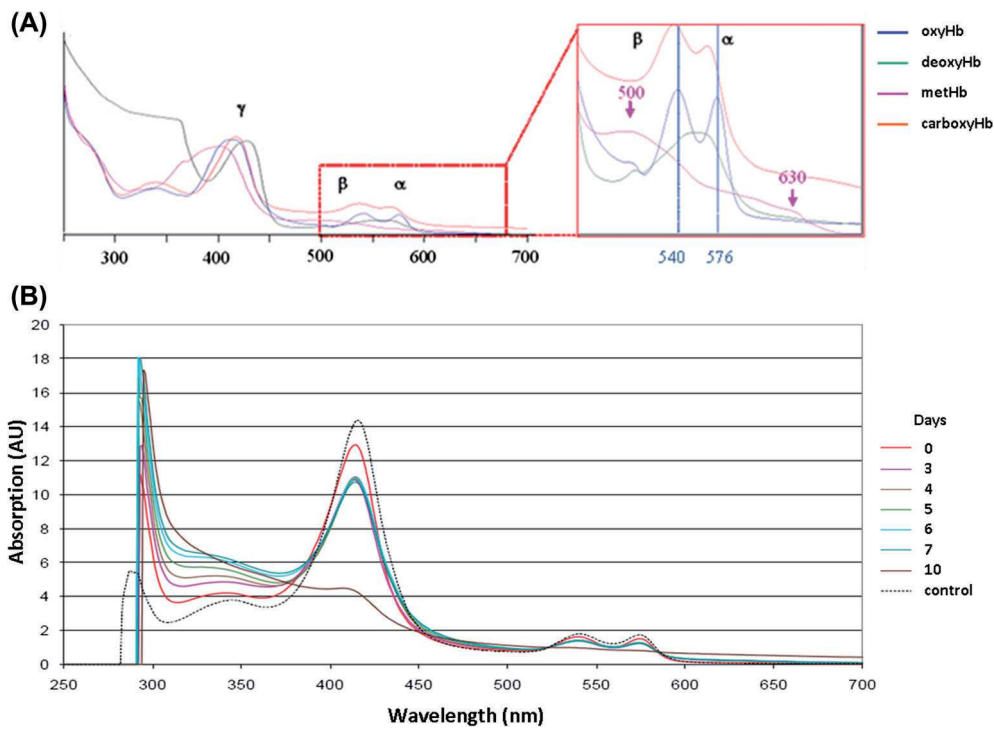


Figure 6. HEMOXCell® UV-visible spectra. (A) UV-visible absorption spectrum of HEMOXCell® under its different conformations. Soret band ( $\gamma$ ) is between about 406 and 430 nm, beta band ( $\beta$ ) and alpha band ( $\alpha$ ) are in the ranges of 500–555 nm and 555–630 nm respectively. (Blue: oxyhemoglobin; green: deoxyhemoglobin; pink: methemoglobin; orange: carboxyhemoglobin). (B) The absorbance of 0.750 g/L HEMOXCell® was determined as between 250 and 700 nm during the 10 days. The spectra obtained were superposed on a graphic representation. The control spectrum corresponds to HEMOXCell® diluted at 0.750 g/L in the conditioning buffer. Results were normalized at 523 nm and corresponding to one experiment. (AU = Absorption unit).

such as anti-oxidative properties and its ability to deliver a high amount of oxygen in a simple oxygen gradient.

In the first part of this project, we have demonstrated how HEMOXCell® increased cell density in the batch bioreactor system and extended the exponential phase of growth

for one or two days. Our results on the growth follow-up revealed a dose-dependent effect of HEMOXCell® with an optimal concentration of 0.500 g/L. Higher concentrations gradually increase the PDT, probably due to an overdose of HEMOXCell® in the medium, inducing a reverse effect of the oxygen carrier. In addition, cell viability could be maintained for a longer period with the optimal dose and stay higher than 95% until day 6 of culture. It is crucial to maintain a high viability in order to enhance the production rate of cells (Birch and Racher 2006, Wurm 2004). A closer study of cell death highlights an apoptotic process by the activation of caspase-3 apoptotic protein. This kind of cell death is characteristic of batch culture and is in major part due to a depletion of nutrients and a lack or an excess of dissolved oxygen, which induces modifications of the physiological environment (Arden and Betenbaugh 2004, Goswami et al. 1999). HEMOXCell® has no impact on the induction of the apoptotic process, therefore a possible combination of this oxygen additive in cell medium with CHO cells transfected with the *bcl-2* or *bcl-x* gene can be expected, according to other reports (Majors et al. 2008). Chemical compounds such as Suramin (Zanghi et al. 2000) or proteins like transferrin and insulin have also shown anti-apoptotic effects on CHO cells cultured in the bioreactor (Sunstrom et al. 2000).

Indeed, in this study, we have shown that cells died *via* apoptosis until day 6, and an induced death was detected at day 7 in culture with or without HEMOXCell®. Considering the higher cell density with HEMOXCell®, observations could be correlated with an increase of nutrient consumption and therefore with an increase of apoptotic effects. The results show that cell density remains relatively constant during this

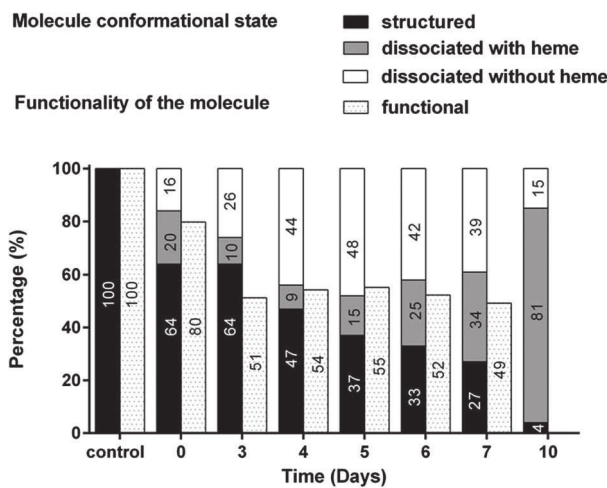


Figure 7. Structural and functional evolution of HEMOXCell® during CHO-S batch culture. The evolution of the various conformational states of HEMOXCell® during culture is represented in percentage (%) per day. Results correspond to the percentage of the structured molecule, the molecule dissociated containing heme, and the molecule dissociated without heme, in comparison with the control conditions consisting of HEMOXCell® diluted at 0.750 g/L in the conditioning buffer. The evolution of HEMOXCell® functionality during culture is represented as percentage (%) per day. Results correspond to the percentage of unoxidized functional molecules in comparison with the control conditions consisting of HEMOXCell® diluted at 0.750 g/L in the conditioning buffer.

period (6–7 days of culture), and this is why we observed the occurrence of cell death. This observation reflects a balance between cell division and cell death. However, these results are difficult to interpret because in our system, cell culture was maintained as a batch, without removal of medium. The decrease of viability, with only about 18% at day 10, corresponds to the phase of cellular decay. During this phase, cells no longer divide and die, causing an increasing degradation of culture conditions and accelerating the process of cell death (Collins et al. 1997).

The second part of this work consisted of evaluating the impact of HEMOXCell® on recombinant protein production in the transfected CHO-S cell line. In our model, the calibration of fluorescence detection was required because we observed an auto-fluorescence of culture medium, probably linked to pyridines and flavines contained (Drepper et al. 2010). However, this auto-fluorescence can constitute a limitation to the fluorometric detection of EGFP. Nonetheless, an analysis of EGFP production shows an increase by more than 70% in the presence of HEMOXCell®.

In parallel to these analyses, the structure and functionality of HEMOXCell® were monitored during culture. We observed a degradation of the molecule over time as well as a loss of functionality. These analyses have to be completed and experiments may need to be repeated in culture medium continuously buffered with carbon dioxide, which should be sufficient to limit the dissociation of molecules. HEMOXCell® is a naturally highly polymerized protein constituted of 198 polypeptide chains including 156 globin chains, each being able to bind one oxygen molecule (Zal et al. 1997). It has been reported that pH variations and temperature can improve the dissociation process (Rousselot et al. 2006), suggesting the use of a continuous culture system to ensure a stable structure of the molecule. An alternative could be the encapsulation of HEMOXCell®, as for example a dialysis system, to retain degradation products.

Indeed, oxygen supply in bioproduction is currently performed by direct bubbling of air and oxygen into the culture medium. In some cases, it could become cytotoxic and involved in oxidative stress or a mechanism damaging the culture. High oxygen supply has been reported to increase CHO growth without inducing an increase of intracellular superoxide level, which seems to have a stimulating effect on oxygen consumption by cells (Kurano et al. 1990).

Despite the fact that we still must work towards improvements of our batch culture process, HEMOXCell® could constitute an innovative tool for bioproduction in batch, fed-batch and continuous culture modes. HEMOXCell® is a new technology produced as an additive for cell culture, its high sensitivity to oxygen pressure allowing the oxygen delivery to the cells according to their needs. This delivery occurs by a simple gradient of the partial pressure of oxygen within the culture medium, which represents a new and original concept.

This project was realised at a laboratory scale using HEMOXCell® as the oxygen carrier, demonstrating, as a first step, its capability to improve cell growth rate, stabilize and maintain high cell viability, and on the other hand, increase of the targeted recombinant protein production rate. In this

context, a recent study was initiated using different rates of stirring and gas supply. Our preliminary results appear to confirm the beneficial contribution of HEMOXCell® on CHO growth rate, with the use of significantly lower doses. The optimization of culture conditions, such as reducing the rate of stirring and controlling the supply of carbon dioxide, seems to limit cell death and to improve growth. These parameters will be considered to optimize the culture of CHO cells and to improve the production of recombinant proteins.

Complementary experiments such as fed-batch and continuous modes have to be addressed. In addition, this study on the CHO-S cell line will be extended with the use of other cell lines, for example, hybridoma for the production of monoclonal antibodies.

This present work contributes to a better understanding of the potential of HEMOXCell® and highlights points for improvement, to optimize large-scale bioproduction in a GMP-compliant manner.

## Acknowledgments

The authors thank the ANRT (Association Nationale Recherche Technologie) for its financial contribution (grant CIFRE N°2012/1161). We are grateful to Olivier Berteau (HEMARINA Inc, Cambridge-USA) for his help with the proofreading and his support.

## Conflict-of-interest disclosure

F. Z. and M. Ro. are founders and hold stock in HEMARINA SA, which produces the substance being investigated. E. L. holds stocks in HEMARINA SA. F. L. is an employee of HEMARINA SA and doesn't hold stock. All other authors declare no conflict of interest. Materials for the studies were provided by HEMARINA.

## References

- Almo SC, Love JD. 2014. Better and faster: improvements and optimization for mammalian recombinant protein production. *Curr Opin Struct Biol.* 26C:39–43. doi:10.1016/j.sbi.2014.03.006
- Arden N, Betenbaugh MJ. 2004. Life and death in mammalian cell culture: strategies for apoptosis inhibition. *Trends Biotechnol.* 22: 174–180. doi:10.1016/j.tibtech.2004.02.004
- Birch JR, Racher AJ. 2006. Antibody production. *Adv Drug Deliv Rev.* 58:671–685. doi:10.1016/j.addr.2005.12.006
- Cacciuttolo MA, Trinh L, Lumpkin JA, Rao G. 1993. Hyperoxia induces DNA damage in mammalian cells. *Free Radic Biol Med.* 14:267–276. doi:10.1016/0891-5849(93)90023-N
- Chabasse C, Bailly X, Rousselot M, Zal F. 2006. The multigenic family of the extracellular hemoglobin from the annelid polychaete *Arenicola marina*. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol.* 144:319–325. doi:10.1016/j.cbpb.2006.03.007
- Collins JA, Schandi CA, Young KK, Vesely J, Willingham MC. 1997. Major DNA fragmentation is a late event in apoptosis. *J Histochem Cytochem.* 45:923–934.
- Costa AR, Withers J, Rodrigues ME, McLoughlin N, Henriques M, Oliveira R, et al. 2013. The impact of cell adaptation to serum-free conditions on the glycosylation profile of a monoclonal antibody produced by Chinese hamster ovary cells. *N Biotechnol.* 30:563–572. doi:10.1016/j.nbt.2012.12.002
- deZengotita VM, Abston LR, Schmelzer AE, Shaw S, Miller WM. 2002. Selected amino acids protect hybridoma and CHO cells from elevated carbon dioxide and osmolality. *Biotechnol Bioeng.* 78: 741–752. doi:10.1002/bit.10255



- Dhanasekharan KM, Sanyal J, Jain A, Haidari A. 2005. A generalized approach to model oxygen transfer in bioreactors using population balances and computational fluid dynamics. *Chem Eng Sci.* 60:213-218. doi:10.1016/j.ces.2004.07.118
- Dorai H, Ellis D, Keung YS, Campbell M, Zhuang M, Lin C, Betenbaugh MJ. 2010. Combining high-throughput screening of caspase activity with anti-apoptosis genes for development of robust CHO production cell lines. *Biotechnol Prog.* 26:1367-1381. doi:10.1002/btpr.426
- Drepper T, Huber R, Heck A, Circolone F, Hillmer A-K, Büchs J, Jaeger K-E. 2010. Flavin mononucleotide-based fluorescent reporter proteins outperform green fluorescent protein-like proteins as quantitative *in vivo* real-time reporters. *Appl Environ Microbiol.* 76:5990-5994. doi:10.1128/AEM.00701-10
- Figueroa B, Ailor E, Osborne D, Hardwick JM, Reff M, Betenbaugh MJ. 2007. Enhanced cell culture performance using inducible anti-apoptotic genes E1B-19K and Aven in the production of a monoclonal antibody with Chinese hamster ovary cells. *Biotechnol Bioeng.* 97:877-892. doi:10.1002/bit.21222
- Goswami J, Sinskey AJ, Steller H, Stephanopoulos GN, Wang DIC. 1999. Apoptosis in batch cultures of Chinese Hamster Ovary cells. *Biotechnol Bioeng.* 62:632-640. doi:10.1002/(SICI)1097-0290(19990320)62:6<632::AID-BIT2>3.0.CO;2-I
- Hu W-S, Aunins JG. 1997. Large-scale mammalian cell culture. *Curr Opin Biotechnol.* 8:148-153. doi:10.1016/S0958-1669(97)80093-6
- Jenkins N, Parekh RB, James DC. 1996. Getting the glycosylation right: implications for the biotechnology industry. *Nat Biotechnol.* 14:975-981. doi:10.1038/nbt0896-975
- Kaneko Y, Sato R, Aoyagi H. 2010. Evaluation of Chinese hamster ovary cell stability during repeated batch culture for large-scale antibody production. *J Biosci Bioeng.* 109:274-280. doi:10.1016/j.jbiosc.2009.09.044
- Kelley B. 2009. Industrialization of mAb production technology: the bioprocessing industry at a crossroads. *MAbs.* 1:443-452.
- Krampe B, Al-Rubeai M. 2010. Cell death in mammalian cell culture: molecular mechanisms and cell line engineering strategies. *Cytotechnology.* 62:175-188. doi:10.1007/s10616-010-9274-0
- Kurano N, Leist C, Messi F, Kurano S, Fiechter A. 1990. Growth behavior of Chinese hamster ovary cells in a compact loop bioreactor: 1. Effects of physical and chemical environments. *J Biotechnol.* 15:101-111. doi:10.1016/0168-1656(90)90054-F
- Lee JS, Ha TK, Park JH, Lee GM. 2013. Anti-cell death engineering of CHO cells: co-overexpression of Bcl-2 for apoptosis inhibition, Beclin-1 for autophagy induction. *Biotechnol Bioeng.* 110:2195-2207. doi:10.1002/bit.24879
- Majors BS, Betenbaugh MJ, Pederson NE, Chiang GG. 2008. Enhancement of transient gene expression and culture viability using Chinese hamster ovary cells overexpressing Bcl-x(L). *Biotechnol Bioeng.* 101:567-578. doi:10.1002/bit.21917
- Meents H, Enenkel B, Eppenberger HM, Werner RG, Fussenegger M. 2002. Impact of coexpression and coamplification of sICAM and antiapoptosis determinants bcl-2/bcl-x(L) on productivity, cell survival, and mitochondria number in CHO-DG44 grown in suspension and serum-free media. *Biotechnol Bioeng.* 80:706-716. doi:10.1002/bit.10449
- Muller B, Bourdais G, Reidy B, Bencivenni C, Massonneau A, Condamine P, et al. 2006. Association of Specific Expansins with Growth in Maize Leaves Is Maintained under Environmental, Genetic, and Developmental Sources of Variation. *Plant Physiol.* 143:278-290. doi:10.1104/pp.106.087494
- Oller AR, Buser CW, Tyo MA, Thilly WG. 1989. Growth of mammalian cells at high oxygen concentrations. *J Cell Sci.* 94:43-49.
- Omasa T, Onitsuka M, Kim W-D. 2010. Cell engineering and cultivation of chinese hamster ovary (CHO) cells. *Curr Pharm Biotechnol.* 11:233-240.
- Pavlou AK, Reichert JM. 2004. Recombinant protein therapeutics—success rates, market trends and values to 2010. *Nat Biotechnol.* 22:1513-1519. doi:10.1038/nbt1204-1513
- Rita Costa A, Elisa Rodrigues M, Henriques M, Azeredo J, Oliveira R. 2010. Guidelines to cell engineering for monoclonal antibody production. *Eur J Pharm Biopharm.* 74:127-138. doi:10.1016/j.ejpb.2009.10.002
- Rousselot M, Delpy E, Drieu La Rochelle C, Lagente V, Pirow R, Rees J-F, et al. 2006. *Arenicola marina* extracellular hemoglobin: a new promising blood substitute. *Biotechnol J.* 1:333-345. doi:10.1002/biot.200500049
- Seth G, Hossler P, Yee JC, Hu W-S. 2006. Engineering cells for cell culture bioprocessing—physiological fundamentals. *Adv Biochem Eng Biotechnol.* 101:119-164.
- Sunstrom NA, Gay RD, Wong DC, Kitchen NA, DeBoer L, Gray PP. 2000. Insulin-like growth factor-I and transferrin mediate growth and survival of Chinese hamster ovary cells. *Biotechnol Prog.* 16:698-702. doi:10.1021/bp000102t
- Walsh G. 2006. Biopharmaceutical benchmarks 2006. *Nat Biotechnol.* 24:769-776. doi:10.1038/nbt0706-769
- Wuest DM, Harcum SW, Lee KH. 2012. Genomics in mammalian cell culture bioprocessing. *Biotechnology Adv.* 30:629-638. doi:10.1016/j.biotechadv.2011.10.010
- Wurm FM. 2004. Production of recombinant protein therapeutics in cultivated mammalian cells. *Nat Biotechnol.* 22:1393-1398. doi:10.1038/nbt1026
- Zal F, Green BN, Lallier FH, Toulmond A. 1997. Investigation by electrospray ionization mass spectrometry of the extracellular hemoglobin from the polychaete annelid *Alvinella pompejana*: an unusual hexagonal bilayer hemoglobin. *Biochemistry.* 36:11777-11786. doi:10.1021/bi9712899
- Zal F, Rousselot M. 2014. Extracellular hemoglobins from annelids, and their potential use in biotechnology. In S. L. Barre & J.-M. Kornprobst (Eds.). *Outstanding Marine Molecules*. Weinheim, German: Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, pp. 361-376. Retrieved from <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/9783527681501.ch16/summary>
- Zanghi JA, Renner WA, Bailey JE, Fussenegger M. 2000. The growth factor inhibitor suramin reduces apoptosis and cell aggregation in protein-free CHO cell batch cultures. *Biotechnol Prog.* 16:319-325. doi:10.1021/bp0000353

---

## Discussion

---

La lignée CHO et ses dérivés, constituent le modèle de référence pour la production de protéines recombinantes. Ce modèle est exigeant, comme toutes les cellules de mammifère, néanmoins son utilisation est maîtrisée et de nombreux outils, aussi bien génétiques que moléculaires, ont été développés pour en améliorer la viabilité et la productivité (Meents *et al.*, 2002; Figueroa *et al.*, 2007; Dorai *et al.*, 2010). De nombreuses équipes se focalisent sur l'amélioration des conditions de culture en bioréacteurs et doivent pour ce faire, passer par des étapes de mise au point à l'échelle du laboratoire. De nombreux paramètres peuvent impacter la viabilité et la croissance cellulaire, ainsi que la productivité. Pour maintenir une densité cellulaire suffisante, il faut limiter les effets délétères des procédés employés. Les systèmes de bullage sont agressifs, et responsables de la formation de radicaux libres et d'un stress, causant des dommages cellulaires et impactant la production. Dans cet article nous avons montré la capacité d'HEMOXCell® à satisfaire les besoins en oxygène des cellules CHO-S dans un système de bioréacteur à échelle réduite, n'utilisant pas de système de bullage. L'analyse de l'effet dose-réponse a permis d'établir une gamme d'utilisation de la molécule, ainsi que de déterminer sa durée d'efficacité. Au-delà d'une certaine concentration les effets observés étaient inversés probablement en raison la teneur en Fer de l'hémoglobine qui aurait alors un effet pro-oxydant.

L'avantage principal de la technique employée, est qu'elle permet d'opérer de multiples bioréacteurs en simultanés et donc d'étudier plusieurs conditions en parallèle. Le volume réduit des bioréacteurs permettait de faciliter la démarche expérimentale, tout en limitant son coût. Cela nous a permis d'établir efficacement la capacité d'HEMOXCell® à booster la croissance cellulaire et à maintenir une bonne viabilité, tout en améliorant considérablement le taux de production de protéines recombinantes. Ce travail a contribué à une meilleure compréhension du potentiel oxygénant d'HEMOXCell® et à la mise en évidence des points à améliorer, pour pouvoir envisager son utilisation en bioproduction à grande échelle. Néanmoins, le protocole de culture ainsi établi, permettait en moins d'une semaine de statuer sur l'efficacité d'un lot d'HEMOXCell®.

Forts de ces différents constats, nous avons choisi d'évaluer son potentiel d'oxygénation dans la culture de cellules souches mésenchymateuses de moelle osseuse, en effectuant selon le même principe, une analyse dose-réponse.

# CHAPITRE III

## Les cellules souches mésenchymateuses

---

*Résumé : Ce troisième chapitre sera consacré à un type cellulaire d'intérêt thérapeutique, les cellules souches mésenchymateuses (CSM) et à leurs nombreuses applications. L'oxygène étant un facteur clé dans la fonctionnalité et dans le devenir de ces cellules, nous présenterons au cours de cette partie les différentes approches méthodologiques développées pour évaluer la contribution d'HEMOXCell® dans leur culture. D'une part nous évalueront son impact dans la croissance cellulaire ainsi que son éventuelle cytotoxicité et d'autre part nous réaliseront une analyse fonctionnelle.*

---



**- Chapitre III -**

## **Introduction**



---

# 1. Les cellules souches mésenchymateuses

---

## 1.1. Historique

Le chercheur russe Alexander Maximow (1874-1928) fut le premier à démontrer que les cellules sanguines dérivait d'un précurseur immature commun. Il établit par la suite le concept de l'hématopoïèse et des cellules souches hématopoïétiques (CSH) de moelle osseuse (MO). Loin d'être encore admis à l'époque, l'héritage laissé par Maximow fut



Figure 27 - A.J. Friedenstein. © Elena Elstner

repris en détail par Alexander Friedenstein (1924-1998) (Figure 27) (Boris V. Afanasyev, 2009). Ce dernier fut le premier à découvrir l'existence de cellules de MO non hématopoïétiques. En effet, il isola à partir de MO totale des cellules adhérentes de type fibroblastique, « fibroblast-like », avec un fort potentiel clonogénique. En plus de pouvoir donner des colonies de type fibroblastique *in vitro* (CFU-F : colony forming unit-fibroblast), ces cellules étaient fortement prolifératives (Friedenstein *et al.*, 1974). Il mit aussi en évidence leur capacité de différenciation *in vivo* en cellules adipocytaires, chondrocytaires et ostéoblastiques ainsi que leur rôle majeur dans le soutien stromal de l'hématopoïèse. Leur capacité à se différencier en cellules de lignées mésenchymateuses leur a valu le nom de cellules stromales mésenchymateuses, puis par la suite de cellules souches mésenchymateuses (CSM). Maximow et Friedenstein furent considérés comme des scientifiques réactionnaires par l'union socialiste soviétique de Russie (USSR) mais sont actuellement considérés comme les pionniers des connaissances actuelles sur les CSH et les CSM, cellules désormais utilisées dans les domaines de la thérapie cellulaire (ex : transplantation de CSH) et de l'ingénierie tissulaire.

## 1.2. Définition

Les cellules souches sont des cellules indifférenciées retrouvées un peu partout au sein de notre organisme et ce, dès notre vie utérine. Elles ont la capacité de s'auto-renouveler afin de maintenir un stock de cellules indifférenciées et de se différencier en cellules matures. On



distingue différentes sous-catégories selon leur capacité de différenciation (*i.e.*, leur aptitude à générer différents types de cellules spécialisées ou précurseurs de ces dernières) :

- **Les totipotentes** : Les cellules avec le plus fort potentiel de différenciation sont les cellules générées lors de l'embryogénèse (stade 64 cellules). Ces cellules sont dites totipotentes car elles ont la capacité à elles seules de pouvoir donner naissance aux 200 types de cellules, y compris celles des lignées germinales.

- **Les pluripotentes** : Les cellules pluripotentes sont issues d'un embryon de 5 à 7 jours appelé à ce stade « blastocyste ». Ce dernier comporte une masse cellulaire interne pouvant générer pratiquement tous les types cellulaires. Ces cellules sont appelées cellules souches embryonnaires et font l'objet de nombreux débats éthiques. Elles participent à la formation de l'embryon.

- **Les multipotentes** : Appelées cellules souches adultes (ou somatiques), elles sont retrouvées dans tout notre organisme et vont permettre d'assurer le renouvellement des cellules et ainsi permettre le maintien de l'intégrité tissulaire. Elles sont capables de donner naissance à un ou plusieurs groupes de cellules ayant une fonction particulière (spécialisation).

- **Les unipotentes** : Ces cellules sont engagées dans un processus de différenciation leur permettant de produire un seul type cellulaire. Elles coexistent avec les cellules multipotentes dans les tissus adultes.

Les CSM et les CSH sont des cellules souches adultes, elles vont s'auto-renouveler tout au long de la vie pour assurer un stock de cellules indifférenciées et la formation de cellules matures. Ce sont des entités clonogéniques, ce qui implique qu'une cellule a la capacité de donner naissance à une population clonale identique à la cellule d'origine. Elles peuvent aussi se différencier en types cellulaires autres que ceux retrouvés dans leur tissu d'origine, c'est le phénomène de plasticité cellulaire.

### **1.3. Caractérisation *in vitro* des CSM**

Bien qu'initialement isolées de moelle osseuse, les CSM peuvent être isolées d'autres tissus dont les principaux sont le tissu adipeux et le sang de cordon (Mosna *et al.*, 2010). La variabilité dans les méthodes utilisées pour isoler, cultiver et caractériser les CSM rendait difficile la comparaison des résultats entre différents laboratoires. Les CSM issues de sources

différentes possédaient néanmoins des caractéristiques communes. La société internationale de thérapie cellulaire (ISCT) a établi des critères minimums pour pouvoir définir les CSM. Tout d'abord il s'agit de cellules qui doivent être adhérentes au plastique des récipients de culture. Elles doivent aussi exprimer un panel spécifique de protéines membranaires et pour finir, leur multipotence doit pouvoir être établie *in vitro* (Tableau 6) (Dominici *et al.*, 2006). Ces critères ont permis de diminuer la variabilité expérimentale et constituent actuellement un contrôle qualité à satisfaire pour la culture de CSM.

**Tableau 6 - Les critères minimaux de caractérisation des CSM *in vitro*.**  
(Dominici *et al.*, 2006)

| <b>1/ Adhérence au plastique dans des conditions de culture standard</b>              |  |   |
|---|--|---|
| <b>2/ Phénotype</b>   | <b>Positive (<math>\geq 95\%</math>)</b> | <b>Négative (<math>\leq 2\%</math>)</b> |
|   | CD105                                    | CD45                                    |
|   | CD73                                     | CD34                                    |
|   | CD90                                     | CD14 ou CD 11b                          |
|   |  | CD79 $\alpha$ ou CD19                   |
|   |  | HLA-DR                                  |
| <b>3/ Différenciation <i>in vitro</i> en ostéoblastes, adipocytes et chondrocytes</b> |  |   |

### 1.3.1. L'adhérence

La méthode d'isolement des CSM mise au point par Friedenstein reposait uniquement sur leur adhérence au plastique contrairement autres cellules de la MO. Cette méthode est encore très utilisée que ce soit à partir de MO totale non purifiée ou de la couche de cellules mononuclées de la MO après centrifugation en gradient de Ficoll<sup>TM</sup>. La fraction de cellules mononuclées est mise en culture et seules les CSM vont adhérer au plastique par l'intermédiaire de leurs nombreuses molécules d'adhésion membranaires (intégrines), les cellules hématopoïétiques seront éliminées au cours des lavages. Les quelques cellules hématopoïétiques adhérentes seront rapidement noyées dans la masse. Ce type d'extraction ne permet pas d'obtenir une population cellulaire homogène dès le début de la culture car les populations présentent des cinétiques de croissance différentes et une faible contamination par les cellules hématopoïétiques. Il est néanmoins possible d'obtenir une population pure par isolation avec des anticorps spécifiques comme STRO-1, CD146, CD105, ALP ou encore CD271 (Bianco *et al.*, 2013).

### 1.3.2. Le phénotypage membranaire

Le phénotypage est réalisé en cytométrie en flux le plus souvent à l'aide d'anticorps monoclonaux couplés à des fluorochromes. De nombreux marqueurs sont exprimés à la surface de la membrane des CSM, ils dépendent cependant de l'espèce et du tissu d'origine mais aussi des conditions de culture. Ci-dessous, le tableau 7 reprend les marqueurs de CSM référencés, il s'agit d'une liste non exhaustive. Il faut tenir compte du fait que le phénotype des CSM *in vivo* diffère de celui retrouvé *in vitro*, car elles vont perdre l'expression de certains marqueurs et en acquérir de nouveaux (Rasini *et al.*, 2013).

**Tableau 7 - Les principaux marqueurs des CSM.** (d'après Mark F. Pittenger and Martin 2004).

| Marqueurs de surface des CSM            |  |
|---|--|
| Marqueurs présents à la surface des CSM | CD13, CD29, CD44, CD49 (Intégrines) a, b, c,e,f, CD51, CD54 (ICAM1), CD58, CD71, <b>CD73 (SH3)</b> , <b>CD90 (Thy-1)</b> , CD102, <b>CD105 (SH2)</b> , CD106 (VCAM), CDw119, CD120a, CD120b, CD123, CD124, CD126 (ALCAM), CD127, CD140a, CD166, CD271 P75, TGFβIR, TGFβIIR, HLA-A,B,C, SSEA-3, SSEA-4, D7. |
| Marqueurs absents de la surface des CSM | CD3, CD4, CD6, CD10, CD11a, <b>CD14</b> , CD15, CD18, CD21, CD25, CD31, <b>CD34</b> , CD36, CD38, <b>CD45</b> , <b>CD49d</b> , CD50, CD62E,L,S, CD80, CD86, CD95, CD117, CD133, SSEA-1, HLA-DR   |

#### 1.3.2.1. Les marqueurs positifs

**Selon l'ISCT :** Le **CD105** (Endoglin), joue un rôle dans l'homéostasie vasculaire et aussi dans la modulation des fonctions du TGF-β (Transforming Growth Factor beta) *via* son interaction avec ses récepteurs RI et RII (Pittenger *et al.*, 1999). Dans une étude récente, des populations de CSM hétérogènes pour le CD105, ont été isolées à partir de MO de souris. Les sous populations CD105<sup>-</sup> et CD105<sup>+</sup> restaient indépendantes et conservaient leurs caractéristiques au cours des passages. Bien que l'expression de CD105 par les CD105<sup>+</sup>, semblait être affectée par les passages, ces deux populations possédaient un potentiel de prolifération identique et répondaient pour les autres marqueurs aux critères de l'ISCT. Ils ont néanmoins observé que les CSM CD105<sup>-</sup> se différenciaient plus efficacement en adipocytes et en ostéocytes que les CD105<sup>+</sup>. Ce marqueur devrait être réévalué pour sa pertinence dans le phénotypage des CSM (Anderson *et al.*, 2013). Le **CD73** (5'-nucléase), intervient dans la catalyse de la production d'adénosine à partir d'AMP. Le **CD90** (Thy1), va jouer un rôle dans la réparation des tissus ainsi que dans les interactions cellulaires et matricielles. Elles

expriment entre autres des molécules d'adhésion telles que CD29, CD106 et CD166/ALCAM (Activated leucocyte cell adhesion molecule).

**Autres marqueurs récemment admis pour la caractérisation des CSM:** Depuis les marqueurs proposés par l'ISCT en 2006, de nouveaux marqueurs ont fait leur apparition (Tableau 8). Il ne s'agit pas de marqueurs exclusivement identifiés chez les CSM mais d'un panel retrouvé chez ces dernières. Parmi les plus cités il y a le **CD271** retrouvé sous l'appellation "low-affinity nerve growth factor" (LNGFR). Il s'agit d'un récepteur pour neurotrophines qui stimule la survie et la différenciation des cellules neurales. Ce marqueur est considéré comme le plus spécifique pour la caractérisation et la purification (CFU-F(+)) des CSM de MO mais il permet également d'isoler les CSM de tissu adipeux et de placenta. En revanche il semble inapproprié pour l'obtention de CSM de sang de cordon (Álvarez-Viejo *et al.*, 2015 p.271). **STRO-1** est un second nouveau marqueur des CSM. L'anticorps monoclonal anti-STRO-1 permet d'enrichir considérablement la population de CFU-F de la MO mais pas du stroma endométrial humain (Bensidhoum *et al.*, 2004). Il est très peu exprimé par les autres sources de CSM et son expression dans les CSM de MO augmente au cours du temps de culture. Il serait impliqué dans le « homing » cellulaire et l'angiogenèse, il est également exprimé par quelques cellules érythroïdes nucléées (Lv *et al.*, 2014).

**Tableau 8 - Nouveaux marqueurs identifiés, exprimés à la surface des CSM.** (Lv *et al.*, 2014)

| Marqueurs de surface | Utilité des marqueurs   |
|----------------------|---|
| Stro-1               | Enrichissement des CFU-F à partir de MO totale  |
| CD271                | Isolement et caractérisation des CSM de MO et du tissu adipeux                                      |
| SSEA-4               | Enrichissement des CFU-F à partir de MO totale  |
| CD146                | Enrichissement des CFU-F à partir de CSM de MO  |
| CD49f                | Enrichissement en CSM pluripotentes et clonogéniques  |
| CD349                | Enrichissement en CFU-F des cellules de placenta  |
| GD2 (Ganglioside 2)  | Forte spécificité pour l'isolement des CSM de MO  |
| 3G5                  | Enrichissement en CFU-F   |
| SSEA-3               | Enrichissement en cellules à fort potentiel de différenciation en ectoderme, endoderme et mésoderme |
| SUSD2                | Enrichissement en CFU-F et en cellules multipotentes  |
| Stro-4               | Enrichissement en CFU-F   |
| MSCA-1               | Enrichissement en CFU-F (x 90) des CSM de MO  |
| CD200                | Enrichissement en CFU-F de CMNMO  |
| PODXL                | Diminution en cultures de fortes densités   |
| Sox11                | Down régulation au cours de la culture  |

L'anticorps monoclonal **W5C5** récemment décrit par Sivasubramaniyan, reconnaît exclusivement les CSM dans la MO. Il reconnaît une protéine membranaire, la **SUSD2** (Sushi domain containing 2). L'analyse en cytométrie en flux et l'analyse CFU-F révélèrent que seules les cellules SUSD2(+) pouvaient générer des CFU-F et étaient multipotentes *in vitro* (Sivasubramaniyan *et al.*, 2013).

### 1.3.2.2. Les marqueurs négatifs

Les CSM n'expriment pas à leur membrane les marqueurs des lignées sanguines immatures ou matures, tels que CD3, CD4, CD11a, CD34 et CD45 (Pittenger & Martin, 2004). Elles n'expriment pas les molécules co-stimulantes CD40, CD80 et CD86 et pas non plus les molécules d'adhésion CD18, CD31 et CD56. Les autres marqueurs absents de la surface des CSM sont listés dans le Tableau 7.

### 1.3.3. La plasticité cellulaire

Les CSM sont des cellules multipotentes, elles peuvent être cultivées *in vitro* pour générer une grande variété de cellules différenciées (Figure 28).

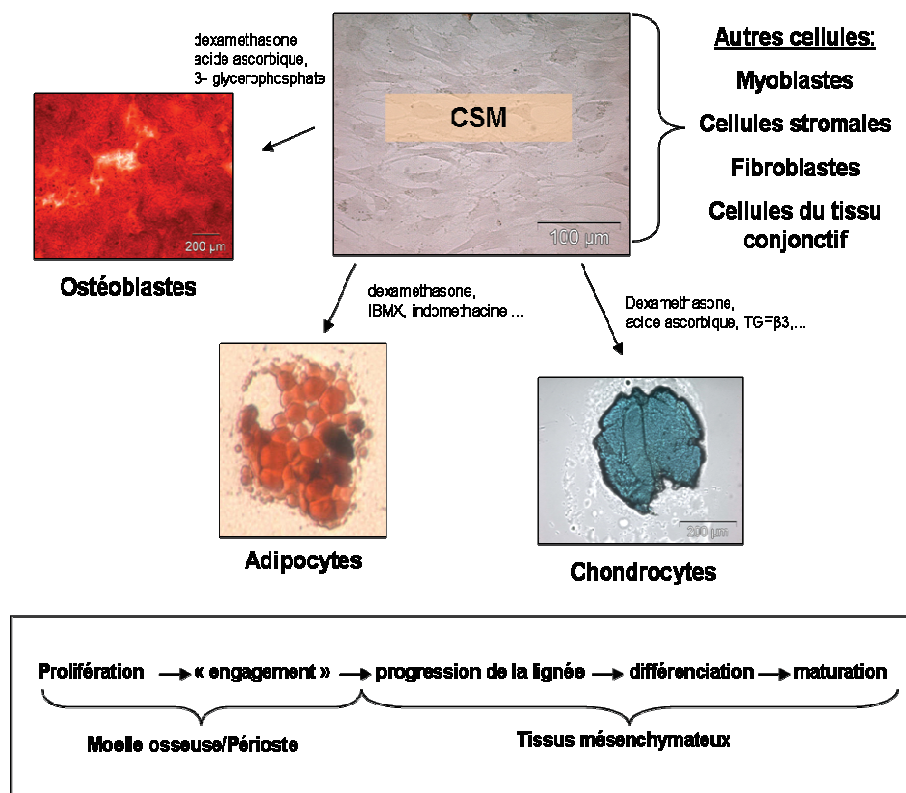


Figure 28 - La plasticité des CSM de moelle osseuse.

Le stade final de différenciation dépend des conditions de culture (*i.e.*, milieu et suppléments). *In vivo*, les CSM se différencient essentiellement en tissus mésenchymateux tels que le cartilage, l'os, le muscle lisse, les ligaments, les tendons et le tissu graisseux (Pittenger *et al.*, 1999).

Selon leur origine les CSM vont pouvoir plus facilement emprunter une voie de différenciation qu'une autre. Quelle que soit leur origine, elles possèdent des fonctionnalités similaires, mais pas identiques. Par exemple les CSM de sang de cordon sont moins sensibles à la différenciation adipocytaire que celles de MO et du tissu adipeux (Kern *et al.*, 2006). Cependant, lorsqu'elles sont cultivées dans un environnement défini *in vitro* elles peuvent aussi se différencier en d'autres types cellulaires comme les cellules rétinienne, les astrocytes (Wislet-Gendebien *et al.*, 2005), les cellules du foie et du pancréas (Chen *et al.*, 2004) et les cardiomyocytes (Toma *et al.*, 2002). Dans une étude de 2015 sur la régénération cardiaque, Shadrin et son équipe ont décrit la formation et la caractérisation de cellules hybrides issues de la fusion de CSM humaines et de myocytes ventriculaires de rat néonataux (NRVMs). Contrairement aux cellules hybrides obtenues à l'aide de PEG ou de HJV (Hemagglutinating virus of Japan), ils ont réalisé une fusion spontanée par co-culture. Les hybrides obtenus présentaient des caractéristiques proches des cardiomyocytes (Shadrin *et al.*, 2015).

Au laboratoire, en accord avec les principes définis par l'ISCT, leur capacité à se différencier en adipocytes, ostéoblastes et chondrocytes (AOC) est évaluée. Chaque laboratoire a ses propres milieux d'induction avec des variations dans la composition et les concentrations des constituants (Mosna *et al.*, 2010).

## **1.4. Les CSM de moelle osseuse**

Actuellement la MO et le tissu adipeux sont les principales sources pour un usage clinique mais leur obtention nécessite un acte invasif. C'est pourquoi d'autres sources alternatives ont été envisagées comme le placenta, le cordon ombilical, la gelée de Wharton et l'amnios. Cependant, ces tissus nécessitent un traitement complexe pour l'isolement cellulaire (Sharma *et al.*, 2014). Dans le cadre de ce travail nous nous focaliserons sur les CSM de MO.

### **1.4.1. La moelle osseuse**

La MO est la source cellulaire la plus demandée pour la thérapie cellulaire car elle contient les CSH qui vont donner naissance aux cellules des différentes lignées sanguines et

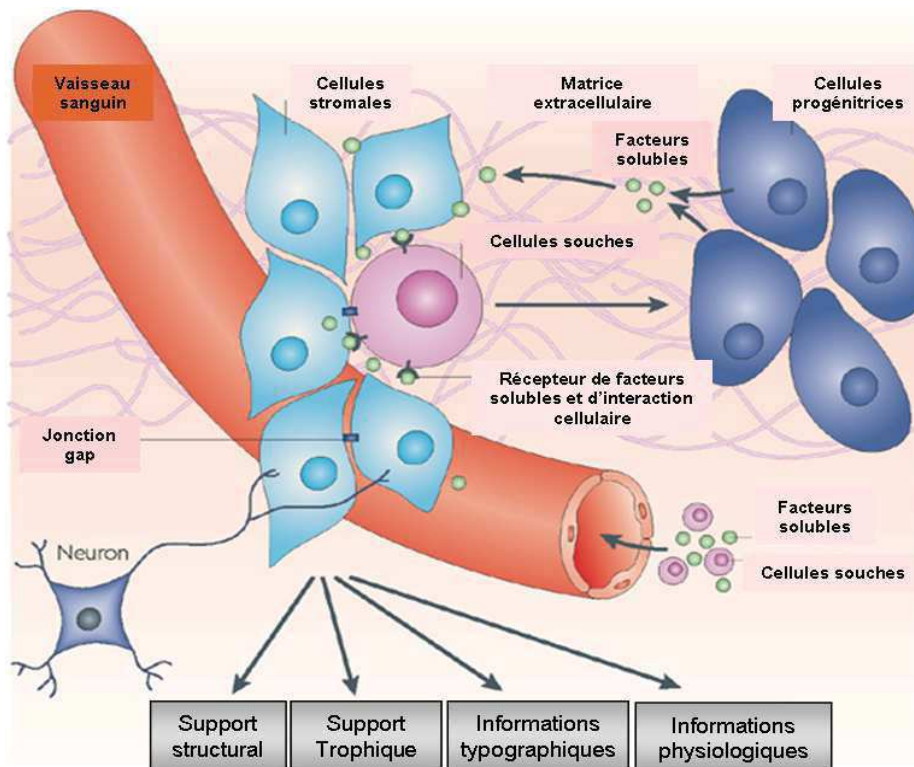
les CSM qui vont assurer le soutien stromal. Un autre type cellulaire multipotent serait aussi présent dans la MO, les MAPC (Multipotent adult progenitor cells). Ces dernières seraient les cellules les plus immatures de la MO à l'origine à la fois des CSH et des CSM (Jahagirdar & Verfaillie, 2005). Les CSM sont retrouvées à la surface externe des sinusoides de vaisseaux sanguins (capillaires) de la MO qui constituent une partie du compartiment tridimensionnel périvasculaire stromal. Ce compartiment trouve son origine au cours de l'organogénèse osseuse et contient les CSM du stroma médullaire, responsables de la régénération de l'environnement de la MO.

Les CSM ne représentent qu'une faible proportion des cellules nucléées de la moelle osseuse, 0.001 à 0.01 %, elles sont donc environ 10 fois moins abondantes que les CSH. De plus, leur fréquence a tendance à diminuer avec l'âge (Kim *et al.*, 2012).

## 1.4.2. Notion de niche

### 1.4.2.1. Définition

Dans l'organisme la région périvasculaire où sont regroupées les cellules souches est retrouvée sous l'appellation de « niche » (Kolf *et al.*, 2007) (Figure 29).



**Figure 29 - Représentation schématique de la composition d'une niche de cellules souches.** (d'après Jones and Wagers 2008)

Ce compartiment spécialisé a pour rôle d'assurer le maintien de l'intégrité des tissus et organes de l'organisme. Il comprend des composants cellulaires et non-cellulaires (composants matriciels et facteurs solubles) qui vont intégrer les signaux nécessaires à la régulation de la biologie des cellules comme l'auto-renouvellement et la différenciation. Une niche est constituée de cellules souches, de cellules stromales, de facteurs solubles, d'une MEC organisée, d'interactions neuronales, d'un réseau vasculaire et de facteurs d'adhérence cellulaire (Jones & Wagers, 2008). Cet ensemble constitue un microenvironnement dynamique et hautement spécialisé dans lequel règne une très faible pression en O<sub>2</sub>.

#### 1.4.2.2. La niche hématopoïétique

Il existe deux modèles de niches hématopoïétiques bien connus : la niche vasculaire, avec un stroma constitué de cellules du sinus vasculaire et la niche ostéoblastique, dont la composante stromale est essentiellement issue de la différenciation de CSM en ostéoblastes (Jones & Wagers, 2008). Il s'agit d'un environnement hypoxique et protecteur au sein duquel les CSM, les CSH et d'autres cellules sont étroitement liées entre elles. Cette proximité va leur permettre de réguler leur différenciation et d'assurer un maintien de leurs caractéristiques d'où l'appellation de « niche hématopoïétique ». A l'intérieure de cette niche, les cellules vont pouvoir intégrer des signaux locaux et systémiques. Ce microenvironnement possède une MEC et un nombre important de facteurs solubles sécrétés par les CSM.

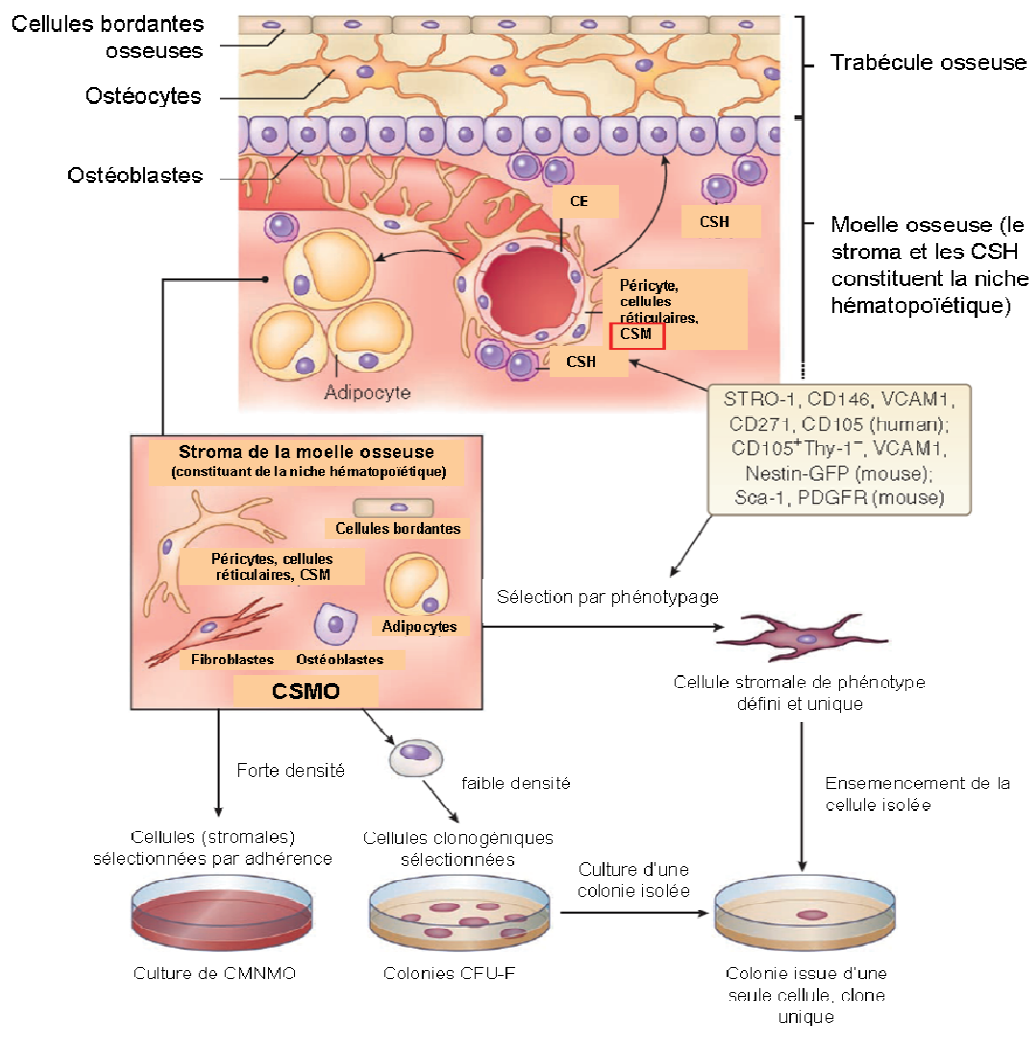
#### 1.4.2.3. Les composants matriciels et cellulaires

La MEC de la niche hématopoïétique est constituée de protéines fibreuses, de protéoglycanes et de glycoprotéines (ex : collagènes, fibronectine, laminine, etc.) sécrétés par les CSM. L'ensemble de ces composés va assurer la structure physique de la niche.

Parmi les populations cellulaires peuplant la moelle osseuse autres que les CSH il y a les CSM, les cellules réticulaires, les fibroblastes, les cellules des sinusoides vasculaires (cellules endothéliales recouvertes d'une couche de cellules réticulaires), les adipocytes, les macrophages et les lymphocytes (Sacchetti *et al.*, 2007; Bianco *et al.*, 2013) (Figure 30). Seules les cellules stromales CD146+ vont pouvoir générer des CFU-F avec une forte capacité d'auto-renouvellement et de différenciation ostéoblastique, indispensable au soutien stromal (Sacchetti *et al.*, 2007). Les cellules endothéliales des capillaires sinusoides, vont être impliquées dans la migration des cellules matures, de la niche vers la circulation sanguine. A



l'inverse, un autre phénomène consiste au retour des cellules matures dans les niches, c'est ce qu'on appelle la domiciliation ou le « homing » (Bensidhoum *et al.*, 2004). En plus de leur rôle dans la production de la structure matricielle, les CSM assurent l'homéostasie du tissu osseux en se différenciant en cellules de soutien comme les ostéoblastes et les adipocytes. Elles vont sécréter des facteurs de croissance et des cytokines impliqués activement dans la prolifération et la différenciation des CSH (ex : angiopoïétine-1, VCAM-1 et le récepteur au SCF), mais aussi des molécules membranaires d'adhésion telles que les intégrines, qui vont impacter le comportement des CSH *via* des interactions cellulaires (Bianco *et al.*, 2013).



CE: cellules endothéliales; CSH: cellules souches hématopoïétiques,  
 CMNMO: cellules mononuclées de la moelle osseuse;  
 CSMO: cellules stromales de la moelle osseuse;  
 CFU-F: colony forming unit-fibroblast

**Figure 30 - Le microenvironnement de la niche hématopoïétique et isolement des CSM.**  
 (Bianco *et al.*, 2013)

Certains de ces facteurs vont interagir de façon transitoire avec des composants de la MEC et d'autres vont assurer l'auto-renouvellement et la prolifération des CSM elles-mêmes (Tableau 9).

**Tableau 9 - Facteurs solubles et récepteurs des CSM retrouvés *in vitro*.** (Kim *et al.*, 2005)

|   |   |
|---|---|
| Cytokines et facteurs de croissances sécrétés par les CSM | Il 1 $\alpha$ , 6, 7, 8, 11, 12, 14, 15<br>Flt 3 ligand, GM-CSF, G-CSF, M-CSF, LIF, SCF |
| Récepteurs aux cytokines et aux facteurs de croissance    | Il 1R, 3R, 4R, 6R, 7R, LIF R, SCF R, G-CSF-R, INF $\gamma$ R, TNF IR, IIR               |

Il: Interleukine; Flt: Fms-related tyrosine kinase; CSF: Colony stimulating factor; G: Granulocyte; M: Macrophage; LIF: leukaemia inhibitory factor; SCF: Stem cell factor

## 1.5. Culture des CSM de moelle osseuse

Les CSM sont généralement obtenues par aspiration de la MO de la crête iliaque ou du sternum. De petits volumes sont prélevés (< 4 mL) pour éviter une hémodilution de la moelle (dilution par le sang). La tête fémorale constitue un site alternatif (Lee *et al.*, 2003). *In vitro*, les propriétés de différenciation et de prolifération des CSM peuvent être influencées par de multiples facteurs provenant des conditions de culture ou du donneur lui-même (Siddappa *et al.*, 2007) (Tableau 10).

**Tableau 10 - Facteurs impliqués dans la variabilité des CSM.**

| Donneur                  | Conditions de culture         |
|--------------------------|-------------------------------|
| Tissu d'origine          | Milieu de culture             |
| Qualité de l'échantillon | Système de culture            |
| Age et sexe du donneur   | Avec ou sans sérum            |
| Maladies éventuelles     | Lysat plaquettaire ou SVF     |
|                          | Facteurs de croissance        |
|                          | Taux d'O <sub>2</sub> dissout |
|                          | Nombre de passage             |

### 1.5.1. Densité d'ensemencement

La densité d'ensemencement initiale est importante pour le maintien des propriétés des CSM. Un ensemencement de 5 000 à 10 000 CMNMO/cm<sup>2</sup> (cellules mononucléées de la MO) permettrait d'enrichir la population en cellules adhérentes et fortement prolifératives (Sotiropoulou *et al.*, 2006a). La densité d'ensemencement lors des sous cultures des CSM est inversement corrélée à leur capacité de prolifération (Neuhuber *et al.*, 2008). Après avoir réalisé des ensemencements de 200 à 5 000 cellules/cm<sup>2</sup>, Lee et son équipe ont analysé l'impact de la densité à l'ensemencement sur l'expression de facteurs jouant un rôle dans la migration cellulaire et la réparation tissulaire. Ils ont démontré que l'expression de PODXL, LIF et des intégrines  $\alpha 4$  et  $\alpha 6$  était supérieure avec un ensemencement de 200 cellules/cm<sup>2</sup> (Lee *et al.*, 2013b).

Idéalement il faudrait utiliser une faible densité d'ensemencement, cependant pour des productions de tailles importantes cela nécessiterait de grandes surfaces de culture ainsi qu'un coût et un temps considérables. Un ensemencement à 1 000 cellules par cm<sup>2</sup> semble être un bon compromis (Sekiya *et al.*, 2002).

### 1.5.2. Passages et confluence

Plusieurs équipes ont démontré l'impact de l'âge du donneur sur les propriétés de différenciation et de prolifération des CSM *in vitro* (Stenderup *et al.*, 2003). D'après les résultats obtenus au cours de différentes études sur ce sujet, il existerait une balance entre les différenciations adipogénique et ostéogénique des CSM de moelle osseuse. En effet, la proportion d'adipocytes est plus élevée dans les os âgés, alors que la formation osseuse y est diminuée. Cela a conduit Kim et ses collaborateurs à émettre le concept que l'inhibition de l'adipogenèse pourrait améliorer la formation osseuse (Kim *et al.*, 2012). Les modifications observées au niveau des propriétés des CSM ne seraient non pas une conséquence directe du vieillissement des cellules mais plutôt un conditionnement dû à la modification de la composition du microenvironnement de la MO (*i.e.*, hormones, facteurs de croissance, acides gras) (Justesen *et al.*, 2002). Leurs résultats indiquaient que l'âge des CSM *in vitro* (nombre de passages en culture) impacterait plus fortement les propriétés des CSM que leur âge *in vivo* (âge du donneur).

#### 1.5.2.1. L'âge *in vivo* des CSM

L'âge des CSM va occasionner un changement de morphologie cellulaire, les CSM perdent au cours du temps leur structure en fuseau de type « fibroblast-like » en faveur d'un aspect plus rond et d'une vitesse de prolifération amoindrie. Les gènes P53 et P21 sont up-régulés avec l'âge, ce qui est corrélé avec l'augmentation de leur expression durant la sénescence cellulaire. Les CSM de donneurs âgés ont probablement accumulé un plus grand nombre de passages que celles de jeunes donneurs et vont donc montrer les signes d'une sénescence accélérée (Kim *et al.*, 2012).

#### 1.5.2.2. Vieillesse *in vitro* : les passages et doublements

La culture *in vitro* va fortement impacter leur capacité de prolifération, en effet il est observé que les CSM perdent leur capacité proliférative au cours des passages. Les résultats obtenus par Bonab et ses collaborateurs ont montré une diminution de 7,7 à 1,2 doublements de population entre le premier et le 10<sup>ème</sup> passage avec respectivement 100% à 40% des échantillons capables de se différencier en adipocytes et de 100% à 80% en ostéoblastes. En parallèle ils ont aussi établi une diminution de la longueur des télomères (Bonab *et al.*, 2006). Par ailleurs une publication de Rubio et son équipe parue en 2005 faisait état des risques de cancérisation liés à la culture sur le long terme des CSM (Rubio *et al.*, 2005). Ils ont été forcés de revenir sur leurs résultats en 2010 car ces derniers se sont révélés être non reproductibles.

#### 1.5.2.3. La confluence

La confluence a aussi un impact sur les caractéristiques des CSM comme la prolifération et la plasticité. Lee et son équipe ont étudié l'impact de la confluence lors des passages cellulaires et ont démontré que 80% était la confluence idéale. La prolifération et la clonogénicité sont diminuées à 100% de confluence de même que la capacité pro-angiogénique (Lee *et al.*, 2013b).

L'utilisation de CSM cultivées à 80% pour des applications cliniques semble être préférable.

### 1.5.3. Milieu de culture

Le plus souvent les CSM sont cultivées dans les milieux  $\alpha$ MEM (Minimum essential medium) et Dulbecco's MEM (DMEM) supplémentés avec 10% de SVF (Sotiropoulou *et al.*, 2006b). Cependant les études utilisant du SVF ne font référence qu'à des applications *in vitro*.

Des milieux de culture sans sérum (serum-free) ont été développés avec une composition en facteurs de croissance bien définie (ex : PDGF, Platelet-derived growth factor, FGF-2, Fibroblast growth factor 2, etc.). L'utilisation de milieux sans sérum constitue un point important pour la sécurité clinique en raison des problèmes soulevés par l'utilisation de sérum d'origine bovine. Une comparaison entre différents milieux de culture et techniques de culture a été réalisée par Sotiropoulou en 2006. Il compara l'impact de l'ensemencement initial, de la densité au repiquage et de la composition du milieu sur le maintien du phénotype cellulaire et des propriétés proliférative et immunorégulatrice des CSM (Sotiropoulou *et al.*, 2006a). Les milieux à base d' $\alpha$ MEM offrirait de meilleurs résultats, à la fois pour l'isolement et la prolifération cellulaire. Il a observé une croissance maximale avec les milieux contenant du Glutamax car ce dernier contient le dipeptide L-alanyl-L-glutamine qui est plus stable que la L-glutamine, laquelle se dégrade rapidement en générant de l'ammonium diminuant la prolifération cellulaire.

#### 1.5.4. SVF vs LP

A la fois dans le domaine de la recherche et pour des applications cliniques le SVF est le supplément nutritif usuellement utilisé dans la culture des CSM.

Cependant il persiste certaines réticences concernant son utilisation à des fins clinique du fait des risques de contamination (prion et pathogènes viraux) et de potentielles réactions immunitaires liées à la présence de composés d'origine (Wessman & Levings, 1998; Bernardo *et al.*, 2007; Sundin *et al.*, 2007). En effet, il a été démontré que les CSM internalisaient des protéines issues du SVF présentant alors un risque immunogène (Spees *et al.*, 2004). L'impact de l'utilisation du SVF sur la capacité de prolifération et la plasticité des CSM *in vivo* n'est pas encore suffisamment compris en exclure son utilisation. La conception d'un milieu parfaitement défini pour la production de CSM à un grade clinique n'a pas encore été finalisée.

En attendant, des compléments alternatifs d'origine humaine comme le sérum humain, le plasma riche en plaquettes (PRP, platelet rich plasma) ou le lysat plaquettaire, dérivés de sang humain (hLP) sont actuellement utilisés dans de nombreuses études réalisées à partir de CSM (Muller *et al.*, 2006; Bieback *et al.*, 2009). La société ZenBio commercialise actuellement des flacons de pools de lysat plaquettaire humain destinés à la culture cellulaire. Les granules plaquettaires renferment de nombreux facteurs de croissance qui sont relargués par éclatement des  $\alpha$ -granules à la suite de cycles de congélation/décongélation répétés

(Doucet *et al.*, 2005). Parmi ces facteurs: l'EGF (Epidermal growth factor), le VEGF (vascular endothelial growth factor), le PDGF, le bFGF, le TGF-1 et l'IGF-1 (insulin-like growth factor -1) (Shanskii *et al.*, 2013).

Ils sont présents en quantité beaucoup plus importante dans le LP que dans le SVF (Tableau 11). Ces facteurs jouent un rôle indispensable dans la prolifération et la différenciation des CSM (Ng *et al.*, 2008).

**Tableau 11 – Comparaison entre la composition en facteurs de croissance du SVF et du hPL.**  
(Shanskii *et al.*, 2013)

| Facteurs de croissance (pg/mL) | SVF (n=4)    | hLP (n=46)      |
|--------------------------------|--------------|-----------------|
| PDGF AA                        | 141.9 ± 14.5 | 6908 ± 673*     |
| PDGF AB                        | 26.8 ± 7.7   | 3984 ± 487*     |
| PDGF BB                        | 0            | 8196 ± 979      |
| IGF-1                          | 64.1 ± 3.3   | 108.7 ± 4.5*    |
| TGF-β                          | 845.0 ± 66.5 | 16303 ± 1004.8* |
| VEGF                           | 2.5 ± 1.5    | 147.7 ± 19.8*   |

\*p<0.05 en comparaison avec le SVF

Le hLP présente de nombreux avantages en comparaison au SVF notamment celui de pouvoir être obtenu à partir de concentrés plaquettaires périmés de 5 jours sans impacter, ni le phénotype ni la multipotence des CSM (Jonsdottir-Buch *et al.*, 2013). De plus, le contenu plaquettaire protégerait les cellules des instabilités chromosomiques et favoriserait leurs propriétés immunorégulatrices (Flemming *et al.*, 2011; Trojahn Kølle *et al.*, 2013). Son efficacité serait comparable entre différents lots, ce qui n'est pas le cas pour le SVF (Jochems *et al.*, 2002; Capelli *et al.*, 2007). Par ailleurs, plusieurs études ont révélé une augmentation de la vitesse de prolifération des CSM cultivées en présence de LP, de même qu'une amélioration de leurs potentiels ostéogéniques et vasculaires (Naaijkens *et al.*, 2012; Leotot *et al.*, 2013; Trojahn Kølle *et al.*, 2013; Rubio-Azpeitia & Andia, 2014).

L'hPL apparait comme un potentiel substitut au SVF pour les programmes de recherche et pour la production à grande échelle de CSM pour des applications cliniques. Il favoriserait même les différenciations chondrocytaire et ostéoblastique (Wang *et al.*, 2015).

### 1.5.5. Influence de l'oxygène dans la culture des CSM *in vitro*

Comme nous l'avons abordé au début de ce chapitre, l'O<sub>2</sub> régule de nombreux aspects de la biologie et du métabolisme cellulaire. Les tissus peu vascularisés peuvent atteindre des concentrations proches de 1% pO<sub>2</sub> alors que pour les tissus vascularisés, la normoxie est aux alentours de 12% pO<sub>2</sub>. Ces valeurs sont bien éloignées des 21% pO<sub>2</sub> de l'air ambiant (Mohyeldin *et al.*, 2010). Les niches cellulaires offrent un environnement protecteur dans lequel est établi un gradient en oxygène créant une condition hypoxique pour les cellules souches et stromales (Parmar *et al.*, 2007). La pression en O<sub>2</sub> du microenvironnement des CSM influence directement le comportement cellulaire *via* le factor HIF (Hypoxia inducible factor) en maintenant leur état souche et leur multipotence (Chen *et al.*, 2010). En effet HIF est impliqué dans l'activation de RhoA et donc dans l'augmentation de la mobilité cellulaire (Vertelov *et al.*, 2013). HIF aurait au moins 1 000 gènes cibles qu'il régulerait directement ou indirectement (Ejtehadifar *et al.*, 2015).

Actuellement les modèles d'études des CSM s'accordent à reproduire les conditions physiologiques avec des environnements pauvres en oxygène (Ivanovic, 2009). Il a été démontré que la culture des CSM à 3% O<sub>2</sub> augmentait significativement la prolifération et la clonogénicité cellulaire (CFU-F). De plus une atmosphère pauvre en oxygène favoriserait l'expression des marqueurs souches tels que Rex-1 et Oct-4, et maintiendrait les fonctions cellulaires. Dans un modèle murin, le pré-conditionnement hypoxique a montré des effets bénéfiques sur les capacités de différenciation cellulaire en up-régulant les récepteurs aux chimiokines CXCR1, CXCR4 et le récepteur à l'HGF (Hepatocyte Growth Factor), (Berniakovich & Giorgio, 2013).

L'hypoxie de la niche favoriserait la capacité des CSM à migrer vers les sites inflammatoires en augmentant la mobilité cellulaire comme cela a été démontré *in vitro*, avec des tests de migrations en réponses à différentes cytokines (HGF, EGF, IIGF-1, etc.). De plus, la culture prolongée en hypoxie favoriserait l'auto-renouvellement et la multipotence. En comparant la culture de CSM à 20% O<sub>2</sub> *versus* 2%, l'équipe de Grayson a obtenu une densité cellulaire nettement supérieure dès 7 jours de culture pour la condition hypoxique, avec un tapis cellulaire orienté. Ils ont par ailleurs démontré une production accrue des protéines matricielles : connexine-43, Col I et fibronectine (Grayson *et al.*, 2007). Dans une autre étude le gène Rex1, qui joue un rôle dans le maintien de l'état indifférencié, a été retrouvé fortement

exprimé par les CSM de sang de cordon et du tissu adipeux en culture hypoxique (Basciano *et al.*, 2011).

De plus, de faibles pressions en O<sub>2</sub> maintiendraient une forte viabilité cellulaire due aux faibles besoins énergétiques cellulaires. En effet, dans la niche les cellules ajustent leur consommation d'oxygène et donc leur métabolisme énergétique, ce qui limite la production de radicaux libres et de ce fait les dommages cellulaires qu'ils occasionnent (Ejtehadifar *et al.*, 2015).

## **1.6. Fonctionnalité des CSM et intérêts thérapeutiques**

### **1.6.1. Soutien de l'hématopoïèse**

Les CSM sécrètent des facteurs de survie cellulaire comme le *stem cell factor* (SCF), et l'érythropoïétine (EPO) qui vont assurer la viabilité et la croissance des progéniteurs myéloïdes. Ils sont aussi impliqués dans la maturation des cellules souches érythroïdes. Le FLT-3 ligand, analogue structural du SCF et du CSF (colony stimulating factor), va avoir un rôle dans la croissance des progéniteurs immatures myéloïdes et mégacaryocytaires (responsables de la production des plaquettes). Les CSM jouent un rôle crucial dans la niche hématopoïétique et dans la prise de greffe hématopoïétique (Battiwalla & Hematti, 2009).

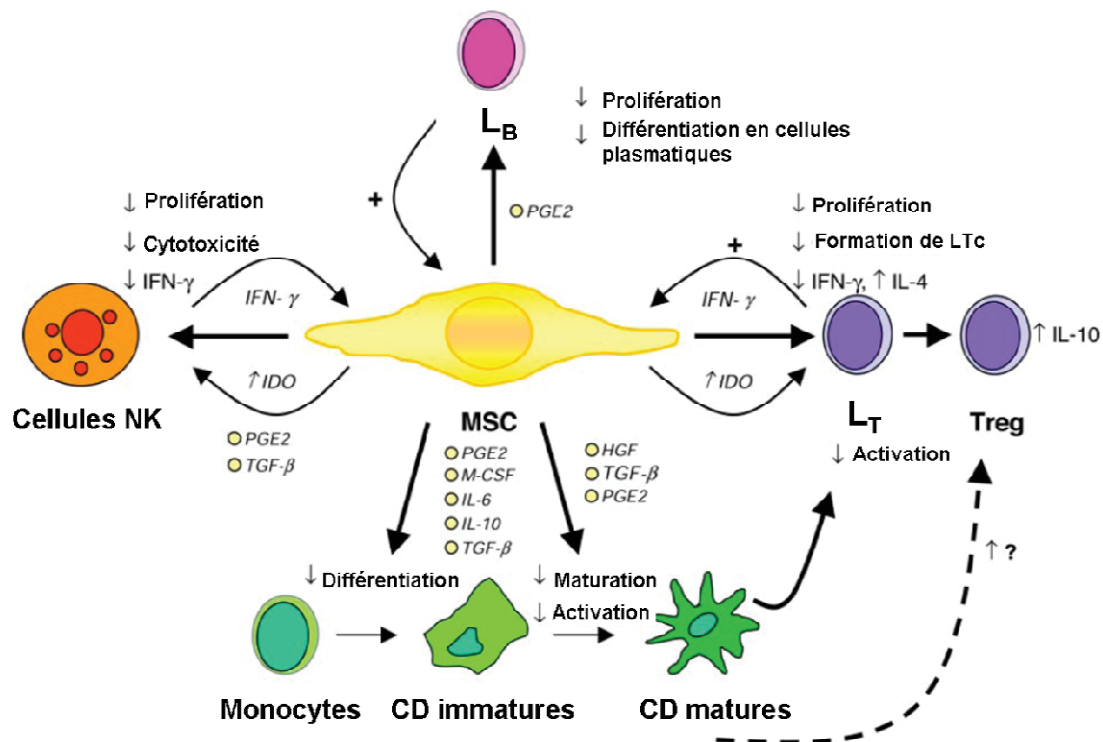
Dans la niche ostéoblastique, les CSM se différencient en ostéoblastes, indispensables à la synthèse de la trame osseuse et au développement des CSH. En effet des études rapportent qu'un déficit en ostéoblastes diminuerait l'hématopoïèse et que leur présence favoriserait la prise de greffe (Taichman *et al.*, 2000; Visnjic *et al.*, 2004).

### **1.6.2. Propriétés immunorégulatrices**

Les CSM possèdent des caractéristiques immunologiques uniques qui leur permettent d'assurer leur survie et leur croissance dans des contextes allogéniques. Des études ont démontré l'effet bénéfique des CSM notamment dans la diminution de la réaction du greffon contre l'hôte (GVHD, graft versus host disease) (Newell *et al.*, 2014). Ce sont les candidates idéales pour une utilisation clinique car elles possèdent de nombreux effets immunomodulateurs *in vivo* et *in vitro*. Elles agissent aussi bien au niveau de l'immunité innée que de l'immunité adaptative. Les CSM peuvent potentiellement interagir avec les



lymphocytes T (LT), les lymphocytes B (LB), les cellules NK (Natural killer) et les cellules dendritiques (CD) (Figure 31) (Nauta and Fibbe 2007).



**Figure 31 - Actions immuno-régulatrices des CSM.** LB, lymphocytes B ; LT, lymphocytes T ; Treg , lymphocytes T régulateur ; CD, cellules dendritiques, NK, natural killer ; LTc , lymphocytes T cytotoxiques ; HGF, hepatocyte growth factor ; IDO, indoleamine 2,3Dioxygénase ; PGE2, prostaglandine E2 ; TGFβ, transforming growth factor β . (D'après Nauta and Fibbe 2007)

En effet, *in vivo* elles exercent une action au niveau des monocytes en inhibant leur maturation en cellules dendritiques et en diminuant la fonction présentatrice d'antigènes de ces dernières. Elles vont diminuer l'activité et la formation des cellules NK. De plus, des expériences de co-culture *in vitro* ont démontré leur capacité à moduler la réponse immunitaire notamment en inhibant l'activation, la prolifération et la maturation des  $L_T$  cytotoxiques par contact cellule-cellule ou bien par sécrétion de facteurs comme l'HGF, le TGFβ1, la prostaglandine E2 et l'IDO (indoleamine 2,3Dioxygénase) (Sharma *et al.*, 2014). *In vivo*, elles vont favoriser en parallèle l'activation de  $L_T$  régulateurs *via* des mécanismes impliquant l'IL-10. Les CSM n'expriment pas les molécules de co-stimulation CD40, CD80 et CD86, ni le CMH (complexe majeur d'histocompatibilité) de classe II. Elles sont ainsi protégées de la lyse cellulaire induite par les NK allo-réactifs, cependant en présence d'interféron  $\gamma$  elles peuvent exprimer le CMH II. Elles expriment par ailleurs le CMH de classe I qui les protège d'une reconnaissance par le système immunitaire du receveur.

### 1.6.3. Notions de « Homing »

L'une des difficultés en thérapie cellulaire consiste à délivrer les cellules au niveau du site lésé, cet adressage localisé est appelé « Homing » (Devine *et al.*, 2003). L'efficacité thérapeutique des CSM est dépendante de leur capacité à produire des facteurs paracrines et juxtacrines (entre cellules adjacentes), qui vont activer la régénération tissulaire à partir des cellules souches endogènes. La migration et le Homing des CSM vers le site lésé est influencé par de multiples facteurs incluant l'âge, le nombre de passage cellulaire, les conditions de culture et le mode d'administration (Sohni & Verfaillie, 2013).

Le Homing est en majeure partie dépendant du récepteur à chimiokines CXCR4 et de son interaction avec son partenaire CXCL12, aussi impliqué dans le Homing des CSH (Sohni & Verfaillie, 2013). Pour que les CSM puissent migrer d'un site à l'autre, il faut à la fois la présence de signaux émis à partir du site altéré et la présence des récepteurs correspondants à la surface des CSM. L'expression de ces récepteurs *ex vivo*, est influencée par de multiples facteurs, c'est pourquoi les CSM fraîchement isolées vont migrer plus efficacement. Cependant des techniques ont été développées pour maintenir l'expression des récepteurs clés. Par exemple, des prétraitements avec des cytokines comme l'IL-6 et l'HGF vont augmenter l'expression de récepteurs impliqués dans la migration, comme le CXCR4 (Ponte *et al.*, 2007).

Le tropisme des CSM pour les sites inflammatoires est également retrouvé dans le cas des tumeurs, assimilées à des lésions qui ne guérissent pas. Ce « homing » tumoral a été référencé dans le cas de gliomes, de cancers pulmonaires, des ovaires, du sein, du colon ou encore du pancréas (Ramdasi *et al.*, 2015). Le mécanisme exacte est encore méconnu mais semble être lié au microenvironnement tumoral. Ce dernier intégrerait les CSM dans son stroma grâce à la sécrétion de facteurs solubles comme le FGF, l'EGF et TGF $\beta$ 1. L'adressage à la tumeur peut potentiellement servir pour cibler l'acheminement d'anticancéreux, directement vers les cellules malignes. Des stratégies thérapeutiques ont été développées, pour utiliser les CSM comme des véhicules pour cibler la production locale d'agents biologiques dans les tumeurs (Studený *et al.*, 2004). Mais aussi pour effectuer de la thérapie génique à l'aide de CSM génétiquement modifiées (Amara *et al.*, 2014). Certains s'accordent sur le double jeu des CSM dans le microenvironnement tumoral. Elles favoriseraient la formation de la niche tumorale en sécrétant des facteurs promouvant l'angiogenèse, entretenant la niche, modulant la reconnaissance immunitaire et favorisant le développement métastatique

(Galderisi *et al.*, 2010). Cependant ces mécanismes sont dépendants de la source tissulaire et de nombreux autres facteurs non répertoriés.

## 1.7. Essais cliniques

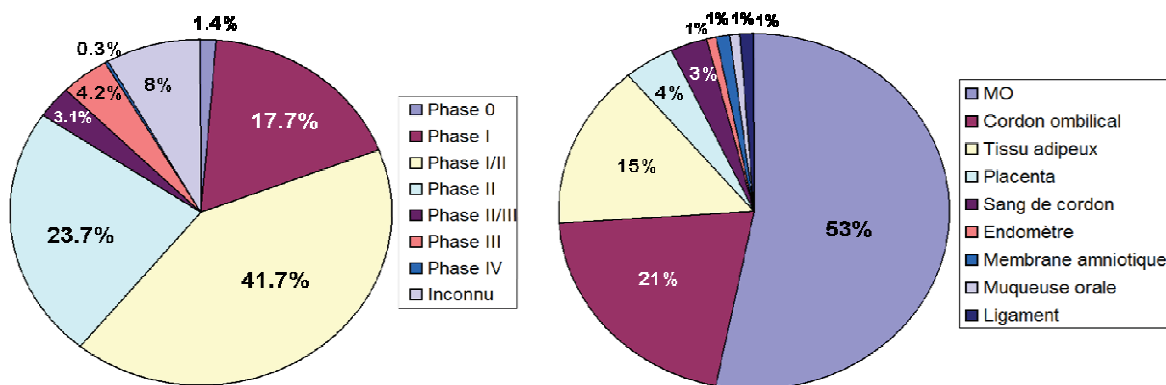
En 2010, Arnold Caplan proposa une nouvelle signification pour l'acronyme CSM « Cellules de Signalisation Médicinale » (MSC, *Medicinal Signaling Cell*), en référence aux bénéfices thérapeutiques qu'elles apportent *via* la sécrétion de molécules bioactives (Caplan, 2010). Les caractéristiques attribuées aux CSM que sont l'immunorégulation, la plasticité, le « homing », leurs propriétés antifibrotiques et leur facilité d'obtention et d'expansion *in vitro*, ont fortement suscité l'intérêt des cliniciens pour des applications cliniques.

Les CSM furent pour la première fois utilisées en clinique pour accélérer le rétablissement hématopoïétique dans un contexte de transplantation de CSH après chimiothérapie (Pittenger & Martin, 2004). Des transplantations de MO allogénique ainsi que des cultures *ex-vivo* de CSM de grade clinique, ont été utilisées pour favoriser la prise de greffe (MO ou organes), mais aussi dans les maladies inflammatoires, auto- et allo-immunes, telles que la maladie du greffon contre l'hôte (GVHD, graft versus host disease) (Battiwalla & Hematti, 2009).

La GVHD est une réaction qui fait suite à l'allogreffe de CSH, utilisée pour traiter de nombreuses hémopathies malignes (cancer du sang). Cette complication résulte de l'attaque des tissus du receveur par les cellules immunitaires du greffon. Une étude de phase II sur l'impact de l'infusion des CSM dans la GVHD a reporté que 30 patients sur les 50 inclus dans l'essai, avaient complètement répondu au traitement indiquant son efficacité contre la GVHD sévère résistante aux stéroïdes (Le Blanc *et al.*, 2008). Récemment, cette même équipe a démontré que les CSM contribuaient à la réduction de la fibrose dans un modèle murin de transplantation d'îlots de Langerhans. En outre, elles favoriseraient aussi la migration des cellules endothéliales du receveur et interagiraient avec les lymphocytes infiltrants (Fransson *et al.*, 2015). D'autres études ont apporté des résultats encourageants concernant leur utilisation pour le traitement de maladies auto-immunes, la prise de greffes rénales, ou pour la régénération cardiaque (Lopes *et al.*, 2013). Actuellement, près de 500 essais cliniques utilisant des CSM sont référencés dont 126 en Europe et 19 en France ([www.clinicaltrials.gov](http://www.clinicaltrials.gov)).

Bien qu'encourageants dans leur globalité, les résultats sont peu compatibles. Il persiste une certaine variabilité de la qualité des CSM entre différents donneurs et une variabilité dans les protocoles utilisés pour l'isolation, la culture et le traitement lors des essais cliniques (Tanavde *et al.*, 2015).

D'après la fédération internationale de biologie cellulaire (IFCB), 58% utilisent des CSM autologues et 30% des CSM allogéniques. En 2014, ils étaient pour la plupart en phase I/II et utilisaient majoritairement des CSM issues de la MO (Figure 32).



**Figure 32 - Phases cliniques des essais réalisés à partir de CSM en 2014 et sources tissulaires correspondantes.**

D'après : <http://www.bioinformant.com/tag/clinical-trials/> et <http://celltrials.info/2015/01/22/2014-report/>.



**- Chapitre III -**

## **Matériel & Méthodes**



---

## 1. Isolement et culture des cellules souches mésenchymateuses

---

Le savoir-faire technique concernant la culture des CSM provient en parti du centre de transfusion sanguine des armées de Clamart, nous nous sommes inspirés de leur expérience pour la mise en place de nos protocoles.

### 1.1. Milieux de culture

Le milieu de culture le plus communément utilisé en culture cellulaire est le DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium), il n'est cependant pas préconisé pour la culture des CSM à l'état indifférencié, mais constitue un milieu de base idéal pour les protocoles dans lesquels le maintien de l'état « souche » n'est pas la priorité. En revanche le milieu  $\alpha$ -MEM ( $\alpha$ -Minimum Essential Medium) constitue l'un des milieux les plus utilisés à cet effet, et c'est celui pour lequel nous avons opté pour nos protocoles de culture cellulaire. Il ressort de certaines études que l' $\alpha$ -MEM améliore la prolifération des CSM par comparaison avec d'autres milieux commerciaux et permet un meilleur maintien de leur phénotype souche (Sotiropoulou *et al.*, 2006b).

Dans tous nos protocoles, les milieux DMEM (PAA®, E15-832, France) et  $\alpha$ -MEM (PAA®, E15-832, France) sont systématiquement complétés avec 1% d'antibiotique, la Ciprofloxacine (2 mg/mL) (Panpharma®, France), 1% de L-glutamine à 200 mM (Gibco®, 25030-081, France) et avec 0.04% d'anticoagulant, l'héparine (25 000 UI/5 mL) (Panpharma®, France). Nous ajoutons de l'héparine à nos préparations pour éviter la gélification des milieux de culture. Cette gélification est due au lysat de plaquettes humaines (LP) que nous utilisons en substitut au sérum de veau fœtal (SVF) pour l'apport en facteurs de croissance et en nutriments essentiels à la croissance cellulaire. Le LP est plus riche en facteur de croissance que le SVF c'est pourquoi il est utilisé à 5% au lieu de 10% pour le SVF (Shanskii *et al.*, 2013). Parmi les nombreux facteurs qu'il renferme, le *thrombocyte-derived factor* ainsi que d'autres facteurs de coagulation, vont induire la gélification du milieu. L'héparine va agir en inhibant l'action de plusieurs enzymes intervenants dans cette cascade de coagulation.



Les milieux sont préparés à l'avance et sont conservés maximum un mois à 4°C, à l'abri de la lumière

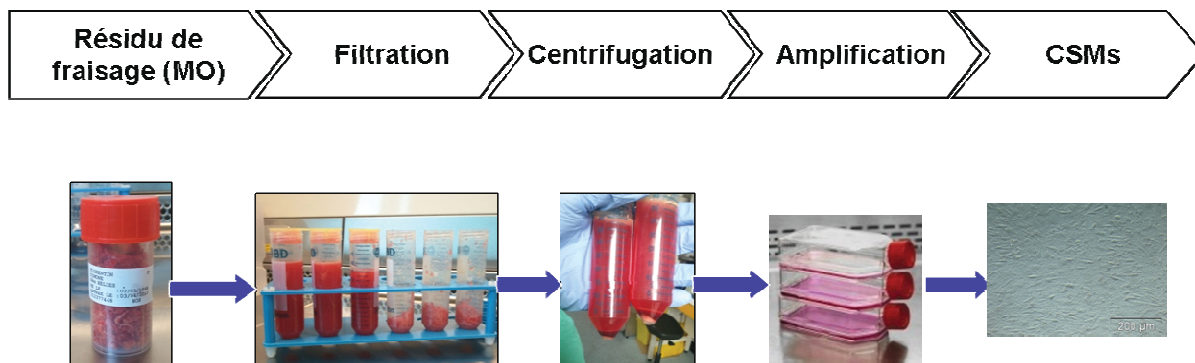
## **1.2. Préparation du lysat plaquettaire humain**

Le LP est obtenu par éclatement des plaquettes contenu dans le plasma sanguin. Des poches de mélanges de concentrés plaquettaires (MCP) périmés de 5 jours nous sont fournies par l'EFS. Ces poches ne sont plus utilisables en thérapie cependant leur contenu plaquettaire reste identique. De plus, qu'il soit utilisé frais ou périmé, le LP a montré des effets similaires dans la culture des CSM (Jonsdottir-Buch *et al.*, 2013). Les poches sont ensuite aliquotées en tubes Falcon de 15 mL annotés de la date et du numéro de lot attribué au MCP considéré. Les tubes sont ensuite stockés à -20 ou -30°C. Le contenu plaquettaire est relargué à la suite de plusieurs cycles de congélation/décongélation qui vont induire l'éclatement des plaquettes. Les tubes sont ensuite centrifugés 15 minutes à 1500 g pour éliminer les débris plaquettaires. Chaque lot est validé avant utilisation. Cette validation consiste à analyser la vitesse de croissance des CSM sur 3 passages cellulaires avec le nouveau lot, en utilisant un lot contrôle comme témoin d'efficacité. Sont conservés uniquement les lots permettant une vitesse de croissance égale ou supérieur au lot témoin. Les tubes de LP sont décongelés au fur et à mesure des besoins et sont conservés 1 an à -20°C.

## **1.3. Isolement des CSM**

Les cellules souches mésenchymateuses sont isolées à partir de la moelle osseuse de résidus d'alésage de cotyle, recueillis lors de la pose de prothèses totales de hanches. Nous sommes approvisionnés en échantillons par les chirurgiens orthopédistes de la Cavale Blanche (Autorisation ministérielle: DC-2009-1006).

de Brest. Le patient doit obligatoirement donner son autorisation écrite pour que le recueil puisse être réalisé. L'échantillon est transféré au laboratoire dans un contenant hermétique stérile recouvert d'un sac doublé et scellé. Il sera manipulé en salle de culture cellulaire sous un poste de sécurité microbiologique (PSM) dans des conditions stériles. Le résidu est réparti dans 3 tubes Falcon de 50 mL puis recouvert de 25 mL de milieu de culture  $\alpha$ -MEM (Figure 33).



**Figure 33 – Etapes du protocole d’isolement des cellules souches mésenchymateuses.**

Les cellules sont extraites par agitation manuelle des tubes fermés, puis le mélange est mis à décanter. Le contenu est ensuite filtré au moyen d’un tamis cellulaire d’une porosité de  $100\ \mu\text{m}$  (CellStainers BD Falcon<sup>TM</sup>, Biosciences, France) pour éliminer les débris osseux et adipeux. Une seconde étape de lavage du prélèvement est pratiquée et les filtrats sont ensuite centrifugés à  $1000\ g$  pendant 10 minutes à  $4\ ^\circ\text{C}$  pour culotter les cellules. Le surnageant et une partie de la couche rouge sont vidés par retournement. Les culots sont repris chacun dans 20 mL de milieu  $\alpha$ -MEM. La concentration cellulaire est ensuite déterminée par comptage avec une cellule de Malassez en utilisant le bleu Trypan (Sigma®) comme colorant vital (v/v). Dans l’idéal l’ensemencement est réalisé à  $100.10^3\ \text{cellules}/\text{cm}^2$ , cependant la concentration cellulaire est très variable d’un patient à un autre et le dénombrement est rendu difficile en raison des globules rouges encore présents. La plupart du temps nous optons pour un ensemencement direct des culots dans des flasques de  $175\ \text{cm}^2$  (1 culot par flasque). Les flasques sont ensuite complétées avec 5% de LP, puis placées dans l’incubateur à  $37^\circ\text{C}$ ,  $21\%\text{O}_2$ . Deux jours après, deux lavages au PBS1X sont effectués pour éliminer les débris et les cellules non adhérentes, principalement des cellules souches hématopoïétiques et des globules rouges. Par la suite le milieu est renouvelé 2 fois par semaine jusqu’à ce que les cellules atteignent la confluence. Elles vont alors subir leur premier passage (P1).

## 1.4. Culture des CSM

La technique de passage des cellules consiste à décoller les cellules qui adhèrent au plastique des flasques de culture par l'action de la trypsine. Une fois que les cellules sont bien décollées on ajoute du milieu de culture  $\alpha$ -MEM pour mettre en suspension les cellules. Cette suspension est centrifugée et le culot est repris dans 10 mL de milieu. La population cellulaire est ensuite dénombrée à l'aide d'un automate de comptage (ADAM, Labtech, France). Les CSM sontensemencées dans des flasques T175 dans du milieu  $\alpha$ -MEM complétement. Elles sont cultivées jusqu'à leur 3<sup>ème</sup> passage pour conserver leurs propriétés initiales. Nous travaillons avec deux densités d'ensemencement en fonction des protocoles réalisés. Lors des passages nous préférons les ensemencer à 400 cellules par  $\text{cm}^2$  pour maintenir les capacités prolifératives, leur clonogénicité et leur plasticité (Sekiya *et al.*, 2002). Cependant, certaines manipulations nécessitent d'avoir un maximum de cellules dans un minimum de temps, c'est pourquoi nous utilisons un ensemencement à 1000 cellules/ $\text{cm}^2$ , ce qui se trouve être un bon compromis entre la préservation des caractéristiques cellulaires et l'obtention d'une quantité cellulaire en un temps raisonnable (Sekiya *et al.*, 2002; Ikebe & Suzuki, 2014).

Selon les tests réalisés, nous avons parfois fait un parallèle entre la condition de culture en normoxie ( $\text{pO}_2$  21%) et la condition hypoxique ( $\text{pO}_2$  5%), à l'aide d'un incubateur tri-gaz (SANYO MCO-19M). Au niveau tissulaire la normoxie est le plus souvent aux alentours de 7-12 % d' $\text{O}_2$ , de ce fait les conditions considérées comme normoxiques correspondent à de l'hyperoxie tissulaire. La culture hypoxique (5%) va alors permettre de se rapprocher de l'environnement physiologique des cellules (Ivanovic, 2009).

## 1.5. Caractérisation des CSM *in vitro*

Nous avons choisi de caractériser les CSM sur la base des 3 critères établis par l'ISCT. Les CSM sont des cellules adhérentes au plastique de culture, elles ont la capacité *in vitro* de se différencier en adipocytes, en ostéoblastes et en chondrocytes, et elles expriment un panel de protéines membranaires permettant de les discriminer de la population hématopoïétique de la moelle osseuse. De nombreux autres marqueurs sont actuellement établis, ces derniers sont listés dans la partie 1.3. de l'introduction de ce chapitre.

### **1.5.1. Adhérence au plastique**

Cette particularité des CSM est la plus facile à identifier puisque c'est la base de notre protocole d'isolation. Les cellules non-adhérentes sont éliminées lors des lavages qui suivent l'ensemencement, seuls quelques macrophages vont adhérer, mais n'ayant pas de propriétés d'auto-renouvellement, ils disparaissent après quelques jours de culture.

La pureté de la population isolée est déterminée en P1 ou P2 par analyse du phénotype membranaire en cytométrie en flux.

### **1.5.2. Caractérisation membranaire**

Le phénotypage des cellules isolées est réalisé au cytomètre (BD Accuri<sup>TM</sup>) à l'aide du kit MSC phenotyping kit (Miltenyi). Ce kit contient des anticorps couplés à des fluorochromes dirigés contre les protéines membranaires exprimées par les CSM (CD90, CD105, CD73) et un panel de marqueurs négatifs, spécifiques des cellules souches hématopoïétiques (CD14, CD20, CD34, et CD45). Nous avons utilisé ce kit selon les recommandations du fournisseur. Nous avons en parallèle vérifié qu'elles étaient bien négatives pour le HLA-DR (anticorps anti-HLA-DR, Pharmingen).

### **1.5.3. Tests de différenciation**

Les protocoles de différenciation cellulaire ont en commun deux phases successives. Une phase d'adaptation, pendant laquelle les cellules sont cultivées 24h dans du DMEM complété puis dans du milieu de différenciation, renouvelé 2 fois par semaine pendant 21 jours, c'est la phase d'induction. Les milieux de différenciation commerciaux contiennent du SVF, comme nous avons choisi de travailler uniquement en LP, nous avons dû réaliser nos propres milieux d'induction. La mise au point de ces tests a duré environ 3 mois, nous avons adapté la composition de nos milieux à partir de la littérature. Les protocoles présentés ci-dessous sont réalisés en plaque 24 puits. La densité d'ensemencement est impliquée dans la réussite de ces protocoles, nous nous sommes inspirés de l'article de Doucet (Doucet *et al.*, 2005). Les protocoles de révélation sont inspirés de ceux disponibles en ligne sur le site de PromoCell dans la rubrique *Application notes* de l'onglet *Mesenchymal Stem Cell Medium*.

**Tableau 12 – Composition des milieux de différenciation.**

| Produit            | Solution stock | Conservation | Concentration dans le milieu |              |              |
|--------------------|----------------|--------------|------------------------------|--------------|--------------|
|                    |                |              | Adipocytes                   | Ostéoblastes | Chondrocytes |
| DMEM High glucose  |                | 4 °C         |                              |              |              |
| Dexaméthasone      | 0,5 mg/mL      | 4 °C         |                              | 0,1 µM       | 0,1 µM       |
| Pyruvate de Sodium | 100 mM         | 4 °C         |                              |              | 1 mM         |
| Acide Ascorbique   | 50 mg/mL       | -20 °C       |                              | 0,05 mM      | 0,17 mM      |
| L-Proline          | 40 mg/mL       | 4 °C         |                              |              | 0,35 mM      |
| ITS 100X           | 100X           | 4 °C         |                              |              | 1X           |
| Acide linoléique   | 10 mg/mL       | 4 °C         |                              |              | 5,33 µg/mL   |
| Albumine 20%*      | 200 mg/mL      | 4 °C         |                              |              | 1,25 mg/mL   |
| TGFβ3              | 1 µg/mL        | -20 °C       |                              |              | 0,01 µg/mL   |
| β-glycérophosphate | 968 µM         | -20 °C       |                              | 10 mM        |              |
| IBMX               | 0.25 M         | -20 °C       | 0,5 mM                       |              |              |
| Indométacine       | 10 mM          | -20 °C       | 0.2 mM                       |              |              |
| Insuline humaine   | 5 mg/mL        | 4 °C         | 0.01 mg/mL                   |              |              |
| Hydrocortisone     | 0.1 mg/mL      | -20 °C       | 0.5 µM                       |              |              |

ITS: Insulin-Transferrin-Selenium; IBMX: 3-isobutyl-1-methylxanthine; \* de chez Vialebex

### 1.5.3.1. Induction adipocytaire

L'objectif de cette expérience est d'induire la différenciation CSM en adipocytes, à l'aide d'un milieu spécifique de différenciation adipocytaire contenant de l'hydrocortisone, de l'IBMX (3-isobutyl-1-methylxanthine), de l'indométacine et de l'insuline (voir tableau 12 ci-contre).

Pour ce test, les cellules sontensemencées à  $2.10^4$  cellules/cm<sup>2</sup> dans du milieu DMEM complétement. Après la différenciation, les cellules sont rincées puis fixées au paraformaldéhyde 4% (PFA 4%) pendant 30 min à température ambiante (TA). Après un rinçage au PBS1X, les cellules sont incubées dans une solution d'éthanol 70% pendant 5 min. La différenciation est confirmée histologiquement par coloration à l'Oil red O, un indicateur

de l'accumulation de lipides intracellulaires. La solution d'Oil red (150 mg/50 ml d'éthanol 100%) (Sigma®) est stable 1 an. Avant chaque utilisation cette solution est mélangée à de l'eau déionisée (2vol/3vol), puis filtrée. Les cellules sont incubées 10 min avec l'Oil red fraîchement préparée, puis rincées à l'eau distillée jusqu'à élimination de l'excès de colorant. Les cellules sont maintenues dans du PBS1X jusqu'à observation.

#### 1.5.3.2. Induction ostéoblastique

L'objectif de cette expérience est d'induire la différenciation des CSM en ostéoblastes avec un milieu à base de DMEM auquel on ajoute de la dexaméthasone, de l'acide ascorbique et du  $\beta$ -glycérophosphate (Tableau 12). Les cellules sontensemencées à  $3.10^3$  CSM/cm<sup>2</sup>.

La minéralisation sera visualisée par coloration à l'Alizarin Red (Sigma®) (1g/50 mL d'eau, pH 1.2) des cellules fixées 30 min au PAF4%. La coloration est réalisée à l'obscurité pendant 45 min. Les puits sont ensuite rincés avec précaution à l'eau distillée puis maintenus dans du PBS1X.

Nous utilisons en parallèle une autre méthode qui consiste à doser qualitativement l'activité phosphatase alcaline (PAL) cellulaire. Pour ce test les cellules sont fixées à l'éthanol 100% et perméabilisées au Tween-20 (Sigma®) à 0.05% pendant 2 min. Les cultures sont ensuite recouvertes du substrat de l'enzyme, le BCIP-NBT (Sigma®) pendant 10 min. Ce dernier est disponible sous forme de tablettes à diluer dans de l'eau distillée. La réduction du substrat va générer une coloration bleue proportionnelle à l'activité enzymatique cellulaire.

#### 1.5.3.3. Induction chondrocytaire

L'objectif de cette expérience est d'induire la différenciation des CSM en chondrocytes. A cet effet,  $2.10^5$  cellules sont centrifugées à 500 g pendant 5 min dans des tubes Falcon 15 mL pour former des « pellets ». Ces derniers sont cultivés en milieu de différenciation chondrogénique contenant de la dexaméthasone, du pyruvate de sodium, de l'acide ascorbique, de la L-proline, de l'ITS, de l'acide linoléique, de l'albumine et du TGF  $\beta$ 3 (Tableau 12). Après les 3 semaines d'induction, les pellets sont fixés au PFA 4 % pendant 60 min à TA, puis rincés à l'eau distillée. Nous utilisons deux techniques pour révéler la différenciation chondrocytaire : **1/** mise en évidence de la résistance à l'écrasement et **2/** coloration de la matrice extracellulaire (MEC) cartilagineuse.

1/ Les pellets sont incubés dans une solution de bleu Alcian (100 mg dans un mélange de 20 mL d'acide acétique et de 30 mL d'éthanol) pendant au moins 2h. L'excès de colorant est éliminé avec 2 lavages de 20 min dans une solution de décoloration (20 mL d'acide acétique + 30 mL d'éthanol). Les pellets sont ensuite rincés à l'eau distillée, puis écrasés entre lames et lamelles pour finalement être observés en microscopie optique. La production d'une matrice cartilagineuse par les chondrocytes offre une résistance à la pression que n'ont pas les cellules indifférenciées.

2/ Les pellets sont enrobés dans de l'OCT (Tissue-Tek® 4583, Sakura) puis stockés à -80°C. Des coupes de 7 µm sont effectuées au cryostat (ThermoScientific Microm HM550) puis séchées et stockées à TA. Les lames sont par la suite colorées selon le même protocole qu'en 1/ avec une étape supplémentaire de contre coloration avec une solution de rouge nucléaire à 0.2% (Sigma®) pendant 10 min. Le bleu Alcian permet de mettre en évidence les mucopolysaccharides acides et l'accumulation de glycosaminoglycanes (GAG), caractéristiques de la matrice cartilagineuse.

#### 1.5.3.4. Marquage du cytosquelette d'actine à la Phalloïdine

La conformation du cytosquelette cellulaire est caractéristique d'un type cellulaire donné et peut être utilisé en complément des colorations histochimiques pour valider l'état de différenciation des CSM (McBeath *et al.*, 2004; Yourek *et al.*, 2007).

Nous avons réalisé des marquages du cytosquelette d'actine et comparé les profils obtenus pour les CSM indifférenciées et induites en chondrocytes, en adipocytes et en ostéoblastes, selon les protocoles d'induction précédemment décrits. Les CSM sont ensemencées en plaques 24 puits sur lamelles. Après 21 jours de culture, les cellules sont fixées au PFA 4% pendant 10 min à RT, puis perméabilisées au Triton-X100 0.2 %/PBS1X pendant 15 min. Les filaments d'actine sont marqués à l'Alexa Fluor® 594 Phalloïdin (Life Technologies) diluée au 1/40<sup>ème</sup> dans du PBS1x. Les lamelles sont montées sur lames avec du *SlowFade*® Gold Antifade Reagent qui est un milieu de montage contenant du DAPI (Life Technologies®). Les lames sont ensuite observées au microscope à immersion (Olympus BX61) ou stockées à -20 °C.

---

## 2. Analyse de l'impact d'HEMOXCell® dans la culture des CSM

---

Les échantillons d'HEMOXCell® sont reçus congelés dans des cryotubes annotés de la concentration et de la date de péremption. Pour préserver l'efficacité de la molécule, les tubes sont aliquotés en barrettes PCR et stockés à -80 °C. Nous avons tout d'abord testé une concentration de 0.25 g/L, pour se rapprocher de la concentration optimale déterminée lors des tests sur CHO-S (voir Article 1). Cette concentration induisait un décollement cellulaire des CSM, il a alors fallu réaliser une analyse dose/réponse de la molécule. Les protocoles qui vont suivre sont pour la plupart détaillés dans l'article 2 : *HEMOXCell®, a new harmless oxygen carrier usable as an additive for mesenchymal stem cell culture in platelet lysate-supplemented media*, ceux n'y figurant pas seront plus amplement abordés.

### 2.1. Analyse de la croissance cellulaire

Nous avons testé l'impact d'HEMOXCell®, que nous appellerons MOX, sur des CSM cultivées en  $\alpha$ -MEM pendant 14 jours en condition standard. A cet effet un éventail de concentrations (0, 0.0125, 0.025, 0.05 et 0.1 g/L) a été testé en triplicat pour des cultures réalisées en plaques 6 puits. La densité cellulaire a été déterminée tous les deux jours pour réaliser des courbes de croissance. Cela a permis de déterminer deux points dans la zone de croissance exponentielle pour le calcul de temps de doublement de population (TD). Le protocole est détaillé dans l'article 2. Au cours de cette étude, nous avons déterminé une concentration optimale de 0.025 g/L et une concentration limite de 0.05 g/L. Elles seront toutes deux évaluées en parallèle dans les protocoles qui vont suivre.

### 2.2. Analyse de la cytotoxicité

Plusieurs tests ont été réalisés pour évaluer si HEMOXCell® avait une action cytotoxique sur les CSM, parmi lesquels une analyse en microscopie confocale (Test Live/Dead®, MolecularProbes®), une analyse en cytométrie en flux (Annexin V-FITC Apoptosis Detection Kit, Sigma®) et le dosage de la lactate déshydrogénase (LDH) sécrétée. Ces trois analyses sont décrites dans l'article 2. La LDH possède une demi-vie d'environ 10h,



les mesures étant effectuées toutes les 24h, elles correspondent à l'activité de la LDH nouvellement sécrétée. Nous avons par ailleurs utilisé le Cell Counting Kit-8 (CCK-8, Dojindo) pour déterminer la prolifération en parallèle de la cytotoxicité. Ce test utilise un sel de tétrazolium hydrosoluble qui est réduit en un composé de couleur orange par les déshydrogénases intracellulaires, le formazan. L'intensité de coloration obtenue est directement proportionnelle à la quantité de cellules vivantes. Pour la réalisation de cet essai nous avons suivi les recommandations du fournisseur. Plusieurs concentrations d'HEMOXCell® (0 à 0.1 g/L) ont été testées sur des CSM ensemencées en plaque 96 puits (1000 cellules/puits), en parallèle d'une gamme étalon allant de 0 à 10000 cellules. À chaque jour d'analyse (J0, J1, J3, J7 et J11) le réactif est déposé dans les puits analysés (triplicat/condition) pendant 2h à 37°C. Après cette incubation, le milieu est prélevé et l'absorbance est ensuite mesurée à 450 nm contre un blanc (milieu sans cellules) au Varioscan™ (Thermo Scientific™).

### **2.3. Analyse de la stabilité cellulaire**

HEMOXCell® est un produit conçu pour améliorer la croissance cellulaire en délivrant de l'oxygène aux cellules. Pour valider son utilisation dans la culture des CSM nous avons dans un premier temps évalué sa cytotoxicité, nous nous sommes intéressés dans un second temps au maintien des caractéristiques cellulaires. A cet effet, nous avons analysé son impact au niveau de l'adhérence, de la différenciation, du phénotype, de la stabilité génétique et au niveau de la clonogénicité des CSM. Nous avons reproduit les différents protocoles de caractérisation cellulaire en présence de MOX à 0.025 et 0.05 g/L. L'analyse génétique a été réalisée à l'aide de plaques PCR Array (Qiagen®), elles permettent d'estimer par PCR quantitative, le niveau d'expression de 84 transcrits de gènes se rapportant aux CSM. Le plan d'une plaque est représenté dans la figure 34. L'analyse finale est réalisée selon la méthode du fournisseur à l'aide du logiciel en ligne RT<sup>2</sup> Profiler PCR Array Data Analysis.

Les CSM possèdent un potentiel clonogénique qui leur est propre. Nous avons donc voulu regarder si MOX impactait cette propriété, en réalisant le test CFU-F (colony forming unit of fibroblasts). Pour ce test les cellules en P0 ou en P1 sont ensemencées à une très faible densité (environ 250 cellules) en boîte de Pétri (Ø 10 cm) et sont cultivées 14 jours en condition standard. Après ce délai, les cellules sont fixées et colorées au réactif de Giemsa (Sigma®). Les cellules possédant une forte capacité proliférative auront généré des colonies visibles à l'œil nu. Les CSM de MO possèdent naturellement un potentiel ostéogénique

visualisable avec l'analyse de l'activité phosphatase alcaline (Prins et al. 2014). Le protocole réalisé est identique à celui décrit dans le paragraphe (2.5.3.2). Les colonies PAL+ sont dénombrées et comparées à la quantité totale de CFU-F obtenue par coloration au Giemsa.

|               |              |               |               |              |               |                |              |               |               |              |               |
|---------------|--------------|---------------|---------------|--------------|---------------|----------------|--------------|---------------|---------------|--------------|---------------|
| ABCB1<br>A01  | ALCAM<br>A02 | ANPEP<br>A03  | ANXA5<br>A04  | BDNF<br>A05  | BGLAP<br>A06  | BMP2<br>A07    | BMP4<br>A08  | BMP6<br>A09   | BMP7<br>A10   | CASP3<br>A11 | CD44<br>A12   |
| COL1A1<br>B01 | CSF2<br>B02  | CSF3<br>B03   | CTNNA1<br>B04 | EGF<br>B05   | ENG<br>B06    | ERBB2<br>B07   | FGF10<br>B08 | FGF2<br>B09   | FUT1<br>B10   | FUT4<br>B11  | FZD9<br>B12   |
| GDF15<br>C01  | GDF5<br>C02  | GDF6<br>C03   | GDF7<br>C04   | GTF3A<br>C05 | HAT1<br>C06   | HDAC1<br>C07   | HGF<br>C08   | HNF1A<br>C09  | ICAM1<br>C10  | IFNG<br>C11  | IGF1<br>C12   |
| IL10<br>D01   | IL1B<br>D02  | IL6<br>D03    | INS<br>D04    | ITGA6<br>D05 | ITGAV<br>D06  | ITGAX<br>D07   | ITGB1<br>D08 | JAG1<br>D09   | KDR<br>D10    | KITLG<br>D11 | LIF<br>D12    |
| MCAM<br>E01   | MITF<br>E02  | MMP2<br>E03   | NES<br>E04    | NGFR<br>E05  | NOTCH1<br>E06 | NT5E<br>E07    | NUDT6<br>E08 | KAT2B<br>E09  | PDGFRB<br>E10 | PIGS<br>E11  | POU5F1<br>E12 |
| PPARG<br>F01  | PROM1<br>F02 | PTK2<br>F03   | PTPRC<br>F04  | RHOA<br>F05  | RUNX2<br>F06  | SLC17A5<br>F07 | SMAD4<br>F08 | SMURF1<br>F09 | SMURF2<br>F10 | SOX2<br>F11  | SOX9<br>F12   |
| TBX5<br>G01   | TERT<br>G02  | TGFB1<br>G03  | TGFB3<br>G04  | THY1<br>G05  | TNF<br>G06    | VCAM1<br>G07   | VEGFA<br>G08 | VIM<br>G09    | VWF<br>G10    | WNT3A<br>G11 | ZFP42<br>G12  |
| B2M<br>H01    | HPRT1<br>H02 | RPL13A<br>H03 | GAPDH<br>H04  | ACTB<br>H05  | HGDH<br>H06   | RTC<br>H07     | RTC<br>H08   | RTC<br>H09    | PPC<br>H10    | PPC<br>H11   | PPC<br>H12    |

Gènes de ménage
Contrôle ADN génomique
Contrôle Réverse transcription
Contrôle de l'efficacité de PCR

- Marqueurs d'indifférenciation: FGF2, INS, LIF, POU5F1, SOX2, TERT, WNT3A, ZFP42.
- Marqueurs spécifiques des CSM: ALCAM, ANPEP, BMP2, CASP3, CD44, ENG, ERBB2, FUT4, FZD9, ITGA6, ITGAV, KDR, MCAM, NGFR, NT5E, PDGFRB, PROM1, THY1, VCAM1.
- Gènes associés au CSM: ANXA5, BDNF, BGLAP, BMP7, COL1A1, CSF2, CSF3, CTNNA1, EGF, FUT1, GTF3A, IGF1, ICAM1, IFNG, IGF1, IL10, IL1B, IL6, ITGB1, KITLG, MITF, MMP2, NES, NUDT6, PIGS, PTPRC, SLC17A5, TGFB3, TNF, VEGFA, VIM, VWF.

**Marqueurs de différenciation:**

- Gènes impliqués dans l'ostéogenèse: BMP2, BMP6, FGF10, HDAC1, HNF1A, KDR, PTK2, RUNX2, SMURF1, SMURF2, TBX5.
- Gènes impliqués dans l'adipogenèse: PPARG, RHOA, RUNX2.
- Gènes impliqués dans la chondrogenèse: ABCB1, BMP2, BMP4, BMP6, GDF5, GDF6, GDF7, HAT1, ITGAX, KAT2B, SOX9, TGFB1.
- Gènes impliqués dans la myogenèse: JAG1, NOTCH1.
- Gènes impliqués dans la ténogenèse (i.e. développement du tendon): BMP2, GDF15, SMAD4, TGFB1.

Figure 34 - Plan de la plaque PCR Array. (<http://www.sabiosciences.com/>)

## 2.4. Rôle dans le transport de l'oxygène en systèmes clos et aéré

D'autre part, nous avons fait l'acquisition d'une plaque Oxoplate® (PreSens) qui intègre des capteurs optiques de l'oxygène chimiques, immobilisés au fond d'une plaque 96 puits. Ces capteurs contiennent deux colorants, un indicateur qui réagit avec l'oxygène dissous et un colorant de référence, indépendant de l'oxygène. Leurs intensités de phosphorescence, respectivement  $I_{\text{indicateur}}$  ( $E_x/E_m = 540 \text{ nm}/650 \text{ nm}$ ) et  $I_{\text{référence}}$  ( $E_x/E_m = 540 \text{ nm}/590 \text{ nm}$ ), permettent de calculer le ratio  $I_R$  ( $I_R = I_{\text{indicateur}} / I_{\text{référence}}$ ). Ce dernier servira de référence pour calculer le taux d'oxygène dissous dans chacun des puits. Il s'agira d'une

double cinétique avec une acquisition réalisée en simultanée pour ces deux intensités pendant 5 h.

Dans un premier temps nous avons réalisé des analyses avec  $1.10^4$  cellules/puits et une concentration test de 0.025 g/L MOX avec des acquisitions réalisées à un intervalle de 10 min pendant 300 min. Puis nous avons réalisées la même analyse avec  $1.10^5$  cellules avec des mesures sur la nuit (800 min d'acquisition). Une dernière expérience a été conduite avec  $1.10^5$  cellules/puits et 0.02 g/L de MOX. Cette dernière analyse a été menée selon deux conditions, une première avec les puits analysés, non scellés et une seconde avec les puits recouverts d'un film adhésif, pour créer une atmosphère sans apport extérieur en oxygène. Dans les 3 conditions d'analyse, des puits témoins contenant du milieu seul ont été préparés, ainsi que des puits avec des cellules +/- MOX, à une concentration de 0.025 ou 0.2 g/L. Cette analyse devrait nous renseigner sur l'aptitude de ce transporteur d'oxygène à restaurer un niveau d'oxygène dissous basal, compte tenu de la consommation en oxygène cellulaire.

## **2.5. Prolifération cellulaire en normoxie vs. hypoxie**

Jusqu'à présent, les expériences étaient réalisées en normoxie (21% O<sub>2</sub>) ce qui correspond à 160 mmHg, nous avons souhaité observer la croissance cellulaire en hypoxie (5% O<sub>2</sub> soit 38 mmHg), afin d'évaluer si l'effet dose/réponse observé en normoxie correspondait. La P<sub>50</sub> d'HEMOXCell® étant de 37 mmHg, en travaillant en hypoxie on se place dans des conditions favorisant la libération d'oxygène. L'analyse de la croissance cellulaire a été à partir d'ensemencements réalisés en plaques 6 puits ( $1.10^4$  cellules /puits) avec une plaque par concentration testée (0, 0.0125, 0.025 et 0.5 g/L d'HEMOXCell®). Le protocole de dénombrement est décrit dans l'article 2.

## - Chapitre III -

# Résultats

---

*Cette partie du chapitre III rapportera les résultats obtenus lors de l'évaluation de l'impact d'HEMOXCell® dans la culture de cellules souches mésenchymateuses en condition standard (2D). Elle sera présentée sous la forme d'un article, puis complétée par d'autres résultats.*

**Article 2: « HEMOXCell®, a new harmless oxygen carrier usable as an additive for mesenchymal stem cell culture in platelet-supplemented media.»**

Fiona Le Pape, Lucie Cosnuau-Kemmat, Frédéric Dubrana, Claude Férec, Franck Zal, Elisabeth Leize & Pascal Delépine. En attente pour le journal *Artificial Organs*.

---



## **Article 2**

**“HEMOXCell®, a new harmless oxygen carrier usable as an additive for mesenchymal stem cell culture in platelet lysate-supplemented media.”**



# HEMOXCell®, a new harmless oxygen carrier usable as an additive for mesenchymal stem cell culture in platelet lysate-supplemented media.

Fiona Le Pape<sup>1,2</sup>, Lucie Cosnuau-Kemmat<sup>2</sup>, Frédéric Dubrana<sup>3</sup>, Claude Férec<sup>1,3,4</sup>, Franck Zal<sup>2</sup>, Elisabeth Leize<sup>1,5a</sup> and Pascal Delépine<sup>1,4a\*</sup>

<sup>a</sup> These authors contributed equally in this manuscript

1: Functional Genetics Department, INSERM Research Unit 1078, University of Western Brittany, European Brittany University, 46 rue Félix Le Dantec, CS51819, 29218 Brest Cedex 02, France

2: HEMARINA SA, Aeropole Center, Biotechnopole, 29600 Morlaix, France,

3: Functional Genetics Department, Regional University Hospital Center of Brest, Brest, France,

4: French Blood Service - Brittany, Brest site, 46 rue Félix Le Dantec, CS51819, 29218 Brest Cedex 02, France.

5: Protesis Department, Regional University Hospital Center of Brest, Research and Formation Unit of Odontology, Brest F29238, France,

\*Corresponding author : Pascal Delépine, PharmD, PhD, EFS Bretagne, site of Brest/Inserm unit 1078, 46 rue Félix le Dantec, 29218 Brest Cedex 2, France – Tel : +33 (0)2.98.44.93.34 – Fax : +33 (0)2.98.43.05.55 - email : [pascal.delepine@efs.sante.fr](mailto:pascal.delepine@efs.sante.fr)

## Abstract

Although human mesenchymal stem cells (MSCs) are promising candidates for therapeutic applications, one of the main challenges is to produce large-scale culture of MSCs while preserving their differentiation potential and viability, which is in part limited by the consumption of dissolved oxygen. A marine haemoglobin, HEMOXCell®, was then evaluated as an oxygen carrier for culturing bone marrow MSCs *in vitro*. Impact of HEMOXCell® on cell growth and viability was assessed in human platelet lysate (hPL)-supplemented media. Maintenance of MSC features, such as multipotency and expression of MSC specific markers, was further investigated by biochemical assays and flow cytometry analysis. Our experimental results indicate that an optimal concentration of 0.025 g/L HEMOXCell® 1/ induces a 25%-increase of the cell growth rate, 2/ preserves MSC phenotype, and 3/ maintains MSC differentiation properties; while a two-fold higher concentration induces cell detachment decreasing cell proliferation without altering cell viability. Our data suggest the potential interest of HEMOXCell® as a natural oxygen carrier for tissue engineering applications to oxygenate hypoxic area and to maintain cell viability, functions and “stemness”. These features will be further tested within three-dimensional scaffolds.

**Keyword:** mesenchymal stem cells, viability, proliferation, human platelet lysate, oxygen carrier, haemoglobin



## Introduction

Mesenchymal stem cells (MSCs) are adult multipotent self-renewing stem cells first described after isolation from bone marrow by Friedenstein in the 1960s [1]. The International Society for Cellular Therapy (ISCT) defined these stromal cells as plastic-adhering cells that can differentiate *in vitro* into osteoblasts, chondrocytes, and adipocytes. They are characterised by the expression of CD90, CD73, and CD105 and the absence of the haematopoietic markers CD14, CD19, CD20, CD34, CD45 and HLA-DR [2]. Bone marrow is the most commonly investigated source of MSCs (called bone marrow stromal stem cells), but MSC-like cells may also be extracted from various other sources, such as adipose tissue and peripheral blood [3,4]. The plasticity of bone marrow MSCs (BM-MSCs) has triggered clinicians' initial interest, particularly for bone and cartilage repairs, but they can also give rise to haematopoiesis-supportive stroma and marrow adipocytes [5]. The multilineage capacity of these cells, their immunomodulating ability, their use in both an autologous and an allogenic context, and their homing capacity make them the ideal candidates for cell therapy and regenerative medicine [5,6]. One of the main challenges for a therapeutic use of MSCs is to sufficiently expand the cells without disturbing their multilineage potential and maintaining their viability [7].

For both research and clinical purposes, foetal bovine serum (FBS) is the conventional nutritive supplement added in basal media for MSC culture. Because of the risk of contamination and the potential immune reaction due to the non-human origin of FBS [8,9], alternative supplements, such as human sera, platelet-rich plasma (PRP) or human-blood derived platelet lysates (hPL), have been used in several trials to mimic the human environment [11].

The capacity of hPL to replace FBS in a variety of cell culture systems has been widely discussed in the literature [11–14]. hPL, produced from expired platelet concentrates, can be used in the same manner as hPL from fresh platelets and alters neither the expression of MSC-specific markers nor their multipotency [15]. Moreover, expansion efficiency of MSCs is comparable between PL batches but not FBS batches [12,16]. Several studies have revealed that using hPL as a supplement enhanced dramatically the proliferation rate of MSCs from bone marrow and adipose tissue (ASC) [13,14]. For these reasons, hPL appears to be a suitable substitute of FBS for research programs and for large-scale production of MSC.

In addition to the benefits provided by platelet-released growth factors, gas dissolved in the cell culture medium is another factor of the cell environment that modulates viability and expansion rate [17]. To define an adequate MSC growth environment, it is critical to maintain a suitable oxygen concentration [18]. Manufacturers have developed technologies that increase the growth surface area, such as multilayer planar vessels, perfusion bioreactors and microcarriers [18,19]. A limiting issue of high-scale setups is the continuous cell proliferation that increases oxygen consumption by the cell metabolism. Hence, growth systems must ideally provide an efficient delivery of gases (O<sub>2</sub> and CO<sub>2</sub>). The variability of oxygen tension in culture media may affect cell viability and proliferation [17].

A compound called HEMOXCell®, recently produced by the French biotechnology start-up HEMARINA, has been specifically designed for cell culture applications, such as recombinant protein production [20]. This product is an extracellular haemoglobin extracted from a marine invertebrate, *Nereis virens* [21,22]. An original aspect of HEMOXCell® is its non-immunogenic nature due to the absence of cell membranes and glycosylated residues [23]. HEMOXCell® exhibits many advantages for large-scale cell culture and can be used as an oxygenation additive. In contrast to human haemoglobin that can bind a maximum of four oxygen molecules, this universal haemoglobin binds 156 oxygen molecules concurrently [24]. This feature enables oxygen release in simple oxygen gradient according to cell requirements. In a recent study, we found that HEMOXCell®, in a dose-dependent manner, increases CHO-S cell density by 2.5- to 4.6-fold in a batch culture system for an optimal concentration of 0.5 g/L of HEMOXCell®, and induces an increase up to 70% in the production of recombinant proteins from CHO-S cell line transfected with EGFP [20]. These positive impacts are thought to be due to the diffusion of oxygen through the medium and to the superoxide dismutase (SOD)-like activity of this molecule [22].

In this study we developed comparative studies to identify the effect of the oxygen carrier in the expansion of BM-MSCs. The aim was to introduce in a culture system an oxygen carrier that would be suitable for specific cultures, such as large scale cultures and colonization of three-dimensional (3D) scaffolds, which require high oxygen diffusion. We have then defined culture conditions, including hPL-released growth factors and HEMOXCell®, in favour of MSC proliferation and differentiation.

## Materials and methods

### HEMOXCell®

The HEMOXCell® product (Hemarina SA, Morlaix, France) is derived from the extracellular haemoglobin M201 coming from the marine annelid *Nereis virens*. This molecule has been developed as an additive for cell culture medium (for R&D laboratories) and for the bioproduction of recombinant proteins. HEMOXCell® is extracted under gentle agitation of frozen *Nereis virens* at 4°C followed by several purification steps and conditioning in cryotubes. The final product is stored at -80°C and thawed at 4°C before experimentation.

### Mesenchymal stem cell isolation and culture

MSCs were extracted from human bone marrow. Samples were obtained from patients who underwent total hip replacement surgery at the Department of Orthopedic Surgery at Hôpital de la Cavale Blanche (Brest, France). Before sampling, written consents of the patients were obtained and cautions were taken to preserve the privacy of the donors (ministerial authorisation: DC-2009-1006).

Cells from bone marrow were isolated from bone and fat residues through a filtration step using cell strainers (Corning®, Amsterdam, Netherlands). Cells were concentrated by two successive centrifugations at 1,000 x g. The cell pellet containing bone marrow mononuclear cells (BMMNCs) was resuspended and the cells were directly seeded at a density of  $100 \times 10^3$  cells/cm<sup>2</sup> in basic growth media consisting of alpha-minimum essential medium ( $\alpha$ -MEM) (Lonza, Basel, Switzerland) containing 5% human Platelet Lysate (hPL), 1% L-glutamine 200 mM (Gibco®, France), 1% Ciprofloxacin 2 mg/mL (Panpharma®, Luitré, France), and 0.04% Heparin (25,000 UI/5 mL) (Panpharma®). After 2–3 days, non-adherent (haematopoietic) cells were removed by changing the medium. Cultures were maintained in a humidified atmosphere with 5% CO<sub>2</sub> at 37°C and the medium was changed twice a week thereafter. Cells were trypsinised when the culture reached 70–80% confluency with 0.05% (V/V) trypsin/1 mM EDTA solution (LifeTechnologies, Saint Aubain, France). MSCs were cultured until passage 3 to preserve their genomic and functional integrity [25].

### Preparation of human platelet lysate

Human platelet lysate (hPL) was obtained from apheresis platelet concentrate pools provided by the French Blood Center (Etablissement Français du Sang - Bretagne, Brest, France) after

their expiration date (5 days after collection). Each pool was prepared from five platelet donations and all units were biologically qualified according to the French regulations. The mean amount of platelets in each pool was  $> 4 \times 10^{11}$ . Platelet units were homogenized and aliquots were prepared for further processing. hPL was generated from aliquots of platelet units by a repeated freezing-thawing procedure. Platelet bodies were removed by centrifugation (15 minutes, 1,500 x g, 4°C) and samples were stored at -20°C for one year until use.

### *In vitro* cell growth analysis

To assess the impact of HEMOXCell® in the *in vitro* proliferation rate of MSCs, cells were plated in six-well plates at a density of 10,000 cells/well in standard culture medium. Three HEMOXCell® concentrations were tested for 13 days: 0.0125, 0.025 and 0.05 g/L. Cell counting was carried out in duplicate every other day using a haemocytometer and cell growth curves were drawn. Doubling time was calculated during the exponential growth phase.

### MSC clonogenic potential and CFU-ALP+ colonies

The clonogenic potential of MSC was analysed in five different MSC samples at passage 1 with the colony forming unit-fibroblast (CFU-F) assay. CFU-F with alkaline phosphatase activity (CFU-ALP+) were assessed on the same experiment to evaluate MSCs osteogenic potential. The cells were seeded at a density of 250 cells per 10 cm Petri dish and cultured in  $\alpha$ -MEM standard medium with 0 (control), 0.025 or 0.05 g/L HEMOXCell® for 14 days. Phosphatase activity was assessed by using SigmaFast™ BCIP-NBT as a substrate (Sigma®, St Quentin-Fallavier, France). After a 10 min-fixation with 4% paraformaldehyde (PFA), cells were rinsed with a washing buffer (0.05% Tween 20 in PBS 1X) and incubated for 10 min with a substrate solution of BCIP-NBT dissolved in distilled water. Enzymatic activity was visualised as blue-violet staining. CFU-ALP+ colonies were counted and rinsed with the washing buffer. Then colonies were stained with a Giemsa solution (Sigma®) and purple colonies were numbered. Results were expressed as the percentage of total CFU-F normalised with control (100% without HEMOXCell®) and percentage of CFU-ALP+ within total CFU-F number.

Colonies numbers were determined macroscopically using the ImageJ Cell Counter program. Clusters of more than 50 cells were considered as colonies.

### Cytotoxicity analysis

### *Cell apoptosis and necrosis*

MSCs from four donors were cultured with 0, 0.025 and 0.05 g/L HEMOXCell®. Cells were incubated with Annexin V-FITC and propidium iodide (PI) from the Annexin V-FITC Apoptosis Detection Kit (Sigma®) for 10 minutes at room temperature in the dark and then immediately analysed by flow cytometry with a BD Accuri™ C6 flow cytometer. To establish the cytometer compensation, an apoptotic control consisting of cells incubated in 70% ethanol solution for 30 minutes was prepared. Cells labelled with both fluorochromes were considered as necrotic cells.

### *LDH activity*

Cells were seeded in 24-well plates at a density of 1,000 cells per well and cultured in  $\alpha$ -MEM supplemented with 0, 0.025 and 0.05 g/L HEMOXCell®. Each condition was tested in triplicate. At various time points (24, 48 and 72 hours after seeding) lactate dehydrogenase (LDH) activity was evaluated as a function of the total cell number. Supernatants were collected and leakage of LDH was assessed with the Lactate Dehydrogenase Activity Assay Kit (Sigma®), according to the manufacturer's instructions. After incubation of samples with LDH substrate solution, absorbance was measured at 450 nm for 30 min. The activity of LDH released in medium was calculated according to the manufacturer's instructions. The control wells (w/o HEMOXCell®) were taken as a reference to calculate spontaneous LDH release and 1% Triton X-100-treated cells for 45 min were used to calculate maximum LDH release.

### *Live/Dead assay*

Cell viability was assessed at 1, 3, 7, 10 and 14 days after seeding. Cells were plated at a density of 1,000 cells per well in a 24-well plate on glass coverslips (Dutscher, Brumath, France) and cultured in standard  $\alpha$ -MEM culture medium with 0 (control), 0.025 or 0.05 g/L HEMOXCell®. For each time point cells were washed with PBS 1X and incubated for 30 min at RT with 2  $\mu$ M Calcein AM and 1.25  $\mu$ M Ethidium homodimer (EthD-1) (Live/Dead® Viability/Cytotoxicity Kit, MolecularProbes®, LifeTechnologies™) diluted in  $\alpha$ -MEM medium. Then the coverslips were upturned in a PBS 1X droplet and cells were observed with a fluorescence microscope (Axio Imager M2, Zeiss) (Calcein: 530  $\pm$  12.5 nm; EthD-1: 645  $\pm$  20 nm). Microscopic images of cell monolayers were taken after 10 days of culture from subconfluent MSC cultures in all conditions. An apoptotic control consisting of cells incubated in a 70% ethanol solution for 30 minutes was prepared.

### **Analysis of HEMOXCell® oxygen release**

The impact of HEMOXCell® on pericellular oxygen partial pressure ( $pO_2$ ) was analysed using a 96-well oxygen biosensor microplate (Oxoplate®, OP96U, PreSens, Saint-Paul-Trois-Châteaux, France). Each well contains two different dyes, the indicator (excitation: 540 nm, emission: 650 nm) and the reference (excitation: 540 nm, emission: 590 nm). Their respective intensity,  $I_{\text{indicator}}$  and  $I_{\text{reference}}$ , were used to calculate the ratio  $I_R$  ( $I_{\text{indicator}}/I_{\text{reference}}$ ) corresponding to the oxygen partial pressure ( $pO_2$ ) into each well. Calibration was performed using oxygen-free water ( $pO_2 = 0\%$ ) prepared with 0.2 g of sodium sulfite (Sigma®) in 20 mL water and dispensed into 4 wells. MSCs were resuspended in equilibrated  $\alpha$ -MEM medium (37°C, 21% $O_2$ , 5% $CO_2$ ) and seeded at a density of  $1.10^5$  cells/well in a final volume of 200  $\mu$ L. Two HEMOXCell® concentrations were tested (0.025 g/L and 0.2 g/L) alongside a HEMOXCell®-free condition. Cell-free oxygen and temperature equilibrated medium samples were used as control. Fluorescence intensities were monitored every 10 minutes during a period of 4 hours with a Varioskan™ Flash Multimode Reader (Thermo Scientific™). The microplate was maintained at a temperature of 37°C during the measurement period. Time points were selected after 60 minutes of incubation of the microplate in the reader to ensure samples equilibrium. The percentage of oxygen measured at each time points were calculated according to the manufacturer's instructions, taking equilibrated medium as standard ( $pO_2 = 21\%$ ). The experiment was performed in triplicate.

### **Phenotypic analysis of MSC by flow cytometry**

Flow cytometry analysis with the MSC Phenotyping Kit (Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach, Germany) was performed with MSC samples from five donors and cultured w/o or w/ 0.025 g/L HEMOXCell® in standard medium. All incubations with antibodies and washes were performed in PBS 1X/1% FBS (Life Technologies™) washing buffer. Adherent cells were trypsinised and washed. Cells were stained with two antibody cocktails provided in the kit by a 10-min incubation in the dark: MSC Phenotyping Cocktail containing MSC markers (anti-CD73-APC, anti-CD90-FITC, and anti-CD105-PE), haematopoietic markers (anti-CD14-PerCP, anti-CD20-PerCP, anti-CD34-PerCP, and anti-CD45-PerCP) and an Isotype Control Cocktail (Mouse IgG1 antibodies conjugated with -FITC, -PE, -APC, -PerCP and IgG2a-PerCP). After a washing step, the analysis was performed using a BD Accuri™ C6 flow cytometer.

### **Analysis of cell differentiation capacity**

Trilineage differentiation was induced in MSC cultures at passage 1 to 3 w/o or w/ 0.025 g/L HEMOXCell®. Cells reaching ~80% confluency were trypsinised and seeded at specific concentrations depending on the differentiation procedure (see below). The standard differentiation medium consists of DMEM high-glucose (4.5 g/L) (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) (Lonza, Basel, Switzerland) supplemented with 5% hPL, 1% L-glutamine 200 mM (Gibco®), 1% Ciprofloxacin 2 mg/mL (Panpharma®, Boulogne-Billancourt, France), and 0.04% Heparin (25,000 UI/5 mL) (Panpharma®).

All additives were of tissue culture grade from Sigma-Aldrich (France). Microscopy observations were conducted using the Olympus IX71 microscope with the image analysis software analySIS® (Soft Imaging System).

#### *Osteogenic differentiation*

For osteogenic differentiation, cells were plated in 24-well plates at a density of 3,000 cells/cm<sup>2</sup> and cultured for 24 hours in the standard medium. The medium was replaced with the differentiation medium (*i.e.*, standard medium supplemented with 1  $\mu$ M dexamethasone, 0.05 mM ascorbic acid and 10 mM  $\beta$ -glycerophosphate). After 21 days of induction, cells were fixed with 4% PFA for 15 min, and stained for extracellular calcium deposits and ALP activity. Calcified matrix was documented using an orange-red staining by incubation in Alizarin Red S staining solution (20 mg/mL, pH 4.1-4.3) for 45 min at room temperature (RT) in the dark with gentle shaking. The staining solution was carefully aspirated and the cell monolayer was washed 3-4 times with distilled water. Washing buffer was replaced with PBS 1X before analysis. Osteoblast phosphatase activity was visualised using the Sigma® BCIP-NBT substrate as described above.

#### *Adipogenic differentiation*

Adipogenic differentiation was performed in 24-well plates with 20,000 cells/cm<sup>2</sup> and cultured for 24 hours in the standard medium. The medium was replaced with the differentiation medium (*i.e.*, standard medium supplemented with 0.5 mM 3-isobutyl-1-methylxanthine, 0.2 mM indomethacin, and 0.01 mg/mL human insulin). After 21 days of induction, intracellular lipid vesicles were stained with Oil Red O solution. Briefly, cells were fixed with 10% PFA for 30 min at RT. The cell monolayer was carefully rinsed with distilled water and incubated with 70% ethanol for 5 min. The cell monolayer was covered with Oil Red O (3 volume 0.3% Oil Red O stock solution + 2 volume distilled water) for 15 min. Cells were washed several times

with distilled water and stored in PBS 1X before analysis.

#### *Chondrogenic differentiation*

The induction of chondrogenesis was performed with 200,000 cells in 15 mL centrifuge tubes (BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ, USA). Briefly, after gentle centrifugation (500 x g for 5 min), cell pellets were cultured in part in a standard medium alone or with 0.1  $\mu$ M dexamethasone, 1 mM sodium pyruvate, 0.17 mM ascorbic acid, 0.35 mM L-proline, ITS 1X, 5.3  $\mu$ g/mL linoleic acid, 1.25 mg/mL 4% albumin (Vialebex) and 10 ng/mL TGF $\beta$ 3 (Miltenyi Biotec GmbH). After 21 days of induction, spheroids were washed with PBS and fixed with 10% PFA for one hour. Pellets were rinsed and washed with distilled water. Samples were embedded into OCT compound (Tissue-Tek® 4583, Sakura Finetek Japan, Japan) and frozen before the cryosection procedure performed with a ThermoScientific Microm HM550 cryostat. Frozen section (7  $\mu$ m) were stained with Alcian blue solution (0.1 mg/mL in a mixture of 2 volume 100% acetic acid + 3 volume 100% ethanol) for 30 minutes and then incubated in nuclear fast red solution (Sigma®). Whole pellets were stained with Alcian blue solution for 2 hours. Non-specific staining was removed with a destaining solution (2 volume 100% acetic acid + 3 volume 100% ethanol) for 20 min. After a final washing, pellet samples were crushed between a microscope slide and a cover glass, and sections were mounted using Eukitt mounting media (Sigma®). Samples analysis was performed with a microscope.

#### **MSC gene expression by RT-PCR**

*RNA isolation* : MSC were seeded in 6-well plates w/o or w/ 0.025 g/L HEMOXCell® until confluency and medium was replaced twice a week. Confluent cells were rinsed with PBS 1X. Total RNA was isolated by using the RNeasy Mini Kit (Qiagen, Courtaboeuf, France) according to the manufacturer's instructions and eluted with 40  $\mu$ L RNase-free water. Concentration and quality of isolated RNA were determined with the NanoDrop 2000 Spectrophotometer (Thermo Scientific, Villebon sur Yvette, France) by determining the absorbance ratios at 260/280 and 260/230. RNA were stored at -80°C until use.

*Reverse transcription and Real-time RT-PCR array*: RT<sup>2</sup> Profiler PCR Array (PAHS-082Z, Qiagen, Courtaboeuf, France) was used to investigate variations in gene expression between different cell samples cultured w/o and w/HEMOXCell®. This array included the analysis of the expression of 84 key genes involved in the identification, growth, and differentiation of MSC

(genes list is detailed in complementary data). One microgram of total RNA extracted from MSC samples serves as a template to generate cDNA with the RT<sup>2</sup> First Strand Kit (Qiagen) following the manufacturer's recommendations. First-strand cDNA was then added to the RT<sup>2</sup> SYBR Green Mastermix (RT<sup>2</sup> Profiler PCR Array) for RT-qPCR analysis. PCR component mix was dispensed into the RT<sup>2</sup> Profiler PCR Array, 25  $\mu$ l/well for a 96-well array format. Q-PCR was performed using a LightCycler<sup>®</sup> 480 Instrument II (Roche, Meylan, France) in the following conditions: one step of activation at 95°C for 10 min; followed by 45 cycles at 95°C for 15 s and 60°C for 1 min. C<sub>t</sub> values were determined for each reaction using the LightCycler software and data were analysed using a web-based PCR Array Data Analysis Software (available at [www.SABiosciences.com/pcrarraydataanalysis.php](http://www.SABiosciences.com/pcrarraydataanalysis.php)). C<sub>t</sub> values are imported within the software, which automatically carries out relative quantitation using the  $\Delta\Delta$ C<sub>t</sub> method. The results were expressed as scatter plots. To take into account the interindividual variability of MSC donors only genes with  $\geq 4$  fold-change ratios were considered to be significantly deregulated ( $p < 0.05$ ), as recommended by the manufacturer.

### Statistical analyses

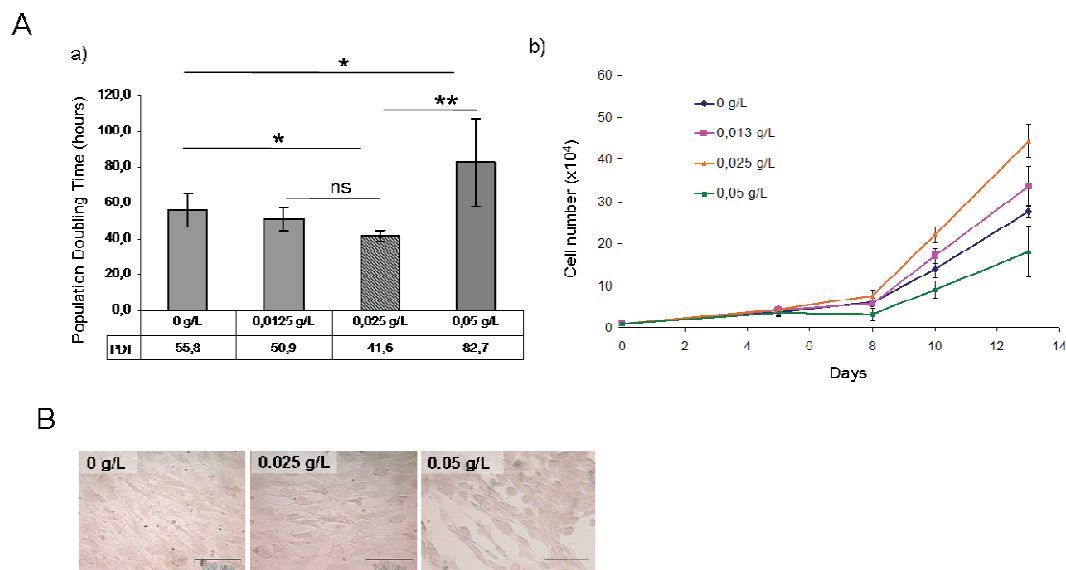
Statistical data were calculated for at least three independent experiments using unpaired Student's t-tests and were expressed as the mean  $\pm$  SD. P-values of less than 0.05 ( $p < 0.05$ ) were considered statistically significant.

## Results

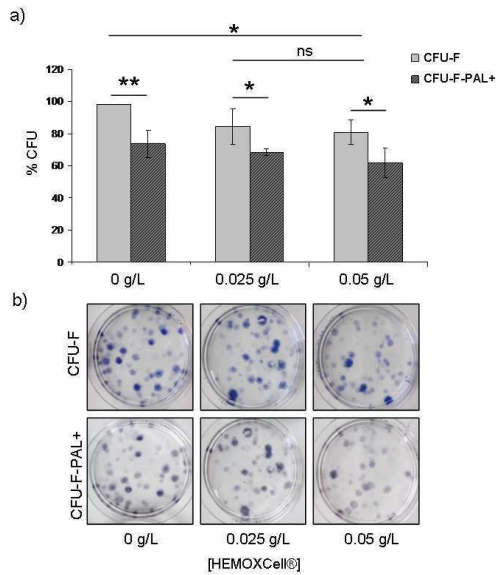
### MSC clonogenic and proliferative potential

**In vitro growth analysis:** PDT was calculated using MSC growth curves for MSC samples cultured with three different concentrations of HEMOXCell<sup>®</sup> (0.0125, 0.025 and 0.05 g/L) (Fig. 1A (a) and (b)). Interestingly, PDT gradually decreases between control and 0.025 g/L (Fig. 1A (a), PDT:  $55.8 \pm 9.6$  hours vs  $41.6 \pm 3.1$  hours, respectively ( $p = 0.031$ )), indicating a 25% improvement of MSC proliferation. Conversely, when using 0.05 g/L HEMOXCell<sup>®</sup> in the medium, a 2-fold higher PDT was found (Fig. 1A (a); PDT:  $41.6 \pm 3.1$  hours vs  $82.6 \pm 24.6$  hours ( $p = 0.028$ ), respectively). Morphological analysis of MSC cultures revealed that cells cultured with 0.025 g/L HEMOXCell<sup>®</sup> conserved their typical fibroblastic shape. With 0.05 g/L, some cells conserved their fibroblast-like morphology, while others exhibited a more rounded shape, characteristic of a loss of adherence (Fig. 1B). For the subsequent experiments, a concentration of 0.025 g/L HEMOXCell<sup>®</sup> was then selected as the optimal concentration for MSC culture. Control medium (DMEM or MEM $\alpha$ ) and 0.025 g/L HEMOXCell<sup>®</sup>-supplemented medium (DMEM or MEM $\alpha$ ) are then referred to as M<sub>CU</sub> and M<sub>HEMOX</sub>, respectively.

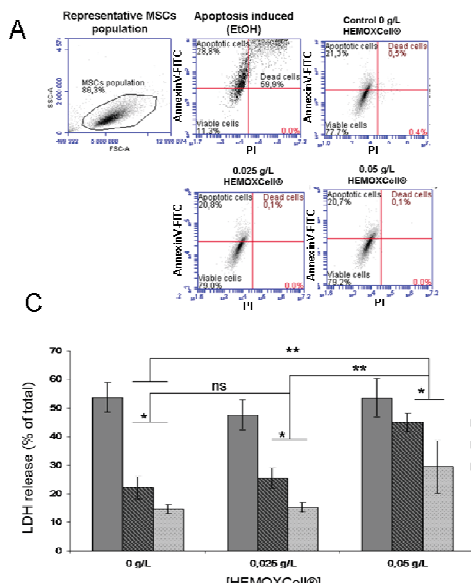
**Clonogenicity:** The effect of HEMOXCell<sup>®</sup> on MSC forming CFU-F capacity was tested (Fig. 2). No differences were observed between control (0 g/L) and 0.025 g/L. However, our results showed a significant decreased of the CFU-F number with the use of 0.05 g/L HEMOXCell<sup>®</sup> ( $p = 0.003$ ) when



**Fig. 1. Evaluation of the effect of HEMOXCell<sup>®</sup> concentration on cell proliferation.** (A) a) The mean population doubling time (PDT) (y-axis) of all MSC samples is represented for each concentration of HEMOXCell<sup>®</sup> tested (x-axis). Data are presented as the mean  $\pm$  SD of four to six independent experiments. P-value: \*,  $p < 0.05$ , \*\*,  $p < 0.01$  indicates a significant difference (ns:  $p = 0.09$ ). b) Representative cell growth curves. (B) Morphological appearance of subconfluent MSC cultured with HEMOXCell<sup>®</sup> (0, 0.025 and 0.05 g/L) obtained with a light microscope. Scale bar 100  $\mu$ m.



**Fig. 2. MSC clonogenicity and alkaline phosphatase activity.** CFU-F formation from hMSC was analysed at passage 1 for control and presence of 0.025 and 0.5 g/L HEMOXCell® after 14 days of culture. Giemsa stained colonies were enumerated (b); percentage of CFU-F were calculated (b) and data normalized with control (100%) (a). Percentage of CFU-F-ALP+ was calculated as a function of the total CFU-F number. Data are representative of 5 experiments performed in duplicates and are shown as mean  $\pm$  SD (\* $p$ <0.05).



**Fig. 3. HEMOXCell® cytotoxicity analysis.** (A) MSCs were cultured in 5% hLP-supplemented medium with 0.025 and 0.05 g/L of HEMOXCell® for 5 days. Annexin V-FITC Apoptosis Detection Kit (Sigma®) was used to determine the externalisation of phosphatidylserine (PS). Apoptotic cells are represented in the top left panel (positive staining for Annexin V). Necrotic cells are in the top right panel. The double labelling indicates a loss of the membrane integrity for this population. Percentages indicated in the lower left panel indicate viable cells (no Annexin V/PI staining). This result is representative of three independent experiments. (B). a) Representative images of cultures performed with 0 (i.e., control), 0.025 and 0.05 g/L HEMOXCell® visualized at 6, 9, 12 and 15 days by Live/Dead® staining of live cells with calcein AM (green) and dead cells with EthD-1 (red) by fluorescence microscopy. Scale bar 500  $\mu$ m. b) Images of MSCs cultured with 70% ethanol for apoptosis staining control. (C) The effect of HEMOXCell® on MSC membrane integrity was assessed by LDH release in cell culture medium. Measurements were normalized according to cell number and were represented as percentage of LDH release. Data represented the mean  $\pm$  SD of 3 experiments performed in triplicates (\* $p$ <0.05, \*\* $p$ <0.001).

$\pm$  7.6%). CFU-F-ALP+ colony numbers were similar in cultures performed with 0.025 g/L and 0.05 g/L when compared to control (~70% of ALP+ colonies). CFU-F-ALP+ colonies were significantly fewer for all tested conditions when compare to the total amounts of CFU-F.

### Cell viability and attachment

**Apoptosis:** Flow cytometry analysis by Annexin V/PI staining revealed that  $78.63 \pm 0.81\%$  of MSCs were both Annexin V- and PI-negative, and were then considered as viable in all conditions (i.e., w/ and w/o HEMOXCell® 0.0125 g/L and 0.05 g/L) (Fig. 3A, bottom left quadrant). For induced apoptosis control, only 11% of viable cells were found, 28.8% were in an early apoptotic state and 60% were in a late apoptotic state (necrotic). For tested conditions, an average of  $20.93 \pm 0.3\%$  of cell were found to be in a early apoptotic state, no differences were observed w/ or w/o HEMOXCell® (Fig. 3A, top left quadrant). Very few cells were found to be in late apoptotic state in all conditions tested (Fig. 3A, top right quadrant:  $0.23 \pm 0.2\%$ ).

**Live/Dead staining:** Monolayer profiles were similar in all conditions at days 6 and 9 (~100% cell confluence), exhibiting a typical fibroblast-like pattern (Fig. 3B (a)). Contrarily to both the control and the 0.025 g/L HEMOXCell® conditions, a growing number of areas without adherent cells

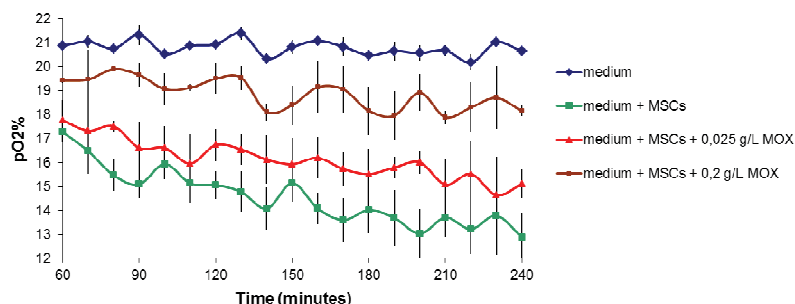
was observed with 0.05 g/L from day 12 to 15 (Fig. 3B (a)), bottom panel). However, no evidence of cell death (red cell staining) was observed in all conditions, suggesting that cells remain alive (green cell staining).

**LDH activity:** Incubation of MSCs with 0 (control), 0.025 and 0.05 g/L HEMOXCell® showed a significant decrease in LDH release between day 1 and day 2 in all conditions. A similar profile was obtained for control and 0.025 g/L with a significant decrease of LDH release after 2 and 3 days of culture (Fig. 3C). In contrast, after 2 and 3 days of culture, the percentage of LDH released was significantly higher with 0.05 g/L in comparison to the other conditions (Day 2 =  $47.7 \pm 3.5\%$ , day 3 =  $38.1 \pm 2.9\%$  versus  $23.5 \pm 4.1\%$  and  $16.2 \pm 1.8\%$  for control respectively). This indicated an effect of the molecule at this dose but not an increase of cellular damages.

These results confirmed that HEMOXCell® does not alter cell viability when used as an additive up to 0.05 g/L in the culture medium.

#### HEMOXCell® oxygen carrier abilities

Pericellular pO<sub>2</sub> was monitored with 0, 0.025 and 0.2 g/L HEMOXCell® during 4 hours (Fig. 4). An important decrease of pericellular pO<sub>2</sub> levels was measured from 60 to 240 minutes of incubation in wells containing only cells (from  $17.2 \pm 0.9\%$  to  $12.9 \pm 0.6\%$ ) compared to cell-free control wells ( $20.8 \pm 0.3\%$  throughout the experiment), suggesting that diffusion of atmospheric O<sub>2</sub> into tested wells is insufficient to compensate for O<sub>2</sub> consumption by MSCs. Interestingly, higher pericellular pO<sub>2</sub> levels were measured in HEMOXCell®-supplemented samples during the same measurement period (0.025 g/L HEMOXCell®: from  $17.76 \pm 0.43\%$  to  $15.11 \pm 0.9\%$ ; 0.2 g/L HEMOXCell®: from  $19.43 \pm 0.12\%$



**Fig. 4. Analysis of HEMOXCell® oxygen carrier function.** Kinetic curves of pericellular pO<sub>2</sub> levels of MSCs plated at  $1.10^5$  cells/well into a microplate Oxoplate® (PresSens) and exposed to 0, 0.025 and 0.2 g/L HEMOXCell® during 4 hours (37°C). Cell-free samples were used as control to visualise cell respiration during the experimentation. Data represented the mean  $\pm$  SD of one experiment performed in triplicate.

to  $18.2 \pm 0.22\%$ ). The oxygen profiles clearly show an effect of HEMOXCell® in a dose dependent manner to compensate the oxygen consumption due to cellular respiration. However, the highest HEMOXCell® dose is not enough for the maintenance of a stable dissolved oxygen level.

#### Biomarker expression by flow cytometry

The presence of specific markers at the surface of cultured MSCs at passage 1 was evaluated with M<sub>Ctrl</sub> and M<sub>HEMOX</sub> (Fig. 5A). Phenotypic profiles in both conditions were entirely consistent with those of MSCs, which strongly express CD73, CD105, and CD90 (100% co-expressed CD73 and CD105; 99.9% co-expressed CD90 and CD105). Cells were almost entirely negative for the haematopoietic markers CD14, CD20, CD34 and CD45 (0.6% in M<sub>Ctrl</sub>, 1.2% in M<sub>HEMOX</sub>).

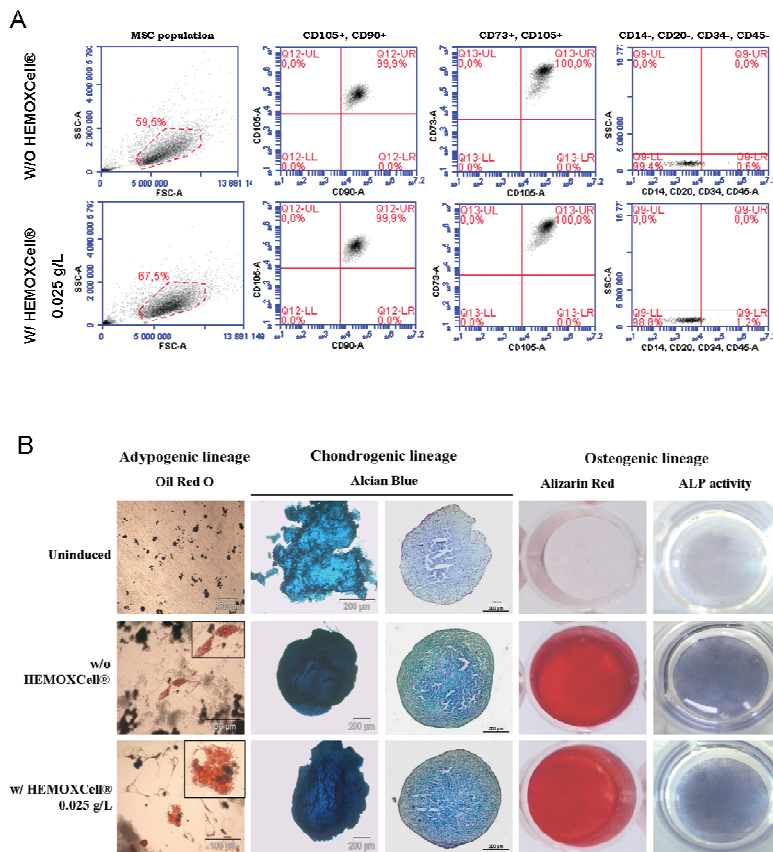
#### Differentiation potential

To investigate whether multilineage properties are conserved in culture with M<sub>HEMOX</sub> *in vitro*, MSCs were chemically induced to differentiate into osteoblasts, adipocytes and chondrocytes. Differentiated cells were characterized by using lineage-specific biochemical staining. After 21 days of culture, MSC-induced osteoblasts showed a dense staining pattern with either M<sub>Ctrl</sub> or M<sub>HEMOX</sub> (red for calcium deposits and blue for ALP activity), although slightly less intense with HEMOXCell®, while uninduced MSCs did not retain any specific staining (Fig. 5B). Induced MSCs were also successfully differentiated into adipocytes, as shown by the red lipid droplet staining with Oil Red O solution (Fig. 5B). Chondrogenic differentiation was assessed by cell-specific staining and pellet hardness analysis. Due to the soft consistency, control pellets, which were slightly bluish, split when interposed between a microscope slide and a cover glass.

Induced pellets were more resistant to the crushing procedure w/ and w/o HEMOXCell®. These pellets retained their spherical shape and stained strongly blue. Frozen sections exhibited light blue staining, whether induced pellet shown an intense blue staining, with collagenic matrix secretion.

#### Gene expression analysis

Expression of 84 MSC-expressed genes was analyzed by real-time, quantitative RT-PCR, and M<sub>Ctrl</sub> and M<sub>HEMOX</sub> conditions were compared. *RPLPO* was chosen as the



**Fig. 5. Analysis of the maintenance of MSC phenotype and differentiation properties.** (A) A flow cytometric analysis of MSC cell surface markers was performed. MSCs cultured in control media or with HEMOXCell® 0.025 g/L supplemented media were positive for the standard MSC markers CD73, CD90 and CD105 and negative for CD14, CD20, CD34 and CD45 (MSC Phenotyping Kit, Miltenyi). The analysis was performed in 6 independent experiments. (B) The *in vitro* differentiation potential of BM-MSCs cultured with or without HEMOXCell® 0.025 g/L. MSCs were cultured in differentiation media supplemented with hPL towards adipogenic, chondrogenic and osteogenic lineages. MSCs cultured without HEMOXCell® were used as control. Cells cultured in the adipocyte medium were stained with Oil Red O and exhibited red lipid droplets. Pellets of cells cultured with either the chondrogenic or control media were stained with Alcian Blue. MSC

housekeeping gene because of its stable expression level in all samples and conditions (Fig. 6:  $M_{Ct}$ :  $16.37 \pm 0.19$  Ct;  $M_{HEMOX}$ :  $16.58 \pm 0.25$  Ct). Comparative analyses indicate that none of the 84 tested genes was differentially expressed (fold-change  $\geq 4$ ) when MSCs were cultured with HEMOXCell®. No difference was observed for the genes involved in the differentiation as well as those involved in cell proliferation.

## Discussion

Several clinical trials have highlighted the therapeutic potential of autologous or allogeneic MSCs in regenerative medicine [3,27,28]. Their preparation for a clinical use have to be in accordance to the Good manufacturing practices (GMP) that requires evidences for the preservation

of cell viability and the maintenance of phenotype, plasticity, homing and safety [29–31]. Given that the sub-culturing may impact these parameters [32], MSCs were only used up to four passages.

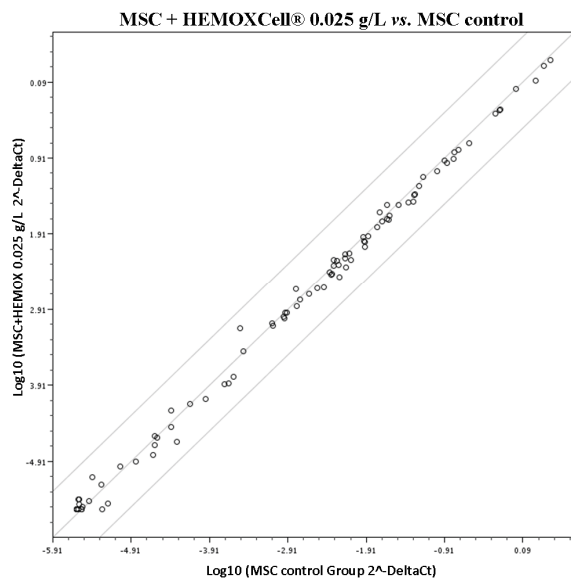
This study aimed at evaluating the feasibility of culturing MSCs in hPL-supplemented media with various concentrations of HEMOXCell® to determine the optimal conditions in planar culture. This extracellular haemoglobin has been developed by HEMARINA for clinical applications. Its powerful oxygen carrier ability is particularly valuable for organ preservation (HEMO2Life®) [33] and for controlling haemorrhagic shock (HEMOXYCarrier®) [34]. HEMOXCell® has been specifically developed for cell culture because of its sensitivity to oxygen variations. Regarding our preliminary results on the CHO-S cell line [20], we sought to investigate the potential use of the oxygen carrier HEMOXCell® as a GMP-compliant additive for MSC cell culture.

In the present work, cell proliferation analysis demonstrated that 0.025 g/L HEMOXCell® in the medium increases the cell expansion rate by 25% in comparison to basal culture conditions for 14 days of culture (Fig. 1A (a) and (b)). A reverse effect was observed with 0.05 g/L leading to an increase of 48% of the PDT. This observation is in

accordance to the microscopic data suggesting cell detachment from 14 days of culture with such a concentration (Fig. 1B). The viability assay performed in these conditions revealed that even with the highest HEMOXCell® concentration (*i.e.*, 0.05 g/L), adherent cells are still viable (Fig. 3B). Cytotoxicity analysis also indicated that there is no correlation between HEMOXCell® concentration and loss of cell viability. However, with a concentration of 0.05 g/L time required for membrane integrity restoration seems to be higher (Fig. 3C).

The optimal PDT in control conditions is consistent with those reported in the literature (*i.e.* 40 to 61.2 hours) [35–37]. Differences between studies can be attributed to variations in the experimental design. In our experiment cell seeding density was 1,000 cells/cm<sup>2</sup> for convenience. It is known that MSC





**Fig. 6. Comparative analysis of gene expression of MSCs.** The quantitative RT-PCR analysis of 84 human MSC-related genes was performed using RT<sup>2</sup> Profiler PCR Array (PAHS-082Z, Qiagen) in MSC cultured in control medium or in 0.025 g/L HEMOXCell® supplemented medium. The scatter plot at log base 10 for each gene tested in the two groups (x-axis, MSC control group; y-axis, MSC + 0.025 g/L HEMOXCell® group) showed no significant change of gene expression (n=3). The lines indicate the fold-change ( $2^{-\Delta Ct}$ ) above and below the threshold of gene expression (middle line = 1-fold change; bottom and top lines = 4).

seeding density and culturing time inversely correlate with MSC proliferation [38,39]. However, plating MSCs at a density of 1,000 cells/cm<sup>2</sup> seems to be the most valuable compromise in terms of clinical-scale production, time and cost [38]. The MSC donor age is another critical point for MSC expansion, since in our project donor ages are between 60-75 years old [40].

MSC clonogenic potential was conserved with 0.025 g/L HEMOXCell® (Fig. 2). Conversely, a significant decrease of CFU-F number was observed with 0.05 g/L HEMOXCell®. HEMOXCell® does not impact MSCs ALP activity in CFU-F, indicating maintenance of mesenchymal progenitors with a similar osteogenic potential in MSCs populations. However a decrease of the CFU-F number was observed, possibly by a phenomenon linked to oxygen pressure that induces a cell detachment. In our work HEMOXCell® seems to reduce MSC attachment but maintains their viability beyond the optimal concentration (i.e., > 0.025 g/L). It seems that HEMOXCell® displays a dose response effect when added to MSC culture medium, in our cell culture models. This effect was associated with a protective effect when it was used up to 0.025 g/L, with an antioxidant activity and conversely, with a prooxidant effect

when exposed to higher doses. Currently, no connection between these two dual antioxidant/prooxidant effects has been formally established.

In the present work, the analysis of pericellular oxygen levels illustrates the ability of HEMOXCell® to release oxygen to meet the cellular needs in a dose dependent manner (Fig. 4). The obtained results were performed at critical cell density ( $5.10^5$  cells/mL) and HEMOXCell® concentration (0.2 g/L) in order to allow the observation of the oxygen release phenomenon.

Finally HEMOXCell® does not alter the expression of neither cellular (i.e., human MSC typical surface proteins) (Fig. 5A) nor molecular (i.e., 84 human MSC-related genes) (Fig. 6) markers, while maintaining their plasticity (Fig. 5B). The pluripotency ability of MSCs is one of the most promising features for clinical applications [3,27,28]. However engraftment of modified MSC is controverted and requires strong regulatory procedures. Thus, preservation of the stemness may be a seductive approach given their possible *in situ* differentiation post-implantation.

In the present study, it appears that a low dose of HEMOXCell® (0.025 g/L) is sufficient to improve MSC growth probably by maintaining an adequate concentration of dissolved oxygen throughout the medium. These results are in accordance with those reported regarding the sensitivity of stem cells to low oxygen variations [41–43]. Oxygen pressure, to which the cells are exposed, could be critical for the cellular metabolism, cell growth and differentiation.

Our standard culture conditions consist of “atmospheric normoxia” (approximately 21% O<sub>2</sub>), but the vast majority of cells and tissues are in a hypoxic environment *in situ* (real tissue normoxia). *In vitro* studies report that medium oxygenation can modulate their multilineage capacity, as well as their PDT [44–46]. It has additionally been shown that hypoxia does not stimulate MSC growth but maintains the cells in a proliferative state [47]. We may hypothesize that variation in HEMOXCell® concentration impacts MSC proliferation rate through its oxygen binding ability. Therefore, preconditioning MSCs appears to impact cell proliferation [48]. Culturing MSCs at 21% O<sub>2</sub> and then with a powerful oxygen carrier likely leads to a different oxygen pressure and to stimulation or repression of cell proliferation according to the “oxygenator” dose and cell concentration. Further analyses are required to ensure that the increase of proliferation induced by HEMOXCell® did not change the biological nature of the cells, as already

reported with bFGF, which alter both plasticity and marrow formation abilities in an *in vivo* model [49].

Transition from laboratory-scale to production in large amount for biomedical applications requires many parameters to be in accordance with GMP [12,30]. HEMOXCell® is a GMP-compliant product subject to standard quality control procedures allowing its use for biomedical purposes, such as MSC infusion or tissue repair. Indeed, one of the major challenges for tissue engineering and regenerative medicine is to obtain a sufficient amount of expanded MSC cells during a limited period of *in vitro* expansion [29,50]. In 3D scaffold base culture systems, a low oxygen diffusion has been reported, especially under static conditions [51,52]. Sensitivity of HEMOXCell® to oxygen variations could constitute an interesting tool for 3D cell culture by forming a homogenous oxygen gradient and thus promoting the oxygenation of tissue substitutes in depth, and thus the cell survival.

## Abbreviations

ALP: Alkaline Phosphatase; APC: allophycocyanin; ASC: adipose stem cell; BCIP: 5-bromo-4-chloro-3-indolyl-phosphate; BSA: Bovine Serum Albumin; CD: cluster of differentiation; CFU-F: colony-forming unit fibroblast; CHO: Chinese hamster ovary; CO<sub>2</sub>: carbon dioxide; Ct: cycle threshold; DMEM: Dulbecco modified Eagle's minimal essential medium; EDTA: Ethylene diamine tetraacetic acid; EGFP: enhanced green fluorescent protein; FBS: foetal bovine sera; FITC: fluorescein isothiocyanate; GAG: glycosaminoglycans; GMP: good manufacturing practice; HCl: hydrochloride; hPL: human platelet lysate; HRP: horseradish peroxidase; IBMX: 3-isobutyl-1-methylxanthine; ISCT: International Society for Cellular Therapy; ITS: Insulin-Transferrin-Selenium;  $\alpha$ -MEM: Minimum Essential Medium Alpha Modifications; MSC: mesenchymal stem cell; O<sub>2</sub>: molecular oxygen; OCT: Optimal Cutting Temperature; PBS: phosphate-buffered saline; NBT: nitro blue tetrazolium; PCR: polymerase chain reaction; PDT: population doubling time; PE: phycoerythrin; PerCP: peridinin chlorophyll; PFA: paraformaldehyde; PI: propidium iodide; PRP: platelet rich plasma; ROS: reactive oxygen species; RT: room temperature; SOD: superoxide dismutase; TGF $\beta$ 3: transforming growth factor beta 3.

## Conflict-of-interest disclosure

FZ is the founder of and hold stock in HEMARINA SA, which produces the substance being investigated. EL holds stocks in HEMARINA SA. FL is an employee of HEMARINA SA and does

not hold stock. All other authors declare no conflict of interest. HEMOXCell® samples were provided by HEMARINA SA.

## Acknowledgments

The authors thank the ANRT (Association Nationale de la Recherche et de la Technologie) for its financial contribution (grant CIFRE N°2012/1161). We are grateful to the association Gaétan-Saleün and ID2Santé (formerly known as CRITT Santé Bretagne) for their financial support. We also thank Professor Jean-Jacques Lataillade for his contribution to our scientific knowledge about MSC culture. We are grateful to Yann Fichou (Research Engineer at EFS Brest, France) for checking the clarity and the language quality of the paper. We are also grateful to Philippe Elies (Plateforme d'Imagerie et de Mesures en Microscopie, PIMM, from the faculty of sciences, Brest) for confocal analysis.

## References

1. Friedenstein AJ, Chailakhyan RK, Latsinik NV, Panasyuk AF, Keiliss-Borok IV. Stromal cells responsible for transferring the microenvironment of the hemopoietic tissues. Cloning in vitro and retransplantation in vivo. Transplantation. 1974;17:331–40.
2. Dominici M, Le Blanc K, Mueller I, Slaper-Cortenbach I, Marini F, Krause D, et al. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. Cytotherapy. 2006;8:315–7.
3. Spitkovsky D, Hescheler J. Adult mesenchymal stromal stem cells for therapeutic applications. Minim. Invasive Ther. Allied Technol. MITAT Off. J. Soc. Minim. Invasive Ther. 2008;17:79–90.
4. De Ugarte DA, Morizono K, Elbarbary A, Alfonso Z, Zuk PA, Zhu M, et al. Comparison of Multi-Lineage Cells from Human Adipose Tissue and Bone Marrow. Cells Tissues Organs. 2003;174:101–9.
5. Belema Bedada F, Technau A, Ebel H, Schulze M, Braun T. Activation of myogenic differentiation pathways in adult bone marrow-derived stem cells. Mol. Cell. Biol. 2005;25:9509–19.
6. McClure MJ, Garg K, Simpson DG, Ryan JJ, Sell SA, Bowlin GL, et al. The influence of platelet-rich plasma on myogenic differentiation. J. Tissue Eng. Regen. Med. 2013;
7. Satija NK, Gurudutta GU, Sharma S, Afrin F, Gupta P, Verma YK, et al. Mesenchymal Stem Cells: Molecular Targets for Tissue Engineering. Stem Cells Dev. 2007;16:7–24.

8. Sundin M, Ringdén O, Sundberg B, Nava S, Götherström C, Blanc KL. No alloantibodies against mesenchymal stromal cells, but presence of anti-fetal calf serum antibodies, after transplantation in allogeneic hematopoietic stem cell recipients. *Haematologica*. 2007;92:1208–15.
9. Wessman SJ, Levings RL. Collective experiences of adventitious viruses of animal-derived raw materials and what can be done about them. *Cytotechnology*. 1998;28:43–8.
10. Doucet C, Ernou I, Zhang Y, Llense J-R, Begot L, Holy X, et al. Platelet lysates promote mesenchymal stem cell expansion: A safety substitute for animal serum in cell-based therapy applications. *J. Cell. Physiol*. 2005;205:228–36.
11. Bieback K, Hecker A, Kocaömer A, Lannert H, Schallmoser K, Strunk D, et al. Human alternatives to fetal bovine serum for the expansion of mesenchymal stromal cells from bone marrow. *Stem Cells Dayt. Ohio*. 2009;27:2331–41.
12. Capelli C, Domenghini M, Borleri G, Bellavita P, Poma R, Carobbio A, et al. Human platelet lysate allows expansion and clinical grade production of mesenchymal stromal cells from small samples of bone marrow aspirates or marrow filter washouts. *Bone Marrow Transplant*. 2007;40:785–91.
13. Naaijkens BA, Niessen HWM, Prins H-J, Krijnen PAJ, Kokhuis TJA, de Jong N, et al. Human platelet lysate as a fetal bovine serum substitute improves human adipose-derived stromal cell culture for future cardiac repair applications. *Cell Tissue Res*. 2012;348:119–30.
14. Rubio-Azpeitia E, Andia I. Partnership between platelet-rich plasma and mesenchymal stem cells: in vitro experience. *Muscles Ligaments Tendons J*. 2014;4:52–62.
15. Jonsdottir-Buch SM, Lieder R, Sigurjonsson OE. Platelet lysates produced from expired platelet concentrates support growth and osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells. *PloS One*. 2013;8:e68984.
16. Jochems CEA, van der Valk JBF, Stafleu FR, Baumans V. The use of fetal bovine serum: ethical or scientific problem? *Altern. Lab. Anim. ATLA*. 2002;30:219–27.
17. Simon MC, Keith B. The role of oxygen availability in embryonic development and stem cell function. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol*. 2008;9:285–96.
18. King JA, Miller WM. Bioreactor development for stem cell expansion and controlled differentiation. *Curr. Opin. Chem. Biol*. 2007;11:394–8.
19. Chen AK-L, Reuveny S, Oh SKW. Application of human mesenchymal and pluripotent stem cell microcarrier cultures in cellular therapy: Achievements and future direction. *Biotechnol. Adv*. 2013;31:1032–46.
20. Le Pape F, Bossard M, Dutheil D, Rousselot M, Polard V, Férec C, et al. Advancement in recombinant protein production using a marine oxygen carrier to enhance oxygen transfer in a CHO-S cell line. *Artif. Cells Nanomedicine Biotechnol*. 2015;1–10.
21. Chabasse C, Bailly X, Rousselot M, Zal F. The multigenic family of the extracellular hemoglobin from the annelid polychaete *Arenicola marina*. *Comp. Biochem. Physiol. B Biochem. Mol. Biol*. 2006;144:319–25.
22. Rousselot M, Delpy E, Drieu La Rochelle C, Lagente V, Pirow R, Rees J-F, et al. *Arenicola marina* extracellular hemoglobin: a new promising blood substitute. *Biotechnol. J*. 2006;1:333–45.
23. Rousselot M, Le Guen D, Chabasse C, Zal F. Novel dissociation mechanism of a polychaetous annelid extracellular haemoglobin. *FEBS J*. 2006;273:1582–96.
24. Zal F, Green BN, Lallier FH, Vinogradov SN, Toulmond A. Quaternary structure of the extracellular haemoglobin of the lugworm *Arenicola marina*: a multi-angle-laser-light-scattering and electrospray-ionisation-mass-spectrometry analysis. *Eur. J. Biochem. FEBS*. 1997;243:85–92.
25. Siddappa R, Licht R, van Blitterswijk C, de Boer J. Donor variation and loss of multipotency during in vitro expansion of human mesenchymal stem cells for bone tissue engineering. *J. Orthop. Res*. 2007;25:1029–41.
26. Stenderup K, Justesen J, Clausen C, Kassem M. Aging is associated with decreased maximal life span and accelerated senescence of bone marrow stromal cells. *Bone*. 2003;33:919–26.
27. Barry FP, Murphy JM. Mesenchymal stem cells: clinical applications and biological characterization. *Int. J. Biochem. Cell Biol*. 2004;36:568–84.
28. Salem HK, Thiernemann C. Mesenchymal stromal cells: current understanding and clinical status. *Stem Cells Dayt. Ohio*. 2010;28:585–96.
29. Rojewski MT, Fekete N, Baila S, Nguyen K, Fürst D, Antwiler D, et al. GMP-compliant isolation and expansion of bone marrow-derived MSCs in the closed, automated device Quantum Cell Expansion system. *Cell Transplant*. 2012;
30. Sensebé L, Bourin P, Tarte K. Good manufacturing practices production of mesenchymal stem/stromal cells. *Hum. Gene Ther*. 2011;22:19–26.

31. Warnke PH, Humpe A, Strunk D, Stephens S, Warnke F, Wiltfang J, et al. A clinically-feasible protocol for using human platelet lysate and mesenchymal stem cells in regenerative therapies. *J. Cranio-Maxillo-fac. Surg. Off. Publ. Eur. Assoc. Cranio-Maxillo-fac. Surg.* [Internet]. 2012 [cited 2012 Sep 24]; Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22878221>
32. Kemp KC, Hows J, Donaldson C. Bone marrow-derived mesenchymal stem cells. *Leuk. Lymphoma.* 2005;46:1531–44.
33. Mallet V, Dutheil D, Polard V, Rousselot M, Leize E, Hauet T, et al. Dose-Ranging Study of the Performance of the Natural Oxygen Transporter HEMO2 Life in Organ Preservation. *Artif. Organs.* 2014;
34. Le Gall T, Polard V, Rousselot M, Lotte A, Raouane M, Lehn P, et al. In vivo biodistribution and oxygenation potential of a new generation of oxygen carrier. *J. Biotechnol.* 2014;
35. Bernardi M, Albiero E, Alghisi A, Chieragato K, Lievore C, Madeo D, et al. Production of human platelet lysate by use of ultrasound for ex vivo expansion of human bone marrow-derived mesenchymal stromal cells. *Cytherapy* [Internet]. [cited 2013 May 30]; Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S146532491300491X>
36. Iudicone P, Fioravanti D, Bonanno G, Miceli M, Lavorino C, Totta P, et al. Pathogen-free, plasma-poor platelet lysate and expansion of human mesenchymal stem cells. *J. Transl. Med.* 2014;12:28.
37. Peng L, Jia Z, Yin X, Zhang X, Liu Y, Chen P, et al. Comparative Analysis of Mesenchymal Stem Cells from Bone Marrow, Cartilage, and Adipose Tissue. *Stem Cells Dev.* 2008;17:761–74.
38. Sekiya I, Larson BL, Smith JR, Pochampally R, Cui J-G, Prockop DJ. Expansion of human adult stem cells from bone marrow stroma: conditions that maximize the yields of early progenitors and evaluate their quality. *Stem Cells Dayt. Ohio.* 2002;20:530–41.
39. Neuhuber B, Swanger SA, Howard L, Mackay A, Fischer I. Effects of plating density and culture time on bone marrow stromal cell characteristics. *Exp. Hematol.* 2008;36:1176–85.
40. Zhou S, Greenberger JS, Epperly MW, Goff JP, Adler C, Leboff MS, et al. Age-related intrinsic changes in human bone-marrow-derived mesenchymal stem cells and their differentiation to osteoblasts. *Aging Cell.* 2008;7:335–43.
41. Ivanovic Z. Hypoxia or in situ normoxia: The stem cell paradigm. *J. Cell. Physiol.* 2009;219:271–5.
42. Mohyeldin A, Garzón-Muvdi T, Quiñones-Hinojosa A. Oxygen in Stem Cell Biology: A Critical Component of the Stem Cell Niche. *Cell Stem Cell.* 2010;7:150–61.
43. Fehrer C, Brunauer R, Laschober G, Unterluggauer H, Reitingner S, Kloss F, et al. Reduced oxygen tension attenuates differentiation capacity of human mesenchymal stem cells and prolongs their lifespan. *Aging Cell.* 2007;6:745–57.
44. Basciano L, Nemos C, Foliguet B, de Isla N, de Carvalho M, Tran N, et al. Long term culture of mesenchymal stem cells in hypoxia promotes a genetic program maintaining their undifferentiated and multipotent status. *BMC Cell Biol.* 2011;12:12.
45. Berniakovich I, Giorgio M. Low oxygen tension maintains multipotency, whereas normoxia increases differentiation of mouse bone marrow stromal cells. *Int. J. Mol. Sci.* 2013;14:2119–34.
46. Vertelov G, Kharazi L, Muralidhar M, Sanati G, Tankovich T, Kharazi A. High targeted migration of human mesenchymal stem cells grown in hypoxia is associated with enhanced activation of RhoA. *Stem Cell Res. Ther.* 2013;4:5.
47. Grayson WL, Zhao F, Izadpanah R, Bunnell B, Ma T. Effects of hypoxia on human mesenchymal stem cell expansion and plasticity in 3D constructs. *J. Cell. Physiol.* 2006;207:331–9.
48. Saini U, Gumina RJ, Wolfe B, Kuppusamy ML, Kuppusamy P, Boudoulas KD. Preconditioning mesenchymal stem cells with caspase inhibition and hyperoxia prior to hypoxia exposure increases cell proliferation. *J. Cell. Biochem.* 2013;114:2612–23.
49. Sacchetti B, Funari A, Michienzi S, Di Cesare S, Piersanti S, Saggio I, et al. Self-renewing osteoprogenitors in bone marrow sinusoids can organize a hematopoietic microenvironment. *Cell.* 2007;131:324–36.
50. Ikebe C, Suzuki K. Mesenchymal Stem Cells for Regenerative Therapy: Optimization of Cell Preparation Protocols. *BioMed Res. Int.* 2014;2014:e951512.
51. Volkmer E, Otto S, Polzer H, Saller M, Trappendreher D, Zagar D, et al. Overcoming hypoxia in 3D culture systems for tissue engineering of bone in vitro using an automated, oxygen-triggered feedback loop. *J. Mater. Sci. Mater. Med.* 2012;23:2793–801.
52. Yeatts AB, Choquette DT, Fisher JP. Bioreactors to influence stem cell fate: augmentation of mesenchymal stem cell signaling pathways via dynamic culture systems. *Biochim. Biophys. Acta.* 2013;1830:2470–80.



---

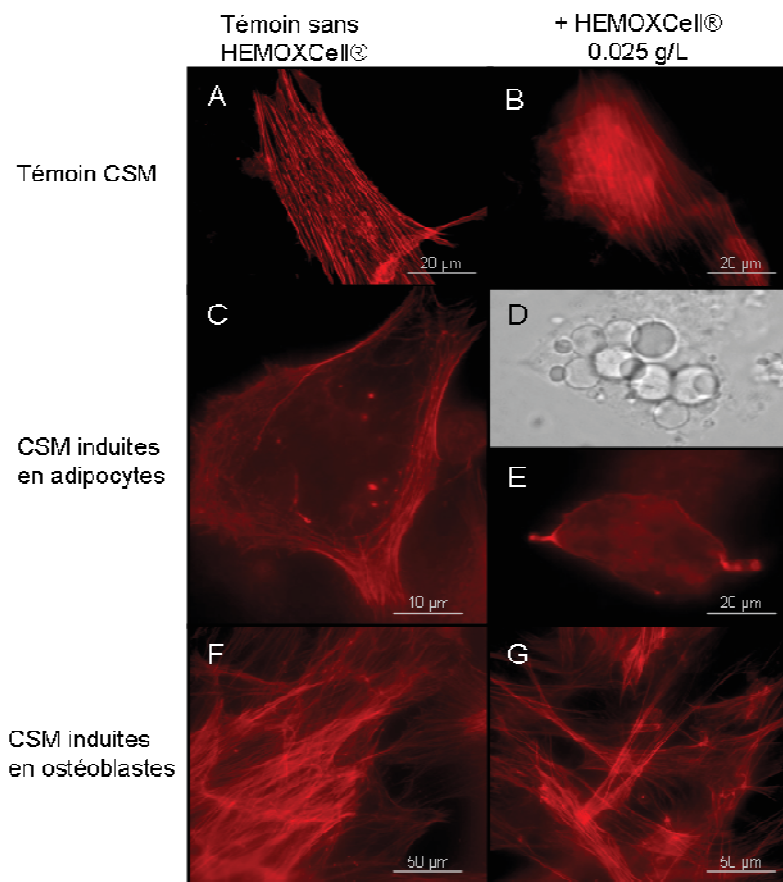
## Autres résultats obtenus pour la culture des CSM en présence d'HEMOXCell®

---

### Structure des filaments d'actine

Nous avons étudié la conformation du cytosquelette d'actine des CSM différenciées en ostéocytes et en adipocytes, en présence d'HEMOXCell®. Pour cela, les CSM ont été cultivées en milieux d'induction ostéogénique et adipocytaire pendant 21 jours. La conformation du cytosquelette d'actine a été analysée après 21 jours d'induction (Figure 35).

Les filaments d'actine ont été colorés à l'Alexa Fluor® 594 Phalloïdine puis observés en microscopie à fluorescence. Les images obtenues concordent avec les observations en coloration histologiques, la présence d'HEMOXCell® ne semblant pas perturber l'intégrité du cytosquelette d'actine-F (fibrillaire). Les CSM indifférenciées présentaient une forme en fuseau de type *fibroblast-like*, avec de longs filaments d'actine, parallèles les uns aux autres, et orientés dans le sens de la polarité cellulaire.

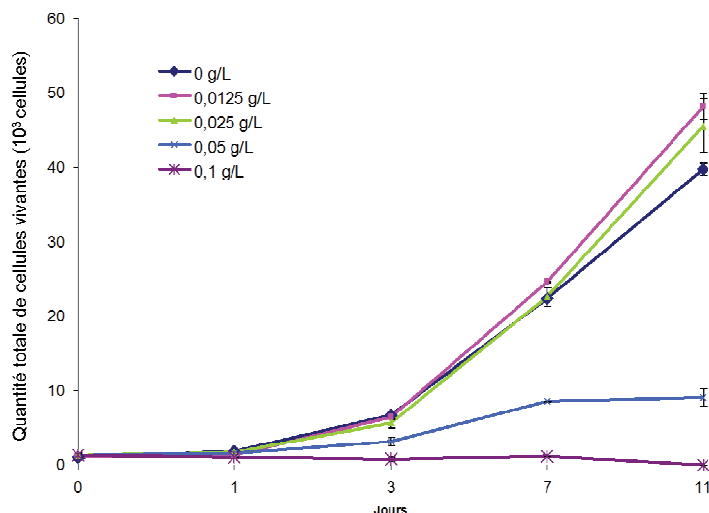


**Figure 35 – Structure du cytosquelette d'actine des CSM induites en adipocytes et ostéoblastes.** Les filaments d'actine de CSM indifférenciées, induites en adipocytes ou en ostéoblastes en présence de MOX à 0.025 g/L, ont été marqués à l'Alexa Fluor® 594 Phalloïdine. Les images ont été réalisées en microscopie à fluorescence ; les niveaux de gris ont été convertis en rouge à l'aide du logiciel ImageJ. L'image D représente une cellule en lumière blanche et l'image E, représente cette même cellule en fluorescence. Le cytosquelette d'actine est localisé à la membrane, les vésicules lipidiques ne sont visibles qu'en lumière blanche.

Un profil similaire était observé en présence de MOX (A, B). Les CSM induites en adipocytes dévoilaient un arrangement du cytosquelette totalement différent. Après 21 jours de culture en milieu de différenciation, la totalité des filaments d'actine étaient localisés à la membrane plasmique, formant un réseau moins dense que pour l'induction ostéogénique et se rejoignant pour former des zones d'adhésion membranaire (C, E). Les cellules induites en adipocytes présentaient différentes morphologies, présentant des formes allant de légèrement globulaires à totalement arrondies, probablement selon leur stade de différenciation. On peut voir sur l'image (D) que la cellule présente une très forte concentration en vésicules lipidiques de grandes tailles, non visibles en marquage fluorescent (E). Pour la différenciation ostéogénique, on observait une diminution de l'épaisseur des filaments, avec un réseau désordonné. Les cellules formaient une structure multicouche. Aucune différence notable n'a été observée avec MOX, démontrant encore une fois son innocuité.

## Analyse de la cytotoxicité avec le test CCK-8

Nous avons réalisé le test CCK-8, en plus de ceux présentés dans l'article 2, pour évaluer une éventuelle cytotoxicité de MOX (Figure 36). Ce test a été réalisé en plaques 96 puits selon les recommandations du fournisseur. La croissance cellulaire optimale est obtenue pour 0.0125g/L ( $48.1 \times 10^3 \pm 1.6 \times 10^3$  cellules) sans différence significative avec 0.025 g/L ( $45.6 \times 10^3 \pm 3.5 \times 10^3$  cellules), ce qui conforte les résultats précédemment obtenus. Il faut par ailleurs tenir compte de la densité cellulaireensemencée (environ 3000 cellules/cm<sup>2</sup>), qui était plus importante que les densités habituellement utilisées (*i.e.*, 400 ou 1000 cellules/cm<sup>2</sup>).



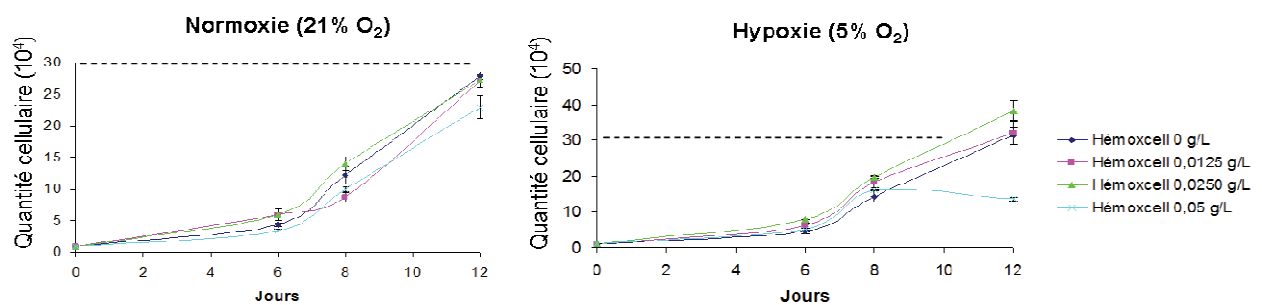
**Figure 36 - Analyse de la viabilité et de la prolifération en plaque 96 puits avec le test CCK-8.** Les CSM ont été cultivées en plaque 96 puits pendant 12 jours en présence de différentes concentrations d'HEMOXCell®. La quantité de cellules vivantes au cours du temps a été déterminée par mesure de l'absorbance à 450 nm. Les résultats représentent la moyenne  $\pm$  ET d'une expérience représentative réalisée en triplicat.

La confluence était de ce fait atteinte plus rapidement. Concernant les concentrations supérieures qui ont été testées (*i.e.*, 0.05 et 0.01 g/L), une faible croissance est observée à 0.05 g/L ( $9.1 \times 10^3 \pm 1.1 \times 10^3$  cellules), avec un plateau à partir du 7<sup>ème</sup> jour ; Aucune croissance cellulaire n'est observée à 0.1 g/L, probablement en raison du décollement cellulaire induit par cette concentration qui sur le long terme est nuisible à la viabilité cellulaire.

Les résultats obtenus nous informent que l'utilisation de MOX à 0.0125 et 0.025 g/L améliore la prolifération tout en maintenant la viabilité cellulaire, par comparaison avec la condition contrôle, sans MOX. Cependant, une concentration limite de 0.05 g/L ne doit pas être dépassée, sous peine de diminuer fortement la croissance voire de l'inhiber complètement lorsque l'on atteint 0.01 g/L.

### Analyse de l'impact de l'hypoxie dans la prolifération des CSM

La culture des CSM a été réalisée en parallèle en normoxie (21% O<sub>2</sub>) et en hypoxie (5% O<sub>2</sub>), en présence de différentes concentrations de MOX (Figure 37). Les conditions de culture étaient identiques pour les deux analyses, avec un ensemencement initial de  $1.10^4$  cellules/puits. En normoxie, la quantité cellulaire pour une concentration de 0.025 g/L, est supérieure aux autres conditions à J8. À J12 en revanche, on n'observe pas de différences significatives entre 0, 0.0125 et 0.025 g/L, avec une augmentation moyenne d'un facteur de 27.4.



**Figure 37 - Analyse de la croissance des CSM en présence d'HEMOXCell® à 21% et 5% O<sub>2</sub>.** La croissance des CSM a été évaluée en hypoxie et en normoxique en milieu  $\alpha$ MEM supplémenté par différentes concentrations d'HEMOXCell®. Les résultats représentent la moyenne  $\pm$  ET d'une manipulation analysée en duplicat. (ET : écart type)

Pour la culture en hypoxie, on observe une densité cellulaire significativement supérieure aux autres conditions (x 38.3) avec 0.025 g/L de MOX à J12. Pour 0 et 0.0125 g/L, des augmentations d'un facteur de 31.2 et de 32.0, ont été respectivement obtenues. À l'inverse, on observe une diminution de la quantité cellulaire entre J8 et J12 en présence de



0.05 g/L de MOX (J8=  $16 \times 10^4$  et J12=  $13.5 \times 10^4$ ), avec une densité cellulaire significativement plus faible toute au long de la culture.

La comparaison normoxie/hypoxie nous informe que l'hypoxie stimule la croissance des CSM et que la concentration de 0.025 g/L d'HEMOXCell® renforce ce phénomène.

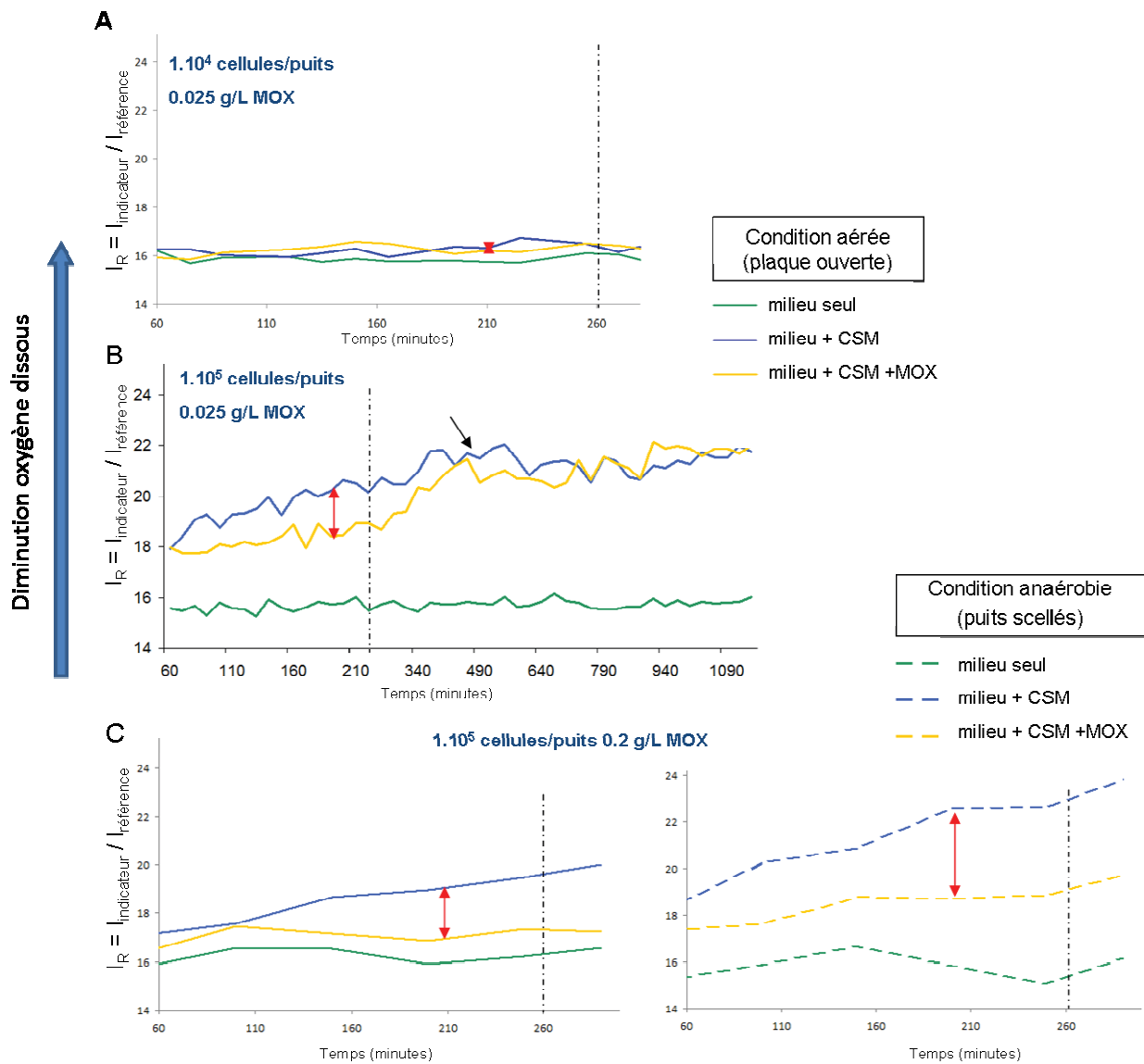
## **Dosage de l'oxygène dissous en condition anaérobie ou aérée**

Le taux d'oxygène dissous a été suivi avec une plaque Oxoplate® sur une durée allant de 6h à 20h. La figure 38 ci-contre, représente l'évolution du taux d'oxygène dissous (ratio indicateur ( $I_R$ )) dans le milieu des puits analysés, au cours du temps.

Dans un premier temps, nous avonsensemencé  $1.10^4$  cellules +/- MOX à 0.025 g/L (Figure 38A). On observe que les courbes obtenues se superposent avec la condition témoin (milieu seul), durant les 5 heures d'acquisition. On peut en déduire que l'oxygène contenu dans le milieu des puits au début des acquisitions ( $T_0$ ), ne varie pas au cours de l'analyse que ce soit avec ou sans cellules (+/- HEMOXCell®). Dans ces conditions, la quantité de cellules par puits ( $5.10^4$  cellules/ml) est insuffisante pour qu'une variation de l'oxygène dissous soit mesurable.

Toujours en plaque ouverte, le graphe de la figure 38B renseigne de l'évolution de l'oxygène dissous, avec cette fois-ci  $1.10^5$  cellules ( $5.10^5$  cellules/ml). Les courbes obtenues sont différentes de celles du graphe (A). La courbe « milieu seul » conserve une allure stationnaire, tandis que dès les 60 premières minutes d'incubation, une diminution est mesurée en présence de cellules +/- MOX. La courbe jaune (+ MOX) augmente moins rapidement que celle en bleue, traduisant une libération d'oxygène par l'hémoglobine pour répondre aux besoins cellulaires. À partir de 260 min d'incubation, on assiste à une diminution du taux d'oxygène mesuré en présence de MOX, avec un chevauchement des courbes jaune et bleue aux environs de 790 minutes. Il s'agit ici d'un épuisement de la réserve en oxygène constituée par HEMOXCell®.

Dans la figure 38C, un parallèle est réalisé entre des puits ouverts (graphe de gauche) et des puits scellés (graphe de droite). La concentration cellulaire reste la même que celle du graphe B, mais la concentration en MOX est augmentée d'un facteur 10 (0.2 g/L) afin de voir si le profil de la courbe jaune est influencé par la concentration utilisée.



**Figure 38 - Analyse du potentiel oxygénant d'HEMOXCell® en fonction des conditions de culture.** Les analyses sont réalisées dans une Oxoplate® avec un volume final de  $200 \mu\text{L}$ . (A) La première condition est réalisée avec  $1.10^4$  cellules/puits +/- MOX à  $0.025$  g/L (concentration optimale), dans des puits ouverts. (B) La seconde condition est réalisée avec la même concentration de MOX et  $1.10^5$  cellules/puits, dans des puits ouverts. (C) Pour la dernière analyse,  $1.10^5$  cellules sont cultivées +/-  $0.2$  g/L de MOX, en parallèle dans des puits ouverts (gauche) et dans des puits scellés (droite). Les graphiques représentent l'évolution du taux d'oxygène dissous dans les puits pour différentes conditions expérimentales. L'acquisition a été réalisée en duplicat toutes les 5 minutes et les courbes représentent l'évolution du ratio  $I_R$  ( $I_{\text{indicateur}}/I_{\text{référence}}$ ) toutes les 50 minutes. L'augmentation de ce ratio correspond à une diminution de l'oxygène dissous. L'écart entre les acquisitions réalisées en absence et en présence de MOX est signalé par une flèche rouge. Les mesures ont été réalisées en triplicat.

En puits ouverts, les valeurs restent proches de celles du graphe précédant, cependant on remarque qu'avec MOX le niveau d'oxygène dissous mesuré reste stable, parallèle au témoin.

En augmentant la quantité d'HEMOXCell®, on augmente la quantité d'O<sub>2</sub> en réserve, et de ce fait on peut stabiliser le taux d'oxygène dissous dans le milieu plus longtemps. A l'inverse, pour les conditions en puits scellés, l'oxygène dissous diminue plus rapidement, MOX parvint à contrer ce phénomène mais la courbe jaune correspondante est supérieure à la courbe « milieu seul » et légèrement ascendante. Ce phénomène est moindre dans la condition aérobie en raison de la diffusion de l'oxygène provenant de l'air ambiant.

Les résultats obtenus au cours de cette analyse, laissent supposer que la libération d'oxygène par HEMOXCell® se fait à partir d'un seuil d'oxygène dissous, permettant le maintien d'un niveau stable dans le milieu. Il semble libérer et rendre accessible l'oxygène aux cellules en système clos, contrant l'hypoxie qui apparaît en l'absence d'apport extérieur en oxygène.

**- Chapitre III -**  
**Discussion**



---

## Discussion sur la culture des CSM en présence d'HEMOXCell®

---

Les résultats de l'analyse dose-réponse présentés dans l'article, montrent une amélioration de la prolifération cellulaire en condition standard (21%O<sub>2</sub>), lorsque l'on utilise HEMOXCell® à 0.025 g/L. Pour cette même concentration nous n'avons pas identifié de modification des caractéristiques cellulaires, telles que la capacité de différenciation ou encore la clonogénicité. En revanche, au-delà de cette dose nous avons observé un décollement cellulaire. D'après nos observations, il ne s'agirait pas d'un effet cytotoxique de la molécule puisque nous n'avons pas détecté d'impact dans la survie des cellules. La teneur en fer d'HEMOXCell®, précédemment, évoquée, pourrait là encore expliquer les résultats observés, impliquant un phénomène d'oxydo-réduction. Dans des études antérieures, il avait été montré que l'hémoglobine d'Annélides possédait des capacités antioxydantes (Rousselot *et al.*, 2006; Zal & Rousselot, 2014). Certains composés antioxydants peuvent avoir une action prooxydante lorsqu'ils sont utilisés en surdosage. Dans le cas présent, le fer contenu dans l'hémoglobine interagirait avec le fer cellulaire exerçant ainsi une attraction sur les cellules. Ce phénomène est observé à partir de 0.05 g/L dans le modèle CSM et à partir de 0.1 g/L pour le modèle CHO. L'effet observé est moindre pour les cellules CHO car il s'agit de cellules non-adhérentes, HEMOXCell® peut alors être utilisé à des concentrations plus importantes, sans que cela ne perturbe la prolifération.

Ces résultats soulignent la nécessité de l'évaluation de l'effet dose-réponse d'un composé, pour mieux appréhender son utilisation. Les tests réalisés avec l'Oxoplate® ont permis de mieux comprendre le fonctionnement d'HEMOXCell®, lorsqu'il est utilisé comme additif en culture cellulaire. En culture standard, il va libérer de l'oxygène uniquement en réponse à une diminution de l'oxygène dissous dans le milieu de culture. Ce phénomène n'est observable qu'en présence de fortes densités cellulaires et il est accentué si l'on empêche les échanges gazeux entre l'environnement extérieur et le milieu de culture (puits scellés). On a pu mesurer la libération d'oxygène au cours du temps et montrer le potentiel oxygénant d'HEMOXCell®. La concentration testée était beaucoup plus élevée que celle déterminée comme optimale dans l'article, car nous voulions rendre observable les variations en O<sub>2</sub> dissous et pour cela nous avons été contraints de pousser les conditions à l'extrême. La culture en hypoxie stimule la prolifération des CSM dans nos conditions, ce qui est en accord avec la littérature (Grayson *et al.*, 2007).

Pour mieux comprendre l'utilisation d'HEMOXCell®, il faut se pencher sur son principe de fonctionnement. HEMOXCell® est une hémoglobine extracellulaire d'une taille 40 fois supérieure à celle de l'homme (3600 kDa vs 64 kDa). Une seule macromolécule peut fixer 156 molécules d'O<sub>2</sub>. L'affinité d'HEMOXCell® (M201) pour l'oxygène est moindre que celle de l'Hb humaine, sa P<sub>50</sub> est de 37 mmHg à 37°C, alors qu'elle est de 28 mmHg pour l'Hb humaine. Si l'on s'intéresse maintenant à nos conditions de culture, la normoxie correspond à 21% O<sub>2</sub> et l'hypoxie à 5% O<sub>2</sub>. La pO<sub>2</sub> de l'atmosphère terrestre avoisine les 21% d'O<sub>2</sub>, ce qui correspond à la pression partielle de la normoxie de culture cellulaire. Une unité de pression atmosphérique correspondant à 760 mmHg (millimètres de mercure), cela signifie qu'une pO<sub>2</sub> de 21% correspond à une pression partielle de 160 mmHg (760 x 0.21). En travaillant à 21% O<sub>2</sub>, on se situe à une pression partielle bien supérieure à la P<sub>50</sub> de MOX, les molécules seront alors saturées (Figure 39 ci-dessous). En présence d'une faible densité de cellules, la diminution de la pO<sub>2</sub> ne suffira pas à induire une libération d'O<sub>2</sub> par MOX qui soit observable en comparaison avec une culture en absence de MOX. Toutefois, si l'on se place dans des conditions où la diminution de la pO<sub>2</sub> est extrême (forte concentration cellulaire, puits scellés...), la diminution de la pO<sub>2</sub> vers le fond des puits tendra vers la P<sub>50</sub> de MOX, favorisant ainsi la libération d'O<sub>2</sub> par ce dernier, et permettant ainsi la visualisation de son potentiel oxygénant.

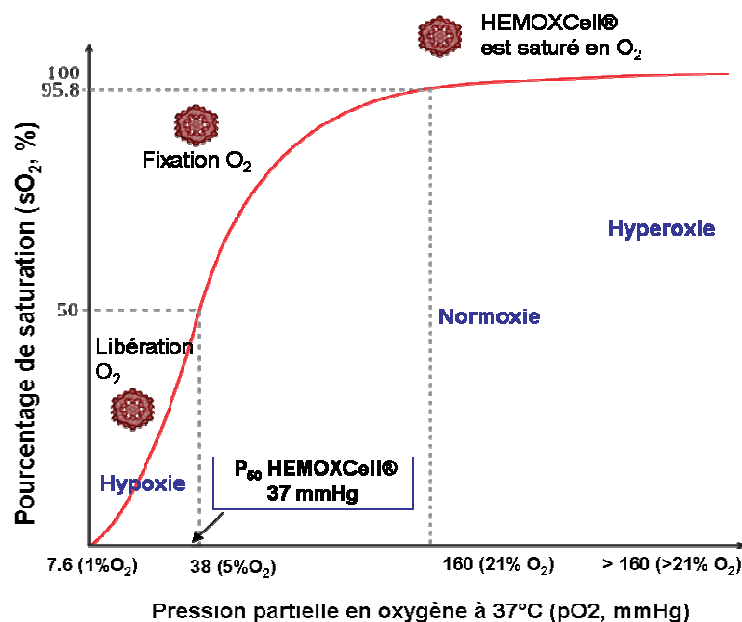


Figure 39 - Courbe de saturation d'HEMOXCell® en fonction des conditions de culture.

Si l'on place à une pression partielle en oxygène de 37 mmHg, 50% des sites de MOX sont saturés. Cette pression partielle équivaut à 4.8% O<sub>2</sub>, c'est-à-dire notre condition hypoxique.

Afin d'être dans des conditions optimales et pouvoir apprécier le rôle d'HEMOXCell®, il faudrait se placer à un pourcentage d'O<sub>2</sub> < 5%. En travaillant en hypoxie nous avons observé une amélioration de la prolifération cellulaire et déterminée une même dose efficace d'HEMOXCell®. L'amélioration de la croissance est observable avec MOX lorsque la densité cellulaire est élevée, la pO<sub>2</sub> à laquelle sont exposées les cellules est alors inférieure à celle de l'incubateur. Il est probable que la balance entre le taux d'oxygène consommé et la diffusion se faisant avec le milieu extérieur, penche en faveur d'une déplétion locale en oxygène ce qui favorise la libération d'oxygène par MOX, améliorant ainsi la prolifération cellulaire. Plusieurs études démontrent un effet bénéfique de l'hypoxie dans la culture des CSM, elle modulerait non seulement les capacités prolifératives des CSM, mais aussi leur capacité de différenciation (Ivanovic, 2009; Basciano *et al.*, 2011; Zhang *et al.*, 2013). Toutefois, lorsque les études sont réalisées *in vivo*, l'hypoxie lorsqu'elle est prolongée et sévère, serait l'un des facteurs impliqués dans la mort cellulaire massive, il est donc important de prévenir une déplétion totale en O<sub>2</sub> en maintenant un niveau en oxygène dissous favorable à la croissance des CSM (Haider & Ashraf, 2008). Il apparaît aussi que le préconditionnement hypoxique des CSM serait une solution pour limiter la mort cellulaire causée par le changement d'environnement brutal au moment de l'implantation (Beegle *et al.*, 2015). Ce phénomène serait aussi lié à un manque de nutriments, notamment en glucose (Deschepper *et al.*, 2011).

Concernant le design expérimental nous avons travaillé à partir de CSM de moelle osseuse, obtenues à partir de résidus de fraisage de hanche. La moelle osseuse représente la principale source de CSM pour des applications thérapeutiques. Cependant, de nombreuses études ont montré des propriétés toutes aussi avantageuses pour les CSM provenant de tissu adipeux (H.-T. Chen *et al.* 2012; H. Li *et al.* 2007; Mosna, Sensebé, and Krampera 2010). Le protocole utilisé pour l'extraction des cellules permet d'éliminer les résidus osseux et graisseux par de simples étapes de filtration. La quantité de moelle obtenue à partir d'un prélèvement étant très faible nous avons préféré ne pas réaliser d'extraction au Ficoll™. De plus, l'ensemencement initial réalisé avec notre technique, permettait d'obtenir une quantité cellulaire suffisante en un temps raisonnable. La richesse en CSM des prélèvements était variable, ainsi que les capacités prolifération et de différenciation des cellules isolées. Cela



s'explique car prélèvements provenaient pour la plupart de sujets âgés (Kim *et al.*, 2012). Le concept même des cellules souches est en perpétuel évolution, ce qui rend leur caractérisation délicate, d'autant plus que leur phénotype membranaire est variable en fonction de la population considérée (source tissulaire, espèce, âge...). Dans notre étude nous avons caractérisé les CSM selon les critères établis par l'ISCT, à savoir l'adhérence au plastique, la différenciation *in vitro* en adipocytes, ostéoblastes et chondrocytes et l'expression d'un panel de marqueurs membranaires (Dominici *et al.*, 2006).

Nous avons choisi de travailler avec du LP plutôt qu'avec du SVF, car nous avons comme objectif de poursuivre nos expériences avec HEMOXCell® dans des systèmes de cultures 3D, en substituts allogéniques. Pour un usage en thérapeutique humaine, il est plus approprié d'utiliser du matériel biologique d'origine humaine. Notre choix a été appuyé par les nombreux avantages attribués à l'utilisation du LP en ingénierie tissulaire et pour la culture des CSM (Fréchette *et al.*, 2005; Capelli *et al.*, 2007; Jonsdottir-Buch *et al.*, 2013; Rubio-Azpeitia & Andia, 2014). Il favoriserait par ailleurs la cicatrisation et la régénération osseuse et cartilagineuse, ce qui nous a semblé d'autant plus intéressant en vue du chapitre qui va suivre (Chevallier *et al.*, 2010; Wang *et al.*, 2015).

Ce second chapitre traitait des deux objectifs principaux liés à la culture cellulaire : tout d'abord mettre au point un test de performance dans un modèle de culture *in vitro*, associant HEMOXCell® et les cellules CHO-S, puis transposer cette étude à un modèle cellulaire d'intérêt en thérapie cellulaire et tissulaire, les cellules souches mésenchymateuses.

## Chapitre IV

# L'ingénierie tissulaire : cas des tissus osseux et méniscaux

---

*Résumé : Nous avons évoqué dans les précédents chapitres, les systèmes respiratoires et les différents pigments qu'ils possèdent, ainsi que les potentielles applications industrielles et thérapeutiques qui en découlent. Nous avons par ailleurs évalué l'impact d'HEMOXCell® dans la culture des CSM et établi son rôle dans la croissance et la stabilité phénotypique de ces dernières. Les CSM suscitent un grand intérêt dans le domaine de la thérapie cellulaire mais aussi dans le domaine de l'ingénierie tissulaire. Dans ce troisième et dernier chapitre, nous commencerons par introduire l'ingénierie tissulaire, avec les critères qui définissent un biomatériau idéal, les conditions de culture optimales et aussi les contraintes liées à l'oxygénation. Nous nous focaliserons ensuite sur l'ingénierie tissulaire des tissus osseux et méniscaux, avec les CSM comme cellules candidates pour leur régénération. Chaque tissu sera abordé de la même manière avec : les généralités fonctionnelles et structurales, les problématiques mécaniques et biologiques, pour finir avec les techniques thérapeutiques innovantes. Au niveau expérimental, une première partie sera consacrée à la caractérisation des cellules méniscales, les fibrochondrocytes. Puis, pour palier au défaut d'oxygénation des substituts, nous avons dans une seconde partie, développé des techniques de culture de CSM sur substituts biologiques humains, en présence d'HEMOXCell®, pour améliorer la colonisation et la survie cellulaire.*

---



**- Chapitre IV -**  
**Introduction**



---

# 1. L'ingénierie tissulaire

---

## 1.1. Définition

L'ingénierie tissulaire est un domaine interdisciplinaire qui a pour objectif de développer des substituts tissulaires biocompatibles, afin de restaurer et maintenir les fonctions d'un tissu ou d'un organe, après implantation chez le patient. Cette discipline a été développée pour solutionner les inconvénients des greffes autologues ou allogéniques, que sont la faible disponibilité en greffon, les risques de rejets et le traumatisme lié à l'acte chirurgical (Daar & Greenwood, 2007). L'approche consiste à générer des structures tridimensionnelles (3D) dynamiques en associant des cellules (autologues ou allogéniques) à un support poreux biocompatible. Le point de départ pour cette pratique nécessite de collecter un échantillon de tissu par biopsie, pour en extraire et cultiver les cellules *in vitro*. Ces dernières peuvent être obtenues par migration à partir de l'explant ou par digestion enzymatique. Elles sont ensuite cultivées puisensemencées sur le substitut tissulaire dans des conditions définies et stériles. Après un certain temps en culture dans la construction, les cellules vont dégrader une partie de la substance organique, le plus souvent le collagène, pour la remplacer par leur propre matrice. En médecine régénératrice, l'avantage de cette technique est qu'elle permet d'utiliser des cellules du patient et donc de s'écarter des potentiels risques de rejets. En recherche fondamentale, l'ingénierie tissulaire permet aussi d'évaluer *in vitro* le comportement des cellules en présence du support. De la même manière, elle permet de définir les conditions optimales pour la cellularisation du greffon, mais aussi de prédire le comportement du greffon *in vivo*. Par exemple, il est commun de travailler en conditions proches de l'environnement physiologique en ajoutant des facteurs de différenciation ou une stimulation mécanique (Shamloo *et al.*, 2015).

Par comparaison avec l'implantation d'un substitut acellulaire, la cellularisation en préimplantatoire a pour objectif d'améliorer la bioassimilation du greffon et d'accélérer le recouvrement de la fonction du tissu ou de l'organe cible. Cette pratique concerne principalement des tissus dotés d'une capacité de régénération spontanée limitée, tels que le cartilage, le ménisque, les tendons et les ligaments. Mais elle peut aussi concerner des fractures conséquentes ou encore des maladies comme l'ostéoporose, l'ostéoarthrite et

certains cancers (Arthur *et al.*, 2009). Différents facteurs sont impliqués dans les réponses et les fonctions cellulaires *in vivo*, comme les facteurs de croissance solubles, les propriétés physico-biochimiques de la matrice, les interactions cellule-cellule et cellule-matrice ainsi que le microenvironnement 3D (Shamloo *et al.*, 2015).

### **1.1.1. Le substitut idéal**

Pour être utilisé en ingénierie tissulaire, un substitut doit être un support tridimensionnel répondant à des critères précis, afin de représenter au mieux l'environnement cellulaire physiologique. *In vitro*, il doit être stable dans les conditions de culture, permettre l'adhérence et la prolifération cellulaire, et constituer un substrat favorable à la néo-synthèse de la matrice extracellulaire du tissu d'origine. *In vivo*, il doit être bioassimilable, c'est-à-dire non-immunogène, s'intégrer parfaitement dans le site d'implantation et générer des composés de dégradation non toxiques pour l'organisme (Hutmacher, 2000). De plus, il doit permettre la circulation des nutriments et le développement de nouveaux vaisseaux sanguins, ce qui implique une porosité adéquate (pores interconnectés). Il doit être bioactif, et de ce fait posséder des propriétés physico-chimiques permettant des interactions chimiques au contact du site receveur.

### **1.1.2. Les cellules candidates**

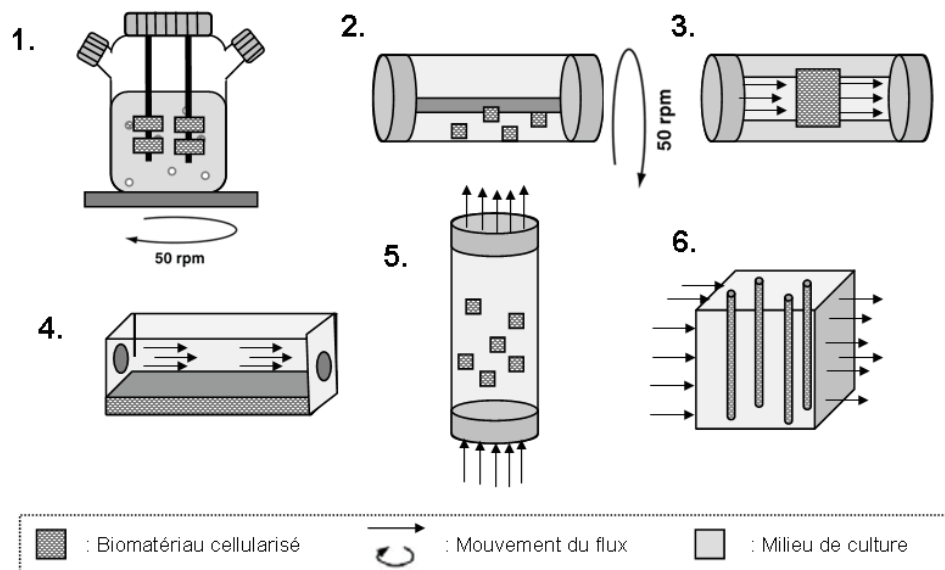
La logique voudrait que les cellules utilisées soient directement extraites d'un explant du tissu cible du patient. Or, les cellules différenciées sont plus difficilement cultivables et le temps nécessaire à l'obtention de quantités suffisantes, a encouragé l'utilisation de cellules multipotentes à forte capacité proliférative *in vitro*. Les cellules souches, et plus particulièrement les cellules souches adultes, sont actuellement les cellules candidates les plus considérées pour des applications de réparation tissulaire (Daar & Greenwood, 2007).

### **1.1.3. Les conditions de culture**

L'activité physiologique et biochimique des cellules peut être améliorée par ajout de facteurs de croissance et de cytokines, mais aussi par stimulation physique pour recréer des conditions favorables à l'organogénèse et à la réparation tissulaire.

La culture en bioréacteur est actuellement la plus utilisée car elle permet de se rapprocher au plus près de l'environnement physiologique. La culture traditionnelle en boîtes de Pétri ou dans des puits de plaques de culture n'est pas adaptée à la culture 3D, principalement pour des substituts de dimensions importantes. En ingénierie tissulaire, il est fréquemment observé un développement tissulaire localisé à la périphérie du substitut. Ce phénomène serait dû aux conditions de culture inadaptées pour l'approvisionnement en nutriments, facteurs de croissance et oxygène. En effet, le milieu de culture et l'oxygène ne circulant pas au travers du support, les cellules vont naturellement se développer et synthétiser de la MEC selon un gradient, de la surface vers le centre du biomatériau, laissant la zone la plus profonde quasiment acellulaire (Holy *et al.*, 2000; Volkmer *et al.*, 2012).

Afin de limiter ces phénomènes, divers systèmes ont été développés pour améliorer la cellularisation des supports, apporter une stimulation mécanique, permettre un apport constant en O<sub>2</sub> et en nutriments (Kim *et al.*, 1998). Ils impliquent un mouvement de milieu autour et/ou au travers du support. Ce type de culture est appelée « dynamique ». Des exemples de bioréacteurs sont schématisés dans la figure 40.



**Figure 40 - Exemples de bioréacteurs utilisés en ingénierie tissulaire.** (1.) Bioréacteur à agitation : les substituts sont attachés à des tiges et le mouvement de milieu est réalisé par un agitateur. (2.) Bioréacteur rotatif : les supports sont en mouvement libre dans le milieu sous l'action de la rotation du cylindre autour de son axe. (3.) Bioréacteur à perfusion : le support est fixé dans le cylindre et le milieu perfuse en continu au travers. (4.) Bioréacteur à plan parallèle (microfluidique): le support 3D est fixé au fond du système et le milieu circule sur sa face supérieure. (5.) Bioréacteur à lit fluidisé : les substituts sont dans le milieu de culture sous un flux continu. (6.) Bioréacteur à fibres creuses : les supports sont bloqués dans des fibres soumis de part et d'autre à un flux de milieu pour un échange par diffusion des nutriments. (Adapté de Martin et al. 2004).



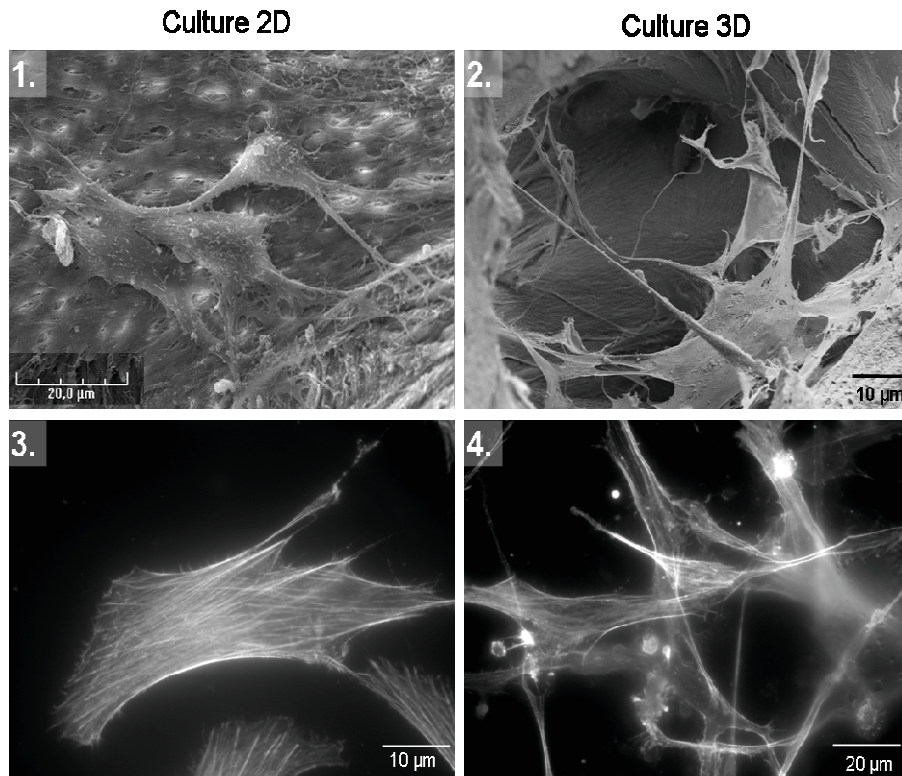
Les systèmes basés sur la perfusion du milieu de culture à la fois au travers et autour de fibres creuses semi-perméables (Figure 40 (6)), ont démontré une performance avérée notamment pour la culture d'hépatocytes (Lu *et al.*, 2005). Ce concept a été étendu à des fins d'ingénierie tissulaire avec les systèmes de culture en perfusion directe (Figure 40 (3)). Dans ce modèle, le milieu de culture est perfusé directement au travers des pores du support limitant ainsi les disparités de répartition cellulaire et de substances (nutriments et déchets). De plus, différentes études s'accordent sur les avantages de ce mode de perfusion, notamment pour promouvoir la croissance, la différenciation et la synthèse de MEC par les cellules osseuses (Bancroft *et al.*, 2002; Sikavitsas *et al.*, 2005) et augmenter la synthèse de glycosaminoglycanes (GAGs) par les chondrocytes (Pazzano *et al.*, 2000).

## **1.2. La culture tridimensionnelle pour se rapprocher du vivant**

La culture conventionnelle est réalisée en deux dimensions (2D) sur des surfaces en verre ou en plastique, ce qui n'est pas réellement pertinent du point de vue physiologique. En effet, *in vivo* les cellules sont incluses au sein d'un environnement complexe, riche en signaux et en composants de la MEC. De nombreux types cellulaires, lorsqu'ils sont isolés des tissus puis cultivés en planaire, perdent progressivement leur capacité de différenciation et de prolifération. Si l'on prend l'exemple des CSM, en culture 3D sur un polymère synthétique de polycaprolactone et de phosphate tricalcique, leur clonogénicité étaient 4 fois supérieure à celle de leurs homologues cultivées en 2D et aussi une meilleure capacité de différenciation *in vitro* (Papadimitropoulos *et al.*, 2014).

Le mode de culture conventionnel en deux dimensions, ne serait pas approprié à la culture cellulaire et induirait un décalage entre les résultats observés et la réalité, principalement pour ce qui est de l'étude des mécanismes de la physiologie cellulaire, tels que le métabolisme, le cycle cellulaire ou bien l'expression génique (Baker & Chen, 2012). L'environnement tridimensionnel dans lequel les cellules sont cultivées va donc être déterminant pour leurs fonctions physiologiques. Des différences entre les profils d'expression génique de cultures réalisées en 2D et en 3D pour un même type cellulaire ont été observées (Luca *et al.*, 2013; Lee *et al.*, 2013a), mais aussi des modifications protéiques et morphologiques (Pontes Soares *et al.*, 2012). Toutes ces différences s'expliquent par le fait que la culture 3D va permettre aux cellules d'interagir entre elles mais aussi avec leur support, favorisant ainsi le remodelage de leur microenvironnement, principalement par des interactions cellules-matrices (Cukierman *et al.*, 2001; Yamada *et al.*, 2003). Lorsque l'on

compare des cellules cultivées en 2D et en 3D, l'une de leurs principales différences est leur disparité morphologique (Rumpler *et al.*, 2008). En culture planaire, le réseau du cytosquelette d'actine est organisé et polarisé alors qu'il est sur différents plans et qu'il présente des filaments plus allongés en culture 3D (Figure 41 (3.), (4.)).



**Figure 41 - Morphologie des CSM en culture 2D et 3D.** Photographies de microscopie électronique à balayage de CSM cultivées sur matrice collagénique osseuse en 2D (1.) et en 3D (2.). Analyse en microscopie à fluorescence du cytosquelette d'actine-F (Alexa Fluor® 594-phalloïdine) de CSM en culture planaire sur lamelles (3.) et dans leur matrice minérale néo-synthétisée (4.). Les signaux perçus par les cellules en 3D sont différents de ceux qu'elles intègrent en culture planaire. La polarité cellulaire n'est pas prédéfinie en 3D, les cellules interagissent avec leur environnement via leurs prolongements membranaires, dans les trois dimensions.

En culture monocouche, la polarité est influencée par les interactions d'adhésion sur un plan horizontal, alors que dans une matrice 3D, qu'elle soit poreuse ou non, elles peuvent établir des interactions dans leur substrat selon les trois dimensions (Figure 41 (1.), (2.)). Huebsch et ses co-auteurs ont examiné l'influence de la rigidité de gels d'alginate sur la différenciation des CSM en 3D. Ils ont observé une modification de l'organisation des protéines d'adhérence, comme les intégrines, et un engagement ostéogénique favorisé par une rigidité intermédiaire (Huebsch *et al.*, 2010).

Pour toutes ces raisons, les supports 3D vont permettre d'étudier et recréer des processus du développement tissulaire mais aussi de suivre des progressions pathologiques. Ils constituent une part importante du domaine de l'ingénierie tissulaire et seront abordés par la suite pour les reconstructions osseuses et méniscales.

### 1.3. Exemples d'applications à partir de CSM et rôle de l'oxygène

Les principales associations de CSM à des supports 3D pour de l'ingénierie tissulaire, sont destinées à des reconstructions osseuses et cartilagineuses (Arvidson *et al.*, 2011; Phadke *et al.*, 2013). On les retrouve cependant dans de nombreuses études de réparation méniscale et cardiaque (Cashman *et al.*, 2013; Yu *et al.*, 2015), mais aussi du tendon et des ligaments. Le type de matériau utilisé va dépendre du tissu à réparer, des exemples sont présentés dans la figure 42.

Une récente étude sur la réparation de défauts du nerf sciatique chez le rat, a démontré que l'utilisation d'un substitut collagénique ensemencé avec des CSM prédifférenciées, améliorait la régénération axonale par comparaison avec une greffe autologue, et cela sans interférer avec les fonctions cellulaires (Boecker *et al.*, 2015).

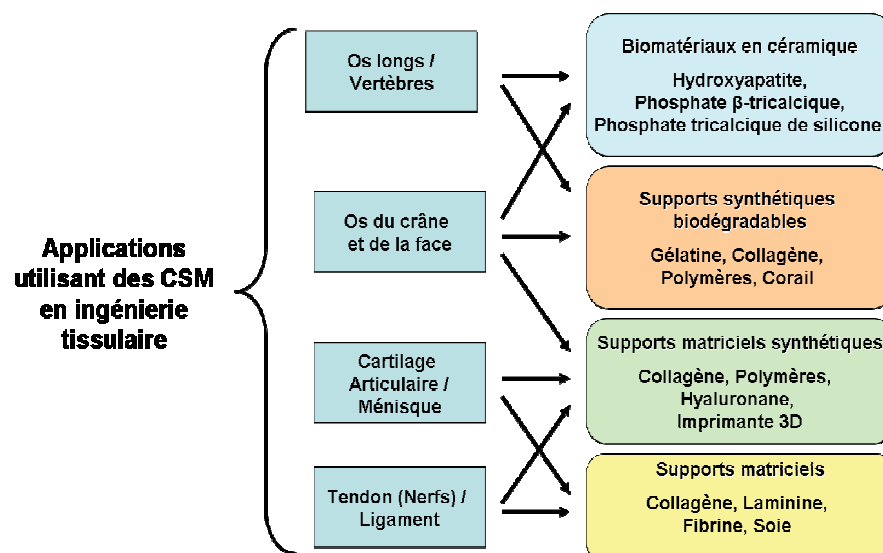


Figure 42 - Exemples d'utilisation des CSM en ingénierie tissulaire des tissus squelettiques, et types de biomatériaux associés. (d'après Arthur et al. 2009)

*In vivo*, les CSM soutiennent les cellules progénitrices par des mécanismes paracrines indirects, parmi lesquels le relargage de médiateurs impliqués dans leurs propriétés immunorégulatrices, angiogéniques et chimiotactiques. (Jorgensen & Noël, 2011).

Le secrétome des CSM serait en grande partie responsable du potentiel régénératif qui leur est attribué. En effet, différentes études précliniques réalisées à partir de milieux conditionnés par des CSM, ont montré de bons résultats dans les réparations de la peau, ainsi que dans les réparations cardiaques et osseuses (Timmers *et al.*, 2011; Ando *et al.*, 2014). Le secrétome des CSM, donc leur fonctionnalité, va être dépendant de la pression en oxygène de leur environnement.

Dans une étude menée sur le secrétome de CSM humaines, Paquet et son équipe ont caractérisé et analysé la bioactivité du secrétome *in vitro* mais aussi *in vivo*, en fonction de la pression en oxygène (Paquet *et al.*, 2015). Ils ont identifié que les CSM cultivées en condition proche de l'anoxie (0.1 % O<sub>2</sub>), possédaient des propriétés pro-angiogéniques et chimiotactiques plus importantes que celles cultivées à 5 et 21 % d'O<sub>2</sub>. Toutefois, ils observèrent une diminution des médiateurs anti-inflammatoires à 0.1% d'O<sub>2</sub>. Cette même équipe a identifié le glucose comme étant un acteur clé dans la survie cellulaire en conditions ischémiques (0.1% O<sub>2</sub>) *in vitro* et *in vivo* (Deschepper *et al.*, 2013).

---

## 2. L'ingénierie tissulaire du tissu osseux

---

### 2.1. Définition

Le tissu osseux est un tissu conjonctif spécialisé dit « squelettique » comme le tissu cartilagineux, ils sont tous les deux caractérisés par une matrice solide. Dans l'organisme l'os va assurer trois grandes fonctions :

- **Fonction mécanique** : Il permet le maintien du corps en supportant les contraintes mécaniques et protégeant ainsi les organes qu'il entoure.

- **Fonction métabolique** : Il joue un rôle dans le métabolisme phosphocalcique en libérant des sels minéraux au cours de son perpétuel remodelage.

- **Fonction hématopoïétique** : La moelle osseuse qu'il renferme dans son espace médullaire, est constituée entre autres de cellules souches hématopoïétiques (CSH), qui vont donner les lignées sanguines et de CSM qui vont se différencier en cellules stromales. Ces cellules vont ainsi assurer un rôle de soutien hématopoïétique mais aussi structural.

### Les os sont répartis en trois groupes selon leur conformation :

- Les os longs: Ils sont constitués d'une diaphyse allongée aux deux extrémités renflées (épiphyses), à l'exception de la clavicule.
- Les os plats : Ils peuvent être longs et larges mais sont peu épais.
- Les os courts : Ils ont une épaisseur, une largeur et une longueur à peu près égales.

Deux types de structures caractérisent les os, la principale constitue l'os compact, appelé os cortical, elle représente à elle seule 85% du squelette et assure sa résistance mécanique. La seconde représente les 15% restant et constitue l'os spongieux, appelé os trabéculaire.

## **2.2. Les cellules du tissu osseux**

Le tissu osseux est constitué de 4 types de cellules dont deux populations distinctes. Les ostéoblastes et les ostéocytes vont assurer la formation et la structure du tissu. Elles sont étroitement liées aux cellules bordantes. Les ostéoclastes vont avoir une action destructrice et sont responsables de la résorption osseuse. Toutes les cellules osseuses sont originaires de la MO et plus particulièrement des cellules souches qu'elle renferme (Buckwalter *et al.*, 1996).

### **2.2.1. Les ostéoblastes**

Les ostéoblastes sont issus d'un progéniteur mésenchymateux, commun aux lignées chondrocytaire, adipocytaire et fibroblastique : les cellules souches mésenchymateuses (Pittenger *et al.* 1999). Il s'agit de cellules de forme ovoïde et allongée, responsables de la synthèse de la matrice osseuse. En réalité ces cellules vont sécréter une substance ostéoïde constituée de fibres de collagène de type I, de protéoglycanes et de glycoprotéines, qu'elles vont minéraliser au cours de la croissance squelettique et lors des phases de remodelage. Lors de ce processus de minéralisation, les ostéoblastes vont déposer de nouvelles lamelles osseuses formant ainsi une ostéone. Ils vont s'enfermer dans cette matrice minérale appelée « ostéoplaste » et s'y transformer en ostéocytes (Buckwalter *et al.*, 1996).

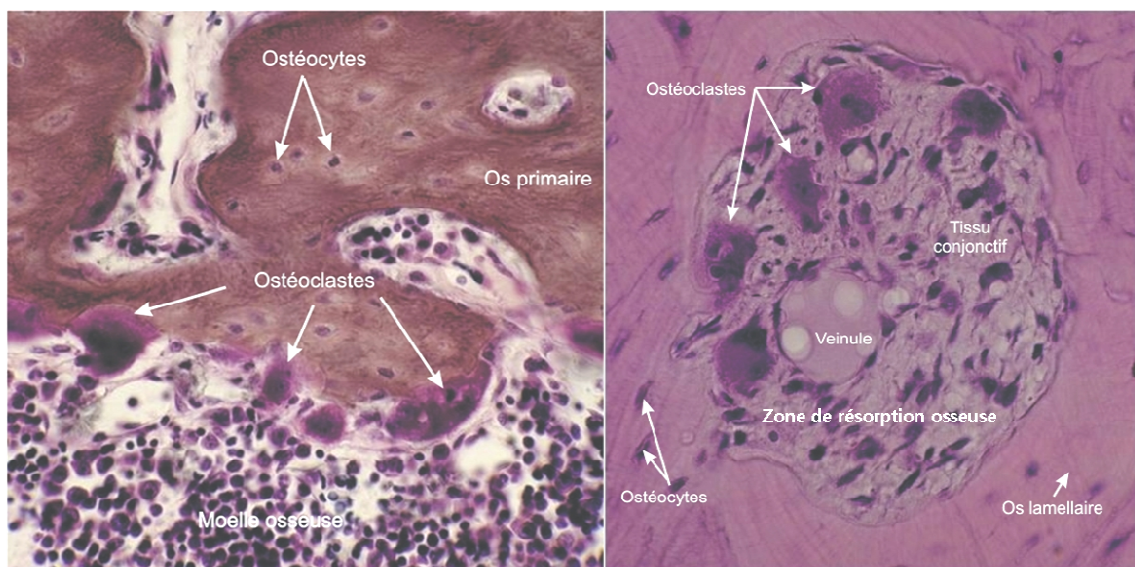
### **2.2.2. Les ostéocytes**

Les ostéocytes sont donc des ostéoblastes coincés dans des logettes de matrice minéralisée qu'ils ont eux-mêmes sécrété. Les ostéocytes sont incapables de se diviser et

subissent des modifications morphologiques. Ils vont former de fins prolongements cytoplasmiques, leur permettant des échanges de substances minérales entre le tissu osseux et la circulation sanguine via des jonctions communicantes Gap (Birmingham *et al.*, 2012). Ils assurent un rôle important dans l'homéostasie du tissu osseux en orchestrant le processus de remodelage (Florencio-Silva *et al.*, 2015).

### 2.2.3. Les ostéoclastes

Ce sont de très grandes cellules dites « géantes » de 50 à 100  $\mu\text{m}$  qui dérivent de la lignée monocyte-macrophage de la MO. Cette dernière peut se différencier en préostéoclastes qui vont fusionner et former des cellules polynucléées (de 30 à 50 noyaux), les ostéoclastes. Ces cellules sont principalement localisées à la surface du tissu osseux en résorption (Figure 43). Le contact qu'elles établissent avec la matrice osseuse, va former un microcompartiment au niveau des travées osseuses, appelées lacunes de « Howship ». Les ostéoclastes assurent la fonction destructrice dans le remodelage osseux, en induisant l'acidification et le relargage d'enzymes dans ces lacunes (Vernejoul & Marie, 1993).



**Figure 43 - Photographies de coupes histologiques d'os compact.** Les ostéocytes sont dans leurs ostéoplastes et les ostéoclastes apposés à l'os qu'ils dissolvent. La photographie de gauche représente des ostéoclastes s'attaquant à l'os en bordure de MO. Celle de droite représente une aire de résorption osseuse entourée d'os lamellaire, composée d'ostéoclastes, de tissu conjonctif et de petits vaisseaux. (Coloration Hematoxyline/Eosine (HE); grossissement: x 1200) (Source: [http://audilab.bmed.mcgill.ca/HA/html/bc\\_14\\_F.html](http://audilab.bmed.mcgill.ca/HA/html/bc_14_F.html))

Cette fonction, appelée résorption osseuse, a pour conséquence la dissolution des composantes organiques et minérales de l'os.

#### **2.2.4. Les cellules bordantes**

Comme leur nom l'indique, ces cellules tapissent la quasi-totalité de la surface osseuse du squelette adulte. Les cellules bordantes sont des cellules quiescentes, pauvres en organites, plutôt fines et allongées. Elles établissent des contacts cellules-cellules entre elles et les ostéocytes via des jonctions de communications (Buckwalter *et al.*, 1996). Bien que leur fonction soit encore peu connue, elles auraient un rôle dans l'entretien des ostéocytes et dans la protection sélective du tissu osseux en formant une barrière de progéniteurs potentiels.

### **2.3. La matrice osseuse**

La matrice extracellulaire du tissu osseux est constituée de substances minérales et organiques. La phase minérale représente 70% de la masse d'un os sec, elle est principalement constituée de cristaux d'hydroxyapatite (HA) issus de la nucléation d'ions phosphate et calcium. La libération du phosphate inorganique est permise par l'action de la phosphatase alcaline, enzyme hautement impliquée dans le processus de minéralisation. La partie minérale de l'os renferme aussi de l'eau, du bicarbonate, du magnésium, des citrates, du sodium, ainsi que d'autres ions. La phase organique, quant à elle, contient principalement des fibres de collagène, 90% de type I et 5% de type V. Elles vont former une structure orientée qui confère l'élasticité à la matrice osseuse mais aussi la forme et le volume d'un os. Le collagène de type I est par ailleurs connu pour son implication dans les processus de migration et de différenciation cellulaire. Des protéines non-collagéniques sont également présentes, telles que l'ostéocalcine, l'ostéopontine, l'ostéonectine, la sialoprotéine osseuse, ainsi que des protéoglycanes et des glycosaminoglycanes sulfatés (Vernejoul & Marie, 1993). L'ostéocalcine est sécrétée par les ostéoblastes et représente la plus abondante de ces protéines.

### **2.4. Le remodelage osseux**

Le cycle de renouvellement du tissu osseux est constitué de trois phases : 1/ l'initiation de la résorption par les ostéoclastes, 2/ la période de transition entre résorption et formation, et 3/ la formation osseuse par les ostéoblastes.

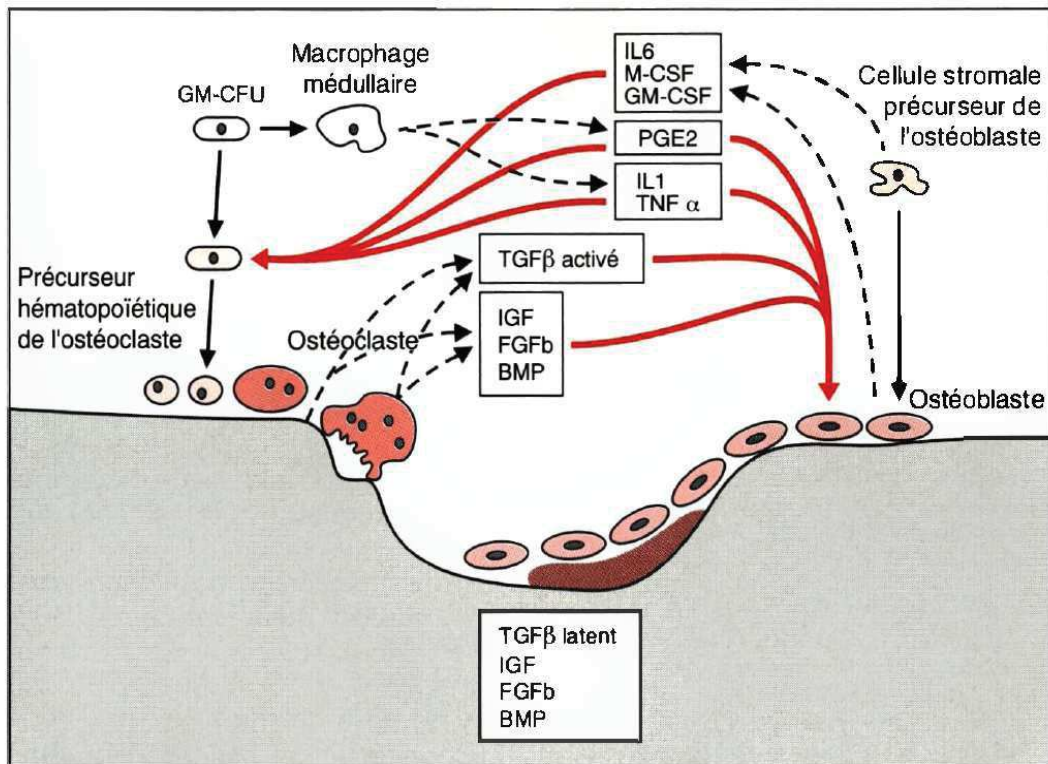
Le remodelage osseux est orchestré par les cellules de la lignée ostéoblastique (ostéoblastes et leurs précurseurs, ostéocytes et cellules bordantes) qui contrôlent la formation et la résorption des ostéoclastes (Figure 44). Les contraintes mécaniques appliquées au tissu osseux vont moduler sa densité et sa micro architecture par l'intermédiaire notamment des ostéocytes (Duncan & Turner, 1995). Ils vont agir comme des senseurs des variations de pression dans la matrice, et sécréter des signaux pour activer la résorption ou la formation osseuse. De la même manière, les cellules ostéoblastiques vont sécréter un nombre important de facteurs locaux de formation et de résorption osseuse. Ils sont soumis à un contrôle hormonal notamment *via* l'action de la parathormone (PTH), qui va avoir un effet stimulateur sur la production de TGF et d'insulin growth factor I et II (IGF)- $\beta$  (Vernejoul & Marie, 1993). Les BMPs (bone morphogenic proteins) sont des membres de la famille des TGF- $\beta$  qui sont sécrétés dans la matrice osseuse. Ces facteurs jouent un rôle fondamental dans l'organogénèse osseuse via l'activation de récepteurs sérine/thréonine kinases, ils vont agir sur le recrutement de nouveaux ostéoblastes (Rahman *et al.*, 2015). A l'inverse, les ostéoblastes sécrètent d'autres facteurs comme la cytokine pro-inflammatoire TNF- $\alpha$ , qui vont converger vers des voies impliquant RANKL (receptor activator of NF- $\kappa$ B ligand) et ainsi activer la résorption osseuse.

Une fois activé, l'ostéoclaste va adhérer à la matrice osseuse et la mettre à nue par acidification locale des cristaux d'HA, libérant ainsi du calcium et du phosphore. Après avoir formé leur lacune, les ostéoclastes meurent et sont éliminés par les macrophages. C'est la période de transition. Certains facteurs, dont les BMPs, sont libérés au cours de la résorption. Ils vont avoir pour effet de recruter des ostéoblastes, qui vont combler la lacune par sécrétion d'une MEC collagénique : c'est le début de la formation osseuse.

Cette étape est favorisée par l'OPG (ostéoprotégérine), un récepteur soluble de la superfamille du TNF produit par les ostéoblastes, qui joue un rôle dans l'inhibition locale de la formation des ostéoclastes.

La formation osseuse au cours de la croissance ou à la suite d'une fracture, nécessite l'intervention des CSM pour l'ostéoinduction. En effet, elles expriment à leur surface des récepteurs à intégrines  $\beta$ 1 dont des récepteurs au collagène, à la fibronectine et à la laminine qui peuvent lier la vitronectine et l'ostéopontine. L'ostéocalcine va jouer un rôle dans la formation osseuse en fixant le calcium tandis que l'ostéopontine et l'ostéonectine vont plutôt favoriser la résorption. Toutes les cellules osseuses vont jouer un rôle précis dans le remodelage de la matière minérale (Birmingham *et al.*, 2012).





**Figure 44 - Principales cytokines ou facteurs de croissance impliqués dans le remodelage osseux.** (Illustration issue de Vernejoul & Marie 1993) GM-CFU : granulocyte macrophage, colony forming unit ; GM-CSF, M-CSF : granulocyte, macrophage-colony stimulating factor, macrophage-colony stimulating factor; IL 1, IL6 : interleukine 1, interleukine 6 ; PGE2 : prostaglandine E2, TNF $\alpha$  : tumor necrosis factor a ; TGF $\beta$  : transforming growth factor b $\beta$  ; FGFb fibroblast growth factor, basic ; BMP : bone morphogenetic protein ; IGF: insulin like growth factor. (—►) : voies de différenciation ; (---►) : la production de cytokines ; ( —►\* ) : les cibles des cytokines.

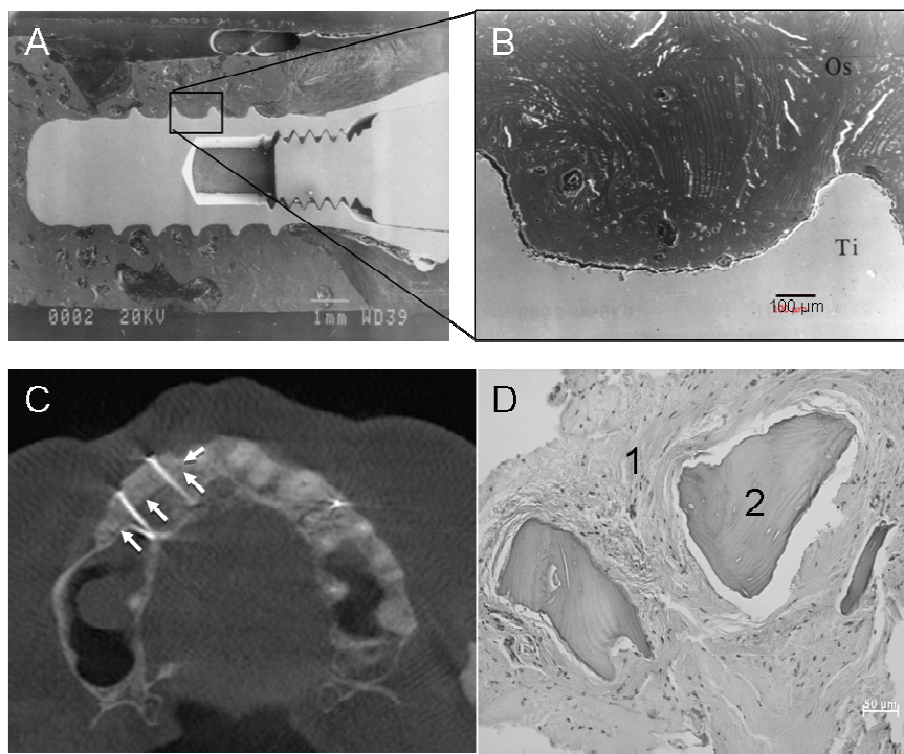
Le remodelage osseux est une machinerie bien orchestrée où règne un équilibre entre les éléments en faveur de la résorption osseuse et ceux qui la limitent. Sa durée est d'environ 3 mois chez l'homme adulte. Cependant dans certaines circonstances il peut se produire un déséquilibre en faveur de la résorption (Vernejoul & Marie, 1993).

## 2.5. Pertes osseuses en implantologie dentaire

### 2.5.1. Généralités

Dans certaines circonstances biologiques ou pathologiques, peuvent survenir des pertes de substances osseuses du maxillaire ou de la mandibule. Le vieillissement, certains traumatismes, des infections ou encore des causes congénitales comme des syndromes dysmorphiques, en sont les fondements étiologiques.

Ce type de pathologies peut expliquer la perte ou l'absence de l'organe dentaire et une perte plus ou moins importante du volume osseux. Dans ce contexte la réhabilitation orale des patients peut être réalisée par la mise en place d'implants dentaires. Ceci consiste à visser dans l'os de la mâchoire une vis en titane recouverte ou non d'un matériel biocompatible, qui va assurer le rôle des racines naturelles (Figure 45 A,B) (Boulic, 2015). Ces dernières sont fixées dans le tissu osseux par le processus d'ostéointégration (*i.e.*, liaison structurelle et fonctionnelle existant entre l'os vivant organisé et la surface de l'implant mis en charge (Albrektsson *et al.*, 2008). Pour avoir un pronostic à long terme favorable au moment de l'implantation, le volume osseux doit être suffisant, en épaisseur et en hauteur minimale, nécessaire à une implantation fiable, doit être de 5 mm. L'implant pourra ainsi être positionné selon un axe qui permet une réhabilitation prothétique esthétique et fonctionnelle.



Ti: vis en titane; Os: Ostéoformation autour de l'implant;  $\rightleftharpoons$  Zones de prélèvement (interface greffon/tissu sain) 1: Tissu fibreux; 2: Matériau greffé.

**Figure 45 - Exemples d'ostéointégration d'un implant dans un tissu sain et d'une greffe osseuse d'apposition.** Dans le cas 1 (A et B), l'examen en MEB est réalisé 1 an après implantation d'un implant en titane (Straumann®, surface TPS (titanium plasma-sprayed) dans de l'os natif. Il révèle une parfaite ostéointégration de l'implant dans le tissu receveur (documents fournis par le Dr. E. LEIZE-ZAL). Concernant le cas 2 (C et D), L'imagerie cone beam réalisée sur un patient 5 mois après une greffe d'apposition allogénique (BIOBank®) (C), révèle une intégration fonctionnelle et esthétique du greffon. Cependant, l'analyse histologique (D) montre la présence d'un tissu fibreux riche en cellules en 1, entourant des fragments correspondant au matériau greffé en 2. A ce stade il n'y a pas de néoformation osseuse donc pas d'intégration biologique (Coloration H&E). (Santucci *et al.*, 2015)

## 2.5.2. Greffes osseuses

Lorsque le volume osseux est insuffisant pour la mise en place d'un implant, il est nécessaire de recourir à des techniques de greffes osseuses afin de corriger le volume osseux disponible. A l'heure actuelle, différentes techniques sont possibles en fonction de l'importance et de la conformation du défaut osseux à traiter. Pour cela on aura recourt à des greffons sous forme de blocs ou de poudres, dont l'origine peut être variable (autologue, allogénique, xénogénique ou synthétique) (Exemples de greffes, figure 46) (Dumitrescu, 2011).

## 2.6. Greffons osseux

Un greffon osseux est un biomatériau pouvant être d'origine humaine (autologue ou allogénique), animale, végétale ou synthétique. Il est destiné à reconstituer le volume osseux défectueux après implantation chez l'homme. Ils peuvent être utilisés seuls ou en association avec des molécules bioactives comme les BMPs et les TGF- $\beta$  (Nazirkar *et al.*, 2014).

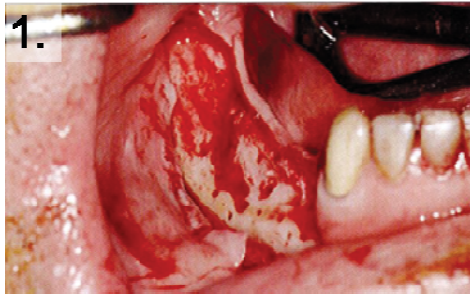
### 2.6.1. Qualités requises

Le greffon osseux idéal doit permettre un renfort de la structure ou remplacer une perte de matière osseuse. Pour qu'il y ait intégration du substitut, il faut répondre à trois éléments essentiels : l'Ostéoconduction, l'Ostéoinduction et l'Ostéogénèse. Il faut une marge minimum de 1 mm de tissu osseux autour de l'implant. Le diamètre implantaire variant en moyenne de 3 à 6 mm, l'épaisseur de la crête osseuse résiduelle

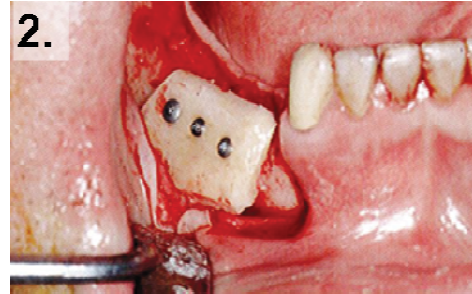
L'ostéoconduction est la capacité du biomatériau à supporter la néoformation osseuse. Pour cela il faut une porosité idéale ( $> 300 \mu\text{m}$ ) avec des pores interconnectés, permettant la colonisation cellulaire et le développement de l'angiogenèse (Chouteau *et al.*, 2003). Cela nécessite l'envahissement du greffon par des cellules ostéoprogénitrices telles que les CSM présentes autour du greffon. Tous les biomatériaux d'ostéo-ingénierie sont ostéoconducteurs (Giannoudis *et al.*, 2005).

L'ostéoinduction correspond à l'infiltration et à la prolifération de cellules ostéo-compétentes dans la matrice inerte. Elles vont par la suite pouvoir s'y différencier en ostéoblastes. Le recrutement a lieu sous l'influence de biomolécules associées au support (Nazirkar *et al.*, 2014). Pour terminer, pour que la greffe soit une réussite il faut que les

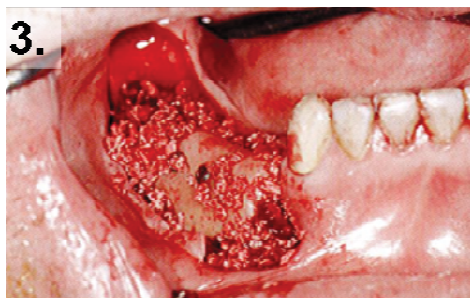
cellules ayant survécu à la transplantation aient conservé leur ostéogénicité, en d'autres termes elles doivent être en mesure de former un tissu ostéoïde qui par la suite permettra le remplacement total du greffon par remodelage progressif.



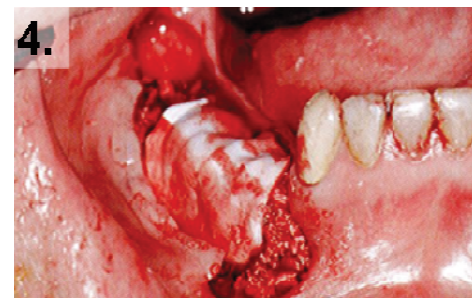
**1.** Patient présentant un défaut osseux dans la mandibule postérieure



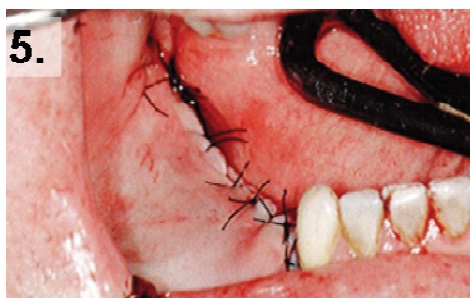
**2.** Greffe d'apposition d'un bloc osseux autologue pour compenser la composante verticale du défaut. La fixation est réalisée à l'aide de trois vis en titane de positionnement.



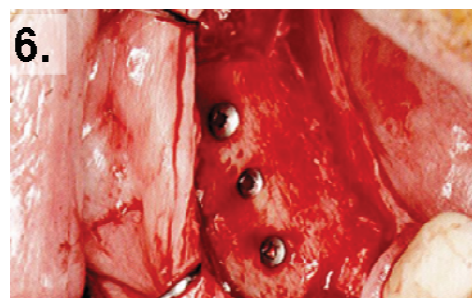
**3.** Afin de lisser le contour, le vide autour et derrière le bloc est comblé à l'aide d'un greffon particulaire mixte, composé de 75% de matrice osseuse déminéralisée (DBM) et de 25% de copeaux d'os autologue.



**4.** Une membrane barrière en collagène résorbable est déposée sur le greffon pour le maintenir et empêcher la résorption de surface.



**5.** Fermeture de la plaie avec des points discontinus



**6.** Au bout de 4 mois, le bloc osseux et les particules sont incorporés dans l'os neuf. Les vis pourront être retirées et les implants mis en place. Pendant 3 à 4 mois le bloc continuera de s'intégrer et de se remodeler.

**Figure 46 - Augmentation osseuse d'une crête mandibulaire.** Greffe d'apposition d'un bloc osseux autologue et d'un mixte particulaire de comblement. (d'après Cordaro & Terheyden 2014)

Il doit être en partie ou dans sa totalité biodégradable selon un processus lent et non toxique. L'interaction finale du greffon avec l'os receveur est appelée ostéointégration. Le tableau 13 représente ces trois propriétés au sein des différents matériaux d'ostéo-reconstruction.

**Tableau 13 - Propriétés des différents biomatériaux utilisés en reconstruction osseuse.** (Petite, 2002)

| Type de greffon                | Ostéoconduction | Ostéoinduction | Ostéogénicité |
|--------------------------------|-----------------|----------------|---------------|
| Autogreffe                     | +               | +              | +             |
| Substitut allogénique          | +               | -              | -             |
| Substituts osseux              | +               | -              | -             |
| Matériau + BMP                 | +               | +              | -             |
| Matériau + cellules ostéogènes | +               | -              | +             |

## 2.6.2. Origine du greffon

### 2.6.2.1. Origine autologue

L'autogreffe consiste à prélever le greffon sur un site donneur du patient. Le plus souvent il s'agit de prélèvements crâniens (pariétal), au niveau de la symphyse mentonnière, dans la zone rétromolaire ou dans l'os iliaque. Cette greffe est réalisée en fonction de l'âge du patient et de la qualité du site receveur, sous forme de bloc ou de copeaux. Elle constitue le « *gold standard* » des greffes osseuses car le greffon est à la fois ostéoconducteur, ostéoinducteur et ostéogénique (Giannoudis *et al.*, 2005). Cependant une morbidité cellulaire importante est observée après transplantation et des complications post-prélèvement ne sont pas rares (Dimitriou *et al.*, 2011). Les patients atteints de tumeurs malignes sont exclus de cette pratique.

### 2.6.2.2. Origine allogénique

La recherche de produits de substitution permettant d'éviter la morbidité du prélèvement d'os autogène et ses limitations, a conduit à l'utilisation des allogreffes. Ces produits sont obtenus à partir d'os d'un individu sain vivant ou d'un cadavre prélevé dans les

48 heures suivant le décès. A l'égal des greffes autologues, elles sont intrinsèquement ostéoinductrices (Giannoudis *et al.*, 2005).

Il s'agit de la greffe la plus répandue en chirurgie dentaire. Le greffon osseux est issu d'un donneur de la même espèce mais génétiquement différent. Ce type de greffe fait appel à des banques de tissus sous le contrôle strict de l'agence de biomédecine et l'agence nationale de sécurité du médicament (ANSM).

La performance de ces produits dépend fortement du donneur et de la procédure de préparation, qui varie d'un laboratoire à un autre. L'allogreffe peut être préparée à partir d'os cortical ou spongieux, frais, congelé ou lyophilisé. Il est rare dans la pratique de réaliser des allogreffes fraîches dû aux risques importants de réactions immunitaires ou de transmission de maladies (Giannoudis *et al.*, 2005). Pour les autres greffons, des traitements stérilisateurs physiques (congélation/chauffage, irradiation gamma) et chimiques (dénaturation des protéines et délipidation) devront être appliqués. Ils présentent des capacités ostéoinductives diminuées en comparaison avec l'allogreffe fraîche.

En France les substituts allogéniques sur le marché sont distribués par BIOBank®, TBF et Zimmer. Ils utilisent respectivement les procédés de traitements Supercrit®, Phoenix® et Puros®. Tous subissent un traitement au peroxyde d'hydrogène qui altère la structure collagénique en surface et d'autres étapes qui vont rigidifier le greffon. En chirurgie dentaire, les greffons peuvent être constitués d'os lyophilisé et non déminéralisé appelé FDBA pour *Freeze-dried Bone Allograft*, ou lyophilisé et déminéralisé (*Decalcified Freeze Dried Bone Allograft* ou DFDBA) (Piattelli *et al.*, 1996; Dumitrescu, 2011). Ces derniers sont utilisés sous forme de pâte ou de gel alors que les FDBA sont solides sous forme de poudre ou de bloc.

### 2.6.2.3. Origine xénogénique

L'utilisation d'os provenant d'une autre espèce (bovidés ou porcins) a été développée comme solution de remplacement pour les allogreffes. Le greffon n'est bien sûr utilisé qu'après traitements stérilisateurs et viro-inactivant, afin d'éviter tous risques de transmission de pathogènes (prions, virus). On peut également trouver des biomatériaux à base d'exosquelette de corail. En effet, ce dernier possède une structure et une composition proche de l'os, riche en carbonate de calcium et transformable en coralline hydroxyapatite, facilitant sa biocompatibilité et sa résorption (Petite, 2002).

Les biomatériaux allogéniques et xénogéniques les plus utilisés, sont les matrices osseuses déminéralisées (DBM, *demineralised bone matrix*) et les substituts collagéniques.

Les DBM sont obtenus par décalcification de l'os cortical. Il s'agit d'une structure collagénique présentant des propriétés ostéoconduites mais une faible rigidité. Ils ne sont pas utilisés comme substituts osseux mais comme des renforts de greffes et peuvent être associés à des composés ostéo-inducteurs, comme la BMP2 recombinante. Le collagène est aussi largement utilisé en tant que composite associé à d'autres substituts (Chen *et al.*, 2007).

### 2.6.3. Origine synthétique

Les stratégies actuelles s'efforcent de sélectionner et/ou de créer le biomatériau idéal présentant des taux de dégradation et de résorption permettant à la fois un maintien du support *in vitro* et une stabilité *in vivo*, pour assurer le rôle structural du tissu receveur. Ce biomatériau se dégraderait en adéquation avec le remodelage osseux jusqu'à totalement s'intégrer dans le tissu receveur.

Les céramiques constituent la catégorie des biomatériaux synthétiques les plus courants. Elles peuvent être biologiquement inertes, bioactives, et résorbables. Les céramiques bioactives, telles que les HA et les phosphates de calcium, présentent de bonnes propriétés d'ostéoconduction. Les HA sont solides mais non-résorbables, cependant ils possèdent des propriétés bioactives qui constituent la base du développement des biomatériaux synthétiques. Lors de leur dégradation au cours de la résorption osseuse, ils vont tamponner le pH et ainsi éviter une acidification cytotoxique. A l'inverse, le phosphate beta tricalcique ( $\beta$ -TCP) est relativement fragile mais est davantage résorbable. Il favorise donc l'intégration du greffon (Arthur *et al.*, 2009). On les décrit par leur rapport molaire Calcium/Phosphate (Tableau 14).

**Tableau 14 - Les principales biocéramiques à base de phosphate de calcium.** (Dorozhkin, 2010)

| Composé                                   | Symbole | Formule chimique  | Ca/P |
|---|---------|---|------|
| Phosphate monocalcique anhydre            | MCPA    | $\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2$                        | 0,50 |
| Phosphate dicalcique dihydraté            | DCPD    | $\text{CaHPO}_4, 2\text{H}_2\text{O}$                       | 1,00 |
| Phosphate dicalcique anhydre              | DCPA    | $\text{CaHPO}_4$  | 1,00 |
| Phosphate octocalcique                    | OCP     | $\text{Ca}_8\text{H}_2(\text{PO}_4)_6, 5\text{H}_2\text{O}$ | 1,33 |
| Phosphate tricalcique $\alpha$ et $\beta$ | TCP     | $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$                                | 1,50 |
| Hydroxyapatite                            | HA      | $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$                | 1,67 |
| Phosphate tétracalcique monoxyde          | TCMP    | $\text{Ca}_4\text{O}(\text{PO}_4)_2$                        | 2,00 |

Les HA peuvent être combinés avec des polyesters comme l'acide polylactidoglycolique (PGA) et former des polymères biodégradables ou encore avec le  $\beta$ -TCP, formant ainsi un matériau composite particulaire biphasé (BCP) qui va cumuler la stabilité de l'un et la résorption de l'autre (Gamblin *et al.*, 2014).

Parmi les polyesters les plus connus il y a le poly( $\epsilon$ -caprolactone), le polyacide glycolique (PGA), le polyacide lactique-co-glycolique (PLGA) et le polyacide lactique (PLA). Ils sont principalement utilisés pour la réparation de petits défauts osseux et donnent de meilleurs résultats lorsqu'ils sont associés à une phase organique minérale. Les matériaux à base de carbone comme le graphène et ses dérivés ont eux aussi suscité l'intérêt dans le domaine des comblements osseux. Ils supporteraient la prolifération et la différenciation cellulaire, notamment vers la voie ostéogénique (Dubey *et al.*, 2015). Il existe d'autres matériaux synthétiques dont les verres bioactifs, lesquels sont composés principalement d'oxydes de silicium ( $\text{SiO}_2$ ), de sodium ( $\text{Na}_2\text{O}$ ), de calcium ( $\text{CaO}$ ) et de phosphore ( $\text{P}_2\text{O}_5$ ). Après immersion dans un milieu physiologique ils présentent la particularité de développer à leur surface une couche d'hydroxyapatite carbonatée qui va permettre à l'implant de s'accrocher de manière stable à l'os receveur (Giannoudis *et al.*, 2005).

Les divers avantages accordés aux matériaux à base de phosphate de calcium ( $\beta$ -TCP) ont conduit certaines équipes à les associer à des hydrogels pour les rendre injectable. Ces substituts sont hautement biocompatibles et largement envisagés pour les reconstructions osseuses (Vinatier *et al.*, 2009). Dans ce domaine, ils ne servent pas uniquement de matrices et sont utilisés comme supports capables de mimer la topographie extracellulaire et aussi comme réservoirs pour délivrer des agents bioactifs, afin favoriser la réparation tissulaire, comme c'est le cas avec la BMP-2 (Tan *et al.*, 2014). Ils peuvent être produits à partir de polymères naturels, tels que la gélatine, les polysaccharides et le collagène, ou de polymères synthétiques comme le PEG ou le polyvinyle d'alcool. Un hydrogel à base d'hydroxypropyl méthylcellulose silanisée (Si-HPMC) a été développé par une équipe nantaise (Vinatier *et al.*, 2005). Ses propriétés mécaniques et biologiques peuvent être ajustées par mesures rhéologiques en modulant la quantité d'eau, le pH, les oscillations et la quantité de groupements silanols.



## 2.7. Réparation tissulaire

Seuls les greffons autologues présentent une ostéogénicité naturelle, c'est pour cette raison que l'ingénierie tissulaire s'applique à apporter un caractère ostéogénique aux greffons inertes, par enrichissement avec des cellules souches ostéoprogénitrices (Chai *et al.*, 2012). Il a en effet été démontré que la reconstruction osseuse, notamment pour la mise en place d'implants dentaires, nécessitait l'intervention de plusieurs acteurs clés : l'inflammation, l'angiogenèse, l'ostéogénèse, et les cellules progénitrices de la moelle osseuse (Fuerst *et al.*, 2003; Xu *et al.*, 2009; Vandamme *et al.*, 2011). Il est important de promouvoir une liaison stable à l'interface implant/tissu receveur, en favorisant le recrutement cellulaire, l'angiogenèse et la formation osseuse (Xu *et al.*, 2009). Ces impératifs vont constituer les principaux enjeux de l'ingénierie tissulaire.

### 2.7.1. Cellules candidates

Au cours de la reconstruction osseuse *in vivo*, de nombreux types cellulaires sont recrutés, pour leur rôle direct dans l'ostéoformation ou indirect, en agissant sur les réponses inflammatoire et vasculaire. Les CSM de moelle osseuse paraissent d'emblée être prédestinées à une utilisation en reconstruction osseuse car ce sont des précurseurs de cellules ostéoprogénitrices fortement impliquées dans le maintien de la MO et dans le remodelage osseux (Pittenger *et al.*, 1999). De plus, elles possèdent des capacités immunorégulatrices et régénératrices permettant d'envisager leur utilisation en ingénierie tissulaire de l'os. Aussi bien *in vitro* que *in vivo*, elles constituent le potentiel « ostéogénique » du greffon. Des méthodes sont actuellement disponibles pour les cultiver en accord avec les bonnes pratiques de fabrication (*Good manufacturing practices*, GMP) pour leur utilisation clinique (Sensebé *et al.*, 2013). Ces cellules sont facilement différenciables en ostéoblastes par ajout de facteurs tels que le dexaméthasone ou des BMPs dans le milieu de culture. Les CSM possèdent naturellement une activité phosphatase alcaline (PAL) intrinsèque, nécessaire à la différenciation ostéoblastique. Elle peut être utilisée comme marqueur du cycle de différenciation et est fortement exprimée au cours de l'ostéoblastogenèse aux alentours du 7ème jour de culture en milieu de différenciation (Shima *et al.*, 2015).

### 2.7.2. Reconstructions osseuses avec des CSM

Certaines études s'accordent sur l'utilisation du lysat plaquettaire humain (LP) pour la reconstruction osseuse. Le « coating » des biomatériaux avec du LP améliorerait la migration cellulaire, la reconstruction osseuse et l'ostéointégration des implants dentaires (Fuerst *et al.*, 2003; Leotot *et al.*, 2013). De plus, des cultures de CSM sur des biomatériaux enrobés d'une colle obtenue par cryoprécipitation de plaquettes, ont aussi montré une amélioration de l'ostéoformation dans le modèle murin (Trouillas *et al.*, 2013). Il a par ailleurs été démontré que le facteur de transcription Osterix (Osx), était fortement impliqué dans les processus de régénération osseuse. Il jouerait un rôle dans la réparation tissulaire associée aux CSM. De plus, sa présence au niveau des sites implantaire favoriserait le recrutement des CSM au niveau de l'interface implant/tissu receveur (Xu *et al.*, 2009).

Les CSM peuvent être génétiquement modifiées pour exprimer des facteurs de croissance ou de transcription comme BMP-2, BMP4, EGF-1, IL-3 et RUNX2 (Satija *et al.*, 2009; Meyerrose *et al.*, 2010). Ces pratiques se sont avérées efficaces pour promouvoir la formation osseuse et ont montré de bons résultats. Dans le même principe, l'association de facteurs de croissance aux biomatériaux a montré une augmentation de la formation osseuse et de la vascularisation du greffon. Des approches de ce genre ont été menées avec des céramiques d'HA associées à du FGF-2 (fibroblast growth factor-2) (Tsurushima *et al.*, 2010), ou encore en incorporant du dexaméthasone et un peptide dérivé de BMP-2 dans des nanoparticules de silice (Zhou *et al.*, 2015). La technique de co-culture constitue une autre stratégie possible, permettant d'éviter l'application de facteurs de différenciations spécifiques. En effet, l'induction de la différenciation ostéogénique des CSM par co-culture avec des ostéoblastes différenciés a été démontrée. Selon les équipes, le mécanisme impliquerait une communication paracrine (Birmingham *et al.*, 2012; Glueck *et al.*, 2015), ou nécessiterait un contact cellulaire (Csaki *et al.*, 2009). L'utilisation de céramiques de phosphate de calcium est limitée à la réparation de petits défauts osseux, leur association avec des CSM permet d'envisager l'élargissement de leur utilisation. En effet, une récente étude a montré qu'après transplantation de céramiques cellularisées chez la souris, il y avait mobilisation des monocytes au sein du greffon en faveur du remodelage osseux. Cependant les cellules présentes dans le greffon provenaient du receveur (Gamblin *et al.*, 2014). Par ailleurs, d'autres études ont été réalisées à partir de biomatériaux BCP, associés avec de la MO totale ou avec de la fraction vasculaire stromale (FVS) de tissu adipeux pour la régénération

osseuses de zones irradiées. D'après les résultats obtenus par ces deux études, la MO semble plus adaptée pour promouvoir une néoformation osseuse que la FVS de tissu graisseux, probablement en raison d'un microenvironnement non approprié de ce dernier (Malard *et al.*, 2005; They *et al.*, 2015).

### **2.7.3. La culture dynamique de CSM pour la reconstruction osseuse**

Dans les cultures 3D non agitées, l'oxygène ne parvient pas à diffuser vers le cœur du substitut. Les cellules vont se retrouver en anaérobiose ( $< 1\%O_2$ ), l'accumulation d'acide lactique va conduire à terme à une acidification du milieu et à une forte mortalité cellulaire (Volkmer *et al.*, 2012). Pour pallier aux effets indésirables de la culture statique, de nombreuses équipes se sont penchées sur l'apport bénéfique de la culture en perfusion de CSM pour la régénération osseuse. Ces différentes études en sont arrivées au même constat. La culture dynamique améliorerait significativement l'adhérence et la prolifération cellulaire, notamment sur des supports biologiques tels que l'os anhydre ou la DBM (Gonçalves *et al.*, 2012; Luo *et al.*, 2013). La déposition de MEC se ferait proportionnellement à la vitesse du flux. En effet, Bancroft et son équipe ont réalisé des essais de culture en perfusion à différentes vitesses de flux sur un maillage en fibres de titane. Ils ont observé une augmentation de la sécrétion de matrice calcifiée en support perfusé, proportionnelle au flux appliqué, ainsi qu'une meilleure répartition cellulaire (Bancroft *et al.*, 2002). L'élasticité de la MEC en présence de stimulations mécaniques influencerait la différenciation des CSM vers la voie ostéoblastique et augmenterait la sécrétion de MEC (Sikavitsas *et al.*, 2005). Néanmoins il est nécessaire de réaliser un temps de culture *in vitro* favorable à la formation osseuse *in vivo*.

Ce type d'étude a été réalisé sur des lésions au niveau de la calvaria de rats avec des substituts en fibres de titane cellularisés avec des CSM pendant 1, 4 et 8 jours en perfusion. L'analyse histologique réalisée 30 jours après l'implantation, a révélé qu'1 jour de culture en perfusion permettait d'obtenir le meilleur pourcentage de néoformation osseuse (Sikavitsas *et al.*, 2005). Une cellularisation de courte durée en préimplantatoire, serait alors suffisante en reconstruction osseuse. Cependant, s'agissant d'une étude réalisée dans le modèle murin, il est difficile de transposer ces résultats à l'homme, le petit animal étant doté d'une régénération spontanée (Gomes & Fernandes, 2011).

La culture dynamique présenterait aussi l'avantage de favoriser la différenciation ostéoblastique en absence de dexaméthasone. De plus, la porosité du support agirait sur le

stade de différenciation ostéoblastique (Holtorf *et al.*, 2005). Des études similaires à celles précédemment citées ont été réalisées sur support résorbables, comme les polymères de poly( $\epsilon$ -caprolactone), et ont démontré une efficacité identique à celle du support en titane (Pham *et al.*, 2006). Une approche de perfusion pour la vascularisation d'un substitut en présence de CSM, a récemment été publiée par Kuo et son équipe. Cette étude consistait à cultiver des cellules endothéliales humaines de sang de cordon avec des CSM de MO, dans un hydrogel allogénique injectable à base de collagène-hydroxyle phénolique. Après greffe chez la souris ils ont observé des résultats optimaux en présence des deux types cellulaires, avec une augmentation de l'anastomose (*i.e.*, connexion entre deux structures *via* des vaisseaux sanguins) et une différenciation sur la durée des CSM en ostéoblastes (Kuo *et al.*, 2015).

En conclusion, la culture en perfusion présente de nombreux avantages pour l'ingénierie tissulaire du tissu osseux. Non seulement le flux appliqué permet un apport en nutriments et en oxygène continu mais il évite aussi l'accumulation des déchets cellulaires. Les divers études ont démontré un impact non négligeable de la structure des pores (forme, interconnexion, taille, et porosité) sur la croissance du tissu osseux après implantation *in vivo* (Kasper *et al.*, 2008).

#### **2.7.4. Rôle de l'oxygène**

Les pressions partielles en oxygène de l'organisme sont très variables d'un tissu à un autre. Les plus faibles  $pO_2$  sont retrouvées dans le cartilage (1-8%) et dans la moelle osseuse (1%-6,5%) ainsi qu'au niveau des lésions tissulaires (< 1%) (Obradovic *et al.*, 1999; D'Ippolito *et al.*, 2006).

Au cours de l'implantation du greffon il est donc important de développer des stratégies pour éviter une diminution trop brusque de l'oxygène dissous dans le microenvironnement cellulaire afin de ne pas entraîner une mort massive. L'oxygène n'est cependant pas le seul facteurs impliqué dans la viabilité cellulaire *in vivo*, l'apport en nutriment, comme le glucose, est tout aussi important. C'est en effet ce qu'ont démontré Deschepper et son équipe en évaluant l'impact de différentes concentrations en glucose en condition proche de l'anoxie, sur la viabilité et les propriétés pro-angiogéniques des CSM. Ils ont ainsi mis en évidence le rôle essentiel du glucose dans le maintien de la viabilité et des fonctions cellulaires (Deschepper *et al.*, 2013).

La vascularisation du tissu osseux est dépendante de sa densité, ce n'est pas l'os mais le tissu conjonctif vasculaire qui va apporter les nutriments et l'oxygène aux cellules osseuses. Lorsque l'approvisionnement sanguin est interrompu, il apparaît rapidement une mort cellulaire puis une nécrose osseuse. Les ostéocytes, ostéoblastes et ostéoclastes ne survivent pas plus de deux jours, alors que les CSH meurent dans les 24h. A l'inverse, un os suffisamment alimenté en oxygène permettra la mise en place de nouveaux capillaires et la migration des cellules souches du tissu voisin vers le greffon, afin qu'elles puissent le recoloniser avec de nouveaux ostéoblastes et fibroblastes. C'est le phénomène attendu après greffe de substituts cellularisés.

Une faible tension en O<sub>2</sub> est connue pour agir comme un stimulateur direct de l'ostéoclastogénèse et va par ailleurs affecter les ostéoblastes en diminuant leur prolifération et leur différenciation cellulaire. En effet, une diminution de l'expression du facteur de transcription ostéoblastique Runx2, du collagène I et de la PAL a été mise en évidence en conditions hypoxiques (Arnett, 2010). Au sein de la MO, les progéniteurs ostéoblastiques peuvent évoluer sous de faibles concentrations en O<sub>2</sub>. Pour les CSM, les conditions hypoxiques (1-12%O<sub>2</sub>) sont favorables à leur prolifération et au maintien de leurs caractéristiques (Grayson *et al.*, 2006). A l'opposé de l'impact de l'hypoxie, l'hyperoxie tissulaire (normoxie de culture  $\approx$  21%O<sub>2</sub>) favoriserait l'expression des marqueurs ostéoblastiques des CSM (D'Ippolito *et al.*, 2006). Cependant des résultats inverses ont été obtenus pour les ostéoblastes de rat (Utting *et al.*, 2006). Les effets de l'oxygène dans la culture cellulaire sont très controversés puisque selon le modèle cellulaire, le modèle animal et le substrat, les résultats sont variables d'une étude à une autre (Ejtehadifar *et al.*, 2015). Au cours de la différenciation cellulaire, les cellules augmentent leur consommation en oxygène dû à un métabolisme énergétique très actif. Ce processus est progressif de l'étape de prolifération jusqu'à la morphogénèse, puis une diminution métabolique est observée au cours de la minéralisation (Komarova *et al.*, 2000). C'est pour cela que de faibles pressions en O<sub>2</sub> sont défavorables à la synthèse de MEC, avec notamment une production de collagène I moins bien organisée et moins abondante (Utting *et al.*, 2006).

Enfin, pour obtenir un biomatériau avec un fort caractère ostéogénique, il faut aussi se placer en conditions favorisant sa vascularisation *in vivo*. L'hypoxie favoriserait l'expression du VEGF par les ostéoblastes. Ce facteur de croissance, contenu abondamment dans le hLP et sécrété par les CSM elles-mêmes, est un puissant chémoattractant, acteur principal de l'angiogénèse (Beckermann *et al.*, 2008).

---

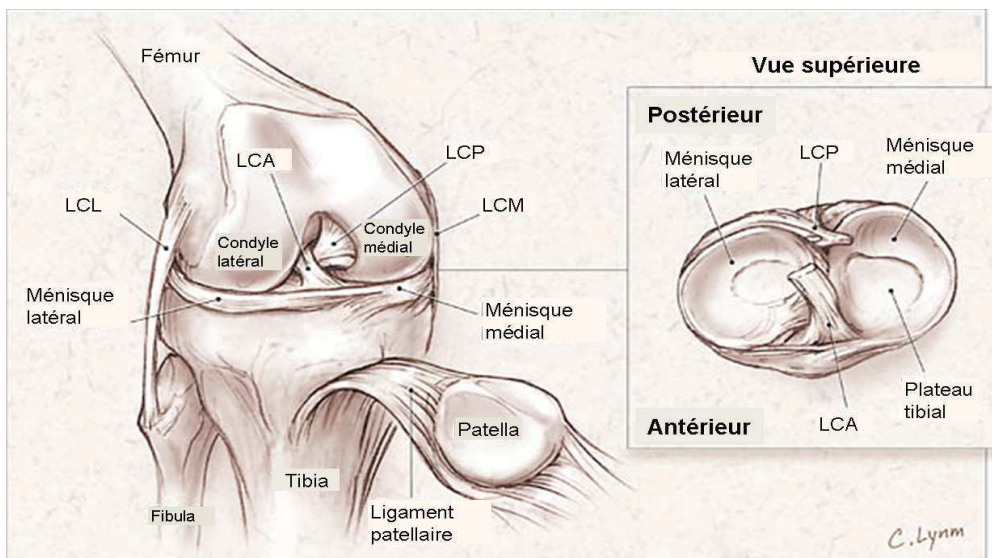
## 3. L'ingénierie tissulaire du tissu méniscal

---

### 3.1. Le ménisque du genou : généralités

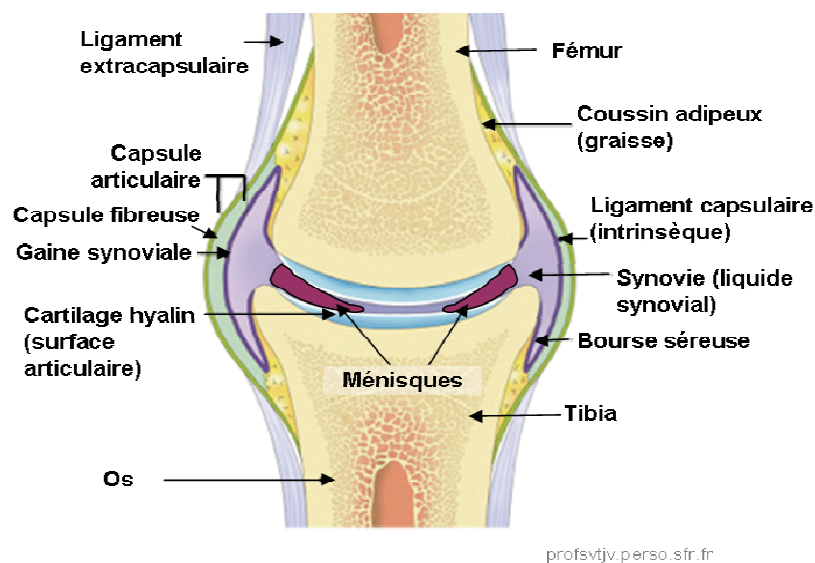
#### 3.1.1. Anatomie du genou

Le genou comporte trois articulations (zone de contact entre deux os), une première entre la patella et le fémur, une seconde entre le condyle latéral du fémur et le plateau tibial, et une dernière entre le condyle médial du fémur et le plateau tibial. La taille et la forme des condyles fémoraux correspondent à celles du plateau tibial, apportant ainsi une stabilité au cours de la marche (Blackburn & Craig, 1980). L'articulation du genou tient sa force des ligaments et des muscles qui l'entourent. On dénombre quatre principaux ligaments : le ligament croisé antérieur (LCA), le ligament croisé postérieur (LCP), le ligament collatéral médial (LCM) et le ligament collatéral latéral (LCL) (Figure 47). Ils sont essentiels au maintien de l'articulation ainsi que dans l'orientation et la limitation du mouvement. Le LCA va prévenir la translation antérieure et l'hyperextension tandis que le LCP va limiter la translation postérieure lors de la flexion (Blackburn & Craig, 1980). Les ligaments croisés sont de ce fait, importants pour stabiliser l'articulation du genou.



**Figure 47 – Articulation du genou en position fléchie montrant les ménisques externe et interne entre le plateau tibial et la tête fémorale (d'après jama.jamanetwork.com).** LCL : Ligament croisé latéral ; LCA : Ligament croisé antérieur ; LCP : Ligament croisé postérieur ; LCM : Ligament croisé médial.

L'articulation du genou est une articulation synoviale (Figure 48). Elle possède donc une capsule articulaire qui va permettre de stabiliser l'articulation avec l'aide des muscles environnants. Elle est composée d'une capsule fibreuse et ligamenteuse, qui est recouverte d'une sorte de muqueuse, appelée membrane synoviale. Cette dernière tapisse les surfaces de la cavité articulaire qui ne sont pas recouvertes de cartilage et sécrète un liquide visqueux et incolore, la synovie. En association avec le cartilage hyalin des surfaces articulaires, elle va avoir un rôle dans la lubrification et dans la protection des surfaces osseuses de l'articulation. Ce cartilage articulaire agit en réduisant la friction au cours de la marche, mais aussi en absorbant et en distribuant les charges mécaniques.



**Figure 48 - Représentation schématique de la capsule articulaire du genou.**

Entre le fémur et le tibia, au niveau des compartiments médial et latéral, sont situés deux disques de fibrocartilage, un interne (médial) et un externe (latéral). Ce sont les ménisques du genou (Figure 48). Leur rôle est en partie similaire à celui du cartilage hyalin concernant l'absorption des charges mécaniques, leurs actions combinées vont assurer la fluidité du mouvement articulaire au cours des déplacements.

### 3.1.2. Fonctions des ménisques

Les ménisques possèdent une structure semi-lunaire, ce qui justifie l'origine grecque du mot ménisque, *mêniskos*, qui signifie croissant. Ils possèdent une forme leur permettant de recouvrir 70% de la surface de contact entre le fémur et le tibia et ainsi d'assurer un rôle de cale. Ils arborent chacun un rôle anatomique particulier. Le ménisque interne a la forme

d'un C et joue un double rôle, celui d'amortisseur entre le fémur et le tibia, et de stabilisateur dans la rotation externe du tibia en flexion. Le ménisque externe est le plus stable, il a la forme d'un O, épousant le plateau tibial et le condyle externe du fémur, tous deux convexe. Ils sont attachés l'un à l'autre ainsi qu'aux ligaments croisés du genou par l'intermédiaire de leurs cornes ou racines.

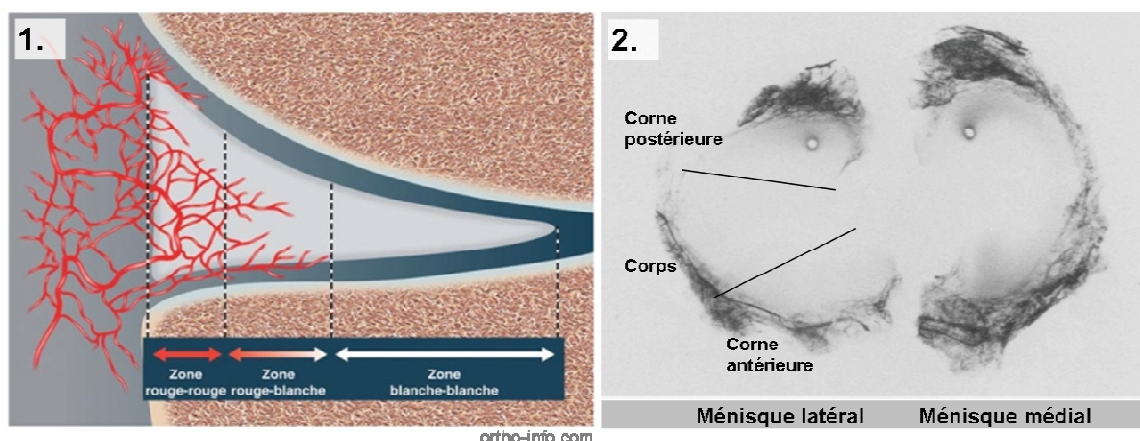
Ils ont un rôle chondro-protecteur (protection du cartilage), mais également stabilisateur passif du genou, notamment en cas de rupture du LCA (Makris *et al.*, 2011). Ils vont donc assurer l'amortissement des chocs, ainsi qu'un fonctionnement durable de l'articulation en redistribuant les charges du fémur vers le plateau tibial (Fairbank, 1948).

### 3.1.3. Composition et ultrastructure

Le ménisque du genou est un tissu fibrocartilagineux de faible cellularité, possédant une structure avasculaire à l'exception de sa périphérie. An niveau tissulaire, il est constitué de deux types de tissus, l'un fibreux et l'autre cartilagineux : le tissu fibreux, situé à l'extérieur, est excessivement flexible et dense alors que le tissu cartilagineux, dans la zone intérieure, est ferme mais élastique.

#### 3.1.3.1. Vascularisation

La vascularisation du ménisque est répartie en trois zones (Figure 49). Les vaisseaux sanguins pénètrent uniquement dans la partie extérieure qui constitue 10 à 25% du tissu, cette zone est appelée rouge-rouge (Day *et al.*, 1985).



**Figure 49 – Microvascularisation méniscale.** (1.) Délimitation des 3 zones du ménisque en fonction de vascularisation. (2.) Analyse histologique de deux ménisques après diaphanéisation (étape qui consiste à rendre transparent un tissu pour obtenir un contraste avec l'arborescence vasculaire colorée à l'encre de chine). (Day *et al.*, 1985).



Par analogie la zone intérieure est appelée blanche-blanche en raison de son absence totale de vascularisation. Et entre les deux, la partie centrale est appelée rouge-blanche car elle est partiellement vascularisée. Les vaisseaux de la zone rouge-rouge sont principalement localisés au niveau des extrémités méniscales, communément appelées cornes méniscales (Figure 49 (2.)). De la même manière, ces cornes sont fortement innervées au niveau des sites d'attachement aux ligaments. Les neurorécepteurs qu'elles contiennent vont avoir des fonctions proprioceptives (perception du corps et des mouvements) et mécanoréceptives (perception du toucher et de l'étirement) (Rijk, 2004).

### 3.1.3.2. Composition matricielle

Le tissu méniscal est constitué à 72% d'eau, les 28% restant correspondent essentiellement à de la matrice extracellulaire (MEC) et à des cellules. La composition du ménisque diffère selon l'âge et l'espèce (Messner & Gao, 1998). Chez l'homme adulte, il est composé d'une matrice essentiellement collagénique (collagène de type I, II, III, V et VI) représentant de 60 à 80% de son poids sec, avec une majorité de collagène I (80%). Le reste étant composé de 8 à 13% de protéines non collagéniques comme l'élastine et des glycoprotéines d'adhésion (fibronectine et thrombospondine) et de 1 à 2 % de protéoglycanes (Makris *et al.*, 2011).

### 3.1.3.3. Configuration collagénique

Les zones rouge-rouge et rouge-blanche sont principalement constituées de collagène de type I tandis que la zone blanche-blanche comporte à la fois du collagène des types I et II, avec une prédominance pour le type II (McDevitt & Webber, 1990).

Les fibrilles de collagène I (Col I) font à peu près 50 nm de diamètre et sont de ce fait très résistantes. Le collagène de type I représente la quasi-totalité du collagène présent dans les zones vascularisées du ménisque. Le collagène de type II (Col II) est le constituant principal du cartilage articulaire. Sa structure est moins résistante que son homologue de type I mais il représente le collagène majoritaire de la zone avasculaire du ménisque (60% *versus* 40% pour le Col I).

Le collagène de type I est organisé en faisceaux de configuration spécifique selon la zone du ménisque. Il est retrouvé sous quatre configurations (Figure 50). Au niveau de la zone superficielle il forme un réseau aléatoire de fibres de faible diamètre, dans la couche sous-jacente (lamellaire) sa structure est orientée mais néanmoins irrégulière. Au centre du

ménisque, les fibres de Col I sont alignées parallèlement les unes aux autres de façon circonférentielle. Elles sont plus épaisses que celles de la zone superficielle. Pour finir, au centre on retrouve des fibres radiaires. Elles sont peu nombreuses et sont positionnées perpendiculairement aux fibres circonférentielles. Elles vont maintenir ces dernières en place et ainsi prévenir les déchirures longitudinales et la mécanique du tissu (McDevitt & Webber, 1990).

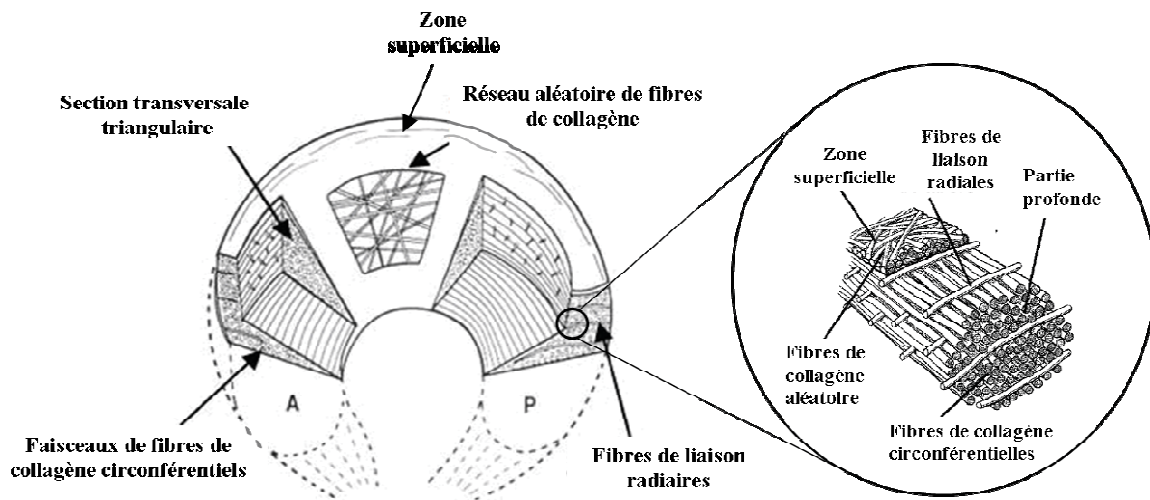
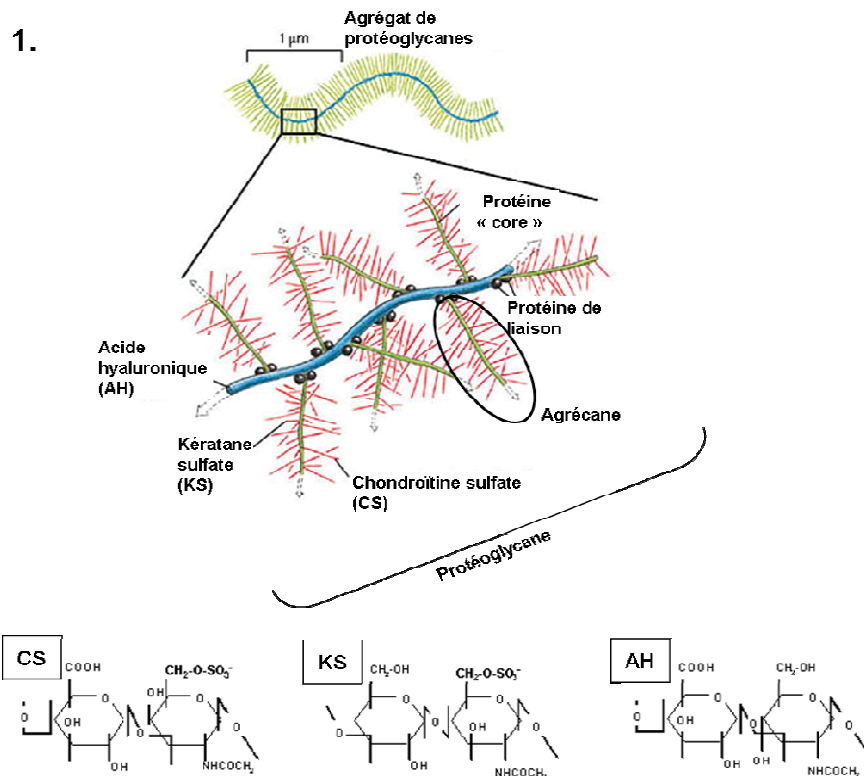


Figure 50 – Organisation des fibres de collagène au sein du ménisque.

#### 3.1.3.4. Les protéoglycanes

Les protéoglycanes sont des assemblages de chaînes polysaccharidiques, les glycosaminoglycanes (GAGs), et de protéines. Ils sont fortement retrouvés comme composants matriciels des tissus de type cartilagineux, car ils agissent comme de véritables pièges à eau, essentiels au rôle mécanique de ces tissus (Sanchez-Adams *et al.*, 2011). S'agissant de grosses molécules, elles résistent aux charges de compression et leurs charges négatives assurent une résistance à la pression osmotique. Les protéoglycanes sont composés de trois GAGs principaux : le sulfate de chondroïtine, l'acide hyaluronique et le sulfate de kératane. Dans la matrice méniscale (et cartilagineuse) elles sont associées à un filament protéique, la protéine « core » pour former une structure appelée agrécane. Les agrécanes vont se fixer à de l'acide hyaluronique formant ainsi le protéoglycane (Makris *et al.*, 2011) (Figure 51).

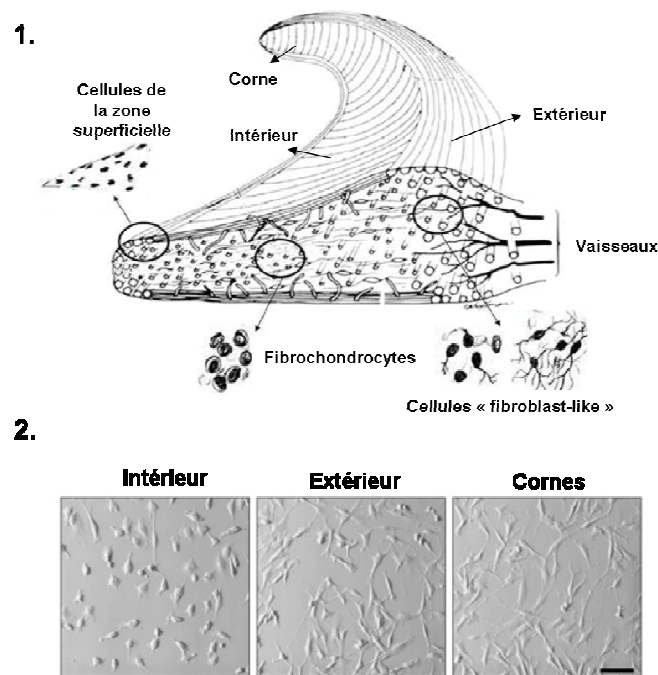


**Figure 51 – Composition d'un protéoglycane.** (1.) Représentation schématique des interactions entre les glycosaminoglycanes (GAGs) et les protéines « core » (2.) Formules chimiques des trois GAGs composant un protéoglycane articulaire. (d'après physiotherapymilan.it)

### 3.1.3.5. Composition cellulaire

Au sein du ménisque on distingue trois types cellulaires : les fibrochondrocytes, les cellules « fibroblast-like » et les cellules de la zone superficielle (Figure 52 (1.)).

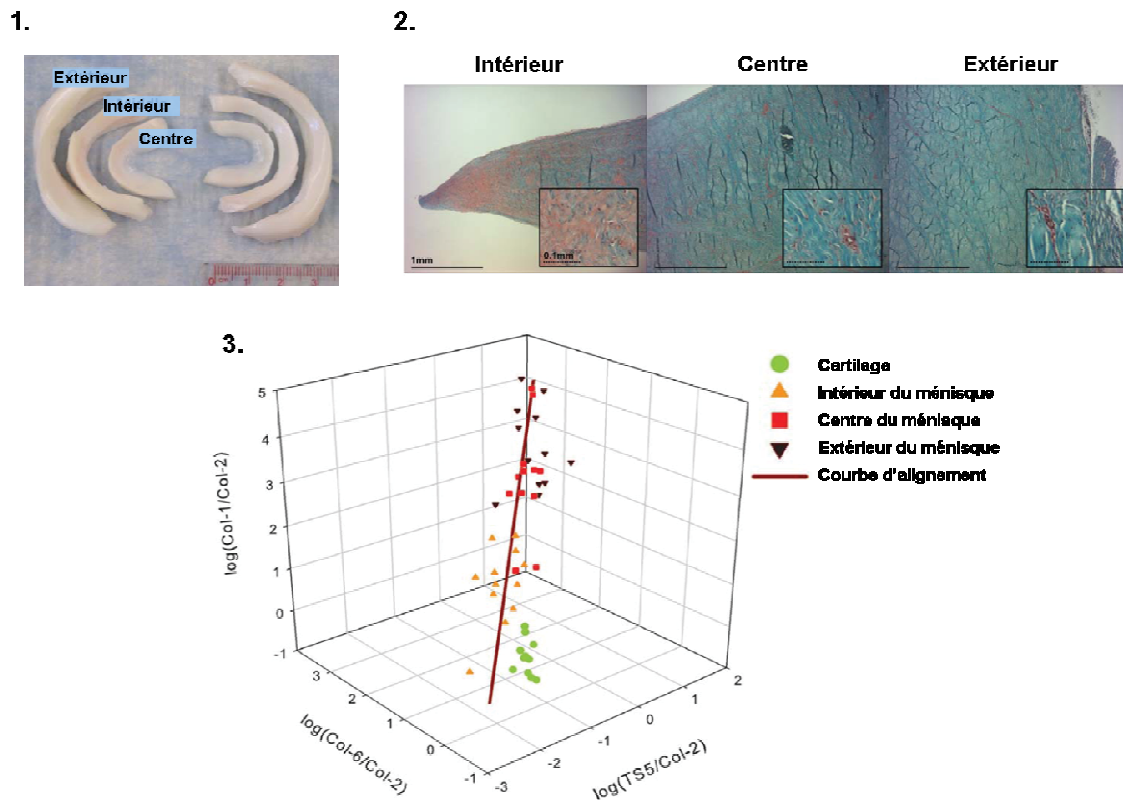
Les fibrochondrocytes sont prédominants au sein du ménisque et sont principalement retrouvés dans la partie intérieure du tissu. Leur morphologie ainsi que leur matrice extracellulaire environnante, ne sont pas sans rappeler les chondrocytes et leur production de Col I, les apparente aux fibroblastes (McDermott, 2010). Ces ressemblances ont conduit au terme de « fibrochondrocytes » pour la description de ce type cellulaire unique. Les cellules de l'intérieur (partie avasculaire) possèdent un phénotype plus chondrocytaire que celle de la partie externe, on les appelle « chondrocyt-like ». En effet, elles sécrètent une MEC riche en Col II et en agrécane identique à la MEC du cartilage hyalin. Deux populations distinctes de fibrochondrocytes sont retrouvées selon leur localisation dans le ménisque humain. La couche superficielle est constituée de cellules ovales ou fusiformes alors qu'en profondeur elles sont rondes ou polygonales (Figure 52 (2.)).



**Figure 52 - Morphologie et localisation des cellules méniscales.** (1.) Schématisation d'une coupe transversale de ménisque représentant les cellules de la zone superficielle (blanche-blanche) de type chondrocytaire, les cellules de la zone intermédiaire, les fibrochondrocytes, et les cellules de la zone vascularisée de type fibroblastique (Makris *et al.*, 2011). (2.) Photographies de cellules méniscales extraites de la zone avasculaire, de la zone vascularisée et des cornes (Mauck *et al.*, 2007).

Jusqu'à présent aucun marqueur spécifique des cellules méniscales (CM) n'a encore été mis en évidence. En règle générale, les équipes se basent sur des marqueurs chondrocytaires pour les caractériser. Différentes équipes ont cependant tenté de développer des systèmes pour les discriminer avec notamment l'établissement de techniques d'analyse quantifiables. C'est en effet ce qu'ont développé Son et Levenston en 2012. Ils ont identifié 3 couples de transcrits susceptibles de caractériser les CM en fonction de leur localisation au sein du tissu d'origine. Ils ont qualifié d'indicateurs de variation génique les couples : collagène VI/collagène II, ADAMTS-5/collagène II et collagène I/collagène II (Son & Levenston, 2012) (Figure 53 ci-après). Ces résultats confirment les similitudes morphologiques observées entre les cellules de la zone avasculaire et les cellules de cartilage. à peu près à la même période, Furumatsu et son équipe sont parvenus au même constat avec des analyses histochimiques et phénotypiques (Furumatsu *et al.*, 2011). Lors d'une étude réalisée en 2005, Verdonk et son équipe avaient entrepris de les caractériser par analyse de la matrice extracellulaire sécrétée. Les cellules ont été cultivées en monocouche ou en gel d'alginate, et leur MEC (Col I, Col II et agrécane) a été comparée à celle de chondrocytes

articulaires cultivés en alginate. Ils ont mis en évidence qu'il y avait différentes populations cellulaires au sein du ménisque, avec une MEC et des marqueurs membranaires distincts. La culture en alginate diminuait significativement la prolifération cellulaire (Verdonk *et al.*, 2005). Cependant peu importe la zone à partir de laquelle elles sont extraites, une partie des cellules peuplant le ménisque peuvent être induites dans les trois lignées mésenchymateuses (chondrogénique, adipocytaire et ostéoblastique), la partie avasculaire possède cependant une faible ostéogénicité (Mauck *et al.*, 2007). Cette caractéristique sous-entend que parmi les populations cellulaires du ménisque se trouvent des cellules s'apparentant à des CSM mais avec une plasticité plus restreinte (Furumatsu *et al.*, 2011).



**Figure 53 - Analyse structurale d'un ménisque bovin.** (1.) Ménisques immatures bovins divisés en trois parties. (2.) Distribution des glycosaminoglycanes sulfatés dans les régions intérieure, centrale et externe. Les coupes sont colorées à la Safranin-O (GAGs en rouge) et contre colorées au Fast Green. (3.) Représentation en Clustergramme des ratios d'expression transcriptomique obtenus pour les 3 zones méniscales de différents échantillons (échantillons de cartilage comme contrôle). La représentation 3D obtenue illustre l'évolution phénotypique des cellules de ménisques selon les zones méniscales (d'après Son & Levenston 2012). (Col-1 : collagène I, col-2 : collagène II, col-6 : collagène VI et TS5 : ADAMTS-5)

### **3.1.4. Contraintes mécaniques du ménisque du genou**

Dans des conditions d'utilisation normales, les forces exercées au niveau de l'articulation du genou sont très importantes. En effet, cette partie du corps est constamment sollicitée, particulièrement chez les sportifs et les personnes adoptant une position accroupie régulière. Afin d'éviter l'érosion du cartilage au niveau du fémur et du plateau tibial, les ménisques vont assumer le rôle de tampon.

De par ses différentes fonctions et sa géométrie, le tissu méniscal est sujet à différents stress tels que la compression, la tension et le cisaillement. La composition et l'organisation structurale de la MEC sont responsables des propriétés biomécaniques de ce tissu et protègent les surfaces cartilagineuses au niveau des zones articulaires.

Les protéoglycanes sont responsables de l'hydratation et offrent au cartilage une résistance mécanique. Ils sont majoritairement localisés dans les régions intérieures et centrales car ce sont les zones les plus sollicitées. Dans la zone externe, ils contribuent à augmenter la viscosité tissulaire alors qu'au centre ils contribuent également à la résistance aux charges de compression (Sanchez-Adams *et al.*, 2011).

L'orientation spécifique des fibres de collagène apporte de la rigidité au tissu et de la résistance à la tension. Les cellules se développent de manière organisée le long des fibres de collagène. Ce réseau complexe permet au fibrocartilage de résister aux forces extrusives appliquées lorsqu'il est comprimé entre les condyles fémoraux et le plateau tibial (Croutze *et al.*, 2013).

## **3.2. Physiopathologie méniscale**

### **3.2.1. Les causes**

Lorsqu'il est trop régulièrement ou trop intensément sollicité, le ménisque peut se déchirer. Les traumatismes du ménisque représentent les opérations les plus pratiquées en chirurgie orthopédique. Elles peuvent être d'origine non traumatique, dégénérative (méniscosés) ou liées à l'âge, mais la plupart du temps elles sont d'origines traumatiques. Pour ces dernières, il s'agit généralement de la conséquence de mouvements de flexion ou de tension forcés, qui sont occasionnées au cours de la pratique trop intensive d'un sport ou alors en adoptant une position accroupie répétée. Les lésions méniscales sont souvent

associées au développement d'une arthrose du genou (maladie articulaire dégénérative).

### 3.2.2. Les déchirures méniscales

#### 3.2.2.1. Déchirures d'origine traumatique

Les déchirures traumatiques surviennent le plus souvent chez des individus jeunes et actifs ou alors en surpoids. Elles sont qualifiées de partielles lorsque la profondeur de la lésion est peu importante et que le ménisque est encore attaché à l'avant et à l'arrière du genou. Selon son emplacement, la guérison peut se faire par des traitements conservateurs. Lorsque l'on parle de déchirure complète, c'est que la lésion traverse toute l'épaisseur du ménisque. Cela va provoquer une instabilité dans l'articulation (Guo *et al.*, 2015). La plupart du temps ces déchirures se caractérisent par un lambeau de ménisque suspendu (languette) ou une anse de seuil méniscale. Ce type de lésion peut conduire à des blocages et/ou des douleurs, c'est pourquoi les chirurgiens ont parfois recours à une résection partielle ou totale du tissu.

#### 3.2.2.2. Déchirure d'origine dégénérative

Il s'agit d'une dégradation du tissu due à l'usure qui apparaît en général chez des patients plus âgés (> 30 ans) qu'ils soient actifs ou non. Les bords du ménisque s'abîment et s'effilochent, ce qui peut conduire à une déchirure dans de multiples directions ou à un ménisque inutile (Guo *et al.*, 2015) (Figure 54).

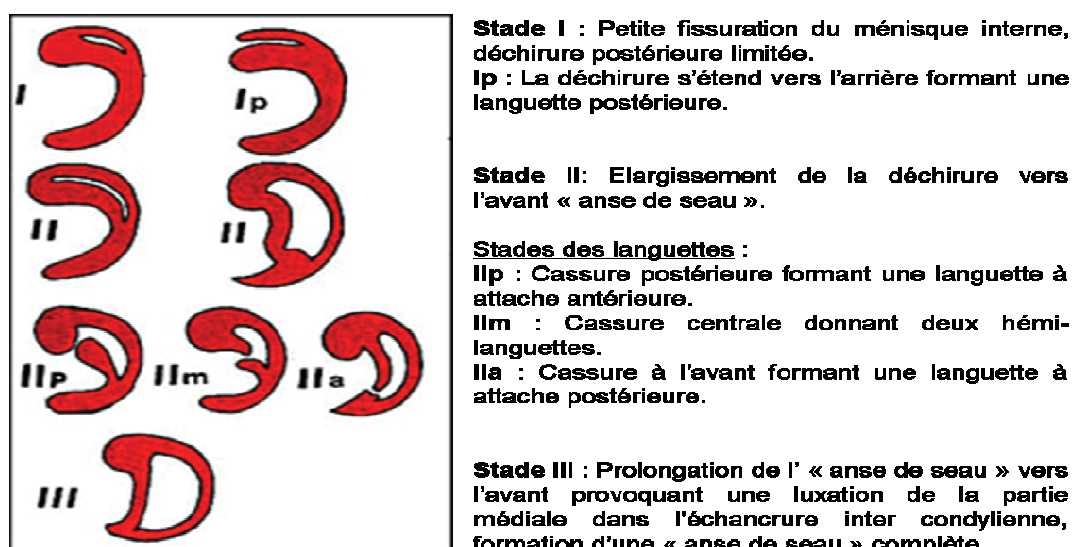


Figure 54 - Classification des lésions méniscales verticales de TRILLAT. (d'après nordgenou.com)

Leur classification repose sur trois critères : leur taille, leur profondeur et leur localisation au sein du ménisque. Le motif de la déchirure va influencer la méthode de traitement utilisée. Les ménisques dégénératifs ont un faible potentiel de guérison et sont le plus souvent associés à d'importantes altérations cartilagineuses.

### **3.3. Stratégies thérapeutiques concernant les lésions méniscales**

Les déchirures méniscales survenant dans la zone rouge-rouge sont celles qui ont le meilleur pronostic de guérison sans nécessairement avoir recours à la chirurgie. Lorsqu'il s'agit de la zone rouge-blanche, le processus de guérison est ralenti. La partie de la déchirure localisée dans la zone vascularisée va pouvoir guérir spontanément mais selon la sévérité de la lésion (taille, forme), l'acte chirurgical sera inévitable. La plupart du temps lorsqu'il s'agit de cette zone, les chirurgiens tentent de pratiquer une suture. Par contre pour ce qui est de la zone blanche-blanche, le taux de guérison est très faible voire inexistant.

#### **3.3.1. Les techniques chirurgicales**

##### **3.3.1.1. La suture**

La chirurgie méniscale peut être réalisée à ciel ouvert, par la technique d'arthroscopie ou par une combinaison des deux. Quatre générations de réparations méniscales se sont succédées. La 1<sup>ère</sup> génération est la technique dite à ciel ouvert, elle était pratiquée avant 1980. Elle était réalisée par arthrotomie et était considérée comme une chirurgie dite classique avec une rééducation longue et imparfaite (Beaufils *et al.*, 2011). Il s'agit d'une technique relativement simple, qui est cependant limitée par la convexité méniscale. Puis ce fut l'arrivée d'une technique de chirurgie micro-invasive, l'arthroscopie, faisant appel à des aiguilles à suture « de dedans en dehors » pour les lésions postérieures, ou « de dehors en dedans » pour les lésions plus antérieures (Beaufils *et al.*, 2011). La procédure de dedans en dehors avec le passage des fils en U d'arrière en avant au travers du ménisque et de la fissure jusqu'au mur méniscal, et celle de dehors en dedans réalisée de l'extérieur vers l'intérieur, avec perforation successive de la capsule articulaire, du mur méniscal, de la fissure et du ménisque. Les troisièmes et quatrièmes générations sont des techniques dites « tout en dedans ». Elles utilisent respectivement des attaches et des fils. Elles ont pour avantage, l'absence d'incision postérieure et l'utilisation de fils, limitant le risque iatrogène des attaches.



La suture méniscale est réalisée dans les cas de lésions d'origines traumatiques. Cette pratique est privilégiée, particulièrement pour le sujet jeune, car elle permet de conserver le tissu et ainsi éviter les conséquences d'une méniscectomie. Elle est actuellement réalisée sous arthroscopie.

### 3.3.1.2. La méniscectomie partielle ou totale

Selon l'atteinte méniscale, il est parfois recommandé d'avoir recours à une ablation partielle ou totale du ménisque. Ce type de résection entraîne une sollicitation irrégulière des surfaces articulaires. Il a en effet été démontré l'existence d'une corrélation linéaire entre l'augmentation de la contrainte sur les surfaces articulaires du tibia et la quantité de tissu méniscal enlevée (McDermott, 2010). Qu'elle soit totale ou partielle, la méniscectomie est documentée comme étant associée à un taux élevé d'arthrose du genou (Fairbank, 1948).

Le revue de 1986 rédigée par Simpson résume rétrospectivement la réhabilitation des 230 patients ayant subi des méniscectomies ouverte ou par arthroscopie. Les résultats montrent que l'arthroscopie diminue significativement la durée de l'hospitalisation et permet une reprise du travail et du sport plus rapidement (Simpson *et al.*, 1986). Cette technique offre donc des avantages à la fois thérapeutiques et économiques.

A ce jour, les traitements chirurgicaux du ménisque se font majoritairement par ces techniques mini invasives arthroscopiques. Les douleurs post-opératoires sont minimales et la durée de rééducation est énormément réduite contrairement aux interventions chirurgicales ouvertes classiques. Néanmoins, la méniscectomie totale ou subtotalaire reste nécessaire pour les déchirures importantes et irréparables.

### 3.3.3. Les conséquences de la méniscectomie

Fairbanks réalisa en 1948 une comparaison radiologique de l'articulation du genou de 107 patients avant et après méniscectomie. Il observa dans une majorité des cas une déformation du condyle fémoral avec l'apparition de crêtes antéropostérieures et d'un aplatissement généralisé de la surface articulaire du fémur. Différentes études du même type ont été réalisées et ne s'accordent pas toutes sur les résultats (McDermott, 2010). Cette disparité serait due aux différences entre les patients, à la procédure de méniscectomie utilisée et à la durée du suivi. Il a de plus été démontré que la préservation du mur méniscal (*i.e.*, bordure périphérique circonférentielle du ménisque) était essentielle pour limiter les conséquences sur le long terme, comme la survenue de gonarthrose.

Par ailleurs les conséquences de la méniscectomie ne seront pas de la même ampleur selon le ménisque considéré. En effet, le ménisque latéral véhicule 70% des charges du compartiment latéral de l'articulation, après résection une étude a révélé que seulement 47% des patients obtenaient de bons résultats sur le suivi au long terme. A l'inverse, le ménisque médial supporte seulement 50% des charges de son compartiment, ce qui explique que même en l'absence du ménisque médial, la convexité du condyle fémoral et la concavité du plateau tibial médial permettent d'assurer un certain degré de congruence (McNicholas *et al.*, 2000).

D'autres paramètres vont être impliqués dans le pronostic au long terme parmi lesquels on peut citer l'âge, le sexe et l'indice de masse corporel du patient. On observe une recouvrance fonctionnelle articulaire plus rapide chez les patients jeunes, et différents rapports semblent montrer que les femmes obtiennent des résultats moins satisfaisants que les patients de genre masculin. De plus, le poids du patient va aussi fortement influencer la réhabilitation dû à la charge imposée (McDermott, 2010).

### **3.4. La préservation méniscale**

Les ménisques ne sont pas des structures uniformes, leur cellularisation est inégale, de même que la répartition de leur viscoélasticité. Leur rôle de cale stabilisatrice implique de maintenir une structure 3D, de préférence collagénique, possédant des propriétés équivalentes au tissu natif.

#### **3.4.1. L'allogreffe méniscale**

Le tissu d'origine est par nature le candidat de remplacement idéal, notamment en cas de méniscectomie totale pour laquelle on assiste à la perte du mur méniscale. Elles offrent des propriétés biomécaniques optimales par leur microstructure et leur composition matricielle établie. Cependant, il persiste des différences morphologiques entre les ménisques allogéniques et les surfaces articulaires du receveur ce qui conduit inévitablement à une diminution de la fonctionnalité méniscale. A cela peut s'ajouter un défaut d'intégration les limitant au rôle de stabilisateur (McDermott, 2010).

Les allogreffes sont de trois catégories : les allogreffes fraîches ou cryopréservées, de ménisques congelés ou lyophilisés. Les allogreffes fraîches ou cryopréservées présentent un risque de transmission de maladies plus élevé que les ménisques traités, mais contiennent un pool de cellules vivantes nécessaire à la préservation de la MEC et au maintien de l'intégrité

mécanique du greffon post-greffe. Des essais cliniques ont démontré que 1 an après la greffe, un envahissement du greffon par les cellules du receveur était observé (Rijk, 2004). Les problèmes majoritaires des allogreffes étant la disponibilité, le coût et la sécurisation. Elles sont indiquées en cas de méniscectomie totale ou subtotale, mais sont contre-indiquées en cas d'arthrose avancée.

Pour ce qui est des ménisques congelés ou lyophilisés, on observe une perte de la composante cellulaire et une dénaturation des antigènes de surface diminuant ainsi les risques de réponses immunitaires. La reconstruction du système vasculaire serait plus efficace dans les ménisques lyophilisés, cependant des inflammations de la membrane synoviale semblent être plus fréquentes avec ce traitement (Rijk, 2004).

Bien que les chirurgiens utilisent les allogreffes après méniscectomie totale, certaines équipes se sont risquées aux greffes autologues pour le recouvrement de petits défauts. Il ne s'agit pas dans ce cas d'une greffe de ménisque, mais du remplacement du tissu réséqué par un greffon provenant d'une autre source tissulaire. Des essais ont été menés chez l'animal avec notamment du tissu graisseux, du péricondre et du tendon (Tienen *et al.*, 2006). Les résultats obtenus étaient insuffisants en raison des faibles propriétés mécaniques de ces tissus et de leur porosité inadaptée.

### 3.4.2. Les substituts méniscaux

Un substitut méniscal doit satisfaire différents impératifs pour se rapprocher au plus près de la physiologie du tissu, tel que des impératifs anatomiques, histologiques, biomécaniques ou encore techniques (Guo *et al.*, 2015) (Tableau 15).

**Tableau 15 - Evaluation des différentes catégories de substituts méniscaux selon trois critères.** Mécanique : propriétés mécaniques, géométrie, anisotropie, ; Bioactivité : phénotype cellulaire, synthèse de MEC, immunogénicité, biointégration ; Logistique : l'apport en produit, fabrication, stérilisation, facilité d'implantation chirurgicale (Makris *et al.*, 2011).

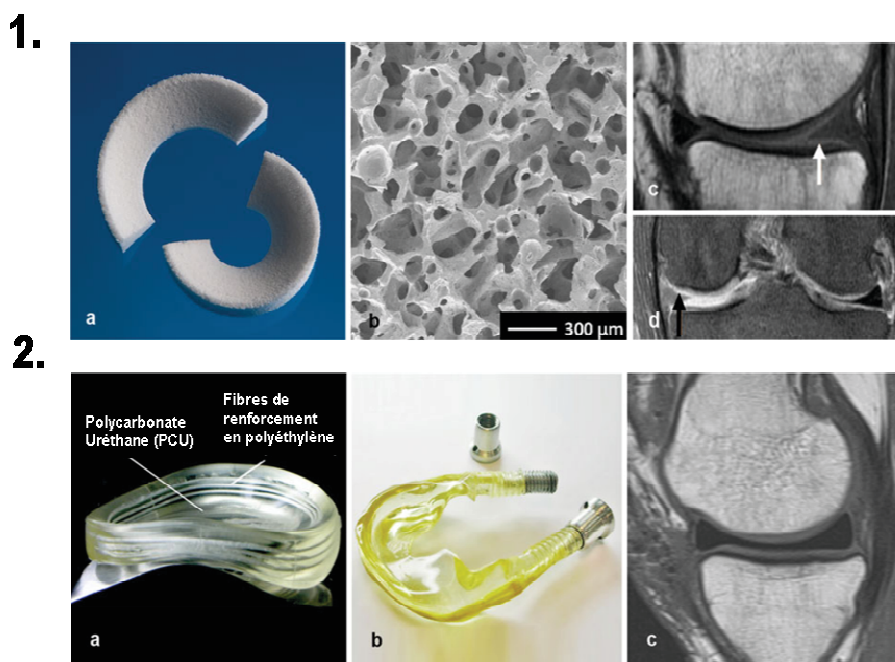
| Critères évalués | Supports synthétiques | Hydrogels | Composants de MEC (collagène, GAGs...) | Supports dérivés de tissus (matrice decellularisée, SIS...) |
|------------------|-----------------------|-----------|--|---|
| Mécanique        | +++                   | +         | +++                                    | ++  |
| Bioactivité      | +                     | ++        | ++                                     | ++++  |
| Logistique       | ++++                  | ++++      | +++                                    | +   |

Des matériaux synthétiques et naturels ont été proposés pour le remplacement permanent du tissu méniscal ou favoriser le développement d'un nouveau tissu. Ils sont catégorisés en 4 classes : les polymères synthétiques, les hydrogels, ceux à base de MEC et les substituts biologiques.

#### 3.4.2.1. Les substituts synthétiques

Les substituts synthétiques offrent de nombreux avantages tels qu'une possibilité de fabrication selon une multitude de méthodes, la maîtrise de la porosité, de la taille des fibres, des propriétés mécaniques et de la géométrie du substitut (Vrancken, Buma, et van Tienen 2013). Cependant ils n'égalent pas la biomécanique du tissu d'origine et sont peu bioactifs. Parmi ces polymères synthétiques, il y a l'acide polylactique, l'acide glucuronique et le polyuréthane.

- L'implant Actifit® (Orteq Sports Medecine) est un support poreux en polyuréthane aliphatique, initialement destiné à remplacer un ménisque dans son intégralité. Il s'agit d'un polymère constitué de fragments flexibles biodégradables de polycaprolactone (80%) et de segments solides semi-dégradables en uréthane (20%) (Figure 55 (1.)). Le processus de dégradation a lieu selon une réaction d'hydrolyse lente et génère des produits de dégradation non toxiques, lesquels seront rejetés ou intégrés par le tissu receveur. Son importante porosité permet la croissance d'un fibrocartilage et la synthèse matricielle. Il est en règle générale, greffé au mur méniscal permettant ainsi le transit cellulaire de ce dernier vers le centre du greffon (Baynat *et al.*, 2012). Les résultats obtenus étaient globalement satisfaisants, avec une diminution des douleurs de la méniscectomie, et un rôle supposé dans le ralentissement du développement arthrosique. Cependant l'apport biomécanique de ce biomatériau n'est pas encore évalué. Une autre étude a été menée à partir d'un greffon similaire chez le chien. Ils ont évalué les effets sur le long terme du matériau sur la dégénération cartilagineuse, en comparaison avec un groupe ayant subi une méniscectomie sans remplacement. Ils ont observé des altérations cartilagineuses significativement plus importantes en présence du substitut, avec des différences notables entre les animaux. Cette étude n'a donc pas permis la mise en évidence d'un avantage de l'utilisation de ce type de substitut, mais souligne l'importance de la forme de ce dernier dans le rôle bénéfique de l'implant (Tienen *et al.*, 2006). Son utilisation serait donc davantage appropriée pour des remplacements de méniscectomies partielles.



**Figure 55 – Exemples de substituts méniscaux synthétiques. (1.) a.** Le substitut Actifit® existe pour le ménisque latéral et le médial. **b.** Image de microscopie électronique à balayage représentant l’interconnexion des pores. **c.** et **d.** Résultats d’imagerie par résonance magnétique de l’implant 14 mois après sa mise en place (← : implant ; → : ménisque sain). **(2.) a.** Photographique du substitut NUsurface® dans sa totalité. On voit clairement la disposition circconférentielle des fibres de polyuréthane. **b.** Version de la prothèse méniscale incluant des boulons pour la fixation aux cornes. **c.** Image de résonance magnétique sagittale après 12 mois d’implantation, on observe une réparation de l’espace articulaire. (Illustrations extraites de Vrancken et al. 2013)

- Dans le cas où la conservation méniscale est impossible dû à la sévérité de la déchirure, il faut remplacer le ménisque dans sa totalité. Pour le moment aucun ménisque synthétique ne possède une forme suffisamment adaptée pour recouvrir de manière appropriée les surfaces articulaires. C’est le défi que tente de relever le substitut NUsurface®, actuellement en essai clinique de phase I. C’est implant méniscal est composé de polymères de polycarbonate d’uréthane (PCU), renforcé dans sa circonférence par des fibres de polyéthylène, ayant but de reproduire les caractéristiques structurales d’un ménisque naturel (Figure 55 (2.)). Il s’agit d’un substitut dit « anisotropique » car il peut présenter différentes caractéristiques selon son orientation, comme c’est le cas du tissu méniscal. Il est indiqué pour des patients souffrant de douleurs articulaires associées à une perte de fonction méniscale. Son implantation chez le mouton en remplacement du ménisque médial, n’a pas montré de différences significatives concernant l’atteinte cartilagineuse par comparaison avec un genou sain (Zur *et al.*, 2011). L’effet chondro-protecteur devra être vérifié sur un temps

plus long, toutefois ce type de substitut semble être prometteur pour la conservation de la fonction méniscale.

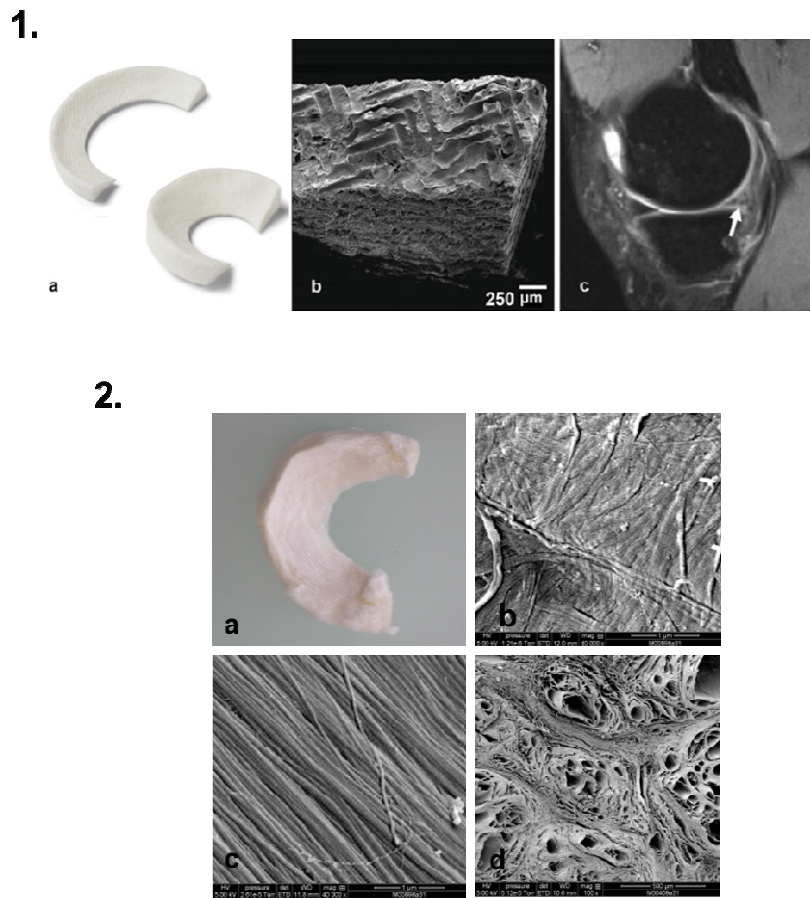
- Les implants en hydrogel à base d'alcool de polyvinyle (PVA) sont les premiers substituts non poreux envisagés pour la substitution méniscale. Ils possèdent une viscoélasticité et une résistance à la force de compression identiques à celle du ménisque natif. Des essais menés sur le lapin ont montré un effet chondro-protecteur par comparaison avec une méniscectomie. Des résultats opposés ont été obtenus avec des modèles animaux plus conséquents. Les moutons implantés ont présenté d'importants dommages du cartilage articulaire, sans bénéfices par comparaison à l'allogreffe, avec des déchirures radiales au niveau des cornes postérieures (Kelly *et al.*, 2007).

#### 3.4.2.2. Substituts biologiques

Les matériaux naturels, en particulier ceux à base de collagène, sont naturellement bioactifs et offrent un avenir prometteur aux substituts tissulaires pour la préservation du cartilage. Trois greffons de composition naturelle seront décrits dans cette sous-partie. Le second, le greffon MENISC-T<sup>®</sup>, est le substitut méniscal que nous avons utilisé dans notre étude.

- L'implant **Menaflex**<sup>®</sup> (ReGen Biologics), plus connu sous le nom de CMI<sup>®</sup> (Collagen Meniscus Implant), est un implant biorésorbable et biocompatible, stérilisé par irradiation gamma (Figure 56 (1.) ci-après). Il est constitué en majorité de collagène de type I extrait de tendons d'Achille bovins et contient aussi des GAGs tels que l'acide hyaluronique et le sulfate de chondroïtine. Un essai a été mené sur 8 patients avec une mise en place de l'implant CMI<sup>®</sup> par arthroscopie. Les analyses réalisées 5 ans après l'implantation ont montré la formation d'un nouveau fibrocartilage robuste et fonctionnel (Steadman & Rodkey, 2005). Toutefois, le tissu obtenu n'a pas permis d'obtenir de différences significatives en termes de douleurs et d'amélioration biomécanique par comparaison avec une méniscectomie partielle. Dans un essai clinique réalisé sur 311 patients ayant subi une méniscectomie, ils obtinrent de bons résultats pour les patients atteints de défauts chroniques, mais aucun bénéfice pour les atteintes sévères (Rodkey *et al.*, 2008). Son utilisation est autorisée en Europe mais a été révoquée en 2010 aux États-Unis par la FDA, à la suite de non-conformités quant à son rôle dans la réparation méniscale et à des résultats insuffisants (Sandberg, 2010). Des analyses plus

poussées devraient être réalisées pour évaluer la composition chimique du tissu néosynthétisé et de ses réelles propriétés biomécaniques.



**Figure 56 – Exemples de substituts méniscaux d'origine biologique. (1.) a.** Photographie des substituts collagéniques CMI®, ménisques latéral et médial. **b.** Image de microscopie électronique à balayage de la structure lamellaire du greffon. **c.** Image d'imagerie par résonance magnétique 12 mois après implantation du greffon. La flèche blanche indique la limite de l'implant. (d'après Vrancken et al. 2013) **(2.) a.** Photographie d'un ménisque humain decellularisé de chez TFB Génie Tissulaire. **b., c.** et **d.** Photographies de microscopie électronique à balayage représentant respectivement le réseau aléatoire de collagène de surface, les fibres parallèles de collagène de type I au centre et une coupe radiale de ces mêmes fibres (Photographies fournies par TBF Génie Tissulaire).

- Une entreprise française, TBF Génie tissulaire, a développé un biomatériau directement conçu à partir de ménisque humain decellularisé, le **MENISC-T®** (Figure 56 (2.)). C'est le seul greffon méniscal allogénique humain en essai clinique (phase II actuellement). Ce type de substitut combine à la fois la résistance mécanique et la biocompatibilité des allogreffes fraîches, avec la disponibilité des greffons synthétiques. Ces

greffons sont issus d'arthroplastie du genou sur donneur vivant et sont indiqués pour la restauration méniscale après méniscectomies partielles.

Une autre équipe a travaillé sur le développement de greffons allogéniques décellularisés, en appliquant des traitements différents du procédé Phoenix®, avec comme ingrédient principal le dodécylsulfate de sodium, qui est un détergent, mais aussi un puissant tensioactif (Sandmann *et al.*, 2009). Après avoir réalisé des analyses biomécaniques et histologiques en comparant avec des ménisques non traités, ils ont confirmé que leurs traitements permettaient bien la destruction des cellules tout en maintenant la structure méniscale.

D'autres biomatériaux naturels sont à l'essai comme ceux à base de gélatine, d'alginate ou de sous-muqueuse d'intestin grêle. Cette dernière est constituée à 90% de collagène et contient des protéoglycanes ainsi que des facteurs de croissance et présente l'avantage d'être peu immunogène (Cook *et al.*, 2006). Des tests ont été réalisés sur le chien et la chèvre ayant subi une méniscectomie partielle ou totale, l'implantation de ce tissu a permis d'observer le développement d'un tissu de remplacement proche du fibrocartilage ainsi qu'une protection cartilagineuse (Bradley *et al.*, 2007). Cependant son utilisation demeure restreinte, car elle possède des propriétés mécaniques limitées, une porosité inappropriée, ainsi qu'une tendance à l'ossification

### **3.5. Ingénierie tissulaire**

Chaque année, plus de 400.000 interventions chirurgicales sont effectuées sur des lésions méniscales en Europe et jusqu'à 1 million aux États-Unis, d'où l'impact socio-économique non négligeable des déchirures méniscales dans notre société (Van der Bracht *et al.*, 2007). Il est alors apparu nécessaire de développer des techniques innovantes s'inscrivant dans le domaine des médecines régénératives pour reconstruire un tissu fonctionnel : c'est l'un des challenges de l'ingénierie tissulaire. Développer le substitut idéal nécessite de considérer les caractéristiques biologiques et biomécaniques des ménisques frais, tels que l'architecture matricielle et la composante cellulaire (Pereira *et al.*, 2014). Ces dispositifs thérapeutiques devraient faciliter la démarche auprès des services de santé et aussi améliorer la vie des patients en empêchant la dégénérescence articulaire sans la nécessité d'avoir recours à d'autres actes chirurgicaux. Le greffon généré doit être biocompatible, parfaitement s'intégrer au tissu receveur et permettre le développement d'une néovascularisation. Et il doit



être résorbable dans un temps adapté à la formation du nouveau tissu, tout en préservant ses propriétés biomécaniques et chondro-protectrice.

### 3.5.1. Les cellules candidates

De préférence il faudrait utiliser des cellules autologues, abondantes, facilement cultivables *in vitro* et capables de synthétiser une matrice fibrocartilagineuse.

#### 3.5.1.1. Les fibrochondrocytes

Idéalement, pour reconstruire du ménisque il serait souhaitable d'utiliser les cellules majoritaires de ce tissu, les fibrochondrocytes. Ils peuvent être obtenus à partir de prélèvement autologue d'un ménisque sain ou à partir du fragment réséqué (Arnoczky, 1999). De façon intéressante, il semblerait que les cellules méniscales préservent leur capacité à produire de la MEC *in vitro*, peu importe l'âge du patient, ce qui offre la possibilité d'utiliser des débris chirurgicaux de ménisque comme source cellulaire (Baker *et al.*, 2009). Leur capacité à synthétiser du fibrocartilage a été démontrée *in vivo*, mais en culture *ex vivo* ils produisent du Col I et Col II mais pas d'agrécane (Verdonk *et al.*, 2005). Cependant le ménisque est un tissu faiblement cellularisé, en particulier dans la zone avasculaire. En conséquence, le rendement d'extraction est relativement faible et c'est sans compter les limites liées à l'approvisionnement en tissus frais. En raison de la difficulté d'obtention en quantité suffisante et à l'acte invasif de la biopsie, les fibrochondrocytes ne sont donc pas les cellules idéales pour la réparation méniscale.

#### 3.5.1.2. Les chondrocytes

Les cellules cartilagineuses sont celles qui s'apparentent le plus aux fibrochondrocytes avec une forte production de GAGs et de Col II, et un approvisionnement moins limité. Leur extraction et expansion à des fins cliniques est déjà validée notamment avec le Cartipatch® (TBF Génie Tissulaire). Il s'agit d'un greffon pour la réparation du cartilage hyalin réalisé à partir de chondrocytes autologues cultivés dans une matrice. De cette manière, le phénotype chondrocytaire et les fonctionnalités cellulaires sont parfaitement maîtrisés (d'après <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT00945399>). Cependant l'utilisation de chondrocytes pour la prise en charge des réparations méniscales ne permettrait pas de reproduire la MEC des différentes zones du tissu, ces derniers ne produisant pas de collagène de type I.

### 3.5.1.3. Les fibroblastes

Les fibroblastes comme les chondrocytes possèdent un phénotype apparenté à celui des fibrochondrocytes. Les fibroblastes sont des cellules qui prolifèrent bien *in vitro* après leur extraction à partir d'une biopsie de peau. D'après certaines études ils auraient la capacité de synthétiser une matrice fibrocartilagineuse. En effet, après implantation de substitut acellulaire ou congelé chez le chien, il a été observé une invasion du support par les cellules fibroblastiques de la synovie (Tienen *et al.*, 2006). Elles produiraient en premier lieu un tissu fibrovasculaire qui laisserait la place à un fibrocartilage. Toutefois des analyses mécaniques et chimiques doivent encore être réalisées. De plus parmi les cellules synoviales, il semblerait qu'il y ait des CSM. C'est en effet ce qu'ont démontré Song et ses collaborateurs en réalisant des co-cultures de fibrochondrocytes en pellet avec du liquide synovial. Ils ont observé une augmentation de la synthèse de collagène et de GAGs ainsi qu'une amélioration de la prolifération des cellules méniscales dans les co-cultures. Ils conclurent que les CSM synoviales peuvent supporter la prolifération des fibrochondrocytes et seraient impliquées dans la guérison spontanée des petits défauts méniscaux (Song *et al.*, 2015).

### 3.5.1.4. Les cellules souches mésenchymateuses

Les CSM ne présentent pas de problème de disponibilité et elles ont l'avantage de posséder la capacité de différenciation en cellules des lignées fibroblastique et chondrocytaire. De plus, un type cellulaire proche est retrouvé dans le tissu méniscal, ce qui permet d'envisager leur différenciation en fibrochondrocytes (Furumatsu *et al.*, 2011). De nombreuses études ont mis en avant leur potentiel thérapeutique *in vivo* et *in vitro*. Elles favorisent la guérison de défauts méniscaux en sécrétant une abondante matrice extra cellulaire s'intégrant parfaitement avec le tissu receveur. De plus, elles auraient aussi un effet chondro-protecteur (Nerurkar *et al.*, 2011). Les CSM sont facilement isolables *in vitro* à partir de moelle osseuse et de tissu adipeux. En culture standard, elles présentent l'avantage de préserver leur capacité de différenciation et peuvent être facilement induites en chondrocytes, lorsqu'elles sont cultivées en milieu supplémenté de dexaméthasone et de TGF- $\beta$  (Barry *et al.*, 2001), ce qui en fait les candidates de prédilection pour des applications d'ingénierie tissulaire du ménisque .

### 3.5.2. Les CSM en réparation méniscale

#### 3.5.2.1. Les facteurs de croissance

Pour induire la différenciation des CSM et la production d'une matrice extra cellulaire appropriée, il faut se placer dans un environnement optimal (facteurs de croissance, cytokines, nutriments, oxygène) (Arnoczky, 1999). Parmi ces facteurs de croissance, le TGF-  $\beta$  va jouer un rôle primordial dans le processus de différenciation chondrogénique et dans la production d'une MEC riche en Col I, Col II et en agrécanes (Bouffi *et al.*, 2010). Il est aussi impliqué dans la formation des tissus osseux (Barry *et al.*, 2001). Le PDGF en association avec le TGF, améliorerait fortement la prolifération chondrocytaire, l'IGF-1, est un facteur essentiel à la formation du cartilage hyalin, le FGF-2, favoriserait la prolifération des CSM *in vitro* et serait impliqué dans la chondrogenèse, et la BMP-6, participerait activement au maintien de l'homéostasie du cartilage articulaire (Van der Bracht *et al.*, 2007). Le PDGF, le TGF et l'IGF-1, sont abondamment présents dans le lysat plaquettaire (LP). Les effets bénéfiques du LP dans la reconstruction cartilagineuse, ont déjà été mis en évidence à plusieurs reprises, ce qui explique l'intérêt qui lui est porté pour la réparation de la zone avasculaire méniscale. Le cocktail de facteurs présent dans le LP jouerait un rôle dans la guérison méniscale, en favorisant la prolifération cellulaire et la vascularisation de ce tissu, et serait de plus impliqué dans le recrutement de fibroblastes et de CSM vers le site endommagé (Wei *et al.*, 2012).

#### 3.5.2.2. Ingénierie méniscale

Les CSM ont su démontrer leur potentiel thérapeutique à de nombreuses reprises. Elles possèdent en effet la capacité de migrer spécifiquement sur les sites lésés et d'y modifier le microenvironnement, en sécrétant des facteurs paracrines, favorisant ainsi la réparation tissulaire (Satija *et al.*, 2009).

Leur tropisme particulier a notamment été démontré chez l'humain, par injection en percutanée de CSM autologues dans des genoux symptomatiques, en présence de lysat plaquettaire autologue. Une amélioration de la formation cartilagineuse et méniscale a été observée, ainsi qu'une diminution de la douleur et une augmentation de l'amplitude articulaire (Centeno *et al.*, 2008). Leur potentiel chondrogénique n'est plus à prouver (Malda *et al.*, 2003). Les stratégies actuelles s'efforcent de trouver les méthodes de culture et d'administration les plus appropriées, entre une application directe, dans du gel de fibrine, en injection articulaire, dans des supports 3D (à l'état indifférencié ou différencié), sous forme

d'agrégats ou encore dans des hydrogels (Yu *et al.*, 2015). Il semblerait que leur prédifférenciation avec du TGF- $\beta$ 1 serait en défaveur de leur intégration dans le ménisque receveur par comparaison à leur utilisation à l'état « souche » (Pabbruwe *et al.*, 2010). C'est en effet le constat réalisé par Pabbruwe et son équipe lors d'une étude pour la régénération de la zone blanche-blanche. Ils ont adopté une méthode sandwich, c'est-à-dire qu'ils ont réalisé un substitut en alternant des couches de cellules souches et de membranes collagénique. Cette construction a été cultivée 40 jours *in vitro* puis implantée *in vivo* chez le mouton. Ils ont obtenu une intégration optimale pour les substituts associant les CSM et le collagène, par comparaison avec ceux de composition uniquement collagénique. Etrangement, l'ajout de TGF- $\beta$ 1 induisait la différenciation en chondrocytes mais inhibait la biointégration du substitut (Pabbruwe *et al.*, 2010). En présence ou en absence de TGF- $\beta$ 1 les supports cellularisés démontraient systématiquement de meilleurs résultats. Le bénéfice de la cellularisation des substituts avant l'implantation a aussi été mis en évidence dans le modèle murin. Des CSM de MO de rats ont étéensemencées dans des ménisques décellularisés murins. Au bout de 4 semaines de culture *in vitro*, les substituts ensemencés présentaient une forte expression de MEC avec une solidité structurale approchant le tissu d'origine. Ces mêmes analyses ont été réalisées *in vivo* par la même équipe (Yamasaki *et al.*, 2008). Ils ont observé que les ménisques cellularisés possédaient un effet chondroprotecteur supérieur aux ménisques implantés sans CSM 8 semaines après implantation et que ces derniers ne présentaient pas de différences notables avec les ménisectomies.

Dans un registre différent, des expériences de thérapie génique ont été menées chez la chèvre à partir de CSM transfectées avec le gène de l'IGF-1 humain. Les CSM ont été injectées en solution d'alginate permettant une gélification *in situ*, des défauts de 3 mm de diamètres créés au niveau des ménisques ont été analysés 2 mois après. Les CSM transfectées ont permis une amélioration de 92% des défauts, et une réparation de 72% a été obtenue pour les CSM seules. Sans cellules, la formation tissulaire fût minimale. Ces résultats furent encourageants quant à l'utilisation des CSM pour délivrer des facteurs locaux. Cependant ils devront être reproduits sur des défauts plus importants et une analyse des propriétés biomécaniques du tissu néosynthétisé devra être conduite. La majorité des études associant des CSM à des biomatériaux biodégradables, ont démontré les effets bénéfiques des CSM. Cependant il faut rester prudent dans l'extrapolation des résultats à l'humain.

En effet, différentes études réalisées avec des modèles animaux de différentes tailles ne s'accordent pas sur leurs résultats. Ils existent des différences inter espèces qui influencent

la vitesse de cicatrisation et la régénération tissulaire. Les ménisques des modèles animaux de petite taille, comme le rat ou le lapin, ne supportent pas les mêmes contraintes biomécaniques que les ménisques humains. Ils sont par ailleurs dotés d'un potentiel de guérison spontanée (Yu *et al.*, 2015).

Il semblerait que la sollicitation mécanique du tissu stimule la sécrétion d'agrécane par les cellules. Il a en effet été démontré que l'immobilisation de l'articulation, à la suite d'une lésion ou d'une opération, affectait la régénération tissulaire notamment en raison d'une diminution de l'expression d'agrécane (Djurasic *et al.*, 1998). Il est vrai que le ménisque est constamment exposé à de nombreux stress lorsque les membres inférieurs sont en mouvement. C'est en tenant compte des caractéristiques du fibrocartilage *in vivo*, que différentes équipes de recherche ont développé des systèmes de cultures pour reproduire ces stimulations mécaniques. Deux études ont d'ailleurs été réalisées à partir de CSM cultivées sur des supports en nanofibres de poly( $\epsilon$ -caprolactone) en perfusion. Ils ont observé une amélioration de la production de collagène en système perfusé. Cependant la perfusion aurait un impact négatif sur la sécrétion d'agrécane. Ces deux études ne s'entendent pas sur l'impact biomécanique de la culture dynamique (Baker *et al.*, 2008; Nerurkar *et al.*, 2011). De plus, la stimulation mécanique peut être réalisée par appliquant des compressions cycliques en alternance ou non avec des cycles de perfusion. Il semblerait en vue des premières études réalisées, que l'application de stimulations mécaniques et de la perfusion, permet de se rapprocher d'un substitut cellularisé au plus proche du fibrocartilage méniscal (Liu *et al.*, 2012). Les protocoles restent cependant à être améliorés.

Des expériences d'un autre genre ont été réalisées, notamment en évaluant l'impact de la co-culture de CSM avec des cellules méniscales sous forme de pellet à différents ratios. Les études réalisées sur ce sujet sont parfois en total désaccord concernant les résultats obtenus (Pabbruwe *et al.*, 2010; Cui *et al.*, 2012b). Mais la présence de fibrochondrocytes aurait néanmoins un impact bénéfique sur la sécrétion d'une matrice de type fibrocartilagineuse par les CSM, ce qui offre l'avantage de réduire la quantité de cellules méniscales de départ.

### **3.5.3. Importance de l'oxygène dans la réparation méniscale**

Croutze et son équipe ont réalisé une analyse de la synthèse de MEC par des cellules extraites des régions internes et externes du ménisque. Les cellules ont été cultivées dans un

support collagénique en présence de TGF- $\beta$ 3, en normoxie (21% O<sub>2</sub>) et en hypoxie (3% O<sub>2</sub>) pendant 21 jours. Ils ont mis en évidence une surproduction significative de Col II et de GAGs en culture standard (21% O<sub>2</sub>, 160 mmHg) par rapport à la condition hypoxique. Ils n'ont pas décelé de différences entre les différentes zones. Il semblerait donc que les cellules méniscales possèdent un potentiel de différenciation chondrocytaire équivalent toutes zones confondues et que l'oxygène joue un rôle clé dans l'orientation phénotypiques de fibrochondrocytes *in vitro* (Croutze *et al.*, 2013). Comme pour le tissu osseux précédemment abordé, l'oxygène joue un rôle essentiel dans la production énergétique des populations cellulaires du ménisque.

Dans le tissu méniscal natif, l'apport en oxygène est principalement régi par la circulation sanguine. Ce qui explique la présence d'une répartition du taux d'oxygène au sein du ménisque et que c'est ce gradient qui va en partie moduler la différenciation des cellules méniscales vers un phénotype fibroblastique dans la zone vascularisée, et chondrocytaire dans la zone avasculaire. Le cartilage est par nature un tissu évoluant *in vivo* sous de très faibles concentrations en oxygène. C'est le liquide synovial qui va acheminer les nutriments et l'oxygène nécessaire à la survie cellulaire en absence de vaisseaux sanguins (Malda *et al.*, 2003). Dans ce liquide, la pression partielle en O<sub>2</sub> est proche de 8% (60.8 mmHg) ce qui signifie que la culture *in vitro* de cellules articulaires (chondrocytes, fibrochondrocytes et synoviocytes) devrait se faire dans une atmosphère n'excédant pas cette concentration. Dans les zones méniscales les plus éloignées de la synovie, l'apport en oxygène doit être aux alentours de 1% (7.6 mmHg), ce qui explique une quasi-absence cellulaire. Les cellules cartilagineuses peuvent survivre quelques jours en anoxie, mais la culture dans une atmosphère pauvre en oxygène va avoir un impact sur leur fonctionnalité notamment en diminuant la synthèse de MEC. Cultivées en agrégats à 5% (38 mmHg) et 21% d'O<sub>2</sub> (160 mmHg), les cellules des zones interne et externe ne réagissent pas de la même manière. Les cellules de la zone vascularisée surexpriment Col II et SOX9 en hypoxie tandis qu'une diminution du Col I est observée. A l'inverse, les cellules de la zone cartilagineuse surexpriment Col I et Col II mais pas SOX9. Un rapprochement a été fait avec l'expression du gène HIF-1 (Hypoxia inductible factor), facteur de transcription fortement exprimé en hypoxie. Cette étude a révélé que les cellules méniscales de la partie avasculaire étaient moins sensibles à l'hypoxie que les cellules de l'extérieure, mais que toutes deux étaient plus sensibles que les chondrocytes articulaires. Ces résultats confirment que la répartition de la vascularisation méniscale est responsable du phénotype cellulaire, mais également de la répartition des fibres de collagène et des protéoglycanes.

Dans l'ingénierie tissulaire du ménisque l'une des principales difficultés est l'approvisionnement en oxygène et en nutriments dans les zones profondes du biomatériau, d'une part *in vitro* lors de la cellularisation en pré-implantatoire et *in vivo* au moment de l'implantation. La privation en oxygène mais aussi en glucose, va compromettre la viabilité cellulaire et la maturation fonctionnelle des greffons. Cependant, certaines sous populations de CSM seraient plus résistantes à ces contraintes métaboliques suggérant le potentiel avantage d'une présélection cellulaire (Farrell *et al.*, 2015).

Les hémoglobines d'Annélides marines, dont le fonctionnement et les applications ont été évoquées dans le Chapitre I, pourraient avoir un intérêt dans la régulation du taux d'oxygène dissous au sein de greffons cellularisés.

## - Chapitre IV -

# Matériel & Méthodes

---

*La partie méthodologie de ce troisième chapitre va aborder les diverses techniques développées au cours de notre étude portant sur l'optimisation de la cellularisation de supports 3D. Une première partie sera axée sur la colonisation d'un substitut osseux allogénique. Dans une seconde partie, nous nous intéresserons à l'ingénierie du tissu méniscal, avec dans un premier temps les protocoles développés pour la caractérisation des fibrochondrocytes, présentés en annexe 2, et dans un second temps, le développement d'un substitut méniscal cellularisé.*

---





---

## 1. Développement *in vitro* d'un substitut osseux cellularisé

---

Cette partie de notre étude fait suite à la validation de la culture en 2D des CSM en présence d'HEMOXCell®. Nous avons à présent déterminé une concentration qui améliore la prolifération tout en maintenant les caractéristiques cellulaires. Cette première partie du chapitre III sur la culture 3D concerne la mise au point d'un système de culture *in vitro*, de CSM sur substituts osseux pour l'ingénierie tissulaire de l'os et plus particulièrement pour des applications en implantologie dentaire. Une fois le design expérimental établi, il s'agira d'évaluer la contribution d'HEMOXCell® dans les diverses conditions de culture développées.

### 1.1. Choix du support

Cette partie du projet a été initiée par une étude comparative de 3 types de substituts osseux sous forme de poudre : un substitut synthétique (IngeniOs™ β-TCP, Zimmer) et deux substituts biologiques, l'un d'origine humaine (BIOBank®) et l'autre d'origine bovine (Endobon®, BIOMET 3i™). L'idéal aurait été de comparer un maximum de substituts mais le nombre de conditions évaluées a été limité pour des raisons de temps. Afin de choisir quel support nous allons utiliser pour notre étude, nous avons regardé l'adhérence, la prolifération et la viabilité cellulaire sur ces trois supports.

- **IngeniOs™ β-TCP**: Il s'agit de particules osseuses synthétiques à base d'une céramique biorésorbable, le phosphate tricalcique béta ( $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ ). Elles sont rendues bioactives par silicatisation. Elles sont entièrement résorbables et leur porosité peut atteindre 75 % avec une taille qui varie de 1 à 2 mm. Les procédés de stérilisation et de fabrication sont confidentiels (<http://zimmerdental.fr>).

- **BIOBank™**: Les substituts osseux BIOBank™ sont issus de têtes fémorales humaines prélevées sur donneurs vivants lors d'arthroplasties de hanche. Les granules ont une taille moyenne de 0.5 mm et une porosité de 80%. Nous reviendrons plus en détails sur ce substitut par la suite.

- **Endobon®**: Les poudres BIOMET 3i™ de la gamme Endobon® sont des céramiques d'hydroxyapatite ( $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6\text{OH}_2$ ), préparées à partir de fémurs et d'humérus d'origine bovine. Ces poudres sont entièrement déprotéinisées, pyrolysées par un chauffage à 900 °C et céramisées pendant 3 jours à 1200 °C. Les granules Endobon® font de 0,5 à 1 mm de diamètre. Elles sont ostéoconductrices et essentiellement non-résorbables (<http://biomet3i.fr>).

Dans un premier temps nous avons cherché à comparer la densité et la structure des substituts acellulaires, par des analyses en tomodynamométrie à rayon X et en microscopie électronique à balayage. Puis nous avons examiné le comportement des CSMensemencées sur ces supports.

### **1.1.1. Analyse en tomographie à rayon X de la densité minérale et de la porosité des poudres**

Le tissu osseux possède une MEC calcifiée qui le rend opaque aux rayons X. Sur ce principe, les échantillons de poudre ont été analysés au scanner micro-CT (Skyscan 1272, Bruker) au Laboratoire d'Ingénierie Ostéo-Articulaire et Dentaire (LIOAD) de Nantes (INSERM UMR 791). Cet appareil permet de réaliser de l'imagerie radiographique 3D sur des petits échantillons sur la base sur l'absorption des rayons X par les objets scannés. Les données sont acquises par tomographie. Cela consiste à réaliser des scans (coupes) de la structure analysée, en la balayant avec un faisceau de rayons X. L'absorption des rayons X par les poudres osseuses est mesurée, puis traitée informatiquement, permettant de générer des images 2D et 3D.

Pour cette analyse, 80 mg de chaque type de poudre sont répartis dans des tubes Falcon de 15 mL et maintenus dans de l'éthanol 70% jusqu'à analyse. Une source de rayons X polychromatiques de 60 kilovolts ainsi qu'un filtre de 0.25 mm, ont été utilisés.

Lors de la phase d'acquisition, un pas de rotation de 0.45° est utilisé entre chaque radiographie, sur un total de 180°. Chaque échantillon est divisé en 4 lignes superposées, chaque ligne correspondant à 433 radiographies. Soit un total de 1158 images reconstruites par échantillon, chaque image faisant 1920x1920 pixels. Le traitement informatique des radiographies est ensuite réalisé avec le logiciel CTan (Bruker), lequel va permettre l'analyse de la porosité (quantité de vide) des échantillons. Des reconstructions 3D sont générées avec le logiciel CTVox.

### 1.1.2. Analyse en microscopie électronique à balayage

Afin de mener à bien cette analyse, nous avons incubé 80  $\mu\text{g}$  de chaque poudre pendant 2 semaines dans du milieu  $\alpha$ -MEM + 5% de LP. Les échantillons ont ensuite été rincés au PBS1X puis fixés au glutaraldéhyde 2.5% pendant 1 h. Après fixation, les poudres sont rincées 3 fois au PBS1X puis déshydratées dans des bains successifs d'alcool éthylique (50, 70, 90 et 100%), 2 fois 10 min chacun. Les échantillons sont immergés dans de l'éthanol 100% à TA, puis transportés à la Plateforme d'Imagerie et de Mesures en Microscopie (PIMM) de la faculté des sciences de Brest. Sur place, les échantillons vont subir une fixation terminale dans du 1,1,1,3,3,3-hexaméthyltrisilazane (HMDS) ( $\text{C}_6\text{H}_{19}\text{NSi}_2$ ) dilué dans de l'éthanol 100% (3 dilutions : 3/1, 1/1, 1/3) 2 fois 10 min dans chaque préparation. Pour terminer, on réalise 3 bains de 10 min dans de l'éthanol 100%. Les échantillons sont ensuite placés sous hotte chimique une nuit pour s'assurer que la totalité des solutions soit évaporée. Après cette étape, les échantillons sont déposés sur de l'adhésif double face en cuivre puis métallisés (SC7620 mini Sputter Coate, Quorum Technologies) avec une fine couche d'or palladium. L'observation est réalisée au MEB (Hitachi S-3200N).

### 1.1.3. Analyse de l'adhérence et de la prolifération en microscopie électronique à balayage

S'agissant de poudres, nous avons opté pour des tubes Falcon 15 comme contenant de culture. La structure conique devrait permettre de se rapprocher des conditions retrouvées dans une cavité dentaire. Nous avons choisi de mettre au point les différentes étapes de la culture sur poudre (ensemencement, adhérence) à partir du substitut BIOBank®, car nous n'étions pas limités en quantité avec ce dernier.

Chaque analyse a été réalisée sur 100 mg de poudre (BIOBank®, Endobon® et IngeniOs™) pesés en condition stérile dans des tubes Falcon 15 mL. La densité d'ensemencement initiale a été déterminée au préalable en calculant l'efficacité d'ensemencement de 80 mg de poudre BIOBank® avec  $1 \times 10^5$ ,  $2.5 \times 10^5$ ,  $7.5 \times 10^5$ ,  $1 \times 10^6$ , et  $1.5 \times 10^6$  cellules. Nous avons retenu  $1 \times 10^6$  cellules comme étant la densité maximale permettant un minimum de perte, ce qui rejoint d'autres études (Bancroft *et al.*, 2002; Luo *et al.*, 2013). Pour nos analyses, les ensemencements ont été réalisés avec des CSM en P1 ou P2, dans un volume final de 200  $\mu\text{l}$  d' $\alpha$ -MEM. Le mélange poudre/cellules est réalisé avec une

pipette dont l'extrémité du cône aura été coupée. Les préparations sont ensuite placées 1 h à l'incubateur pour permettre aux cellules d'adhérer aux supports, puis le milieu est ajusté à 5 mL. Les supportsensemencés sont ensuite incubés pendant 23 jours et analysés à J2, J9 et J23. Durant toute la durée de la culture, les bouchons sont maintenus dévissés pour permettre les échanges gazeux et les milieux sont renouvelés 2 fois par semaines.

L'adhérence ainsi que la prolifération, ont été visualisées en MEB selon le protocole précédemment décrit (1.1.2).

#### **1.1.4. Analyse qualitative de la viabilité**

L'analyse de la viabilité cellulaire au sein des cultures sur poudre est réalisée avec le LIVE/DEAD® Viability/Cytotoxicity Assay Kit (Invitrogen). Ce kit utilise deux marqueurs fluorescents, la calcein AM et l'Ethidium homoDimer-1 (EthD-1). La calcein AM est un colorant polyanionique non fluorescent, capable de traverser la membrane plasmique des cellules. Dans les cellules vivantes, les estérases intracellulaires vont pouvoir la convertir en émettant une fluorescence verte ( $530 \pm 12.5$  nm). L'EthD-1 quant à lui, ne marque que les cellules dont la membrane plasmique est endommagée. Il va se lier aux acides nucléiques présents dans le noyau et émettre une fluorescence rouge ( $645 \pm 20$  nm). En accord avec les recommandations du kit, nous avons réalisé des gammes de dilutions de chaque marqueur, afin de déterminer les concentrations optimales d'utilisation. Considérant les résultats obtenus, nous avons travaillé dans un milieu réactionnel contenant  $2 \mu\text{M}$  de calcein AM et  $1.25 \mu\text{M}$  d'EthD-1. Les échantillons sont rincés deux fois au PBS 1X avant de réaliser les marquages, puis incubés 30 min dans le mélange, avant d'être observés au microscope confocal (ZEISS LSM780) à la plateforme d'imagerie PIMM.

## **1.2. Culture en support 3D BIOBank®**

Cette première partie était axée sur la comparaison de la culture des CSM sur 3 poudres de biomatériaux. Il a fallu faire un choix pour la poursuite de cette étude, bien que les résultats obtenus penchaient à la fois en faveur de l'utilisation des substituts IngeniOs™ et BIOBank®, nous avons opté pour le substitut allogénique BIOBank®. Compte tenu de notre thématique, nous privilégions l'utilisation de produits biologiques et si possible d'origine humaine, comme le sont les CSM et le LP. L'utilisation future d'IngeniOs™ ou d'Endobon® n'est cependant pas à exclure.

### **1.2.1. Caractéristiques des substituts osseux BIOBank®**

Les biomatériaux BIOBank® proviennent de têtes fémorales humaines, obtenues à partir d'arthroplasties de hanches. Cette procédure concerne exclusivement des donneurs vivants et l'acte ainsi que le suivi sont réalisés en France par des chirurgiens orthopédiques. Il s'agit d'os lyophilisé non déminéralisé (FDBA), commercialisé sous forme de poudre ou de bloc d'os spongieux ou de plaquette d'os cortico-spongieux. Sur le plan chirurgical, le grand bénéfice des allogreffes pour le patient est la nécessité d'un seul site opératoire contrairement aux autogreffes (Dimitriou *et al.*, 2011).

Ce type de greffons présente l'avantage de conserver un potentiel ostéoconducteur en maintenant sa structure trabéculaire après traitements. De plus, il possède une micro- et une macroporosité biologique, naturellement adaptées au soutien de la formation d'un nouveau tissu. C'est pourquoi la plupart des substituts synthétiques tentent de se rapprocher au plus près des caractéristiques de l'os spongieux, car ce dernier possède une macroporosité idéale pour la colonisation cellulaire et la vascularisation du greffon, ainsi qu'une microporosité suffisante pour la diffusion des nutriments et de l'oxygène. Au niveau biologique, les traitements appliqués lors de la préparation et de la stérilisation de l'échantillon vont fortement affecter son potentiel ostéogénique mais aussi son potentiel ostéoinducteur (Betz 2002). Ce dernier étant en parti dû à l'absence de facteurs solubles comme les BMPs. Le fait de cultiver en LP devrait néanmoins rétablir un caractère ostéoinducteur à ce support (Fuerst *et al.*, 2003; Leotot *et al.*, 2013) et l'apport cellulaire, un caractère ostéogénique (Nazirkar *et al.*, 2014).

### **1.2.2. Procédé de traitement Supercrypt®**

Les greffons BIOBank® sont viro-inactivés et stérilisés selon un procédé breveté appelé Supercrypt®. Le fondement de cette technique repose sur l'utilisation du CO<sub>2</sub> supercritique (CO<sub>2</sub>SC) comme solvant naturel. Le CO<sub>2</sub> est soumis à une augmentation conjointe de sa pression et de sa température jusqu'au point critique (260 bars, 50°C), où la transition de l'état solide à l'état gazeux est impossible. Dans cet état, il peut être utilisé comme solvant non polaire et non-toxique, pour éliminer les résidus lipidiques en profondeur et en surface d'un matériau solide, tout en préservant l'intégrité minérale et chimique du greffon (Mitton *et al.*, 2005). Cette méthode va le rendre hydrophile, favorisant ainsi son

hydratation en profondeur par la suite. Conjointement à cette étape, le greffon va être viro-inactivé par traitement au peroxyde d'hydrogène, pour oxyder les protéines résiduelles, à la soude molaire, pour inactiver les prions, et à l'éthanol pour le déshydrater. La dernière étape consiste à irradier les greffons dans leur emballage final, par application de rayons gamma à 25 kGy. Ils sont ainsi stables à température ambiante pour une durée de 5 ans.

### **1.2.3. Développement de la culture 3D des CSM sur substituts osseux BIOBank® en conditions statiques et perfusées**

#### **1.2.3.1. Evaluation de la capacité de différenciation ostéoblastique.**

Dans l'article 2 nous avons démontré qu'HEMOXCell® utilisé à 0.025 g/L boostait la prolifération des CSM en 2D sans perturber leur capacité de différenciation. Avant de passer au développement de la culture en substitut pour l'ingénierie du tissu osseux, nous avons dans un premier temps évalué la différenciation ostéoblastique des CSM au cours du temps en présence de différentes concentrations d'HEMOXCell®.

Pour cela nous avons réalisé le protocole standard de différenciation en plaque 24 puits en présence de 0, 0.025 et 0.05 g/L d'HEMOXCell®. La matrice minérale synthétisée et l'activité PAL ont été révélées à J5, J10, J15 et J20, en duplicat pour chaque condition.

#### **1.2.3.2. Design expérimental de la culture 3D**

La culture en substituts 3D des CSM est réalisée en présence d'HEMOXCell® à la concentration optimale précédemment déterminée, de 0.025 g/L. Concernant la géométrie du support, nous avons opté pour une forme cylindrique de 4 mm d'épaisseur sur 8 mm de diamètre, ce qui correspond à un volume de 0.2 cm<sup>3</sup>, avec une porosité d'environ 70%. Les cylindres sont usinés à la demande par BIOBank® et nous sont délivrés dans des sachets comportant un numéro d'échantillon, le sexe et l'âge du donneur. L'intérêt de l'utilisation de ce type d'échantillon réside dans la reproductibilité des analyses en raison de la géométrie calibrée des échantillons, et de la possibilité d'utiliser des supports provenant d'un même donneur pour une même série d'analyses. De plus, ces cylindres sont adaptables à des systèmes de culture dynamique. Cette dernière caractéristique a été mûrement réfléchie puisque par la suite nous souhaitons faire un parallèle entre la culture en conditions statique et dynamique. Deux milieux de culture seront utilisés en absence (Control, Ctl) ou en présence (MOX) d'HEMOXCell® à 0.025 g/L. Nous appellerons respectivement les conditions en

DMEM, DMEM<sub>Ctl</sub> et DMEM<sub>MOX</sub> et en milieu d'induction ostéoblastique, (OBS) OBS<sub>Ctl</sub> et OBS<sub>MOX</sub>. L'ensemencement a été réalisé avec 1 million de cellules par support, soit  $5.10^6$  cellules par  $\text{cm}^3$ . L'ensemencement avec des densités supérieures n'apporterait à priori, aucun bénéfice (Holy *et al.*, 2000).

#### 1.2.3.3. La culture statique

La cytocompatibilité entre les CSM et le substitut BIOBank® a été validée sur les poudres en absence d'HEMOXCell®. Avant de démarrer les expériences en statique et en perfusion, nous avons commencé par l'analyse de la viabilité cellulaire en DMEM+/- MOX et OBS+/- MOX, sur des supports cultivés en statique. La quantité de cellules vivantes a été déterminée au cours du temps pendant deux semaines, à l'aide du test CCK-8 présenté dans le chapitre II (II.6.2). Comme nous l'avons évoqué dans la partie introductive de ce chapitre, la culture statique n'est pas adaptée aux supports 3D, car elle ne permet pas une distribution uniforme des cellules au sein du support et favorise l'établissement de gradients de nutriments et d'oxygène (Bancroft *et al.*, 2002). Dans cette étude, elle est réalisée en parallèle de la culture en perfusion, pour évaluer la contribution d'HEMOXCell® dans cette condition et pour constituer un témoin d'efficacité par rapport aux supports perfusés.

Les cylindres sont ensemencés en plaques 6 puits, 1 cylindre/puits, avec 80  $\mu\text{l}$  de DMEM contenant  $1.10^6$  cellules. La suspension cellulaire est injectée à l'aide d'une aiguille et d'une seringue, de manière à remplir l'intégralité des pores du cylindre. Les plaques sont ensuite placées à l'incubateur pendant 1 h le temps que les cellules adhèrent. Chaque cylindre est ensuite recouvert de 5 ml de milieu DMEM<sub>Ctl</sub> ou DMEM<sub>MOX</sub> pendant 24h. Après ce délai, les cylindres sont déposés dans de nouvelles plaques 6 puits et une partie des milieux est remplacée par du milieu OBS<sub>Ctl</sub> ou OBS<sub>MOX</sub>. Les cylindres sont cultivés pendant 4 semaines avec 2 renouvellements de milieux par semaine.

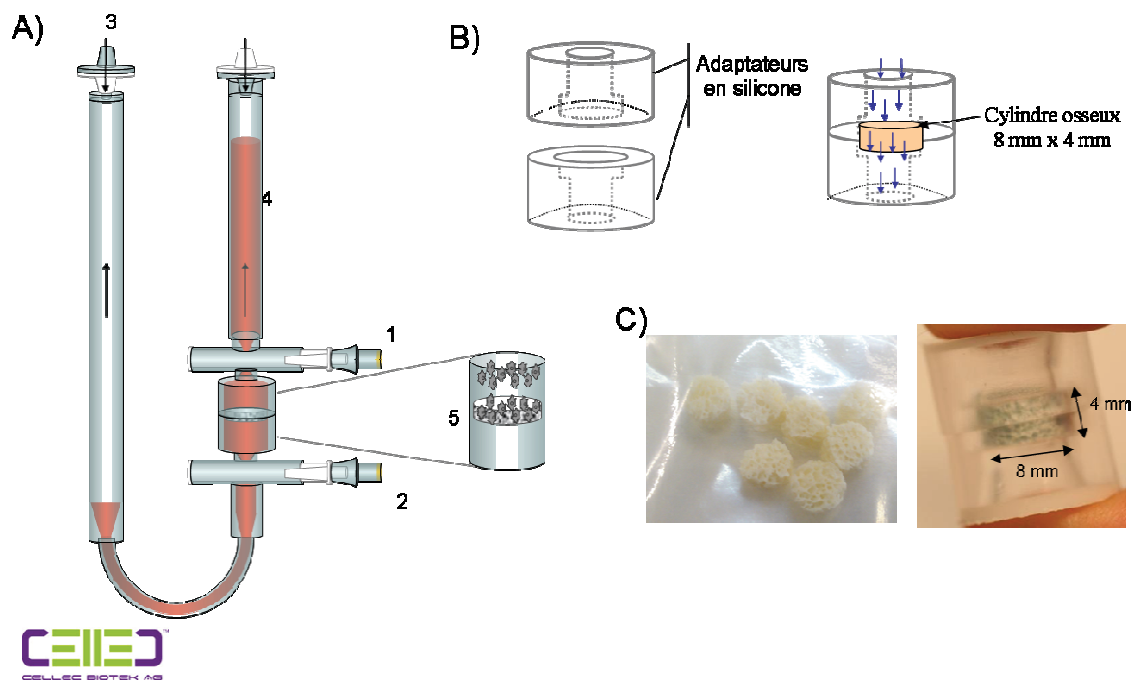
#### 1.2.3.4. La culture en perfusion

Pour la culture en condition dynamique, nous avons travaillé avec le système U-Cup® de CellecBiotek (Bâle, Suisse). Ce système permet l'utilisation simultanée de 10 bioréacteurs à usage unique pour la culture en perfusion de cylindre de 6 à 10 mm de diamètre sur 2 à 4 mm d'épaisseur. Les bioréacteurs sont non-adhérents et peuvent contenir jusqu'à 14 mL de milieu. Des adaptateurs en silicone assurent l'étanchéité du système autour des supports.



Le flux de milieu est appliqué à l'aide de seringues reliées aux extrémités de chaque bioréacteur. Elles effectuent des mouvements de va et vient à vitesse constante, ce qui crée un mouvement de liquide au travers des biomatériaux.

La suspension cellulaire est administrée stérilement au travers d'une valve (Figure 57.A1), puis perfusée avec le milieu. Le mouvement de flux au travers du support va favoriser un ensemencement homogène. Dans chaque bioréacteur nous avons réalisé une injection d'1 million de cellules dans 2 mL de DMEM. Les premières 24 h correspondent à l'ensemencement, elles sont effectuées en DMEM<sub>Ctrl</sub> ou en DMEM<sub>MOX</sub>, à une vitesse de perfusion de 3 mL/min. Après cette étape, les milieux sont renouvelés pour retirer les cellules non-adhérentes et les quatre conditions (DMEM<sub>Ctrl</sub>, DMEM<sub>MOX</sub>, OBS<sub>Ctrl</sub> et OBS<sub>MOX</sub>) sont réalisées en duplicat. Pendant 28 jours les cylindres sont perfusés à une vitesse constante de 0.3 mL/min (Bancroft *et al.*, 2002; Papadimitropoulos *et al.*, 2013). A chaque changement de milieu, un prélèvement homogène de 500  $\mu$ L est réalisé puis stocké à -20 °C, pour le dosage de la phosphatase alcaline.



**Figure 57 – Système de culture en perfusion des CSM sur cylindres BIOBank®.** A) Bioréacteur à perfusion U-Cup®. Le schéma représente les valves de changement de milieu (1. et 2.), l'extrémité du bioréacteur reliée au système de pompe (3.), le milieu de culture (4.), et un agrandissement de la chambre de culture (5.) (d'après <http://www.cellecbiotek.com/>). B) Schéma représentant les adaptateurs en silicone de la chambre de culture. Ils assurent l'étanchéité du système en forçant le flux à passer dans le cylindre. C) Photographies de cylindres osseux dans leur sachet (gauche) et d'un cylindre dans les adaptateurs en silicone (droite).

#### 1.2.3.5. Analyse de l'efficacité d'ensemencement

Un million de CSM a été ensemencé par support, 24 h après nous avons déterminé le pourcentage de cellules ensemencées dans les cylindres pour les conditions statiques et perfusées (=E%). Pour ce calcul nous avons pris en considération la quantité totale de cellules ensemencées (=100%) et soustrait le pourcentage de cellules non-ensemencées (=NE%), ce dernier prenant en compte les cellules adhérentes au fond des puits (pour la condition statique uniquement) additionnées aux cellules en suspension dans le milieu de culture. L'efficacité d'ensemencement est calculée de la manière suivante :  $E\% = 100\% - NE\%$ .

#### 1.2.4. Dosage de la phosphatase alcaline

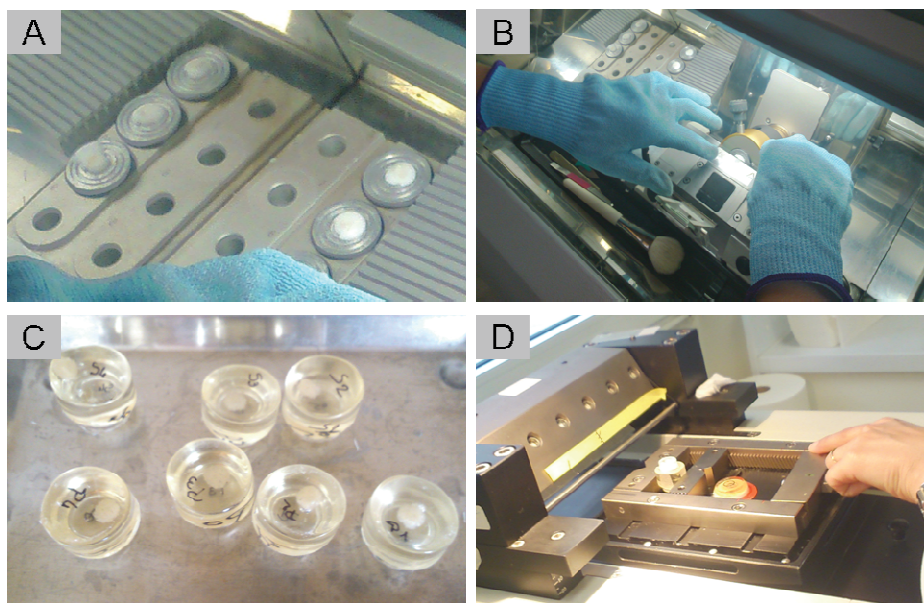
La phosphatase alcaline est une enzyme fortement impliquée dans le processus de formation osseuse, particulièrement dans la minéralisation pendant laquelle elle est sécrétée localement (Farley *et al.*, 1994). Elle est ancrée à l'extérieure de la membrane des lignées ostéoblastiques par association entre un glyco-phosphatidyl-inositol et un phosphatidyl-inositol. La sécrétion de l'enzyme sous sa forme soluble est principalement due à l'action d'inositol-glycan hydrolases. La PAL est couramment utilisée comme marqueur de l'ostéogénèse car elle reflète la proportion de cellules ostéo-compétentes et/ou ostéo-différenciées (Prins *et al.*, 2014; Shima *et al.*, 2015). Elle est principalement dosée après lyse cellulaire, cependant il a aussi été montré qu'elle était sécrétée par les cellules ostéoblastiques, ce qui permet de la doser dans le milieu de culture. Comme nous avons 4 conditions de culture à tester en duplicat et seulement 10 bioréacteurs disponibles avec le U-Cup®, nous avons choisi de doser la quantité d'enzyme relarguée par les CSM directement dans le milieu de culture à l'aide du SensoLyte® pNPP Alkaline Phosphatase Assay Kit (Anaspec, Inc). Le protocole utilisé est détaillé dans l'article 3.

#### 1.2.5. Analyse de la cellularisation et de la morphologie cellulaire

Pour réaliser les coupes d'échantillons cellularisés, nous disposons dans notre unité d'un cryostat (Figure 58A,B). Son utilisation impose de réaliser en amont, une décalcification partielle des échantillons avec du Super Decalcifier I (Polysciences), pour faciliter leur découpe. Nous avons réalisé des essais de décalcification à différents temps d'incubation en

piquant une aiguille, pour déterminer la durée permettant le passage de l'aiguille au travers du cylindre. Selon la densité de l'échantillon, ce temps variait entre 20 et 30 minutes.

Les étapes de décalcification et de congélation, réalisées lors de la préparation des échantillons, sont susceptibles de les altérer. En réalisant des observations microscopiques préliminaires, nous avons en effet remarqué un décollement cellulaire. Afin de vérifier si ce phénomène était lié à la technique utilisée, nous avons réalisé des analyses histologiques au Laboratoire d'Ingénierie Ostéo-Articulaire et Dentaire (LIOAD) de Nantes. Ils utilisent une techniques d'enrobage dans une résine à base de méthylméthacrylate, ne nécessitant ni décalcification, ni congélation (Figure 58C,D).



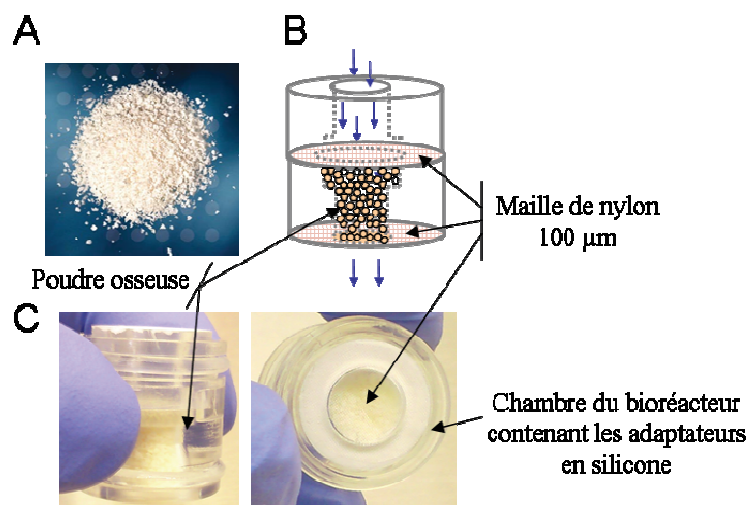
**Figure 58 – Techniques utilisées pour la réalisation des coupes histologiques.** A) Les échantillons sont enrobés d'OCT sur des platines placées dans le cryostat à -20 °C (Microm HM 550, Thermo Scientific™). B) Photographie de l'enceinte du cryostat. C) Photographie des échantillons enrobés de résine Technovit 9100. D) La surface de l'échantillon est placée parallèlement au rasoir du Polycut Leica SM2500 (Leica Biosystems). Les coupes sont réalisées à température ambiante.

Cette technique est réalisée après fixation des échantillons au PFA 4% pendant 24h à 4°C. Les cylindres sont ensuite déshydratés par des bains successifs d'éthanol 70, 80, 95 et 100%, pendant 24 h chacun. Ils sont par la suite plongés dans du xylène pour faciliter l'imprégnation. Enfin, les échantillons sont imprégnés pendant plusieurs jours dans différentes solutions de Technovit 9100 New® (Heraeus Kulzer GmbH) en présence ou en absence d'un catalyseur de radicaux libres, selon les recommandations du fournisseur. La polymérisation finale se fait à -20 °C en présence d'un initiateur de polymérisation et d'un régulateur de température.

Ces deux techniques ont été testées en parallèle pour les cylindres cultivés en statique et en perfusion. Des colorations histochimiques à l'hématoxyline & éosine ainsi qu'au pentachrome de Movat, sont réalisées sur les coupes obtenues. La morphologie cellulaire est observée en MEB sur os décalcifié à la plateforme PIMM. Les protocoles ainsi que les résultats correspondant sont présentés dans l'article 3.

### 1.2.6. Mise au point de la culture en perfusion à partir de poudre BIOBank®

L'utilisation de bloc osseux en chirurgie dentaire nécessite une étape de façonnage du substitut pour qu'il puisse s'adapter au site receveur. L'une des possibilités est l'utilisation d'os sous forme de granules (Boulic, 2015). Nous avons essayé d'adapter le système U-Cup® à la culture en perfusion de poudre BIOBank® ( $\approx 500\mu\text{m}$ ). La difficulté était de développer une technique simple permettant à la fois le maintien des granules dans les adaptateurs et le passage des cellules au cours de l'étape d'ensemencement. A cet effet, nous avons opté pour une maille en nylon de  $100\mu\text{m}$  de porosité, découpée dans des tamis cellulaires (Corning™). La figure 59, ci-dessous, illustre le prototype mis en place.



**Figure 59 – Prototype de culture en perfusion de la poudre osseuse.** A) Poudre d'os BIOBank® ([www.biobank.fr](http://www.biobank.fr)). B) Schéma de la chambre de culture. C) Photographies du prototype vue de côté (gauche) et de dessous (droite).

La culture des poudres a été testée uniquement en milieu  $\text{OBS}_{\text{Cu}}$  et  $\text{OBS}_{\text{MOX}}$  pendant 28 jours. Passé ce délai, des cylindres de granules cellularisés ont été délicatement sortis du montage, une cohésion inter-granules probablement d'origine matricielle, a rendu le démoulage possible. Les structures obtenues ont été fixées 24h à  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  puis décalcifiées 20

min avant d'être enrobées dans de l'OCT, puis découpées au cryostat ( $7\ \mu\text{m}$ ). Les lames sont colorées à l'H&E et observées au microscope.

### **1.2.7. Evaluation de la différenciation des CSM en ostéoblastes par PCR quantitative en temps réel**

La PCR quantitative (PCRq) en temps réel est utilisée afin d'évaluer l'expression relative de gènes caractéristiques de l'engagement des CSM vers la voie ostéoblastique. Cette technique permet la quantification du produit de la PCR au fur et à mesure des cycles, de façon fiable et routinière. Cette technologie est basée sur la détection d'un rapporteur fluorescent, dont la consommation est directement proportionnelle à la quantité d'amplicons générée pendant la réaction PCR. La PCRq permet de déterminer le nombre de cycles à partir duquel le produit PCR est détectable, ce qui correspond au nombre de cycle seuil (Ct en anglais pour Cycle threshold). Cette valeur va dépendre de la quantité de matrice initialement présente dans l'échantillon amplifié.

Cette méthode permet de détecter sensiblement, voire même de quantifier les ARN messagers, et donc proportionnellement, les gènes qui sont exprimés au niveau d'un organe, d'un tissu ou d'un type cellulaire. L'objectif étant de déterminer et/ou de comparer des niveaux d'expression entre différents types cellulaires ou différentes conditions de culture.

#### **1.2.7.1. Extraction des ARN totaux**

L'extraction des ARN totaux a été réalisée à l'aide du kit RNeasy® Plus Mini (Qiagen®), selon les spécifications du fabricant. Nous avons adapté la première étape du protocole pour pouvoir réaliser l'extraction à partir des cylindres cellularisés. Les échantillons sont répartis en tubes Eppendorf®, puis  $350\ \mu\text{L}$  de tampon RLT sont déposés par échantillon. Les tubes sont vigoureusement vortexés pendant 30 secondes, puis complétés à  $700\ \mu\text{L}$  avec de l'éthanol 70%. Les préparations sont de nouveau vortexées pendant 30 secondes, puis centrifugés 20 à 30 secondes à 300 g pour culoter les débris osseux générés au cours des étapes précédentes. Les  $700\ \mu\text{L}$  de solution sont ensuite prélevés avec précaution et déposés dans les colonnes d'extraction fournies avec le kit. Après l'élution finale, la pureté et la concentration des ARN sont déterminées avec un nano spectrophotomètre (NanoPhotometer™ UV/Vis Spectrophotometer, Implen). Les ARN sont conservés à  $-80\ ^\circ\text{C}$  jusqu'à leur utilisation. La transcription inverse ou reverse transcription (RT) de 500 ng d'ARN totaux, est réalisée à l'aide du kit SuperScript™ II Reverse Transcriptase

(Invitrogen™), en accord avec les instructions du fabricant. Au cours de cette étape les ARN purifiés, sont convertis en ADN complémentaires (ADNc) à l'aide d'amorces oligo(dT)<sub>25</sub>, de dNTP et d'une polymérase thermorésistante, la SuperScript™ II Reverse Transcriptase. La synthèse du second brin d'ADNc est réalisée lors d'une autre étape, par une ADN polymérase thermorésistante, la Taq polymérase.

### 1.2.7.2. PCR quantitative en temps réel

La quantification relative des cibles d'intérêt est réalisée à l'aide du kit QuantiTect® SYBR® Green (Qiagen®).

Ce kit comprend un mix PCR, le QuantiTect® SYBR® Green PCR Master Mix et la HotStarTaq® DNA polymerase, un mix de dNTP et un agent intercalant de l'ADN, le SYBR Green I. Ce dernier émet de la fluorescence seulement lorsqu'il est lié à de l'ADN double brin. L'appareil de lecture utilisé est le LightCycler® 480 Real-time PCR system (Roche), en format plaque 96 puits. Le mélange réactionnel est réalisé selon le tableau 16 ci-dessous, pour un volume final de 10 µL.

**Tableau 16 – Composition d'un mix réactionnel pour la PCRq** Les réactifs proviennent du kit QuantiTect® SYBR® Green (Qiagen®). Les volumes sont adaptés au nombre de réaction.

| Volume par puits (µL) | Réactifs                               |
|-----------------------|--|
| 5                     | 2x Quantitec SYBR Green PCR Master Mix |
| 0,5                   | Amorce sens (0,5 µM)                   |
| 0,5                   | Amorce anti-sens (0,5 µM)              |
| 3                     | Eau RNase-free                         |
| 1                     | ADNc dilué                             |

Chaque échantillon analysé est déposé en triplicat pour chaque couple d'amorces. Les conditions d'amplification utilisées sont résumées dans le tableau 17.

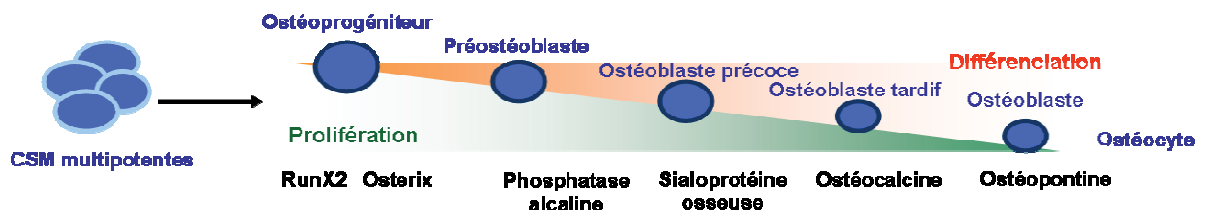
**Tableau 17 – Paramètres d'amplification des PCRq.**

| Etapes                          | Température (°C) | Durée      | Vitesse de chauffage (°C/s) |
|---------------------------------|------------------|------------|-----------------------------|
| Activation de la Taq polymérase | 95               | 15 min     | 4,4                         |
| 45 cycles de PCR                | Dénaturation     | 15 s       | 2,2                         |
|                                 | Hybridation      | 30 s       | 2,2                         |
|                                 | Elongation       | 30 s       | 4,4                         |
| Refroidissement                 | 40               | 10 s       | 2,2                         |
| Courbe de fusion                | 45               | 5 s        | 4,4                         |
|                                 | 65               | 1 s        | 2,2                         |
|                                 | 95               | En continu | 0,11                        |

Pour l'analyse des résultats nous avons opté pour la quantification relative normalisée par un calibrateur. Cette quantification ne nécessite pas de connaître la valeur absolue du nombre de copies d'ADNc présentes dans les échantillons, mais uniquement les Ct des gènes cibles. Les résultats sont exprimés en unité de quantification relative ce qui correspond à un ratio normalisé.

Ce dernier correspond au rapport des Ct cible/référence de chaque échantillon, normalisé par le rapport des Ct cible/référence d'un échantillon appelé calibrateur. Le calibrateur est un contrôle positif pour les gènes cibles et la référence, dans notre étude il s'agit de l'ADNc d'un échantillon cultivé en milieu standard DMEM. Les gènes utilisés comme références sont des gènes dits « de ménage » ou *house keeping genes* (HKG) en anglais. Leur expression doit être stable dans les échantillons et dans les conditions expérimentales utilisées. Ici le gène de référence est celui codant la  $\beta$ -actine (ACTB).

Les gènes cibles sont sélectionnés pour leur implication au cours de l'ostéogénèse, voir figure 60 (Beederman *et al.*, 2013).



**Figure 60 – Représentation schématique des marqueurs ostéoblastiques exprimés au cours de la différenciation osseuse** (adapté de Beederman *et al.* 2013).

Les différentes amorces utilisées ont été dessinées sur le site internet de PrimerQuest (<http://eu.idtdna.com/primerquest/home/index>) de manière à ce qu'elles couvrent la jonction entre deux exons et que l'amplicon généré après RT-PCR, soit d'environ 150 paires de bases (pb) (Tableau 18 ci-contre).

Le test-t de Student est utilisé pour comparer les différents résultats obtenus entre les échantillons. Seuls les résultats dont  $p < 0.05$  seront considérés comme significatifs. Les amorces sont validées sur gel d'agarose à partir d'un ARN témoin obtenu à partir d'une lignée ostéoblastique (C-1407, Promocell).

Puis l'efficacité et la fidélité de chaque couple d'amorce sont vérifiées par dilution sérielle de l'ADNc cible. Seules les amorces ayant une efficacité proche de 2 seront conservées.

**Tableau 18 - Séquences des amorces utilisées pour la PCRq.**

La taille de chaque amplicon est exprimée en paires de bases (pb). F=Forward pour amorce sens, R=Reverse pour amorce anti sens.

| Gène & Symbole  | Numéro accession | Amorce & Séquence | Taille amplicon (pb)                       |     |
|---|------------------|-------------------|--|-----|
| <b>β actine</b>   | <i>ACTG1</i>     | NM_001101.3       | ACTB_F<br>TCTCCATGTCGTCGCCAGTTG            | 164 |
|   |                  |                   | ACTB_R<br>AGTCTTCCCCTCCATCGTTG             |     |
| <b>Ribosomal Protein L13a</b>   | <i>RPL13A</i>    | NM_001270491\$    | RPL13A_F<br>CTATGACCAATAGGAAGAGCAAC<br>C   | 121 |
|   |                  |                   | RPL13A_R<br>GCAGAGTATATGACCAGGTGGAA        |     |
| <b>Collagène de type alpha 1</b>  | <i>COL1A1</i>    | NM_000088         | COL1A1_F<br>TGTGGCCCAGAAGAAGACTGGTACA<br>T | 89  |
|   |                  |                   | COL1A1_R<br>ACTGGAATCCATCGGTCATGCTCT       |     |
| <b>Phosphatase Alcaline</b>   | <i>ALPL</i>      | NM_000478.4       | TNAP_F<br>ATTCTCTTGGGCAGGCAGAGAG<br>T      | 118 |
|   |                  |                   | TNAP_R<br>ATCCAGAATGTTCCACGGAGGCT<br>T     |     |
| <b>Ostéopontine</b><br>(secreted phosphoprotein 1)                          | <i>SPP1</i>      | NM_001251830      | SPP1_F<br>AGAATGCTGTGTCCTCTGAAG            | 146 |
|   |                  |                   | SPP1_R<br>GTTTCGAGTCAATGGAGTCCTG           |     |
| <b>Runt-related 2</b><br>(core-binding factor subunit alpha-1)              | <i>RUNX2</i>     | NM_001024630      | RUNX2_F<br>GGCCCACAAATCTCAGATCGTT          | 184 |
|   |                  |                   | RUNX2_R<br>CACTGGCGCTGCAACAAGAC            |     |
| <b>glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase</b>                            | <i>GAPDH</i>     | NM_002046.4       | GAPDH'_F<br>AGCCACATCGCTCAGACAC            | 66  |
|   |                  |                   | GAPDH'_R<br>GCCCAATACGACCAAATCC            |     |
| <b>Ostéocalcine</b><br>(bone gamma-carboxyglutamic acid-containing protein) | <i>BGLAP</i>     | NM_199173         | OC_F<br>CAGCGAGGTAGTGAAGAGAC               | 144 |
|   |                  |                   | OC_R<br>TGAAAGCCGATGTGGTCAG                |     |
| <b>Ostéonectine</b>   | <i>ON</i>        | NM_001309444.1    | ON_F<br>TCCACAGTACCGATTCTCTCT              | 182 |
|   |                  |                   | ON-R<br>TCTATGTTAGCACCTTGCTCCAG            |     |
| <b>Bone morphogenetic protein 2</b>   | <i>BMP2</i>      | NM_001200.2       | BMP2_F<br>CCCGCTGTCTTCTAGCGTT              | 107 |
|   |                  |                   | BMP2-_R<br>CTGTTTCAGGCCGAACATGC            |     |



---

## 2. Ingénierie tissulaire du ménisque

---

### 2.1. Génération d'un substitut méniscal cellularisé *in vitro*

L'ingénierie tissulaire constitue actuellement une approche thérapeutique innovante pour la réparation méniscale. Les cellules, ainsi que les substituts utilisés, sont essentiels à la réussite de cette pratique. Dans cette dernière partie expérimentale, nous évoquerons les méthodes utilisées pour analyser la compatibilité entre les CSM et un substitut méniscal allogénique, le MENISC-T® (TBF Génie tissulaire). Ce dernier est évoqué dans la partie introductive de ce troisième chapitre (sous partie 3.4.2.2.) Il est admis qu'en culture 3D la prolifération cellulaire est limitée à la périphérie en raison des gradients de pH, de nutriments d'oxygène, qui s'établissent de l'extérieur vers le centre du support (Volkmer *et al.*, 2012). Pour tenter de limiter ces phénomènes, et ainsi préserver la viabilité cellulaire, nous avons réalisé des cultures dynamiques 3D des CSM, en présence d'HEMOXCell®, pour stimuler la prolifération cellulaire et satisfaire les besoins en oxygène. Le raisonnement suivi est similaire à celui développé pour le substitut osseux. Quatre 4 conditions de culture sont testées : DMEM +/- MOX et milieu d'induction chondrogénique (CM) +/- MOX. Nous les appellerons respectivement DMEM<sub>Ctl</sub>, DMEM<sub>MOX</sub>, CM<sub>Ctl</sub> et CM<sub>MOX</sub>.

#### 2.1.1. Design expérimental

##### 2.1.1.1. Le MENISC-T®

Le MENISC-T® est un ménisque humain allogénique provenant de donneurs vivants. Le donneur doit répondre aux critères de sélection établis par l'Agence de la Biomédecine, tels que l'absence de signes neurologiques, de risque de transmission d'agents non-conventionnels et d'infection généralisée. Un statut clinique est dressé par l'orthopédiste responsable du prélèvement et la conformité sérologique est vérifiée (Hépatites B et C, HIV 1 et 2, syphilis). Les substituts conformes subissent un traitement spécifique, le procédé Phoenix®. Ce dernier comporte différentes étapes telles que l'inactivation virale, par des traitements chimiques et mécaniques, une délipidation, une lyophilisation et une

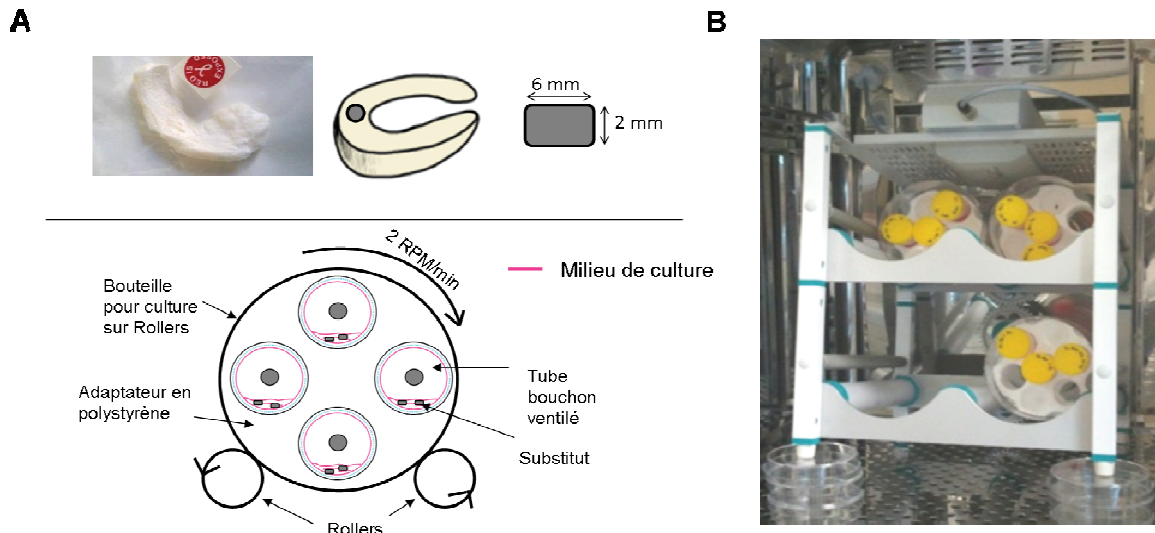
radiostérilisation gamma. Les substituts sont systématiquement délivrés avec leur certificat de conformité. Ces procédés ont été préalablement élaborés et validés sur des ménisques bovins, puis adaptés aux ménisques humains. Le MENISC-T® rentre dans la catégorie des tissus d'origine humaine. De ce fait, il doit répondre à certains critères, tels que l'absence de risque de transmission d'agents pathogènes (virus, bactéries), et être biocompatible, ce qui implique de s'assurer de l'absence de cellules résiduelles après traitements. Par ailleurs, il faut s'assurer du maintien de la structure collagénique du tissu d'origine. C'est en effet les différentes orientations des fibres de collagène du tissu méniscal, qui sont en grandes parties responsables des fonctions biomécaniques de ce tissu (McDevitt & Webber, 1990; Makris *et al.*, 2011).

### **2.1.2. Culture dynamique en système rotatif**

La culture dynamique de CSM en substitut méniscal a été initiée dans un système de culture rotatif, le système CELLROLL® (Integra Biosciences) (Figure 61B). Il permet une agitation douce, avec une vitesse de rotation maximale de 2 RPM (rotations par minute). Le mouvement de milieu créé par la rotation, limite la formation de gradients principalement autour des supports. Ce type de système est en général utilisé pour la culture à grande échelle de cellules adhérentes. Des cylindres de MENISC-T® sont réalisés à l'aide punches à biopsie de 6 mm (Stiefel®) (Figure 61A). Des tranches de 2 mm d'épaisseur sont découpées au scalpel et ensemencées avec  $1.10^5$  cellules. L'ensemencement est réalisé par injection de 40  $\mu$ L de suspension cellulaire en DMEM complété. Les premières 24h de culture sont réalisées en statique, pour favoriser l'adhérence cellulaire et permettre le calcul de l'efficacité d'ensemencement. Des bouteilles de culture sur rollers (850 cm<sup>2</sup>), fournies avec le système, sont modifiées pour recevoir des tubes Falcon de culture cellulaire (Corning®). Les bouteilles sont sciées en 2 pour permettre l'insertion d'adaptateurs en polystyrène, d'un diamètre identique aux bouteilles, dans lesquels nous avons fait des trous pour y glisser les tubes Falcon (3 à 5/ demi-bouteille). L'appareil est légèrement incliné, afin d'empêcher le milieu de culture d'entrer en contact avec les bouchons ventilés. Le schéma du principe expérimental est représenté dans la figure 61 ci-contre.

Le prototype ainsi mis en place, permet de cultiver en parallèle jusqu'à 20 tubes, alors qu'à l'origine, il ne permettait la rotation que de 4 bouteilles à la fois. Les supports cellularisés (2/tube et 3 tubes/condition) sont cultivés pendant 4 semaines en agitation continue 2 RPM (37°C, 5% CO<sub>2</sub>), avec 2 changements de milieux par semaine. Au total il y a

6 échantillons par condition : 2 sont fixés au PFA 4% puis inclus en OCT pour réaliser des analyses histochimiques, 2 autres sont fixés au glutaraléhyde 2.5 % pour être analysés en MEB, et les 2 derniers sont analysés avec le test Live/Dead®. Les protocoles sont identiques à ceux utilisés pour le substitut BIOBank®, à la différence que le ménisque ne nécessite pas d'étape de décalcification.



#### 2.1.2.1. Efficacité d'ensemencement

Après 24h de culture, l'efficacité d'ensemencement est analysée pour chaque condition de culture en triplicat. Les cellules adhérentes au fond des puits sont poolées avec celles dans le milieu de culture. Le dénombrement est réalisé avec un compteur cellulaire automatique (ADAM, Labtech). L'efficacité d'ensemencement est calculée en pourcentage par rapport à la quantité de cellules totale (*i.e.*,  $1 \cdot 10^5$  cellules/cylindre).

#### 2.1.2.2. Analyse de la viabilité cellulaire

La viabilité cellulaire est analysée après 4 semaines de culture à l'aide du kit Live/Dead® (MolecularProbes®, LifeTechnologies™). Pour permettre l'observation des

cellules viables au centre des supports, ces derniers sont coupés en deux avant de réaliser le protocole de marquage.

### 2.1.2.3. Analyse de la colonisation des substituts

La cellularisation des échantillons est analysée sur coupes histologiques et en MEB, afin d'avoir à la fois une vue d'ensemble de la cellularisation et des indications sur la morphologie cellulaire. Une partie des cylindres est traitée pour la réalisation de coupes au cryostat, avec une étape de fixation au PAF 4% 24h à 4°C puis 24h d'enrobage en OCT à 4°C (Tissue-Tek® 4583). Des sections de 7  $\mu\text{m}$  sont colorées à l'H&E pour chaque condition et observées en microscopie (Axio Imager 2, Zeiss).

L'adhérence et la morphologie cellulaire sont visualisées au en MEB selon le protocole précédemment décrit (1.1.2). Des substituts acellulaires incubés en  $\text{DMEM}_{\text{Ctl}}$ , dans les mêmes conditions sont utilisés comme contrôles.

### 2.1.3. Culture statique sur sections de substitut méniscal

Nous avons initialement envisagé de tester la culture en perfusion avec des cylindres méniscaux, mais nous nous sommes heurtés à des difficultés techniques. En effet, la densité de la matrice collagénique méniscale gênait le passage du flux de milieu au travers des cylindres. Par ailleurs, un gonflement de ces derniers a été observé.

Nous avons donc été contraints de réaliser des cultures en mode statique. A cet effet, des sections transversales de MENISC-T®, de 2 mm d'épaisseur, ont été réalisées à l'aide d'un scalpel. Les échantillons ainsi obtenus permettaient d'observer les différentes orientations du collagène. Chaque échantillon estensemencé en plaque 6 puits (1 échantillon/puits) par une injection de 100  $\mu\text{L}$  contenant  $1.10^6$  cellules. Les analyses sont effectuées après 4 semaines de culture, pour comparer les résultats obtenus avec ceux en culture rotative, et après 8 semaines de culture, pour apprécier l'évolution des substituts cellularisés sur le long terme. Les conditions de culture sont identiques à celles utilisées pour la culture dynamique.



## - Chapitre IV -

# Résultats

---

*Les résultats du chapitre IV seront présentés en deux parties distinctes. La première concernera l'optimisation de la cellularisation des substituts osseux, sous la forme de poudre et sous forme cylindrique, en statique et en perfusion en présence d'HEMOXCell®. La culture réalisée sur les cylindres d'os BIOBank® sera présentée dans l'article 3 :*

**Article 3: “Perfusion culture of human MSCs with a marine oxygen carrier improves cell adhesion and proliferation on allogenic bone scaffold.”**

Fiona Le Pape, Gaëlle Richard, Emmanuelle Porchet, Sophie Sourice, Richard Pace, Jérôme Guicheux, Frédéric Dubrana, Claude Férec, Valérie Polard, Pierre Weiss, Franck Zal, Pascal Delépine et Elisabeth Leize

*La seconde partie rapportera les résultats obtenus lors de l'évaluation de l'impact d'HEMOXCell® dans la culture de cellules souches mésenchymateuses dans le substitut méniscal MENISC-T®. Un quatrième article est en préparation.*

---



---

# 1. Optimisation de la cellularisation d'un substitut osseux *in vitro* avec une hémoglobine marine

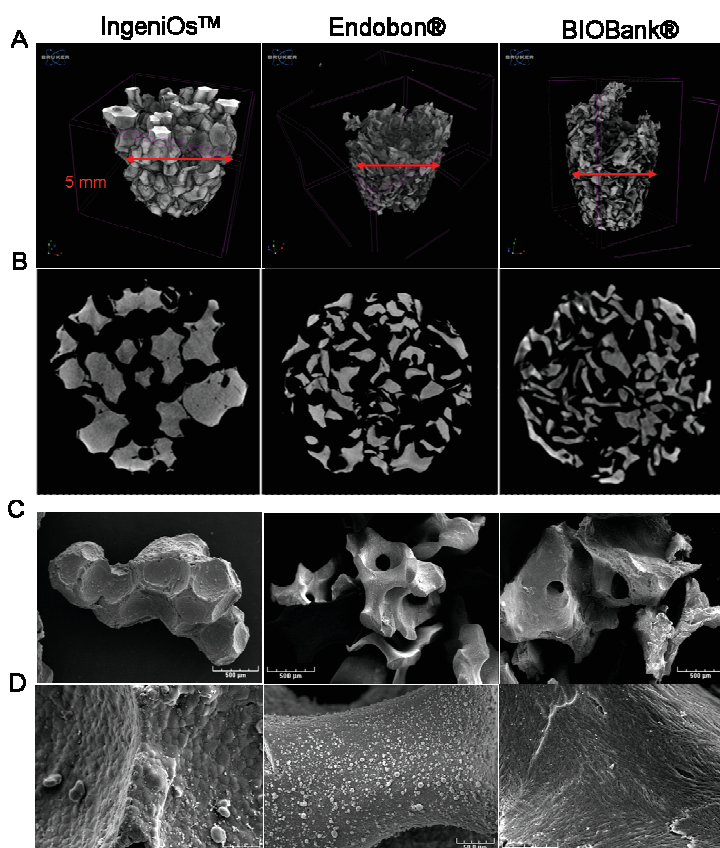
---

## 1.1. Choix du support de l'étude

### 1.1.1. Analyse structurale des poudres inertes

La structure des poudres utilisées est analysée selon deux techniques, la première consiste en la réalisation d'une représentation 3D en tomographie à rayons X de la matrice minérale et la seconde en une analyse en microscopie électronique à balayage de la surface des biomatériaux.

Les analyses tomographiques avaient pour objectif de créer des reconstitutions 3D des poudres de différentes origines, IngeniOs™ (Zimmer Dental), Endobon® (BIOMET 3i™) et la poudre de chez BIOBank® (Figure 62A), afin de visualiser et calculer, l'espace libre entre les granules et de définir leur densité. La porosité des échantillons est analysée avec le logiciel CTan (Bruker) à partir d'un rapport entre le volume de biomatériau et le volume total.



**Figure 62 – Analyse microstructurale des poudres de substituts osseux en tomographie à rayons X et en MEB.** La densité minérale de 80 mg de poudres IngeniOs™, Endobon® et provenant de BIOBank®, cultivées en  $\alpha$ MEM + 5% LP, a été évaluée au Skyscan 1272 (A, B). Pour chaque échantillon des reconstitutions 3D sont réalisées (A) ainsi que des radiographies transversales (B). La flèche rouge représente environ 5 mm et délimite la zone de la coupe. L'analyse en MEB de la macro et microstructure des substituts est représentée au grossissement x50 (C) et x 500 (D).

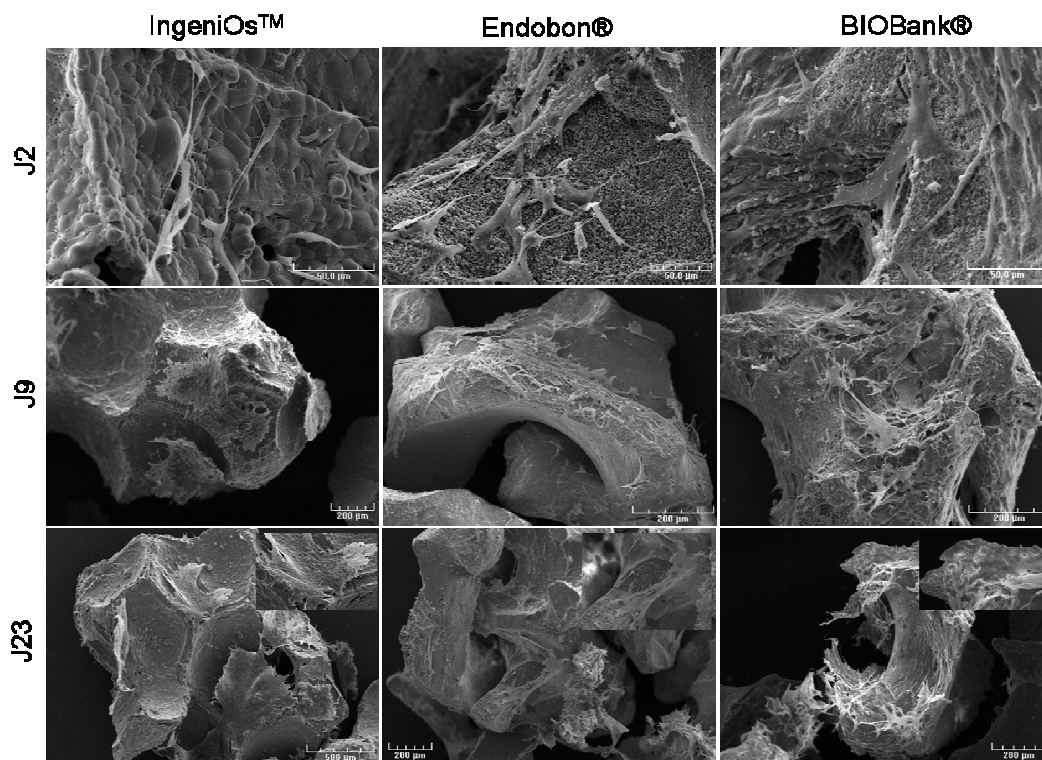


La poudre BIOBank® présentait une porosité de  $70.8 \pm 5.7 \%$ , ce qui correspond à celle estimée par le fournisseur ( $\pm 80 \%$ ). Une porosité légèrement inférieure est calculée pour Endobon®, avec une moyenne de  $64.1 \pm 4.7 \%$  et le minimum est obtenu pour IngeniOs®,  $58.3 \pm 1.9 \%$ . Le logiciel CTVox est utilisé pour reconstituer des images 3D des échantillons (1158 images de  $1920 \times 1920$  pixels) (Figure 62A) des coupes transversales sont obtenues à partir des reconstitutions 3D (Figure 62B). Les images obtenues avec Endobon® et BIOBank® sont visuellement identiques. La taille des granules synthétiques IngeniOs™ est plus importante que celle de ses homologues biologiques. La surface de culture est donc moindre pour un même volume de poudre.

La figure 62 (C,D) illustre respectivement la macro- et la microarchitecture des poudres IngeniOs™, Endobon® et BIOBank® en MEB. Comme pour l'analyse morphométrique, on retrouve des similitudes entre Endobon® et la poudre BIOBank®, en termes de taille mais aussi d'aspect (diamètre des pores et morphologique). La surface du biomatériau IngeniOs™ présente des aspérités creuses et arrondies, et sa microstructure possède un relief avec une multitude de formes arrondies. La surface du substitut Endobon® est lisse et celle de BIOBank® présente un aspect fibreux.

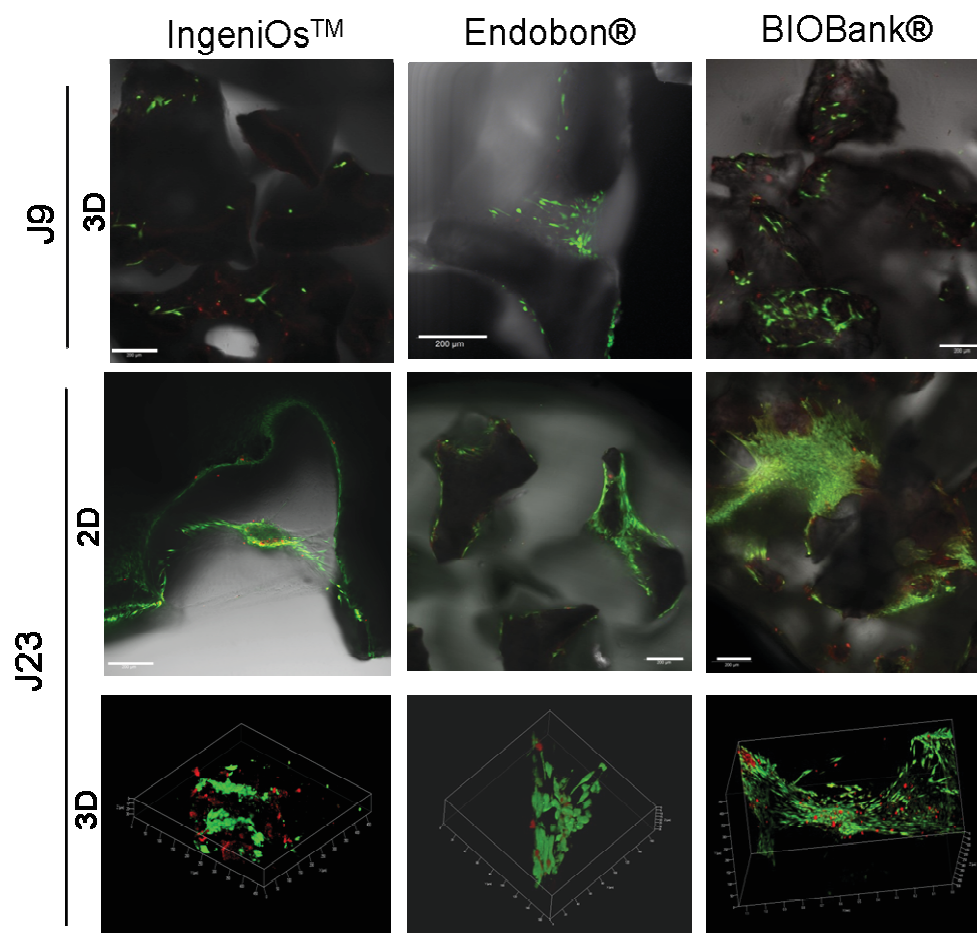
### **1.1.2. Analyse de la prolifération et de la viabilité cellulaire**

Les 3 biomatériaux ont été cultivés avec des CSM pendant 23 jours. L'adhérence et la prolifération cellulaire sont analysées en MEB à J2, J9 et J23 (Figure 63). L'analyse à J2 permet d'évaluer l'adhérence et la morphologie cellulaire en début de culture. Les photographies réalisées à J2 montrent que le contact cellules/support s'effectue avec une efficacité similaire entre les différentes poudres (Figure 63). Quel que soit l'origine du support, les CSM adhèrent à la surface des poudres avec une morphologie tantôt fibroblastique, tantôt aplatie, avec de nombreux prolongements cytoplasmiques. Les résultats obtenus montrent une augmentation de la quantité cellulaire entre J2 et J9, avec des zones confluentes. Entre J9 et J23, la différence est plus discrète en raison de l'importante densité cellulaire, les cellules forment un tapis relativement dense, qui ne laisse plus apparaître les jonctions membranaires à J23. Les 3 matériaux semblent favoriser l'adhérence et la prolifération dès le deuxième jour de culture. La densité cellulaire rend difficile l'observation morphologique, cependant les monocouches paraissent plus homogènes avec Endobon® et la poudre BIOBank®. Les cellules ont tendance à s'amasser dans les creux à la surface du biomatériau IngeniOs™.



**Figure 63 - Analyse de l'adhérence et de la prolifération des CSM sur les poudres de biomatériaux au MEB.** Les poudresensemencées avec  $1.10^6$  cellules/100 mg ont été cultivées 23 jours en condition standard. L'analyse en MEB a été réalisée à J2, J9 et J23. Les images sont représentatives des 3 poudres cellularisées et montrent des cellules adhérentes formant des connexions entre elles et avec leurs supports.

L'analyse de la viabilité en microscopie confocale permet en revanche d'apprécier la morphologie fibroblastique, caractéristique des CSM, jusqu'au 23<sup>ème</sup> jour de culture (Figure 64 ci-après). Elles n'ont en effet pas subi de traitement pouvant altérer leur aspect, comme c'est le cas pour l'analyse en MEB. Les résultats montrent une forte viabilité cellulaire (cellules vertes) à la fois à 9 jours et à 23 jours de culture. Bien que la différence de densité ne soit pas flagrante entre les 3 biomatériaux à J9, les résultats à J23 (2D) montrent une densité cellulaire similaire entre IngeniOs™ et Endobon®, mais moins dense que pour l'os BIOBank®.



**Figure 64 – Analyse de la viabilité cellulaire sur poudres de substituts osseux.**

La viabilité est analysée avec le test Live/Dead® à J9 et J23. Les cellules vivantes sont marquées en vert et les cellules mortes en rouge. Les barres d'échelle correspondent à 200  $\mu\text{m}$ .

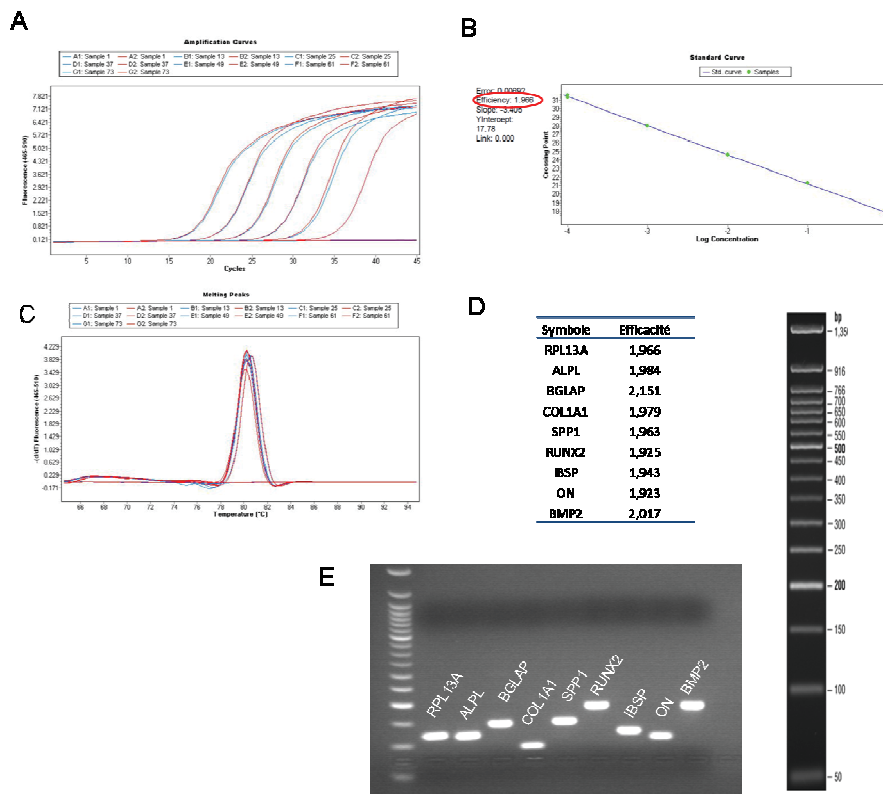
La microscopie confocale permet d'apprécier la cellularisation sur le plan focal, mais pas en profondeur. Toutefois, des reconstitutions 3D peuvent être réalisées à l'aide d'outils d'analyse complexes, en cumulant plusieurs coupes. Cela permet de faire des rendus volumiques d'une série d'images et de ce fait, de reconstituer une image 3D de l'échantillon analysé. Ces analyses sont réalisées avec le logiciel ZEN (microscope confocal ZEISS LSM 780) à partir d'images acquises sur une zone donnée des échantillons de poudre. Un résultat représentatif de chaque condition est intégré dans la figure 64 (J23, 3D). Les reconstitutions 3D obtenues montrent la formation de structures multicellulaires avec des cellules orientées et de forme allongée. La culture réalisée avec IngeniOs® n'est pas homogène : des amas cellulaires sont clairement distingués, et il apparaît une proportion de cellules mortes plus importante en comparaison aux poudres biologiques.

Les substituts testés semblent supporter efficacement à la fois la prolifération et la viabilité cellulaire. Il ressort néanmoins de ces résultats, que les supports Endobon® et

BIOBank® sont plus propice à la prolifération cellulaire. Au vu des résultats et afin de rester dans une thématique d'ingénierie tissulaire utilisant des produits humains, nous avons sélectionné le substitut BIOBank® pour la suite de notre étude.

### 1.1.3. Validation des couples d'amorces

Les amorces dessinées pour l'analyse de la différenciation ostéoblastique ont été validées de deux manières, tout d'abord en réalisant le calcul de l'efficacité d'amplification des amorces, puis en réalisant les courbes de fusion (*Melting Curves*) des amplicons générés. Pour le calcul de l'efficacité, l'ADNc contrôle est dilué selon une gamme de raison 10 puis amplifié avec les couples d'amorces à valider (Figure 65A). La droite correspondant aux Ct des solutions diluées est utilisée pour calculer l'efficacité des couples. La pente de la droite doit être comprise entre 3,2 et 3,7, ce qui représente respectivement une efficacité de 100% et 86 %.



**Figure 65 - Analyse de la spécificité d'amplification des amorces pour l'analyse de la différenciation ostéoblastique.** La fidélité des amorces est vérifiée en amplifiant des dilutions sériees de l'ADNc contrôle (A), l'efficacité des couples est ensuite calculée (B). La spécificité est vérifiée avec le calcul du Tm (C) et la migration sur gel d'agarose du produit d'amplification (E). (D) Tableau récapitulatif des efficacités. (Marqueur de poids moléculaire : Quick-Load 50 bp DNA Ladder (New England Biolabs))

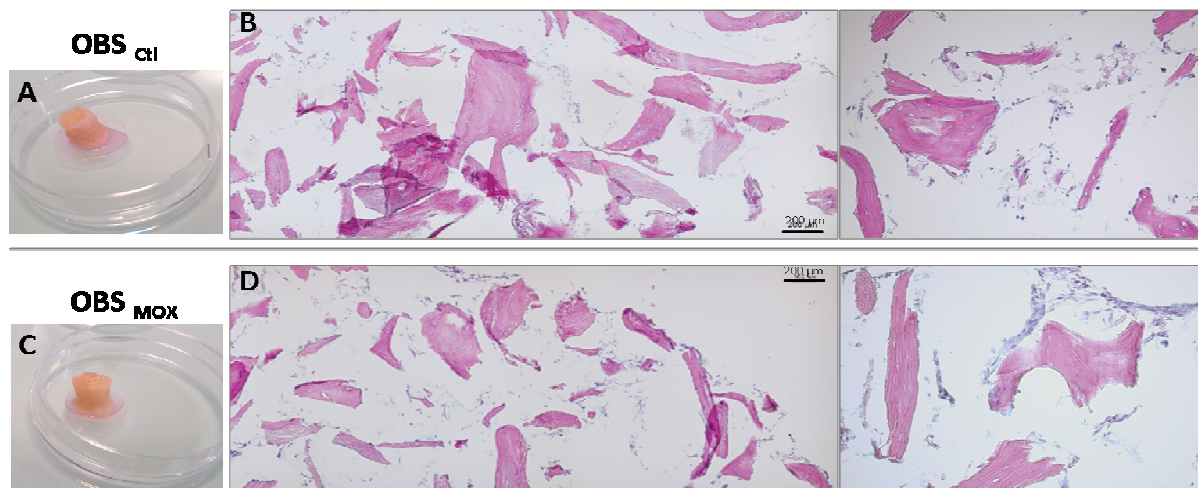
Une efficacité de 100% à chaque cycle s'écrit  $E=2$ , ce qui correspond à un décalage des Ct selon une valeur constante. Le tableau des Ct (Figure 65D) informe des efficacités obtenues pour nos amorces. En parallèle, les courbes de fusion sont réalisées pour s'assurer de la spécificité de l'amplification. Puis les dérivées de ces courbes sont réalisées pour vérifier les températures de fusion ( $T_m$ ). Un seul pic de fusion est obtenu pour chaque couple d'amorces (Figure 65C), attestant de la spécificité de reconnaissance.

Nous avons donc 9 couples d'amorces validées ciblant 1 gène de référence (RPL13A) et 8 gènes spécifiques de la différenciation ostéoblastique. Les résultats sont en cours.

## 1.2. Culture en perfusion

La culture en perfusion a été utilisée pour la culture des CSM sur cylindre osseux et sur poudre BIOBank®. Nous aborderons dans la partie qui va suivre, uniquement l'analyse de la culture sur la poudre en normoxie. Les autres résultats obtenus avec les substituts cylindriques sont présentés dans l'article 3 « *Perfusion culture of human MSCs with a marine oxygen carrier improves cell adhesion and proliferation on allogenic bone scaffold* ».

La culture en perfusion des CSM avec de la poudre d'os a été réalisée en duplicat, en milieux  $OBS_{Cl}$  et  $OBS_{MOX}$ . Des coupes réalisées sur les poudres perfusées pendant 4 semaines ont été colorées à l'H&E. Les images A et C de la figure 66, représentent les structures formées par les granules d'os après 4 semaines de culture, respectivement en milieu  $OBS_{Cl}$  et  $OBS_{MOX}$ . Les structures ainsi obtenues étaient molles mais suffisamment stables pour maintenir leur forme cylindrique, et ceci même après avoir subi les différentes étapes précédant la réalisation des coupes au cryostat. Les coupes ont été réalisées au centre des cylindres et les photographies A et D de la figure 66, sont représentatives de chacune des conditions et illustrent les résultats obtenus après coloration H&E, à deux grossissements différents. La matrice osseuse apparaît en rose tandis que les cellules apparaissent en bleu-violacé. On remarque que des cellules sont présentes de part et d'autres des granules et que la densité cellulaire est plus importante dans la condition  $OBS_{MOX}$ .



**Figure 66 – Coloration histologique de la poudre BIOBank® cultivée en perfusion.** La culture en perfusion de poudre osseuse a été réalisée en milieu de différenciation ostéoblastique (OBS) +/- HEMOXCell® à 0.025 g/L, en duplicat. Photographies de cylindres de poudre après 4 semaines de culture en milieu OBS<sub>Ctl</sub> (A) et en milieu OBS<sub>MOX</sub> (C). Des images représentatives des colorations H&E réalisées sont présentées en (B) et (D).



## **Article 3**

**“Perfusion culture of human MSCs with a marine oxygen carrier improves cell adhesion and proliferation on allogenic bone scaffold”**





# Perfusion culture of human MSCs with a marine oxygen carrier improves cell adhesion and proliferation on allogenic bone scaffold

Fiona Le Pape<sup>1,2</sup>, Gaëlle Richard<sup>1,3</sup>, Emmanuelle Porchet<sup>1</sup>, Sophie Sourice<sup>4</sup>, Frédéric Dubrana<sup>5</sup>, Claude Férec<sup>1,3,5</sup>, Valérie Polard<sup>2</sup>, Richard Pace<sup>4</sup>, Pierre Weiss<sup>4</sup>, Franck Zal<sup>2</sup>, Pascal Delépine<sup>1,3a\*</sup> and Elisabeth Leize<sup>1,6a</sup>

<sup>a</sup> the last two authors have contributed equally to this work

1: Unité INSERM 1078, Université de Bretagne Occidentale, Université Européenne de Bretagne, 46 rue Félix Le Dantec, CS51819, 29218 Brest Cedex 02, France

2: HEMARINA SA, Aéroport centre, Biotechnopôle, 29600 Morlaix, France,

3: Etablissement Français du Sang - Bretagne, Site de Brest, 46 rue Félix Le Dantec, CS51819, 29218 Brest Cedex 02, France.

4 : Unité INSERM, UMR 791, center for osteoarticular and dental tissue engineering, Université de Nantes, Nantes, France ; Centre Hospitalier Universitaire de Nantes, Pôle Hospitalo-Universitaire 4, Nantes, France.

5: Centre Hospitalier Régional Universitaire, Brest, France,

6: Centre Hospitalier Régional Universitaire de Brest, UFR Odontology, Prosthetic department, Brest F29238, France,

\*Corresponding author : Pascal Delépine, PharmD, PhD, EFS Bretagne, site of Brest/Inserm unit 1078, 46 rue Félix le Dantec, 29218 Brest Cedex 2, France – Tel : +33 (0)2.98.44.93.34 – Fax : +33 (0)2.98.43.05.55 - email : pascal.delepine@efs.sante.fr

## Abstract

Tissue engineering strategies have been developed to optimise osseointegration in dental implant surgery. One of the major problems is the non-homogeneous spatial cell distribution in the scaffold, as well as subsequent matrix production. Insufficient nutrient and oxygen supplies inside the scaffold are factors in this phenomenon. To mediate this gradient formation, we have implemented a perfusion culture method to seed human bone marrow mesenchymal stem cells (MSCs) into 3D-allogenic bone scaffolds in combination with a marine haemoglobin, HEMOXCell®, for oxygen delivery. Cell culture was performed under static and hydrodynamic conditions, on standard and osteogenic medium, with and without HEMOXCell®. The cell seeding efficiency, as well as MSC/scaffold compatibility was assessed using viability and proliferation assays. Scaffolds' cellularisation and matrix formation were analysed using scanning electron microscopy and histological staining. Alkaline phosphatase (AP) quantification was used to analyse cell differentiation. The perfusion culture was observed to significantly promote MSC proliferation throughout the scaffolds, especially when using the induction medium w/HEMOXCell®. In addition, AP and Col I were over-expressed in perfused scaffolds. Our data suggest that perfusion culture of MSC with HEMOXCell® as a natural oxygen carrier is promising for tissue engineering applications to oxygenate hypoxic areas and to promote cellular proliferation.

**Keyword:** Mesenchymal stem cells, tissue engineering, bone substitute, perfusion culture, oxygen carrier, haemoglobin

## Introduction

In dental surgery, the use of titanium implants is a standard procedure for replacing a missing tooth. In a healthy bone, osseointegration is supported by the local inflammation, the neovascularisation, the osteogenesis, the bone cells and the bone marrow progenitor cells<sup>1-3</sup>. However, it has been demonstrated that osseointegration is delayed for compromised bone. It has been proved that traumatic or pathological injuries, such as diabetes and irradiations, dramatically increased the risks of implant failure due to modifications of the bone microenvironment which impact molecular interactions, cellular functions and thus bone regeneration<sup>4,5</sup>. One of the challenges is to promote implant anchorage into bone which has a poor natural healing capacity for prosthodontic rehabilitation in maxillofacial surgeries. The most common strategy is the replacement of damaged bone using a bone graft substitute. Autologous grafts are considered the “gold standard” treatment due to their osteoconductive, osteoinductive and osteogenic natural properties<sup>6</sup>. However the availability and morbidity of donor site, and the potential risk of infection represent some of the limitations to this procedure<sup>6</sup>.

Allogenic substitutes appears to be an alternative to autogenous bone graft because of their availability without the requirement of a second surgical site<sup>7</sup>. However the theoretical risks of immune reaction and disease transmission have led to the development of acellular bone substitutes like freeze-dried bone allograft (FDBA) and demineralized freeze-dried bone allografts (DFDBA). These allografts are processed and sterilized using specific protocols to remove biological components including cells and lipids, to minimize the risk of immune reactions and infections of the host<sup>8</sup>. Unfortunately, treatments performed on the collected bone reduce the osteoinductive and osteogenic properties of the graft<sup>9</sup>. A critical failure of bone substitute grafts has been the local ischemia due to the lack of blood supply and a lack of osteoblast progenitor into the graft<sup>10</sup>. As a solution, tissue engineering strategies could provide an osteogenic character to an inert graft by creating a new bone-like physicochemical environment using growth factors and osteocompetent cells<sup>11,12</sup>. This strategy should promote healing, decrease the patient’s pain and increase the implant’s biointegration.

Mesenchymal stem cells (MSC) constitute the most promising candidates for bone tissue engineering because of their immunomodulatory properties and their plasticity. MSC have been described by Friedenstein as adherent bone marrow cells with a self-renewing capacity, exhibiting a fibroblast-like morphology<sup>13</sup>. MSC can give rise to mesenchymal cell lineages including adipocytes, chondrocytes and osteoblasts *in vitro*<sup>14</sup>. In addition MSC have even been used in the treatment of a range of tissue repair including cartilage, tendon, nerve, heart and bone<sup>15-17</sup>. MSC derived from bone marrow are the most frequently used for bone regeneration<sup>18-20</sup>. However, other sources like adipose tissue and peripheral blood have been investigated for bone repair as well<sup>21-23</sup>. MSC can promote new blood vessel formation and limit the immune reaction<sup>24</sup>. Therefore, the use of human platelet lysate (hPL) as a supplement for MSC culture has demonstrated improvements in cellular proliferation, differentiation and angiogenic properties<sup>25,26</sup>. hPL is a rich source of growth factors like platelet derived growth factor (PDGF),

transforming growth factor (TGF), insulin growth factor (IGF), vascular endothelial growth factor (VEGF) and endothelial growth factor (EGF) which promote the healing process, angiogenesis and cell osseodifferentiation<sup>25,27-30</sup>. In dental implantology, hPL injections influence the cell migration to the implant and the bone formation<sup>2</sup>. For bone engineering constructs, the technique employed for seeding and the subsequent culture conditions, can affect cell viability as well as their proliferation and plasticity. Perfusion culture system have been reported to promote cell and nutrient repartition as well as oxygen diffusion and cell differentiation to osteogenic lineages<sup>31-33</sup>.

HEMOXCell® is a biological oxygen carrier extracted from the marine worm *Nereis virens*<sup>34,35</sup> and produced by the French startup in biotechnology HEMARINA. This extracellular haemoglobin, which can carry 40 times more oxygen molecules than the human haemoglobin, enables oxygen release in a simple oxygen gradient according to cellular needs. We recently reported that HEMOXCell® can be used as an oxygenation additive in CHO-S culture for bioproduction, accelerating the cell productivity as well as the growth rate<sup>36</sup>. In another study, we have highlighted its potential use at low doses as a non-toxic additive for bone marrow MSC culture with positive effects on cell proliferation with a 25% increase cell growth and the maintenance of cells characteristics (personal data).

Given its potential for oxygenation, we aim to develop a method associating HEMOXCell® and human MSCs, to promote cell growth and differentiation in three-dimensional (3-D) allogeneic bone substitutes (BIOBank®). In order to achieve it, we investigated the cell behaviour in both static and perfused 3-D cultures, using osteoinductive hPL-supplemented medium with HEMOXCell®. We demonstrated that perfusion of bone marrow MSC through the pores of BIOBank® scaffolds resulted in the efficient cellular expansion and differentiation into osteoblastic lineage. This phenomenon was increased in HEMOXCell®-supplemented medium. This work underlines the potential use of a universal oxygen carrier for *in vitro* bone scaffold cellularisation as well as providing an experimental basis for the further *in vivo* studies. These studies could include the oxygenation of hypoxic graft areas and environment in the implantation site where the local blood supply is compromised.

## Materials and methods

### HEMOXCell®

The extracellular marine haemoglobin is manufactured under the trademark name of HEMOXCell® or sometimes referred by its internal company name of M201 by Hemarina SA (Morlaix, France). HEMOXCell® was extracted under gentle agitation of frozen *Nereis virens* at 4°C followed by several purification steps and then conditioned in cryotubes. The final product was conserved at -80°C and thawed at 4°C before experimentation. In our experiments it was used at an optimal concentration of 0.025 g/L as was previously found and described (Le Pape et al. 2015, submitted).

In this report, cell culture performed in control medium Dulbecco's Modified Eagle's medium (DMEM)

and 0.025 g/L HEMOXCell®-supplemented medium were referred as DMEM<sub>Cti</sub> and DMEM<sub>MOX</sub>, respectively. Likewise the osteo-induction medium w/o and w/ HEMOXCell® were referred to OBS<sub>Cti</sub> and OBS<sub>MOX</sub>.

### **Isolation and culture of hMSCs**

MSCs were extracted from human bone marrow. Samples were obtained from patients who underwent total hip replacement surgery at the Department of Orthopedic Surgery at the Brest University Hospital (Brest, France). Before sampling, written consents of the patients were obtained and all precautions were taken to preserve the privacy of the donors and the project was approved by local ethical committees (ministerial authorisation: DC-2009-1006).

Cells from bone marrow were isolated and characterized according to ISCT criteria<sup>14</sup>. Briefly, bone and fat residues from bone marrow samples were eliminated through a filtration step using cell strainers (Corning®, Amsterdam, Netherlands) and then cells were concentrated by centrifugation at 1,000 x g. These total bone marrow cells were then directly seeded at a density of 1 x 10<sup>5</sup> cells/cm<sup>2</sup> into basic growth media consisting of alpha-minimum essential medium ( $\alpha$ -MEM) (Lonza, Basel, Switzerland) containing 5% human Platelet Lysate (hPL), 1% L-glutamine 200 mM (Gibco®, France), 1% Ciprofloxacin 2 mg/mL (Panpharma®, France) and 0.04% Heparin (25,000 UI/5 mL) (Panpharma®, France). Cultures were maintained in a humidified atmosphere with 5% CO<sub>2</sub> at 37°C and the medium was changed twice a week thereafter. Adherent cells were cultured until passage two or three and aliquots were used to characterize them by their typical membrane expression markers and their trilineage differentiation before use<sup>14</sup>.

### **Preparation of human platelet lysate**

Human platelet lysate (hPL) was obtained from apheresis platelet concentrate pools (5 donors) provided by the French blood bank or “Etablissement Français du Sang” (Bretagne, Brest, France) after their expiration date and were biologically qualified according to the French legislation. The mean amount of platelets in each pool was > 4 x 10<sup>11</sup>. hPL containing platelet-released growth factors was generated from platelet units through a repeated freezing-thawing procedure. Platelet bodies were removed by centrifugation (15 min, 1,500 x g) and the supernatant was stored at -20°C until use.

### **Analysis of cell osteogenic differentiation capacity**

Osteogenic differentiation was induced in MSC cultures between passages 1 and 3. Cells reaching ~80% confluence were trypsinised and plated in 24-well plates at a density of 5,000 cells/well in duplicates and cultured for 24 hours in the standard differentiation medium (DMEM<sub>Cti</sub>) consisting of DMEM high-glucose (4.5 g/L) (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) (Lonza, Basel, Switzerland) supplemented the same as the already listed  $\alpha$ -MEM medium. After this adherence period, the medium was replaced with the differentiation medium (OBS<sub>Cti</sub>) (*i.e.*, standard medium supplemented with 1  $\mu$ M dexamethasone, 0.05 mM ascorbic acid and 10 mM  $\beta$ -glycerophosphate (Sigma®, St Quentin-Fallavier, France)) for induced wells. The remaining wells were left without any additives and were cultured as an undifferentiated

control. After 5, 10, 15 and 20 days of induction, alkaline phosphatase (AP) activity and mineralization were analysed. These experiments were performed with DMEM<sub>Cti+MOX</sub> and OBS<sub>Cti+MOX</sub> media.

**AP activity:** Osteoblastic phosphatase activity was visualised using the BCIP/NTB substrate (SigmaFast™ BCIP-NBT, Sigma®, France). Cells were fixed with 4% PFA for 10 minutes and rinsed with a washing buffer (0.05% Tween 20 in Phosphate Buffered Saline (PBS)). Fixed cell monolayers were incubated for 10 min with a substrate solution of 5-bromo-4-chloro-3-indolyl-phosphate- nitro blue tetrazolium (BCIP-NBT) dissolved in distilled water. Enzymatic activity was visualised as a blue-violet stain.

**Alizarin red staining:** Extracellular calcium deposits were revealed using an orange-red stain with Alizarin Red S (Sigma®, France). Briefly, cells were fixed with 4% paraformaldehyde (PFA) for 15 min, followed by incubation in Alizarin Red S staining solution (20 mg/mL, pH 4.1-4.3) in the dark at room temperature (RT) for 30 min with gentle shaking. The staining solution was carefully aspirated and the cell monolayer was washed 3-4 times with distilled water and conserved in PBS.

### **Analysis of MSC/scaffold compatibility**

#### **Scaffolds design**

Powder (0.5 mm diameter, 80% porosity) and cylinders (8 mm x 4 mm) of human cancellous bone (BioBank™, Presles-en-Brie, France) were used as scaffolds for cell proliferation in these experiments. These scaffolds are viro-inactivated and sterilized using the Supercrit® process which is based on the use of supercritical CO<sub>2</sub> (CO<sub>2</sub>SC). In this condition, CO<sub>2</sub> behaves as a natural solvent for lipid removal. The Bone powders had a porosity of 80% and the bone cylinders had an approximate porosity of 70% and pore sizes ranging from 200 to 800  $\mu$ m.

#### **Cell morphology and viability assays on scaffold powder**

To assess cell compatibility with bone scaffolds, MSCs were seeded on bone powder (1 x 10<sup>6</sup> cells/80 mg) on 15 ml Falcon® tubes in DMEM standard medium in static culture. Cultures were maintained during 23 days in standard condition (5% CO<sub>2</sub>, 37°C) and were analysed at 2, 10 and 23 days by confocal microscopy and SEM (scanning electron microscopy). For SEM, samples were incubated in 2.5% (w/v) glutaraldehyde solution for 1 h at room temperature (RT) and then washed three-times in PBS. Samples were dehydrated by a series of ethanol solutions. Specimens were observed under SEM (Hitachi S-3200N).

Viability was assessed with calcein AM and ethidium homodimer (EthD-1) from the Live/Dead® Viability/Cytotoxicity Kit (MolecularProbes®, LifeTechnologies™) according to the user manual. Seeded powders were washed with PBS and incubated for 30 min at RT with 2  $\mu$ M Calcein AM and 1.25  $\mu$ M Ethidium homodimer (EthD-1) diluted in  $\alpha$ -MEM medium. Constructs were observed with a fluorescence microscope (Axio Imager M2, Zeiss) (Calcein: 530  $\pm$  12.5 nm; EthD-1: 645  $\pm$  20 nm).

### ***Analysis of cell proliferation on 3-D bone scaffolds***

MSCs were seeded on bone scaffolds ( $5.10^6$  cells/cm<sup>3</sup>) under static conditions, after 1 h incubation, constructs were maintained in standard medium for 24h and then media were replaced with DMEM<sub>Ctl</sub>, DMEM<sub>MOX</sub>, OBS<sub>Ctl</sub> or OBS<sub>MOX</sub> to a final volume of 500  $\mu$ L. Cell number was calculated using Cell Counting Kit-8 (CCK-8, Dojindo Molecular Technologies, Rockville, USA) according to the manufacturer's instructions. Briefly, after 7 and 14 days of culture, 50  $\mu$ L of CCK-8 solution was added to constructs medium and incubated for 2 h at 37°C. Then 100  $\mu$ L from each condition were dispensed into a 96-well plate. The optical density was then measured at 450 nm using a microplate reader. Cell quantity was determined using a standard curve. Unseeded scaffolds were used as controls.

### ***Static and perfusion culture on bone cylinders***

#### ***Experimental design***

MSCs were cultured with bone cylinders using two different cultivation methods. A static culture was performed in 6-well plates. Scaffolds were seeded by the injection of  $1 \times 10^6$  cells in DMEM standard medium and then incubated in standard condition for 1 h to allow cell attachment. Scaffolds were then cultured in DMEM<sub>Ctl</sub> or DMEM<sub>MOX</sub>. Perfused scaffolds were seeded with  $1 \times 10^6$  cells using a perfusion bioreactor system (U-Cup®, CeltecBiotek, Basel, Switzerland) described in previous work<sup>37</sup>. According to the user's manual, a seeding period of 24 h with a flow rate 3 ml/min was used to calculate the seeding efficiency. During the culture, perfusion rate was reduced to 0.3 ml/min.

For the cultivation period, four different media were used: DMEM<sub>Ctl</sub>, DMEM<sub>MOX</sub>, OBS<sub>Ctl</sub> and OBS<sub>MOX</sub>. The Media were changed twice a week and an aliquot from each medium change was collected and stored at -20°C for AP dosage. For experiments, constructs were cultured either statically or perfused for a 4 week period.

#### ***Cell seeding efficiency***

Cell seeding efficiency in the scaffolds was investigated for both static and perfusion seeding methods after 24h of culture. Medium was removed from the wells and perfusion systems. For the static conditions, adherent cells on the bottom wells were trypsinised and collected with cells remaining in medium. Total cell number and viability were evaluated using an ADAM automated cell counter (Labtech, France). Seeding efficiency was calculated as a percentage of seeding cells among the total cell number (i.e.,  $1.10^6$  cells/scaffolds).

#### ***AP activity***

Alkaline phosphatase released into the medium was calculated using a SensoLyte® pNPP Alkaline Phosphatase Assay Kit (Anaspec, Inc., Fremont, CA, USA). Medium samples previously collected were diluted in dilution buffer to a final volume of 25  $\mu$ L in a 96-well microplate. Then 25 $\mu$ L of pNPP substrate solution were added into each well. The final solution shows a yellow-coloured product. The absorbance was measured at 405 nm with a Varioskan™ Flash Multimode Reader (Thermo

Scientific™). The absorbance values were translated into alkaline phosphatase activity using an alkaline phosphatase standard provided in the kit.

#### ***Histological analysis***

Two methods of sample preparation were used in parallel to optimise labelling experiments and histological analysis of the scaffolds.

#### ***1/ Samples preparation for cryostat sectioning***

Cylinders were fixed with 4% PFA at 4 °C for 24 h. Partial decalcification was performed using Super Decalcifier I solution (Polysciences, Le Parray-en-Yvelines France) for 30 min at RT. Decalcified cylinders were rinsed three times with PBS and were frozen in Optimal Cutting Temperature (OCT) compound (Tissue-Tek® 4583, Sakura Finetek Japan, Japan) for 24 h à 4°C. Embedded samples were then stored at -80°C. Frozen samples were then cut into 7  $\mu$ m sections using a cryostat (Microm HM 550, Thermo Scientific™).

Sections were then stained by hematoxylin and eosin (H&E) (Rapid-Chrome H&E Frozen Section Staining Kit, Thermo Scientific™). Slides were mounted using Eukitt® mounting medium (Sigma®) and observed under a light microscope (Axio Imager 2, Zeiss, Jena, Germany).

#### ***2/ Resin embedded samples***

Scaffolds were fixed for 24 h at 4°C and then dehydrated in a graded series of ethanol baths for four days. After dehydration, the non-decalcified bone scaffolds were infiltrated and embedded in methyl methacrylate (MMA) resin for 1 week (Technovit 9100 NEW, Kulzer; Hanau, Germany). Then, serial 5mm deep sections were cut from the cylinders along its perpendicular axis using a diamond saw made for nondecalcified tissues (Polycut Leica SM2500, Leica Biosystems; Wetzlar, Germany). Resin was removed from the bone sections using acetone and sections were stained with Movat's pentachrome and Hematoxylin-Eosine-Safran (HES) using the Varistain™ Gemini ES Automated Slide Stainer (Thermo Scientific™) and observed under a light microscope (AxioPlan 2, Zeiss; Jena, Germany).

Immunostaining of Collagen I (Col I) was performed with an anti-human Col I antibody (ab138492, 1/250, Abcam, Cambridge, UK) on sections after incubation with acetone to remove embedding resin and with 3% peroxide hydrogen (Sigma®) to block endogenous peroxidases. Incubation with biotinylated secondary antibody (anti-rabbit, Dako) was performed and Col I positive staining was developed in brown colour using the LSAB®2 system HRP Kit (Dako). Mayer's Hematoxylin (Sigma®) was used as the counterstain. Slides were mounted in Eukitt® medium and observed under a light microscope (AxioPlan 2, Zeiss; Jena, Germany).

#### ***SEM analysis***

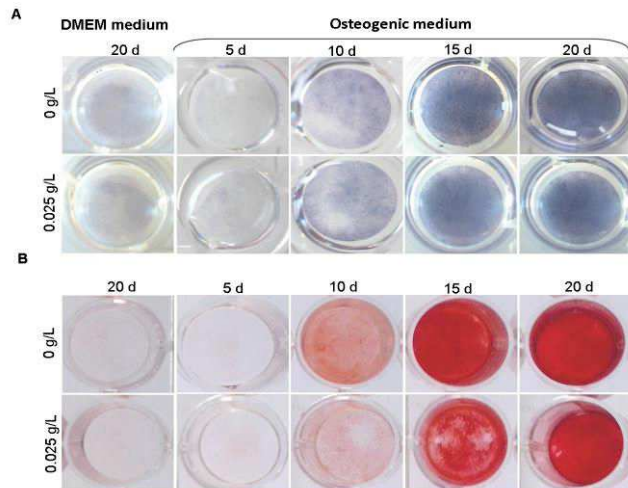
Scaffolds cultured in all conditions were treated for SEM analysis with the same protocol as for cell morphology on bone powder. After the fixation step in 2.5% glutaraldehyde solution for 2 h at RT, a decalcification step with the Super Decalcifier I was performed for 30 min. Decalcified scaffolds were then cut in two parts vertically to analyse inner and outer

cellularisation and processed according the SEM protocol. Specimens were observed under SEM (Hitachi S-3200N).

## Results

### Effect of HEMOXCell® on MSCs osteogenic differentiation

Osteoblast differentiation of MSCs was analysed after 5, 10, 15 and 20 days of culture with AP activity quantification and Alizarin red staining (Fig. 1). Experiments were performed in duplicate for 3 different MSCs samples w and w/o 0.025 g/L HEMOXCell®. After 5 days of OBS medium treatment, no staining was observed for both experiments, indicating that cells were still not differentiated enough to express these markers. From the 10th day to the 20th day, a similar profile was obtained for both analyses. The colour intensity of both OBS<sub>Cu</sub> and OBS<sub>MOX</sub> media increased in a time-dependent manner, corresponding to an increase of the AP activity, simultaneously with the mineralised matrix production. The use of HEMOXCell® as an additive for MSC osseodifferentiation does not seem to have any effect on bone marrow MSCs differentiation in PL-supplemented medium.



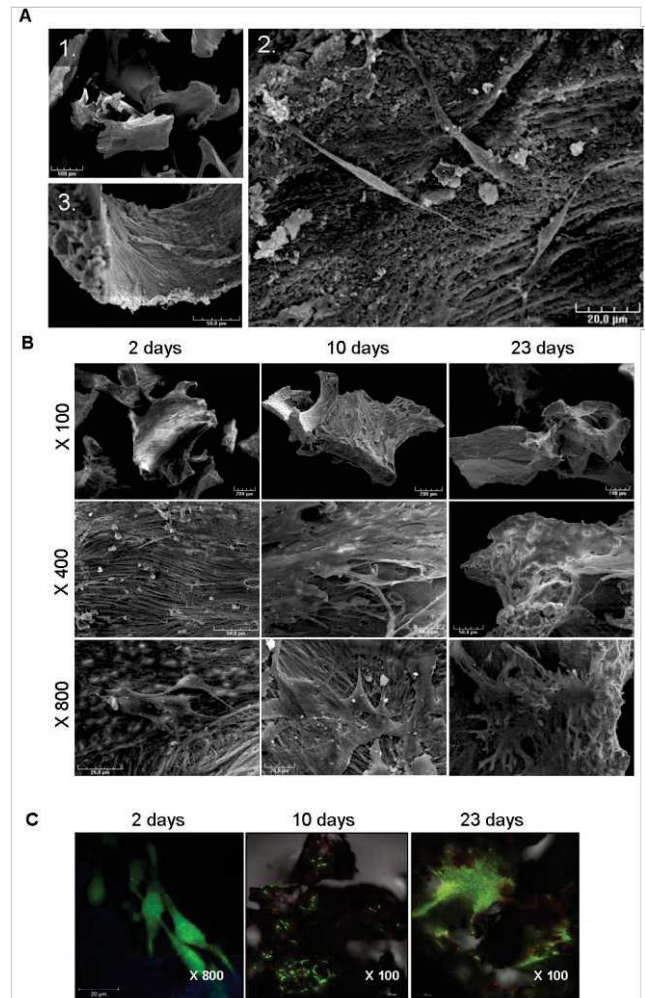
**Fig. 1. Kinetic analysis of MSC osteoblast differentiation with HEMOXCell®.** Osteoblast differentiation was analysed at 5, 10, 15 and 20 days of culture in OBS<sub>Cu</sub> and OBS<sub>MOX</sub> media. DMEM<sub>Cu</sub> and DMEM<sub>MOX</sub> were used as undifferentiated references. Images represented (A) AP activity staining of osteoblasts and (B) Alizarin red staining of mineralized matrix. Representative results of 3 independent experiments are shown.

### MSC compatibility with BIOBank® substitute

#### MSCs morphology and viability on BIOBank® powder

To observe the structure of the allogenic substitute powder and the morphology of MSCs, we performed a SEM analysis after 24 h of culture. On the Fig. 2A, the scaffolds showed an irregular structure with an average diameter of 500 µm and adherent MSCs exhibited a fibroblast-like morphology. After the first 24h, MSCs already showed adhesion spreading processes demonstrating the biocompatibility of the scaffold. The adherence of MSCs on BIOBank® substitute for a longer culture period, under static condition, was then

investigated as well as their viability (Fig. 2B, 2C). SEM analysis after 2, 10 and 23 days showed a strong increase in adherent cells number during the culture period (Fig. 2B). After 23 days, cells were confluent and covered the entire surface of the scaffold. The Live/Dead® staining revealed a very high cell viability (green cell staining) until day 23 (Fig. 2C). However, no evidence of cell death (red cell staining) was observed in any condition. These results suggest the ability of MSCs to adhere and proliferate on the BIOBank® substitute, and show the non-cytotoxicity of the scaffold.

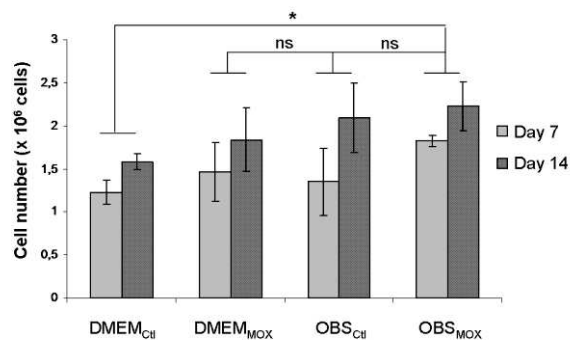


**Fig. 2. Analysis of cell viability and proliferation.** (A) Construct morphology was observed using scanning electron microscopy. SEM microphotographs of BIOBank® powder cultured 24h with MSCs. Scale bars represent 500 µm (1), 20µm (2) and 50 µm (3). MSCs adhere to the scaffold and exhibit a fibroblast-like morphology. (B) (C) Morphology and viability were analysed after 2, 10 and 23. (B) Representative SEM images of MSCs cultured on bone powder at different magnifications, from top to bottom: x100, x400, x800. (C) Confocal microscopy analysis of MSCs viability using Live/Dead® staining showed cell proliferation and viability on the powder. Data are representative of 3 different experiments.

#### Cell proliferation

A static analysis of cell proliferation was performed with the CCK-8 proliferation assay, in order to analyse the cellular proliferation potential on the cylinder scaffolds with the oxygen carrier. In all tested conditions

we obtained an increase in cell density between 7 and 14 days of culture (Fig. 3.). A significantly higher cell density was obtained with OBS<sub>MOX</sub> than when compared to DMEM<sub>Ctl</sub>, indicating that MSC proliferation in 3-D scaffolds under static condition was promoted in differentiation media supplemented with the oxygen carrier, HEMOXCell®.



**Fig. 3. Analysis of MSC proliferation on 3-D bone scaffold.** CCK-8 proliferation assay of cell-constructs was performed under different conditions after 7 and 14 days under static culture. Data represents mean  $\pm$  SD (n = 4, \*p < 0.05; ns = non-significant).

### Comparison of static and perfusion culture with HEMOXCell®

#### Analysis of the seeding efficiency

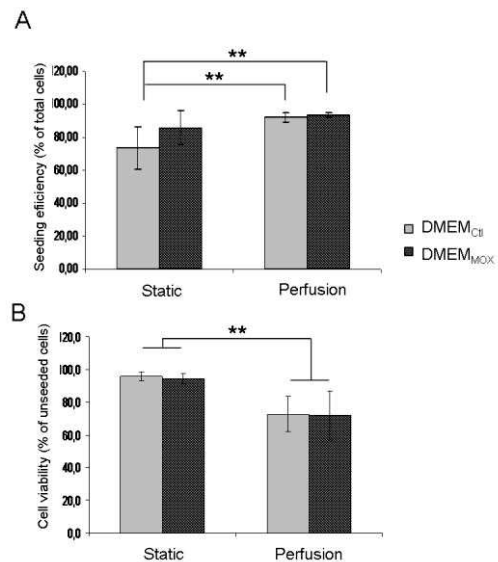
At the beginning of the culture period, the seeding efficiency was investigated for both static and hydrodynamic culture systems in DMEM<sub>Ctl</sub> and DMEM<sub>MOX</sub> (Fig. 4). The static seeding technique was performed by deposition of  $1 \times 10^6$  cells per cylinder and resulted in  $73 \pm 12.7\%$  and  $85.95 \pm 10.56\%$  cell seeding efficiency for DMEM<sub>Ctl</sub> and DMEM<sub>MOX</sub> respectively (Fig. 4, top). Better results were obtained for the perfusion seeding method with a higher reproducibility for DMEM<sub>Ctl</sub> and DMEM<sub>MOX</sub> ( $92.1 \pm 3.12\%$  and  $93.45 \pm 2.48\%$  respectively). The viability of non-seeded cells was also analysed (Fig. 4, bottom). For the static condition, counted cells exhibited a high viability of  $95.8 \pm 2.7\%$  in DMEM<sub>Ctl</sub> and  $94 \pm 3.3\%$  in DMEM<sub>MOX</sub>. A significantly lower viability was calculated for non-adherent cells in the perfusion system due to the non-adherent surface of the bioreactors (DMEM<sub>Ctl</sub>:  $72.62 \pm 10.8$ ; DMEM<sub>MOX</sub>:  $71.7 \pm 15.08\%$ ). These results suggested that the perfusion seeding method equally promote the cellular adherence w/ and w/o 0.025 g/L HEMOXCell®.

#### Alkaline phosphatase release in the culture medium

As shown in Fig. 5, in both static and perfusion cultures with DMEM, no significant increase in the amount of AP was measured during the 23 days of culture. However, in static DMEM conditions (Fig. 5A), an increase was observed for DMEM<sub>MOX</sub> after 16 days of culture. In static differentiation media, significantly higher values were observed from the 11th to 16th days of culture compared to DMEM conditions. No significant differences were observed w/ and w/o HEMOXCell® with OBS medium. Under perfusion conditions (Fig. 5B), the amount of released AP increased rapidly in DMEM<sub>MOX</sub> when

compared with DMEM<sub>Ctl</sub> from 7 days to 23 days of culture. The maximum release was observed at day 16 of culture and then a decline was observed. AP measured in OBS<sub>Ctl</sub> and OBS<sub>MOX</sub> media samples increased in a time-dependent manner both in static and perfusion systems. Interestingly, the maximum AP release was obtained at 16 day of culture as observed in DMEM. At all the points examined, a significantly higher AP activity was found in perfused media especially for OBS<sub>MOX</sub>.

Our results suggested an impact of HEMOXCell® on MSCs alkaline phosphatase secretion especially for cultures performed under perfusion in differentiation medium.

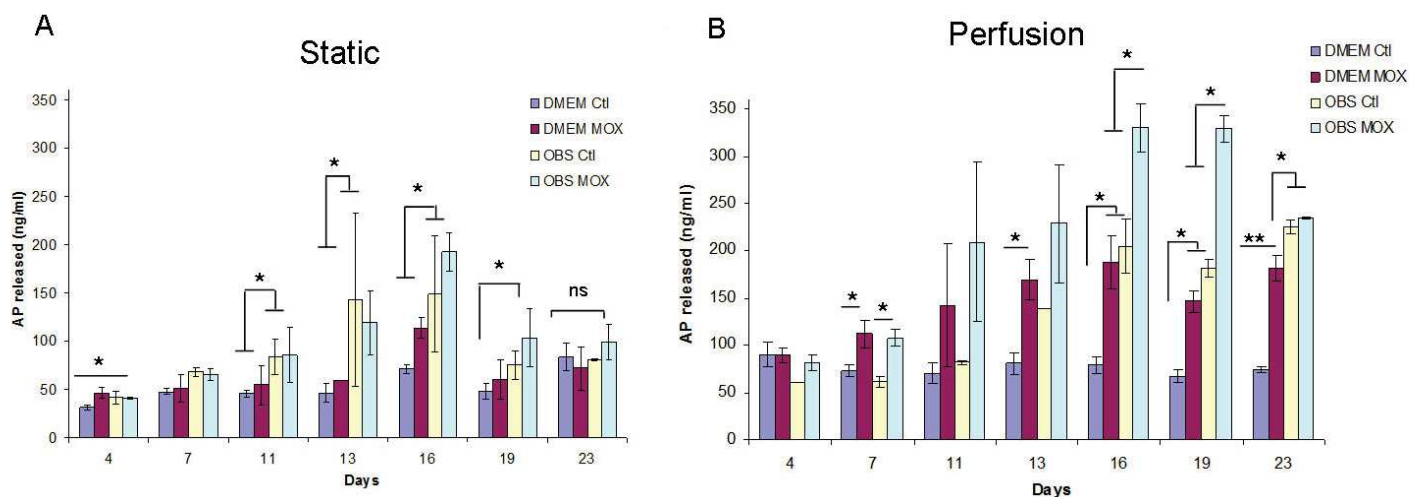


**Fig. 4. Scaffolds seeding efficiency and cell viability analysis.** MSCs were seeded into bone cylinders by four different cultivation methods, by static or perfusion for each DMEM<sub>Ctl</sub> and DMEM<sub>MOX</sub>. After 24 h, seeding efficiency (A) and cell viability of remaining cells (B) were calculated. For each condition, 10 different scaffolds were analysed. Data are represented as mean  $\pm$  SD (\*\* p < 0.01).

#### Histological analysis

Histological analysis was performed on both decalcified and non-decalcified samples to combine the respective advantages of each technical approach when analysing cellular and tissue structure preservation. Representative H&E stains obtained from decalcified scaffolds are shown in Fig. 6. The images demonstrated a similar cellularisation for all scaffolds cultured statically, with a cell development mostly located in the peripheral zones of the scaffold. However, under perfusion a significantly higher cell density was observed in all conditions compared with constructs cultivated. However, in static and perfused scaffolds, no significant difference was observed between DMEM<sub>Ctl</sub> and DMEM<sub>MOX</sub>. Additionally, for OBS<sub>Ctl</sub> and OBS<sub>MOX</sub> perfused scaffolds, the 3-D cellular structures filled the pores of the scaffolds. Extracellular matrix (ECM) secretion was not observed in the Results.

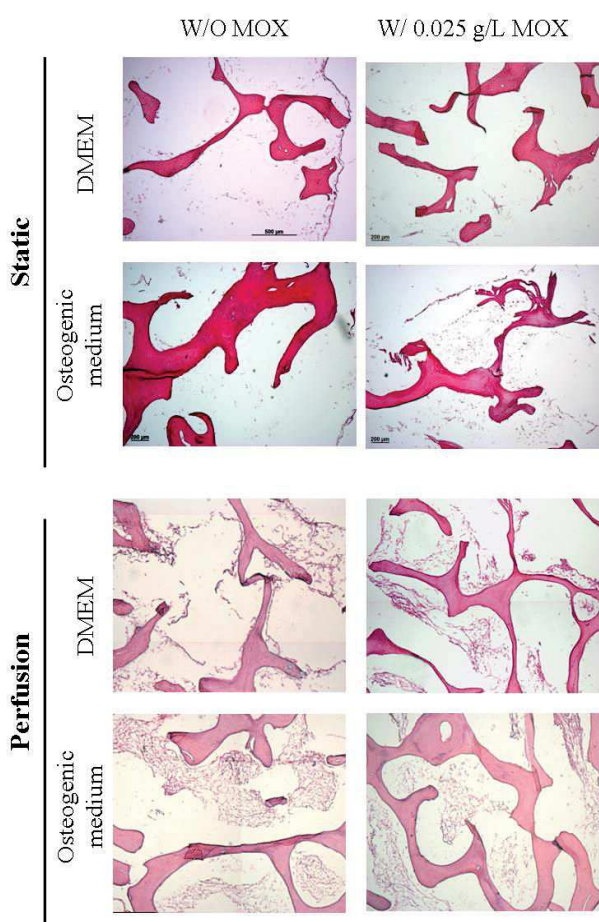
Movat and HES staining were performed on non-decalcified bone sections to analyse the preservation of the cellular structures when using a resin embedding method



**Fig. 5. Evaluation of MSCs osteoblastic differentiation in bone cylinders.** AP activity was analysed in DMEM and differentiation medium, with and without MOX, during 23 days of culture; graphs represent values at day 4, 7, 11, 13, 16, 19 and 23 for static culture (A) and perfusion culture (B). Data are represented as mean  $\pm$  SD of a representative experiment (n=3; \* p < 0.05; \*\* p < 0.01).

for histological analysis. Fig. 7A and 7B showed representative micrographs of Movat and HES staining. Only a few cells were observed under static culture conditions whereas some large cell clusters were observed

in perfused scaffolds in OBS medium. The creation of ECM was observed in high magnitude for OBS<sub>Cl</sub> and OBS<sub>MOX</sub> perfused scaffolds (orange/pink and blue colours for HES and Movat staining respectively). Images of entire sections clearly showed the scaffolds filled with cells when using OBS media. These cells were more numerous than when compared to other test conditions.



**Fig. 6. Histological staining of cryosectioning for cell distribution through BIOBank® scaffolds analysis.** Histological images of decalcified scaffolds for cultures performed under static or perfusion systems after 4 weeks and stained with H&E. (Scale bare represents 200  $\mu$ m).

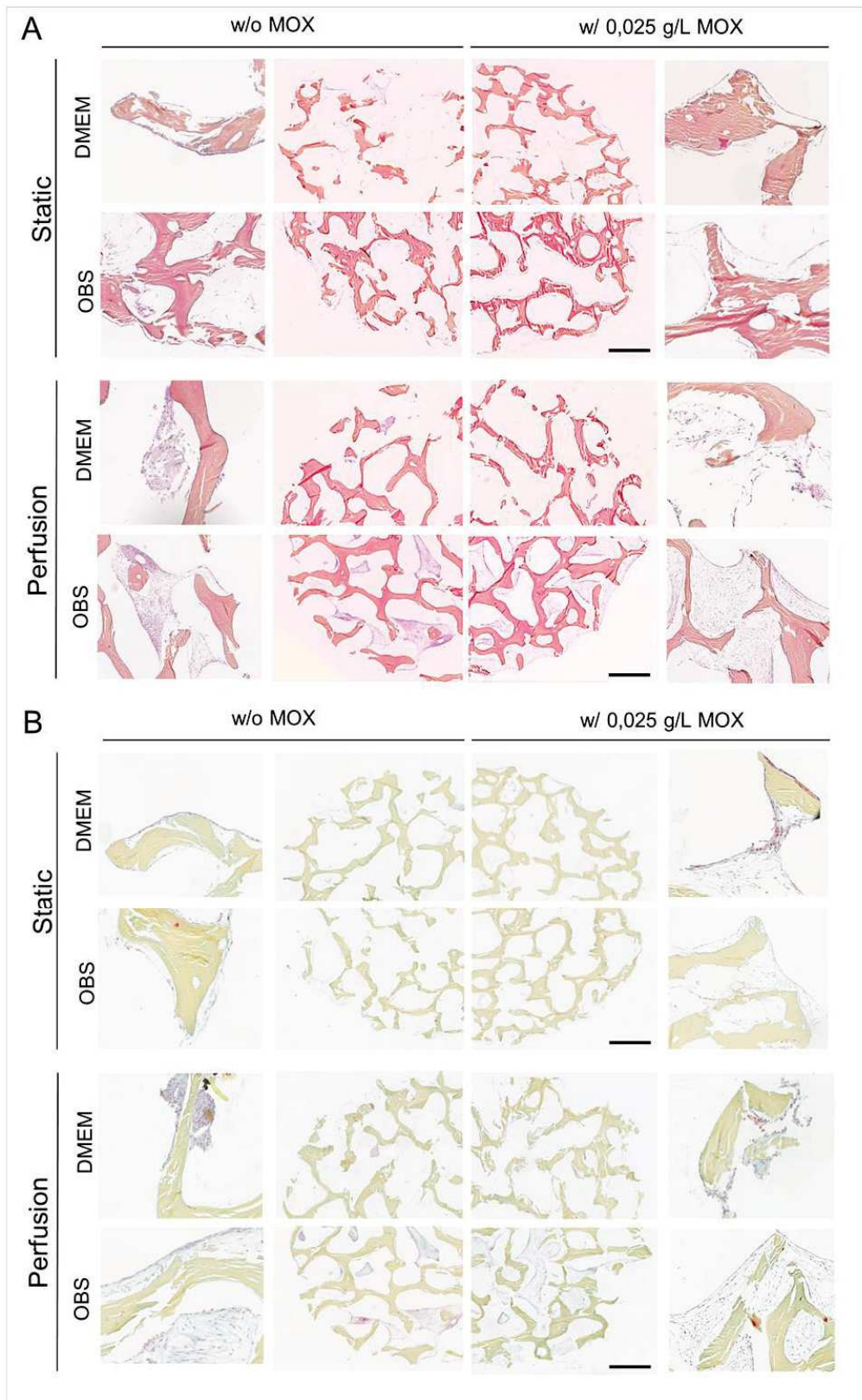
On both systems, MSCs adhered to the scaffold surfaces, but perfusion culture allowed the formation of multiple cell layers. Sectioning performed with the two methods lead to the similar histological artefacts. In all conditions, a detachment of the cell layers from the bone surface was observed. According to the results obtained, cell proliferation within the scaffold pores under perfusion culture appeared to be increased and more homogeneous when using HEMOXCell® as supplement.

The presence of Col I was investigated by immunohistochemistry and resulted in a brown uniform colour. Col I labelling was detected in all conditions (Fig. 8). A stronger expression was observed in perfusion cultures indicating the effect of the flow perfusion on the ECM production. A brown coloration of the bone scaffolds was also observed due to collagenic composition of the bone matrix.

#### Scanning electron microscopy analysis

Morphologies of the cellular structures within the scaffold pores were examined after 4 weeks of culture using SEM (Fig. 9). Under static culture, the results obtained from DMEM<sub>Cl</sub> and DMEM<sub>MOX</sub> showed a cellular monolayer lining the scaffold pores and a thick cell layer on the scaffold surfaces. For OBS<sub>Cl</sub> and OBS<sub>MOX</sub> the cell growth was more extensive and formed multilayer structures. In comparison with static culture condition, cellular density appeared significantly greater for the perfused group. Cells exhibited large filopodia structures forming an interaction network between their membranes and scaffold. Large 3-D cellular structures were observed in all conditions, which filled a part of the scaffold pores for OBS<sub>Cl</sub> and OBS<sub>MOX</sub>. Perfusion culture seems to promoted cell density as well as cell-cell interactions. A lower scaffold cellularisation was obtained for DMEM





**Fig. 7. Histological analysis of cell distribution throughout BIOBank® scaffolds on resin embedding sections.** Representative histological images of non-decalcified scaffolds for cultures performed under static or perfusion systems after 4 weeks and stained with HES (A) and Movat's Pentachrome (B) (Specimens diameter represents 8 mm). (HES stains: bleu/black = nuclei; orange/pink = collagen; pink = cytoplasm) (Movat stains: red = fibrin; blue = mucin and extrafibrillar matrix; black = nuclei; yellow = collagen)

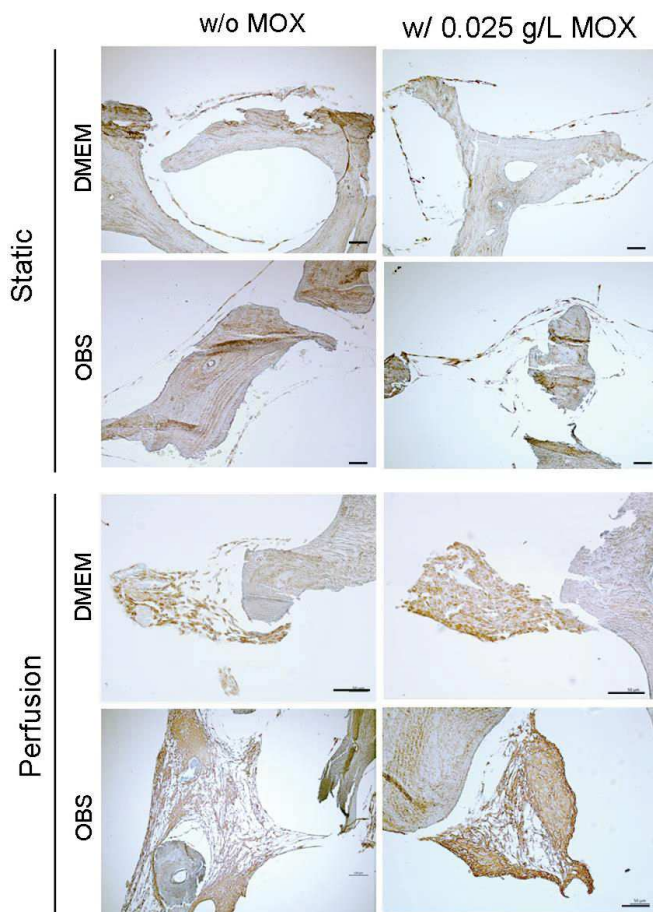
conditions in both static and perfusion systems. The use of HEMOXCell® seems to improve multilayer structure formation especially under perfusion of OBS medium.

Furthermore, a crumbling effect was observed in all constructs processed with the non-decalcifying method..

## Discussion

Bone regeneration is clinically relevant especially in dental surgery and represent a great challenge for surgeons and researchers<sup>1,3,38</sup>. Tissue engineering of bone aims to create a viable substitute *in vitro* with the combination of osteocompetent cells with a biocompatible scaffold in order to facilitate new bone formation into the injured tissue (19).

Various factors are involved in the success of bone tissue engineering applications, including the scaffold, the cell inoculum, the cell culture medium, soluble molecules as well as the cell spatial distribution<sup>28</sup>. Static culture is the most commonly used strategy for cell culture in planar and 3-D cultures. However, static culture has been largely documented to be not effective at distributing cells through the scaffold<sup>31,39-41</sup>. Indeed, gradients of oxygen and nutrients often take place within the constructs, resulting in spatial variations in cell density and viability<sup>42</sup>. In the present study we compared the effects of static and perfusion methods in the seeding efficiency and proliferation of MSCs into 3-D porous bone substitutes, with the use of HEMOXCell® as oxygen carrier.



**Fig. 8. Immunohistological staining of Collagen I.** Representative images of Col I immunostaining for cells cultures under static and perfusion with and without 0.025 g/L HEMOXCell®. Data showed a high expression of Col I (brown stain) by MSCs especially under perfusion culture. Scale bares represent 100  $\mu$ m.

MSCs were selected for these experiments because of their numerous properties that make them the most promising candidates for bone tissue engineering. They are strongly involved in bone remodelling by supporting bone marrow stroma and by differentiating into chondrocytes and osteoblasts<sup>19</sup>. In this work, we firstly investigated the osteoblastic differentiation of MSCs using HEMOXCell® in a time-dependent manner. Undifferentiated MSCs showed a weak AP activity, whereas MSC cultivated on osteogenic medium featured very high phosphatase activity. Similar differentiation profiles were obtained for AP activity and mineralized matrix production, w/ and w/o HEMOXCell® supporting the potential use of this supplement for bone tissue engineering. We then investigated the use of a porous human bone substitute, to support MSCs 3-D culture under standard (DMEM) and osteoblastic (OBS) environment. We found no significant differences between the efficiencies of the two seeding methods tested (Fig. 4).

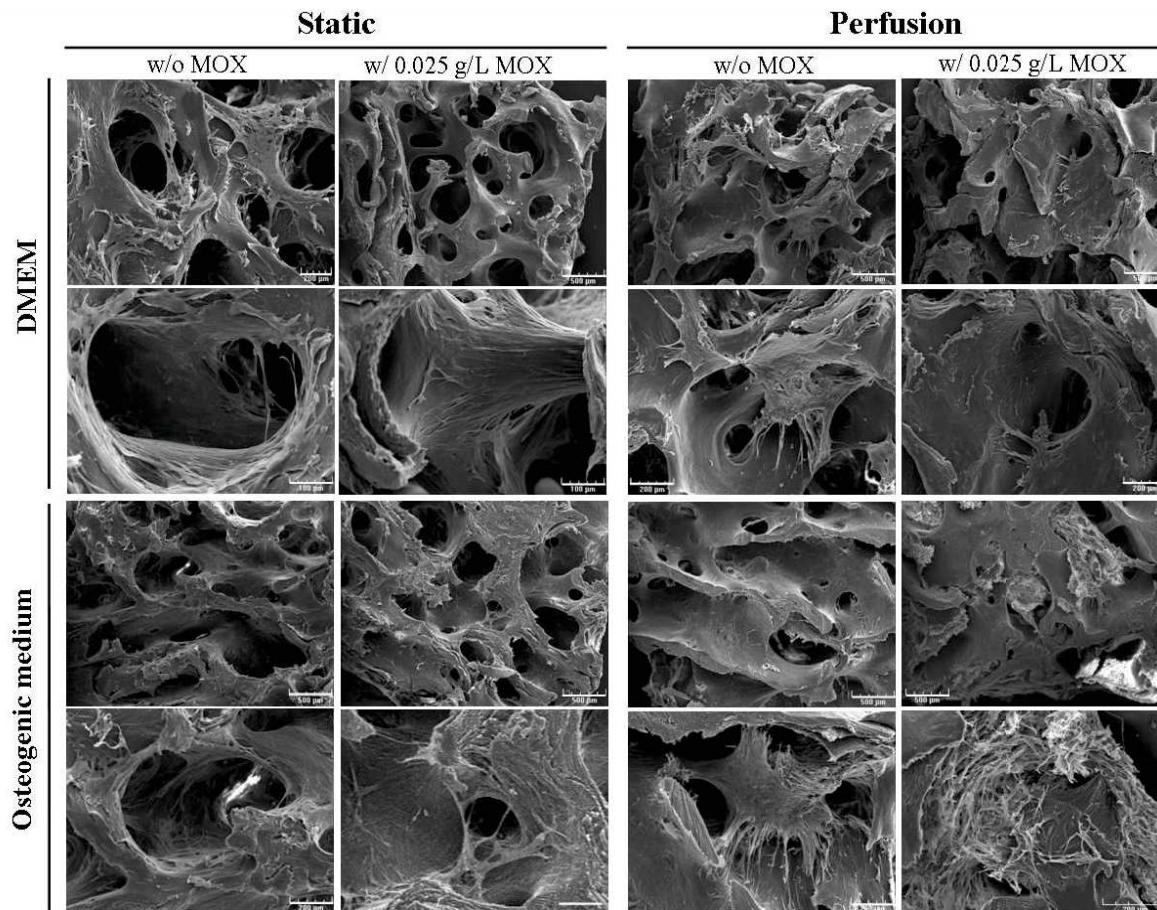
It was reported that the initial cell seeding density of MSCs has an effect on bone tissue formation *in vitro*<sup>11</sup>. In our study we used an initial cell seeding density of 1 million cells/100 mg scaffold, which is in accordance with other studies showing that higher cell density has no beneficial effects on the bone forming abilities<sup>11,43</sup>.

SEM and confocal analysis of MSCs seeded on a powder form of the bone scaffold revealed the non-toxicity of the scaffold and its ability to support cell proliferation with DMEM<sub>Ctrl</sub> and DMEM<sub>MOX</sub> medium culture (Fig. 2). Besides that, a higher cell proliferation was observed under OBS medium for 3-D constructs, with a significant increase using OBS<sub>MOX</sub>.

In this work, constructs were maintained for 4 weeks in culture and then analysed using histological techniques. Two sample preparations protocols were compared to optimize our analyses (*i.e.*, w/ and w/o the decalcification step). The same cellular structure detachment was observed in both methods. However, staining on non-decalcified bone is more intense and cell morphology is better preserved due to the freezing step which alters cell morphology for the decalcified method. However, a crumbling of the bone structure occurred with resin embedded method due to the natural stiffness of the bone tissue.

Perfusion culture was demonstrated to be the more effective culture system for cell proliferation among all the tested conditions, with a higher density and a more uniform spatial distribution of the cells. This point has been largely discussed<sup>31,33,44,45</sup>. In static conventional cell seeding, the cell distribution is limited to the periphery of the scaffold with few cells observed in the inner part of the scaffolds. Scaffolds cultured in DMEM (Ctrl or MOX) remained equally cellularised with adherent cell layers. A higher cell density is observed in OBS<sub>Ctrl</sub> and OBS<sub>MOX</sub> conditions; with HEMOXCell® some cells formed 3-D intercellular and cell-scaffold interactions. The same observation was made for perfused scaffolds with a significantly higher cell density when compared with scaffolds cultured statically. The Movat's pentachrome staining showed an intense blue coloration in cellularised areas corresponding to mucin and extrafibrillar matrix, which are associated with bone mineralization<sup>46</sup>.

In parallel, we measured the alkaline phosphatase concentration in the culture medium during culture. A higher AP quantity was measured under perfusion, which is in agreement with the observed increases in cell density.



**Fig. 9. Scanning electron micrographs of cell-scaffold constructs after *in vitro* culture for 4 weeks.** Each condition (both in perfused and static systems) is imaged using two magnifications. Top images represent a large view of scaffolds porosity (scale bare represent 500µm) and low images represent a magnification on a pore (scale bares represent 100 µm). Images are representative of two experiments.

Interestingly, samples cultured with HEMOXCell® produced a significant higher enzyme level especially under standard condition.

The observed results under osteogenic condition could be explained by the increase of cell metabolism during differentiation inducing a higher oxygen consumption<sup>47</sup>. HEMOXCell® acted by releasing oxygen to restore oxygen basal level through the medium. Both in static and hydrodynamic cultures, the obtained values were higher in OBS medium when compared with DMEM<sub>Ct</sub> medium. AP is a commonly used marker of osteogenic differentiation that explains this increased expression<sup>48</sup>. In addition, in all samples MSCs secreted a matrix containing collagen I with higher colour intensity for perfused scaffolds with HEMOXCell®. It was previously reported that the use of hPL promotes MSCs osseodifferentiation<sup>49,50</sup>. Col I is a natural component of stromal cells, ECM and bone matrix. The results obtained from AP and Col I analysis, showed the beneficial role of perfusion culture in ECM production as well as for MSCs osteoblastic differentiation in HEMOXCell®-supplemented-media. These results clearly suggest that using HEMOXCell® as an additive to the differentiation culture media does not negatively impact the differentiation process but increase it.

The flow rate in perfusion bioreactors is directly implicated on the oxygen supply in depth<sup>51</sup>. However, the flow rate also has an effect on differentiation as well as cell detachment. In this study we worked at a slow perfusion rate (0.3 ml/min) to avoid a large shear stress while still prevent a nutrition gradient formation. This low

perfusion rate was found to be optimal for the scaffolds' cellularisation. In addition we compared different culture conditions to analyse cell behaviour under an osteogenic environment and with the contribution of HEMOXCell® in the 3-D culture of MSC

In this present study we evaluated the impact of this marine oxygen carrier in the culture of human MSCs on BIOBank® bone substitute for bone tissue engineering applications. This haemoglobin is a GMP-compliant product usable for medical purposes with a high oxygen carrying potential and a SOD-like activity<sup>35</sup>. Sensitivity of HEMOXCell® to oxygen variations constitute an interesting tool for bone tissue engineering by promoting scaffold cellularisation in static conditions and even under perfusion *in vitro*. HEMOXCell® could potentially be used to promote the oxygenation of tissue substitutes in depth after implantation, and therefore the tissue repair.

#### Abbreviations

3-D: three-dimensional; AP: alkaline phosphatase; BCIP: 5-bromo-4-chloro-3-indolyl-phosphate; CD: cluster of differentiation; CHO: chinese hamster ovary; CO<sub>2</sub>: carbon dioxide; Col I: collagen I; DFDBA: demineralized freeze-dried bone allografts; DMEM: Dulbecco modified Eagle's minimal essential medium; ECM: extracellular matrix; EGF: endothelial growth factor; EthD-1: ethidium homodimer; FBS: foetal bovine sera; FDBA: freeze-dried bone allograft; hPL: human platelet lysate; H&E: hematoxylin and eosin; HES: hematoxylin-eosine-safran; HRP: horseradish peroxidase; LSAB: labelled streptavidin

biotin  $\alpha$ -MEM: minimum essential medium alpha modifications; MMA: methyl methacrylate; MSC: mesenchymal stem cell; O<sub>2</sub>: molecular oxygen; OBS: osteoblastic; OCT: Optimal Cutting Temperature; PBS: phosphate-buffered saline; PDGF: platelet-derived growth factor; NBT: nitro blue tetrazolium; PFA: paraformaldehyde; RT: room temperature; SEM: scanning electron microscopy; SOD: superoxide dismutase; TGF: transforming growth factor beta 3; VEGF: vascular endothelial growth factor.

### Conflict-of-interest disclosure

FZ is founder of and hold stock in HEMARINA SA, which produces the substance being investigated. EL holds stocks in HEMARINA SA. FL is an employee of HEMARINA SA and does not hold stock. All other authors declare no conflict of interest. HEMOXCell® samples were provided by HEMARINA SA.

### Acknowledgments

The authors thank the ANRT (Association Nationale de la Recherche et de la Technologie) for its financial contribution (grant CIFRE N°2012/1161). We are grateful to Raphaël Bardonnet (Chief Scientific Officer at BIOBank®, France) for his material support and his implication in this project. We also thank Professor Jérôme Guicheux (LIOAD, Nantes) for his scientific contribution. We are grateful to Yann Fichou (Research Engineer at EFS Brest, France) for checking the clarity and the language quality of the paper. We also thank the Région Bretagne and its community partners for their financial support to the project “FUI 18 – MARBIOTECH 2”. Special thanks to Gérard Siquin and Philippe Elies (Plateforme d'Imagerie et de Mesures en Microscopie, PIMM, Faculty of Sciences, Brest) for SEM and confocal analysis.

### References

- Xu B, Zhang J, Brewer E, et al. Osterix Enhances BMSC-associated Osseointegration of Implants. *J Dent Res*. 2009;88(11):1003-1007. doi:10.1177/0022034509346928.
- Fuerst G, Gruber R, Tangl S, Sanroman F, Watzek G. Enhanced bone-to-implant contact by platelet-released growth factors in mandibular cortical bone: a histomorphometric study in minipigs. *Int J Oral Maxillofac Implants*. 2003;18(5):685-690.
- Vandamme K, Holy X, Bensidhoum M, et al. In vivo molecular evidence of delayed titanium implant osseointegration in compromised bone. *Biomaterials*. 2011;32(14):3547-3554. doi:10.1016/j.biomaterials.2011.01.056.
- Ihde S, Kopp S, Gundlach K, Konstantinović VS. Effects of radiation therapy on craniofacial and dental implants: a review of the literature. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2009;107(1):56-65. doi:10.1016/j.tripleo.2008.06.014.
- Vandamme K, Holy X, Bensidhoum M, et al. Establishment of an in vivo model for molecular assessment of titanium implant osseointegration in compromised bone. *Tissue Eng Part C Methods*. 2011;17(3):311-318. doi:10.1089/ten.TEC.2010.0402.
- Giannoudis PV, Dinopoulos H, Tsiridis E. Bone substitutes: an update. *Injury*. 2005;36 Suppl 3:S20-S27. doi:10.1016/j.injury.2005.07.029.
- Bostrom MPG, Seigerman DA. The clinical use of allografts, demineralized bone matrices, synthetic bone graft substitutes and osteoinductive growth factors: a survey study. *HSS J Musculoskelet J Hosp Spec Surg*. 2005;1(1):9-18. doi:10.1007/s11420-005-0111-5.
- Fretwurst T, Spanou A, Nelson K, Wein M, Steinberg T, Stricker A. Comparison of four different allogeneic bone grafts for alveolar ridge reconstruction: a preliminary histologic and biochemical analysis. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol*. 2014;118(4):424-431. doi:10.1016/j.oooo.2014.05.020.
- Mitton D, Rappeneau J, Bardonnet R. Effect of a supercritical CO<sub>2</sub> based treatment on mechanical properties of human cancellous bone. *Eur J Orthop Surg Traumatol*. 2005;15(4):264-269. doi:10.1007/s00590-005-0250-x.
- Scherberich A, Galli R, Jaquiere C, Farhadi J, Martin I. Three-dimensional perfusion culture of human adipose tissue-derived endothelial and osteoblastic progenitors generates osteogenic constructs with intrinsic vascularization capacity. *Stem Cells Dayt Ohio*. 2007;25(7):1823-1829. doi:10.1634/stemcells.2007-0124.
- Holy CE, Shoichet MS, Davies JE. Engineering three-dimensional bone tissue in vitro using biodegradable scaffolds: investigating initial cell-seeding density and culture period. *J Biomed Mater Res*. 2000;51(3):376-382.
- Daar AS, Greenwood HL. A proposed definition of regenerative medicine. *J Tissue Eng Regen Med*. 2007;1(3):179-184. doi:10.1002/term.20.
- Friedenstein AJ, Chailakhyan RK, Latsinik NV, Panasyuk AF, Keiliss-Borok IV. Stromal cells responsible for transferring the microenvironment of the hemopoietic tissues. Cloning in vitro and retransplantation in vivo. *Transplantation*. 1974;17(4):331-340.
- Dominici M, Le Blanc K, Mueller I, et al. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy*. 2006;8(4):315-317. doi:10.1080/14653240600855905.
- Arthur A, Zannettino A, Gronthos S. The therapeutic applications of multipotential mesenchymal/stromal stem cells in skeletal tissue repair. *J Cell Physiol*. 2009;218(2):237-245. doi:10.1002/jcp.21592.
- Segawa Y, Muneta T, Makino H, et al. Mesenchymal stem cells derived from synovium, meniscus, anterior cruciate ligament, and articular chondrocytes share similar gene expression profiles. *J Orthop Res Off Publ Orthop Res Soc*. 2009;27(4):435-441. doi:10.1002/jor.20786.
- Barry FP, Murphy JM. Mesenchymal stem cells: clinical applications and biological characterization. *Int J Biochem Cell Biol*. 2004;36(4):568-584. doi:10.1016/j.biocel.2003.11.001.

18. Arvidson K, Abdallah BM, Applegate LA, et al. Bone regeneration and stem cells. *J Cell Mol Med.* 2011;15(4):718-746. doi:10.1111/j.1582-4934.2010.01224.x.
19. Grayson WL, Bunnell BA, Martin E, Frazier T, Hung BP, Gimple JM. Stromal cells and stem cells in clinical bone regeneration. *Nat Rev Endocrinol.* 2015;11(3):140-150. doi:10.1038/nrendo.2014.234.
20. Wang X, Wang Y, Gou W, Lu Q, Peng J, Lu S. Role of mesenchymal stem cells in bone regeneration and fracture repair: a review. *Int Orthop.* 2013;37(12):2491-2498. doi:10.1007/s00264-013-2059-2.
21. Fu W-L, Xiang Z, Huang F-G, et al. Coculture of peripheral blood-derived mesenchymal stem cells and endothelial progenitor cells on strontium-doped calcium polyphosphate scaffolds to generate vascularized engineered bone. *Tissue Eng Part A.* 2015;21(5-6):948-959. doi:10.1089/ten.TEA.2014.0267.
22. Li H, Dai K, Tang T, Zhang X, Yan M, Lou J. Bone regeneration by implantation of adipose-derived stromal cells expressing BMP-2. *Biochem Biophys Res Commun.* 2007;356(4):836-842. doi:10.1016/j.bbrc.2007.02.165.
23. Yoon E, Dhar S, Chun DE, Gharibjanian NA, Evans GRD. In vivo osteogenic potential of human adipose-derived stem cells/poly lactide-co-glycolic acid constructs for bone regeneration in a rat critical-sized calvarial defect model. *Tissue Eng.* 2007;13(3):619-627. doi:10.1089/ten.2006.0102.
24. Chen X, Armstrong MA, Li G. Mesenchymal stem cells in immunoregulation. *Immunol Cell Biol.* 2006;84(5):413-421. doi:10.1111/j.1440-1711.2006.01458.x.
25. Chevallier N, Anagnostou F, Zilber S, et al. Osteoblastic differentiation of human mesenchymal stem cells with platelet lysate. *Biomaterials.* 2010;31(2):270-278. doi:10.1016/j.biomaterials.2009.09.043.
26. Wang D, Jiang H, Wang S, et al. Construction of tissue-engineered bone using a bioreactor and platelet-rich plasma. *Exp Ther Med.* 2014;8(2):413-418. doi:10.3892/etm.2014.1774.
27. Trouillas M, Prat M, Doucet C, et al. A new platelet cryoprecipitate glue promoting bone formation after ectopic mesenchymal stromal cell-loaded biomaterial implantation in nude mice. *Stem Cell Res Ther.* 2013;4(1):1. doi:10.1186/scrt149.
28. Lovett M, Lee K, Edwards A, Kaplan DL. Vascularization Strategies for Tissue Engineering. *Tissue Eng Part B Rev.* 2009;15(3):353-370. doi:10.1089/ten.teb.2009.0085.
29. Leotot J, Coquelin L, Bodivit G, et al. Platelet lysate coating on scaffolds directly and indirectly enhances cell migration, improving bone and blood vessel formation. *Acta Biomater.* 2013;9(5):6630-6640. doi:10.1016/j.actbio.2013.02.003.
30. Ng F, Boucher S, Koh S, et al. PDGF, TGF- $\beta$ , 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 MSCs into adipogenic, chondrogenic, and osteogenic lineages. *Blood.* 2008;112(2):295-307. doi:10.1182/blood-2007-07-103697.
31. Kasper FK, Liao J, Kretlow JD, Sikavitsas VI, Mikos AG. Flow perfusion culture of mesenchymal stem cells for bone tissue engineering. In: *StemBook.* Cambridge (MA): Harvard Stem Cell Institute; 2008. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK27082/. Accessed September 8, 2015.
32. Bancroft GN, Sikavitsas VI, van den Dolder J, et al. Fluid flow increases mineralized matrix deposition in 3D perfusion culture of marrow stromal osteoblasts in a dose-dependent manner. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2002;99(20):12600-12605. doi:10.1073/pnas.202296599.
33. Papadimitropoulos A, Piccinini E, Brachat S, et al. Expansion of human mesenchymal stromal cells from fresh bone marrow in a 3D scaffold-based system under direct perfusion. *PLoS One.* 2014;9(7):e102359. doi:10.1371/journal.pone.0102359.
34. Chabasse C, Bailly X, Rousselot M, Zal F. The multigenic family of the extracellular hemoglobin from the annelid polychaete *Arenicola marina*. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol.* 2006;144(3):319-325. doi:10.1016/j.cbpb.2006.03.007.
35. Rousselot M, Delpy E, Drieu La Rochelle C, et al. *Arenicola marina* extracellular hemoglobin: a new promising blood substitute. *Biotechnol J.* 2006;1(3):333-345. doi:10.1002/biot.200500049.
36. Le Pape F, Bossard M, Dutheil D, et al. Advancement in recombinant protein production using a marine oxygen carrier to enhance oxygen transfer in a CHO-S cell line. *Artif Cells Nanomedicine Biotechnol.* May 2015:1-10. doi:10.3109/21691401.2015.1029632.
37. Wendt D, Marsano A, Jakob M, Heberer M, Martin I. Oscillating perfusion of cell suspensions through three-dimensional scaffolds enhances cell seeding efficiency and uniformity. *Biotechnol Bioeng.* 2003;84(2):205-214. doi:10.1002/bit.10759.
38. Nazirkar G, Singh S, Dole V, Nikam A. Effortless Effort in Bone Regeneration: A Review. *J Int Oral Health JIOH.* 2014;6(3):120-124.
39. Volkmer E, Drosse I, Otto S, et al. Hypoxia in static and dynamic 3D culture systems for tissue engineering of bone. *Tissue Eng Part A.* 2008;14(8):1331-1340. doi:10.1089/ten.tea.2007.0231.
40. Pazzano D, Mercier KA, Moran JM, et al. Comparison of chondrogenesis in static and perfused bioreactor culture. *Biotechnol Prog.* 2000;16(5):893-896. doi:10.1021/bp000082v.
41. Liu C, Abedian R, Meister R, et al. Influence of perfusion and compression on the proliferation and differentiation of bone mesenchymal stromal cells seeded on polyurethane scaffolds. *Biomaterials.* 2012;33(4):1052-1064. doi:10.1016/j.biomaterials.2011.10.041.
42. Papadimitropoulos A, Scotti C, Bourguin P, Scherberich A, Martin I. Engineered decellularized matrices to instruct bone regeneration processes. *Bone.* 2015;70:66-72. doi:10.1016/j.bone.2014.09.007.
43. Luo F, Hou T-Y, Zhang Z-H, Xie Z, Wu X-H, Xu J-Z. Effects of initial cell density and hydrodynamic culture on osteogenic activity of tissue-engineered bone grafts. *PLoS*

*One*. 2013;8(1):e53697.  
doi:10.1371/journal.pone.0053697.

44. Martin I, Wendt D, Heberer M. The role of bioreactors in tissue engineering. *Trends Biotechnol.* 2004;22(2):80-86. doi:10.1016/j.tibtech.2003.12.001.
45. Gonçalves F da C, Paz AH da R, Lora PS, Passos EP, Cirne-Lima EO. Dynamic culture improves MSC adhesion on freeze-dried bone as a scaffold for bone engineering. *World J Stem Cells.* 2012;4(2):9-16. doi:10.4252/wjsc.v4.i2.9.
46. Nikolov S, Raabe D. Hierarchical Modeling of the Elastic Properties of Bone at Submicron Scales: The Role of Extrafibrillar Mineralization. *Biophys J.* 2008;94(11):4220-4232. doi:10.1529/biophysj.107.125567.
47. Pattappa G, Heywood HK, de Bruijn JD, Lee DA. The metabolism of human mesenchymal stem cells during proliferation and differentiation. *J Cell Physiol.* 2011;226(10):2562-2570. doi:10.1002/jcp.22605.
48. Prins H-J, Braat AK, Gawlitta D, et al. In vitro induction of alkaline phosphatase levels predicts in vivo bone forming capacity of human bone marrow stromal cells. *Stem Cell Res.* 2014;12(2):428-440. doi:10.1016/j.scr.2013.12.001.
49. Arpornmaeklong P, Kochel M, Depprich R, Kübler NR, Würzler KK. Influence of platelet-rich plasma (PRP) on osteogenic differentiation of rat bone marrow stromal cells. An in vitro study. *Int J Oral Maxillofac Surg.* 2004;33(1):60-70. doi:10.1054/ijom.2003.0492.
50. López-Pérez PM, da Silva RMP, Sousa RA, Pashkuleva I, Reis RL. Plasma-induced polymerization as a tool for surface functionalization of polymer scaffolds for bone tissue engineering: An in vitro study. *Acta Biomater.* 2010;6(9):3704-3712. doi:10.1016/j.actbio.2010.03.008.
51. Volkmer E, Otto S, Polzer H, et al. Overcoming hypoxia in 3D culture systems for tissue engineering of bone in vitro using an automated, oxygen-triggered feedback loop. *J Mater Sci Mater Med.* 2012;23(11):2793-2801. doi:10.1007/s10856-012-4725-0.



---

## 2. Ingénierie tissulaire du ménisque

---

### 2.2. Optimisation de la cellularisation d'un substitut méniscal

#### 2.2.1. Culture dynamique en système rotatif

##### 2.2.1.1. Analyse de l'efficacité d'ensemencement

L'efficacité d'ensemencement a été analysée 24h après l'injection de  $1.10^5$  cellules par support, dans les conditions  $DMEM_{CtI}$ ,  $DMEM_{MOX}$ ,  $MC_{CtI}$  et  $MC_{MOX}$  (Figure 67). Une efficacité d'ensemencement moyenne de  $81.33 \pm 10.54\%$  est obtenue pour les différentes conditions. Ces résultats suggèrent que les CSM adhèrent au substitut méniscal, de façon similaire en milieu standard et chondrocytaire, sans impact notable d'HEMOXCell®.

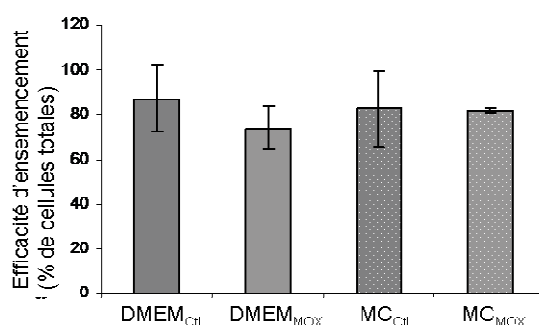


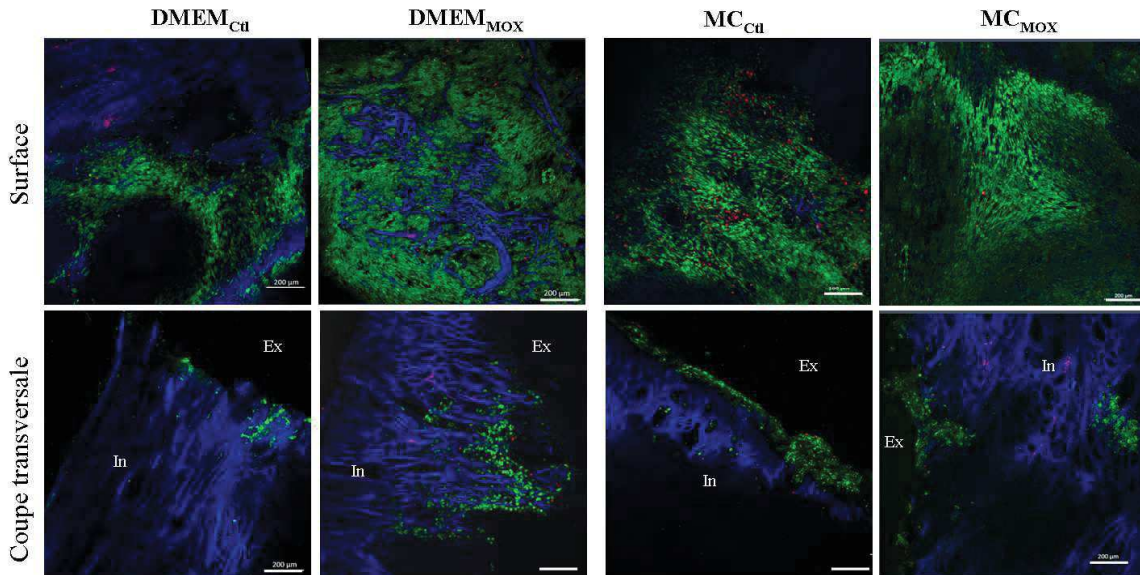
Figure 67 - Analyse de l'efficacité d'ensemencement.

##### 2.2.1.2. Analyse de la viabilité cellulaire

L'analyse de la viabilité cellulaire montre une forte viabilité cellulaire dans toutes les conditions de culture (cellules vertes) (Figure 68). La densité cellulaire semble être plus importante à la surface des échantillons cultivés en  $DMEM_{MOX}$  que pour ceux cultivés en  $DMEM_{CtI}$ . En milieu de différenciation chondrocytaire les cellules sont plus abondantes qu'en DMEM et forment une couche cellulaire épaisse, recouvrant la surface du support avec une faible mortalité cellulaire (cellules rouges). Les résultats obtenus sur les coupes transversales montrent que la cellularisation est limitée à la superficie des échantillons, toutes conditions confondues. En milieu  $DMEM_{MOX}$ , il semblerait que les cellules aient colonisé le support plus profondément qu'en  $DMEM_{CtI}$ , cependant sans différences notables par rapport aux



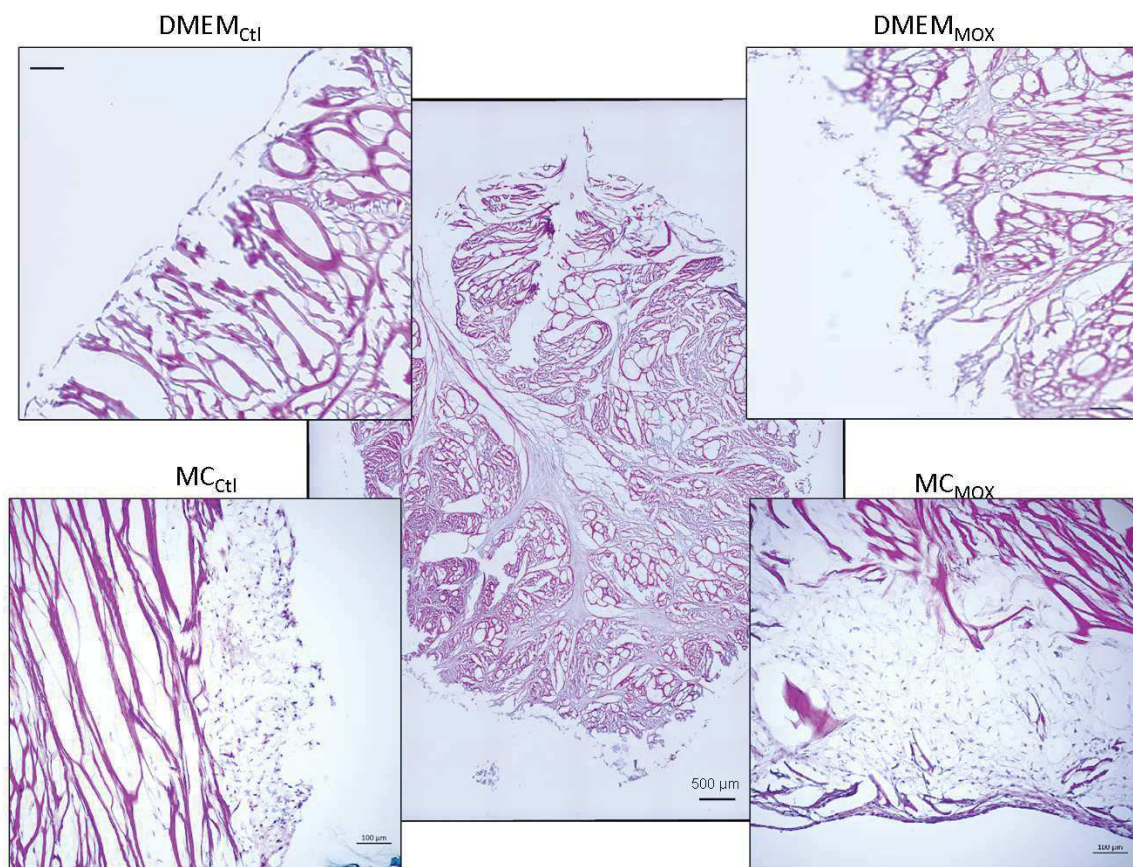
conditions MC. Toutefois, on observe la présence d'une couche cellulaire superficielle plus épaisse en milieu d'induction. Les résultats obtenus en milieu DMEM et MC, nous informent que HEMOXCell® utilisé à 0.025 g/L n'affecte pas la viabilité des CSM et que la colonisation semble être favorisée en sa présence.



**Figure 68 – Analyse en microscopie confocale de la viabilité et de la densité cellulaire.** Les cellules vivantes apparaissent en vert et les cellules mortes en rouges. La matrice collagénique autofluoresce dans le filtre bleu. Les images du haut représentent la surface des échantillons et les images du bas, représentent des sections transversales. La barre d'échelle = 200  $\mu\text{m}$ ; In : zone intérieure; Ex: zone extérieure. Les images sont représentatives d'analyses réalisées en duplicat.

### 2.2.1.3. Analyse histologique des échantillons

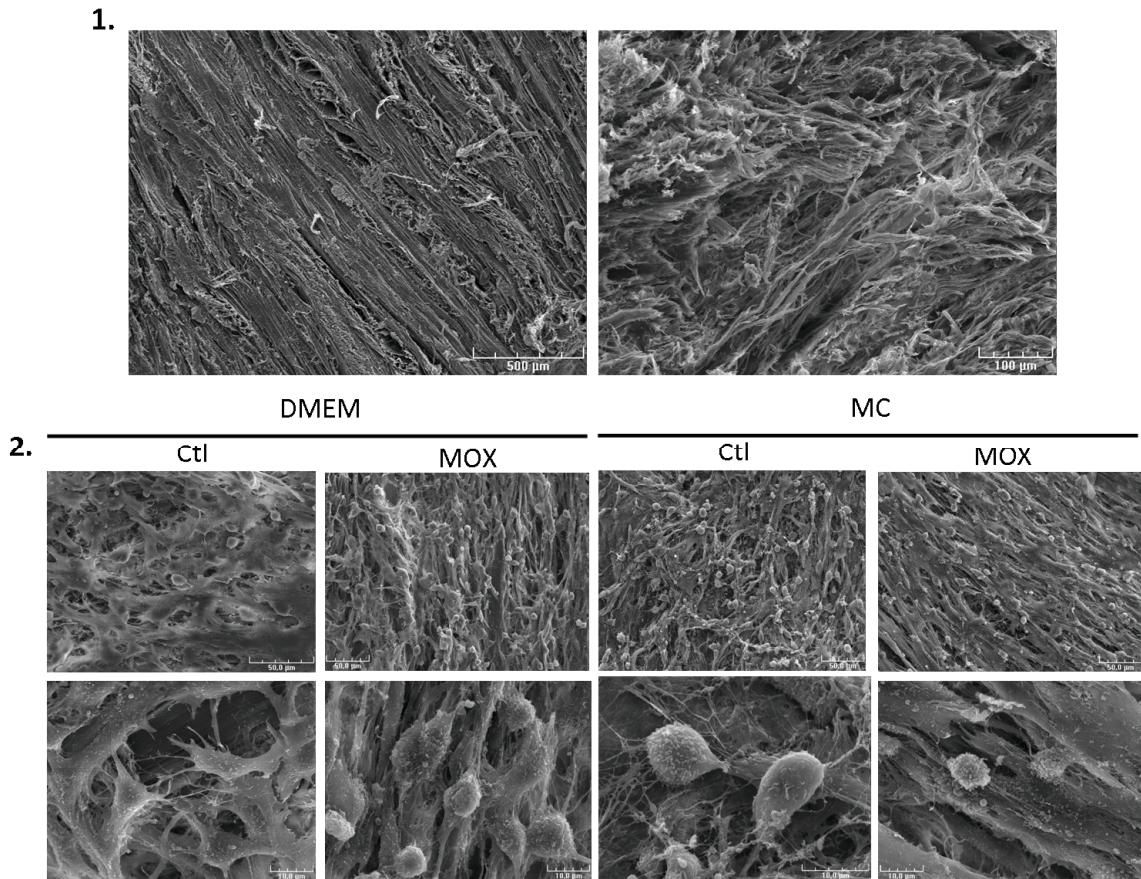
Les analyses histologiques des échantillons sont réalisées sur des coupes au cryostat de 7  $\mu\text{m}$ . Des images représentatives sont présentées dans la figure 69. Les images permettent de visualiser la structure poreuse du substitut, avec une interconnexion entre les pores. On observe une cellularisation principalement périphérique toutes conditions confondues, ce qui concorde avec les résultats obtenus avec le test Live/Dead®. Une couche cellulaire plus épaisse est observée en présence de MOX en milieux DMEM et chondrogénique, par comparaison avec les contrôles correspondants. En milieux de différenciation, des cellules ont proliféré en profondeur dans le support, il semblerait qu'elles aient résorbé la matrice collagénique initialement présente. Une MEC est observée entre les cellules cultivées indépendamment de la présence de MOX.



**Figure 69 – Analyse histologique de la distribution cellulaire au travers du substitut méniscal.** Les images sont représentatives des colorations H&E après 4 semaines de culture rotative. L’image centrale correspond à une coupe DMEM<sub>MOX</sub> dans son intégralité. La barre d’échelle représente 100 µm (500 µm pour l’image centrale).

#### 2.2.1.4. Analyse de la morphologie au MEB

Des substituts acellulaires sont utilisés pour analyser la préservation de l’organisation collagénique d’origine (Figure 70 (1.)). Sur la coupe longitudinale (gauche) et sur la transversale (droite), on peut voir les fibres circonférentielles méniscales, avec un réseau collagénique dense et parallèle, caractéristique de la région centrale du ménisque. Les microphotographies en 2, permettent d’observer la morphologie cellulaire à la surface des échantillons. Dans toutes les conditions, les cellules ont une forme polygonale et arrondie, caractéristique des cellules chondrocytaires (Figure 70 (2.)). Toutefois, on observe nettement moins de cellules rondes en DMEM<sub>Ctl</sub>. Dans les autres conditions, les cellules poussent selon la même orientation que les fibres de collagène. Ces résultats ne nous permettent pas de comparer la cellularisation des supports mais ils permettent d’observer des différences morphologiques. Le MENISC-T® constitue un substrat favorable à la prolifération et probablement à la différenciation cellulaire.

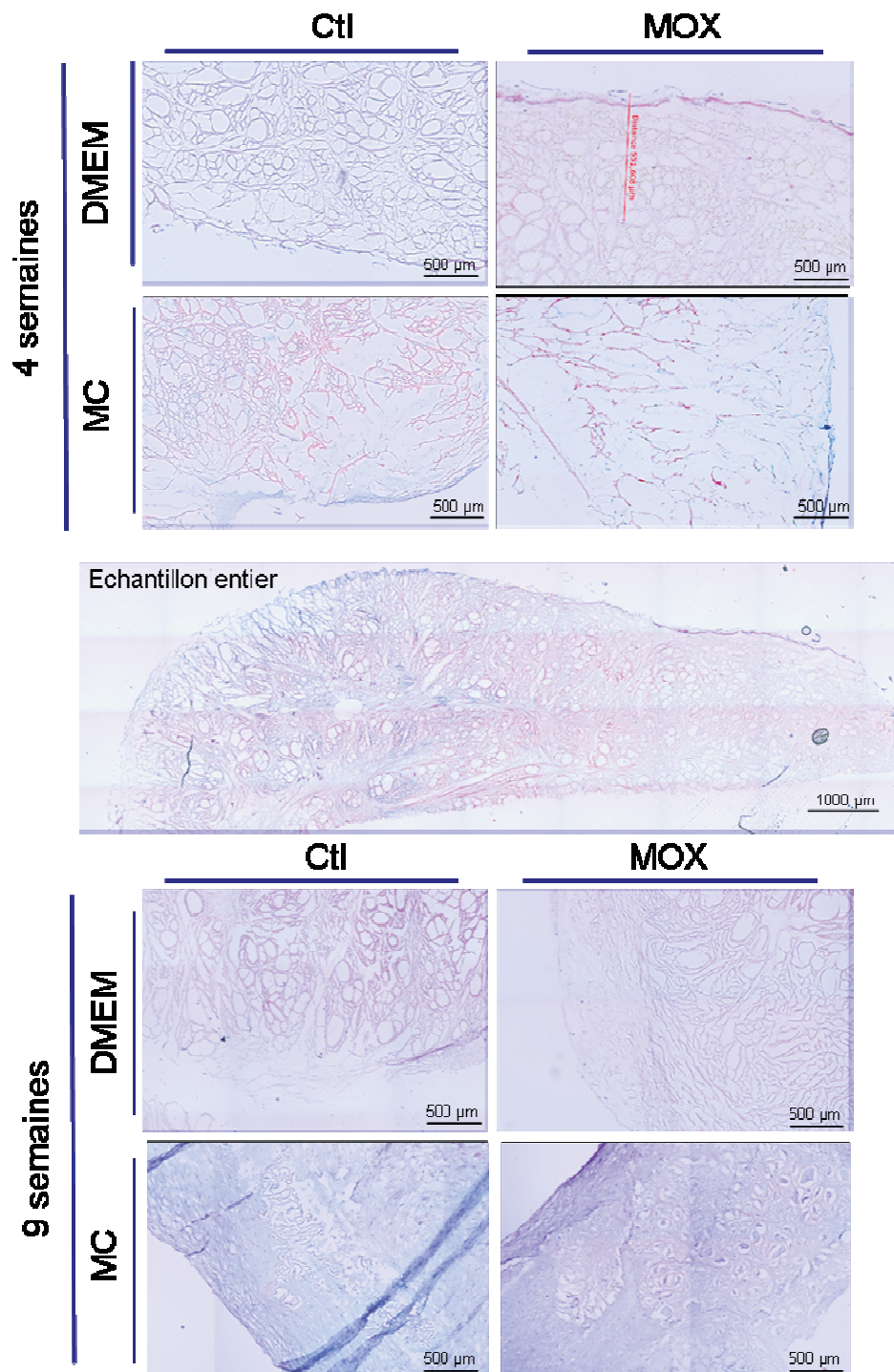


**Figure 70 – Photographies des échantillons acellulaires et cellularisés en MEB. (1.)** L’analyse de la microstructure du support montre un réseau collagénique organisé. **(2.)** Photographies de la surface des supports cellularisés à deux grossissements.

## 2.2.2. Culture statique du substitut méniscal cellularisé

### 2.2.2.1. Analyse histologique de la prolifération cellulaire

La culture statique est réalisée sur des sections du substitut méniscal de 2 mm d’épaisseur, après injection de  $1.10^6$  cellules. La cellularisation est visualisée après 4 et 9 semaines de culture par coloration à l’H&E (Figure 71). Les résultats obtenus à 4 semaines montrent une cellularisation uniquement périphérique en milieu DMEM, en absence ou en présence de MOX. En revanche, en milieu d’induction chondrocytaire la colonisation est plus profonde et semble être favorisée en présence de MOX. Les cultures réalisées pendant 5 semaines supplémentaires, révèlent une augmentation de la densité cellulaire en DMEM, sans différences notables en présence de MOX.

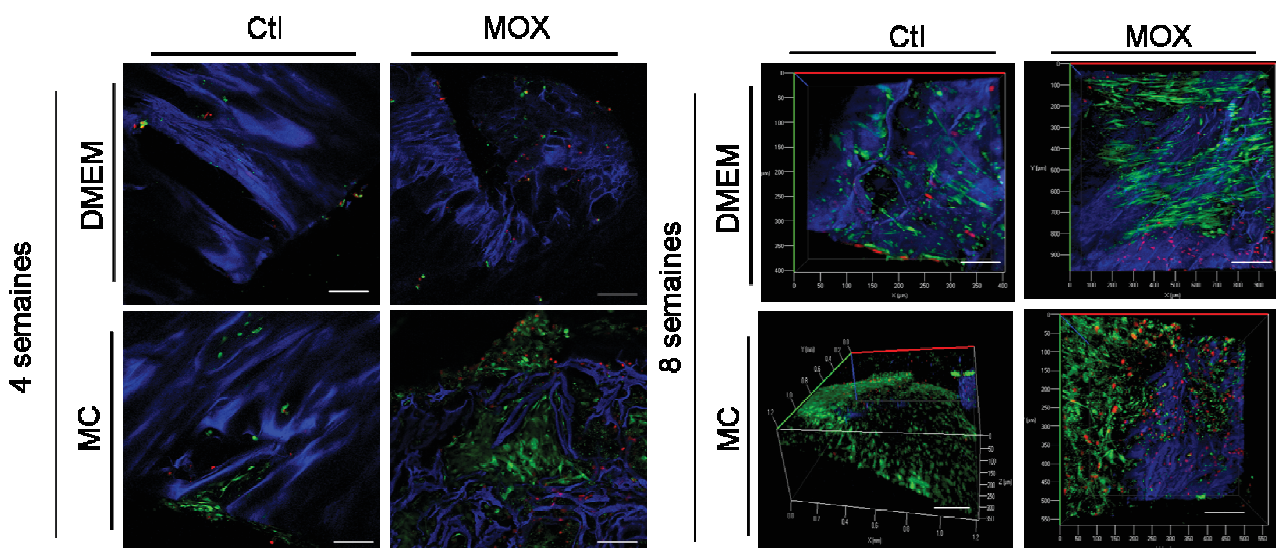


**Figure 71 – Analyse histologique de la cellularisation du substitut MENISC-T® en statique.** Des tranches de substitut sont cultivées pendant 4 ou 9 semaines en milieu  $DMEM_{Ctl}$ ,  $DMEM_{MOX}$ ,  $MC_{Ctl}$  ou  $MC_{MOX}$ . La coloration H&E est réalisée sur des coupes de  $7\ \mu M$ .

Par contre, entre 4 et 9 semaines de culture en milieu MC, les cellules ont colonisé la totalité du support, ne laissant apparaître que de rares zones du substitut d'origine. La présence de MOX semble bénéfique à la prolifération cellulaire en DMEM mais semble la ralentir en milieu de différenciation.

### 2.2.2.2. Analyse de la viabilité cellulaire

La viabilité cellulaire est analysée avec le kit Live/Dead® (Qiagen) après 4 et 8 semaines de culture statique. La figure 72 ci-dessous, montre des images représentatives obtenues en microscopie confocale, à partir des échantillons cultivés en milieu DMEM ou MC +/- HEMOXCell® à 0.025 g/L. Après 4 semaines de culture, le centre des substituts cultivés en milieu DMEM<sub>Ctl</sub> ou DMEM<sub>MOX</sub> demeure acellulaire. En milieu de différenciation, on peut observer des amas de cellules vivantes (vertes). Pour avoir un meilleur aperçu de la cellularisation après 8 semaines de culture, des représentations 3D sont réalisées avec le logiciel Zen (ZEISS). Comme pour l'analyse histologique, en milieu DMEM, HEMOXCell® semble promouvoir la prolifération cellulaire tout en maintenant une forte viabilité, tandis qu'en milieu MC, la densité cellulaire semble plus importante en absence de MOX.



**Figure 72 – Analyse de la viabilité cellulaire à 4 et 8 semaines de culture 3D sur substitut méniscal en condition statique.** Images 2D réalisées en microscopie confocale après 4 semaines de culture (gauche) et 3D, après 8 semaines de culture (Droite). La barre d'échelle représente 200  $\mu\text{m}$ . vert : cellules vivantes ; rouge : cellules mortes ; bleu : autofluorescence du collagène.

La culture *in vitro* des CSM sur le MENISC-T® a permis d'obtenir un support cellularisé dans sa totalité après 9 semaines de culture en statique. Utilisé comme supplément dans les milieux de culture, HEMOXCell® à 0.025 g/L n'affecte ni la viabilité, ni la croissance cellulaire.

**- Chapitre IV -**

# **Discussion**



---

## Discussion sur la colonisation des substituts tissulaires

---

### Colonisation d'un substitut osseux allogénique

Ce troisième chapitre, est consacré aux différentes approches que nous avons mises en place pour améliorer la colonisation de substituts osseux et méniscaux avec des CSM, en présence d'HEMOXCell®.

Dans la première partie de ce chapitre, traitant de la colonisation de substituts osseux avec des CSM, nous avons dans un premier temps sélectionné le support de travail. Notre choix s'est porté sur le substitut BIOBank®, car ce dernier a permis d'obtenir de meilleurs résultats de viabilité cellulaire que la poudre IngeniOs™. De plus il est d'origine humaine, ce qui permettait de continuer notre approche exclusivement à partir de matériel d'origine humaine.

La culture en perfusion a permis d'améliorer la colonisation des supports ainsi que la prolifération cellulaire (Papadimitropoulos *et al.*, 2014). En milieu de différenciation la densité cellulaire était plus importante, que ce soit avec ou sans HEMOXCell®. Cela s'explique par le fait qu'au début de la différenciation ostéoblastique les cellules se divisent activement, puis on observe un ralentissement de ce phénomène au fil de l'avancement dans les stades de différenciation (Beederman *et al.*, 2013). De plus, les CSM vont avoir un métabolisme très actif et donc consommateur d'oxygène, ce qui explique l'amélioration de la colonisation en présence d'HEMOXCell® (Pattappa *et al.*, 2011). Nous avons cependant travaillé à faible flux, car notre objectif premier n'était pas de stimuler la différenciation mais d'améliorer la colonisation. Dans la littérature, il apparaît que la vitesse du flux stimule la différenciation cellulaire, et ce pour les tissus osseux et cartilagineux (Bancroft *et al.*, 2002; Kasper *et al.*, 2008; Liu *et al.*, 2012). Il serait intéressant de travailler avec un flux plus important en conservant les mêmes conditions de culture et comparer les résultats avec ceux obtenus, mais aussi de travailler avec d'autres substituts actuellement utilisés en clinique, pour identifier un biomatériau cytocompatible favorisant à la fois la prolifération cellulaire *in vitro* et la repousse osseuse *in vivo*.

Pour les reconstructions maxillo-faciales, l'utilisation de blocs osseux de tailles conséquentes peut créer des problèmes liés au façonnage et au procédé de cellularisation.



Les résultats obtenus avec la poudre perfusée, permettent d'envisager des cultures de ce type dans des systèmes en perfusion à plus grande échelle. La cohésion inter-granules observée, ainsi que la souplesse de la structure obtenue, sont prometteuses. L'association de ce type de biomatériau avec des hydrogels demeure aussi un domaine à explorer.

Dans le cadre d'une greffe de substitut osseux, la régénération tissulaire peut être fortement compromise si le réseau vasculaire fait défaut. Cela va avoir pour conséquence d'empêcher l'apport en oxygène dans le tissu et ainsi provoquer une mort cellulaire massive. La porosité du substitut BIOBank® est satisfaisante pour permettre la formation d'un nouveau système vasculaire après greffe. Nous avons montré la possibilité de perfuser ce type de support pour permettre une cellularisation homogène. Les CSM étant connues pour leurs propriétés angiogéniques, elles pourraient favoriser ce phénomène et recruter des progéniteurs endothéliaux au sein du support, et modérer l'inflammation locale. Les CSM présents dans le greffon pourront par ailleurs s'y différencier en ostéoblastes sous l'influence des médiateurs solubles sécrétés par les ostéocytes et autres cellules environnantes (Heino *et al.*, 2004; Birmingham *et al.*, 2012). Dans la pratique, cela pourrait favoriser l'intégration des greffons, au moins sur le court terme. Au niveau clinique, HEMOXCell® devrait favoriser la cellularisation des greffons *in vitro* et maintenir la viabilité des cellules *in vivo*. C'est principalement au moment de la mise en place du substitut que l'oxygène apporté par HEMOXCell® pourrait permettre la survie cellulaire. Des injections post-implantaire seraient également utiles le temps de permettre le recrutement de progéniteurs endothéliaux et la formation d'un nouveau système vasculaire. Afin d'apporter plus de poids à ces suppositions, nous allons réaliser un parallèle en condition hypoxique. La différenciation osseuse étant décrite comme favorisée en normoxie, nous verrons quel rôle joue HEMOXCell® dans ces conditions. Les analyses sont actuellement en cours.

## **Colonisation d'un substitut méniscal**

Le tissu méniscal a été utilisé comme second modèle tissulaire pour la validation de l'utilisation d'HEMOXCell® dans la culture 3D des CSM. Comme pour le tissu osseux, nous avons observé une amélioration de la croissance cellulaire en milieu de différenciation, avec une meilleure colonisation des substituts en profondeur en présence d'HEMOXCell®. Cependant, nous n'avons pu réaliser de culture en perfusion sur ce biomatériau en raison de sa densité collagénique qui n'autorise pas de flux traversant.

Comme cela a déjà été publié, dans notre étude nous avons observé une cellularisation principalement périphérique en culture statique et sur rollers (Holy *et al.*, 2000; Volkmer *et al.*, 2012). La plupart des études *in vitro* sont réalisées sur une durée assez courte, en maintenant la culture jusqu'à 9 semaines, nous nous sommes aperçus que les CSM ne colonisaient pas seulement la périphérie du support, mais qu'elles l'avaient envahi dans sa totalité. Toutefois, il s'agit de supports de petite taille, une colonisation possiblement bien moindre pourrait être observée avec des substituts de dimensions supérieures voire entiers. Le tissu méniscal étant peu oxygéné, un parallèle en hypoxie sera réalisé pour se rapprocher des conditions physiologiques.

En parallèle de la mise en place de la culture 3D, nous avons œuvré à l'établissement de différentes approches pour la caractérisation des cellules méniscales. Il est acquis que les CSM possèdent la capacité de se différencier en fibroblastes et en chondrocytes, deux types cellulaires proches des fibrochondrocytes, les cellules d'intérêt. Sur ce constat, nous avons supposé que les CSM étaient possiblement des cellules progénitrices des fibrochondrocytes. Or, leur capacité de différenciation en fibrochondrocytes n'a jusqu'à présent pas été concrètement établie. Nous avons dans un premier temps axé notre stratégie sur le développement d'une approche de co-culture CSM/fibrochondrocytes pour tenter d'identifier la voie de différenciation fibrochondrocytaire, puis dans un second temps nous avons entrepris de caractériser les cellules méniscales, les fibrochondrocytes. Les protocoles développés ainsi que les résultats obtenus sont présentés dans l'annexe 2.



# Conclusion



L'oxygène est l'un des facteurs limitant en culture cellulaire, notamment pour des cultures réalisées en bioréacteurs ou en support 3D. En partant de ce constat, nous nous sommes intéressés aux propriétés de l'hémoglobine de *Nereis virens*, exploitée sous le nom d'HEMOXCell®, dans le but d'améliorer la diffusion de l'oxygène dans les milieux de culture. En premier lieu, l'efficacité d'HEMOXCell® a été évaluée dans la culture cellulaire en bioréacteur à partir d'une lignée cellulaire non-adhérente. Les résultats obtenus, nous ont permis de valider sa non-cytotoxicité et de mettre en évidence les bénéfices de son potentiel oxygénant pour la culture cellulaire. Compte tenu de ces résultats, nous avons réitéré ces analyses sur un autre modèle cellulaire d'intérêt thérapeutique.

L'utilisation d'un modèle cellulaire connu, la lignée CHO-S, et d'une technique de culture en batch à petite échelle, a permis de déterminer une concentration de travail de l'hémoglobine HEMOXCell® de 0.5 g/L, laquelle favorise significativement la croissance de la lignée CHO-S et la productivité de cette dernière. Ce premier point a permis d'établir un test robuste pour l'analyse de la performance des différents lots d'HEMOXCell®, lequel est actuellement utilisé dans le circuit de contrôle qualité du produit. D'autre part, cette étude a aussi permis d'envisager son utilisation dans le domaine de la production de protéines médicamenteuses.

Toujours dans une approche thérapeutique, en tenant compte de la non-immunogénicité et du potentiel oxygénant de ce transporteur d'oxygène, son efficacité a été évaluée sur la culture de cellules souches mésenchymateuses. L'analyse de l'effet dose/réponse du lot considéré, a permis de déterminer une dose efficace de 0.025 g/L. Comme pour le précédent modèle cellulaire, l'innocuité d'HEMOXCell® a été établie par diverses analyses. Les disparités entre les concentrations efficaces déterminées entre ces deux modèles cellulaires, soulignent les écarts entre les besoins en oxygène selon les conditions de culture et le modèle cellulaire considéré. Ils soulignent aussi l'importance de la détermination de la concentration de travail, laquelle doit être adaptée aux conditions de culture.

Bien que ses effets soient modérés dans la culture en condition standard (21% O<sub>2</sub>), les cultures tridimensionnelles, sur substituts allogéniques méniscaux et osseux, ont permis d'observer une amélioration de la cellularisation en milieux de différenciation. Ces résultats indiquent un bénéfice lié à l'oxygène libéré par la molécule dans des conditions où les cellules possèdent un métabolisme actif. Ces études reproduites dans des conditions

hypoxiques, devraient accentuer les bénéfices observés, et permettre de mieux appréhender l'utilisation d'HEMOXCell® dans les milieux de conditionnement préimplantatoire de substituts cellularisés. Le degré et la durée de l'hypoxie vont avoir des effets sur les fonctions sécrétrices des CSM. Il sera donc nécessaire de considérer les conditions de culture afin de se placer dans les conditions idéales pour des applications cliniques.

Des analyses complémentaires sont en cours, et d'autres seront à envisager, afin d'utiliser d'HEMOXCell® dans des conditions optimales.

De nombreuses questions concernant la distribution des CSM dans les tissus, leur survie et leurs mécanismes d'action, restent encore non résolues. La poursuite des analyses *in vivo*, devrait permettre d'améliorer notre approche et de recadrer les objectifs. Les observations faites sur le comportement cellulaire *in vitro* ne sont malheureusement pas le reflet des phénomènes qui surviennent *in vivo*. Cela s'explique par les échanges effectués entre les cellules et leur environnement, par contact direct ou indirect, les stimuli perçus ou encore un état pathologique. Il est difficile de reproduire *in vitro* un environnement suffisamment représentatif du *in vivo* (partenaires cellulaires, facteurs solubles, stimulation biomécanique...). Au cours de notre tentative de caractérisation des fibrochondrocytes, nous avons mis en évidence par un test simple, la capacité des médiateurs solubles sécrétés par les fibrochondrocytes à moduler le profil d'expression transcriptomique des CSM. La compréhension du phénomène observé nécessiterait une analyse plus poussée, notamment du sécrétome. Cependant, la communication qui s'effectue avec les cellules d'intérêt conforte l'idée d'utiliser ces cellules pour la régénération méniscale.

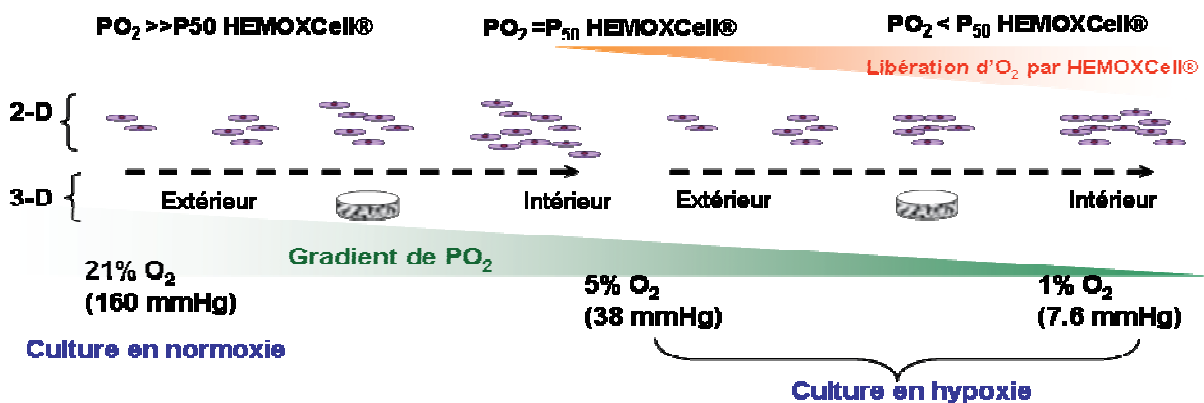
Nous sommes encore loin de la commercialisation de greffons osseux et méniscaux cellularisés, car rares sont les préparations à base de cellules bénéficiant d'une autorisation de "procédés de préparation et de conservation". Les démarches sont longues et coûteuses principalement sur le plan réglementaire. Bien que la capacité des CSM à soigner de nombreuses pathologies soit actuellement acquise, la production de ces cellules en quantité suffisante et de façon standardisée est délicate. La variabilité entre les individus rend difficile l'établissement de contrôles qualité standardisés. L'objectif de notre démarche est d'agrandir les connaissances actuelles sur les reconstructions tissulaires avec des cellules souches mésenchymateuses. Les approches expérimentales sont différentes selon les équipes, les CSM proviennent de sources différentes, d'espèces différentes, les conditions de culture elles aussi sont variables, sans compter le large choix de biomatériaux

disponibles. Le but commun à toutes ces recherches est d'améliorer la qualité de vie des patients, en facilitant le recouvrement fonctionnel de l'organe cible.

Au cours de ce travail de thèse, il a été possible d'établir la cytocompatibilité des CSM avec deux substituts allogéniques biocompatibles, actuellement utilisés en clinique. Nous avons pu mettre en évidence le bénéfice apporté par HEMOXCell® dans nos conditions de culture, ainsi que les potentielles applications qui en découlent. L'hémoglobine de vers marin constitue un outil prometteur pour améliorer les transferts d'oxygène dans le microenvironnement cellulaire. Les premiers jours post-implantatoires sont décisifs pour la survie cellulaire, avant même qu'il y ait la formation d'un tissu vascularisé, la pression en oxygène du microenvironnement va constituer l'un des facteurs clés modulant non seulement la survie mais aussi la fonctionnalité des CSM (Bland *et al.*, 2013).

*In vivo*, HEMOXCell® devrait permettre l'oxygénation des greffons sur le court terme, assurant ainsi un rôle de réserve en oxygène permettant une libération progressive et donc une diminution graduelle du taux d'oxygène dans les greffons après implantation.

L'oxygène n'est cependant pas le seul facteur limitant en ingénierie tissulaire. Des stratégies doivent être élaborées pour maintenir une réserve en nutriments dans l'implant, le temps de permettre la formation de nouveaux vaisseaux sanguins. Ces derniers devraient par la suite, assurer l'apport en nutriments mais aussi en oxygène pour *in fine* favoriser la réparation tissulaire (Deschepper *et al.*, 2013). La figure 73 ci-dessous, récapitule les conditions favorisant la libération d'O<sub>2</sub> par HEMOXCell®.



**Figure 73 - Schéma récapitulatif de la libération d'oxygène par HEMOXCell® en culture cellulaire, en fonction de la pO<sub>2</sub> dans le milieu de culture.** En 2D la diminution de la pO<sub>2</sub> est proportionnelle à la densité cellulaire et est dépendante du volume de milieu. En 3D, la colonisation est généralement périphérique selon le gradient de pO<sub>2</sub> et de nutriments, de l'extérieur vers l'intérieur des supports. Le maximum de libération est attendu en hypoxie, en présence de fortes concentrations cellulaires et dans le centre des substituts.





# **Bibliographie**



- Adrio JL & Demain AL (2014). Microbial Enzymes: Tools for Biotechnological Processes. *Biomolecules* **4**, 117–139.
- Aguzzi A & Glatzel M (2004). vCJD tissue distribution and transmission by transfusion--a worst-case scenario coming true? *Lancet* **363**, 411–412.
- Alayash AI (2014). Blood substitutes: why haven't we been more successful? *Trends Biotechnol* **32**, 177–185.
- Albrektsson T, Sennerby L & Wennerberg A (2008). State of the art of oral implants. *Periodontol 2000* **47**, 15–26.
- Almo SC & Love JD (2014). Better and faster: improvements and optimization for mammalian recombinant protein production. *Curr Opin Struct Biol* **26C**, 39–43.
- Álvarez-Viejo M, Menéndez-Menéndez Y & Otero-Hernández J (2015). CD271 as a marker to identify mesenchymal stem cells from diverse sources before culture. *World J Stem Cells* **7**, 470–476.
- Amara I, Touati W, Beaune P & de Waziers I (2014). Mesenchymal stem cells as cellular vehicles for prodrug gene therapy against tumors. *Biochimie* **105**, 4–11.
- Amberson WR, Jennings JJ & Rhode CM (1949). Clinical experience with hemoglobin-saline solutions. *J Appl Physiol* **1**, 469–489.
- Anderson P, Carrillo-Gálvez AB, García-Pérez A, Cobo M & Martín F (2013). CD105 (Endoglin)-Negative Murine Mesenchymal Stromal Cells Define a New Multipotent Subpopulation with Distinct Differentiation and Immunomodulatory Capacities. *PLoS ONE* **8**, e76979.
- Ando Y, Matsubara K, Ishikawa J, Fujio M, Shohara R, Hibi H, Ueda M & Yamamoto A (2014). Stem cell-conditioned medium accelerates distraction osteogenesis through multiple regenerative mechanisms. *Bone* **61**, 82–90.
- Anon (n.d.). Improving Productivity in Bioreactors | GEN Magazine Articles. *G E N*. Available at: <http://www.genengnews.com/gen-articles/improving-productivity-in-bioreactors/3241/> [Accessed August 6, 2015].
- Anon (n.d.). Réponse biologique de cellules animales à des contraintes hydrodynamiques : simulation numérique, expérimentation et modélisation en bioréacteurs de laboratoire, Biological response of animal cell to hydrodynamic stresses : numerical simulation, experimentation and modelling in bench-scale bioreactors. Available at: <http://www.youscribe.com/catalogue/rapports-et-theses/savoirs/reponse-biologique-de-cellules-animales-a-des-contraintes-683186> [Accessed July 29, 2015].
- Arbabi-Ghahroudi M, Tanha J & MacKenzie R (2005). Prokaryotic expression of antibodies. *Cancer Metastasis Rev* **24**, 501–519.
- Arico C, Bonnet C & Javaud C (2013). N-glycosylation humanization for production of therapeutic recombinant glycoproteins in *Saccharomyces cerevisiae*. *Methods Mol Biol Clifton NJ* **988**, 45–57.
- Arnett TR (2010). Acidosis, hypoxia and bone. *Arch Biochem Biophys* **503**, 103–109.

- Arnoczky SP (1999). Building a meniscus. Biologic considerations. *Clin Orthop* **S244–S253**.
- Arthur A, Zannettino A & Gronthos S (2009). The therapeutic applications of multipotential mesenchymal/stromal stem cells in skeletal tissue repair. *J Cell Physiol* **218**, 237–245.
- Arvidson K, Abdallah BM, Applegate LA, Baldini N, Cenni E, Gomez-Barrena E, Granchi D, Kassem M, Konttinen YT, Mustafa K, Pioletti DP, Sillat T & Finne-Wistrand A (2011). Bone regeneration and stem cells. *J Cell Mol Med* **15**, 718–746.
- Auten RL & Davis JM (2009). Oxygen Toxicity and Reactive Oxygen Species: The Devil Is in the Details. *Pediatr Res* **66**, 121–127.
- Aymard J-P (2012). Karl Landsteiner (1868–1943) et la découverte des groupes sanguins. *Transfus Clin Biol* **19**, 244–248.
- Badeau M (2006). *Effets d'un antioxydant, le tempol, sur les actions métaboliques et vasculaires de l'insuline chez le rat insulino-résistant avec un surplus de poids. Effets de l'insuline sur le transport du glucose dans le muscle squelettique, la réactivité vasculaire, l'expression des protéines eNOS, le stress oxydatif et les effets hémodynamiques régionaux.* (thesis). Université de Laval.
- Baker BM & Chen CS (2012). Deconstructing the third dimension: how 3D culture microenvironments alter cellular cues. *J Cell Sci* **125**, 3015–3024.
- Baker BM, Gee AO, Metter RB, Nathan AS, Marklein RA, Burdick JA & Mauck RL (2008). The potential to improve cell infiltration in composite fiber-aligned electrospun scaffolds by the selective removal of sacrificial fibers. *Biomaterials* **29**, 2348–2358.
- Baker BM, Nathan AS, Huffman GR & Mauck RL (2009). Tissue engineering with meniscus cells derived from surgical debris. *Osteoarthr Cartil OARS Osteoarthr Res Soc* **17**, 336–345.
- Bancroft GN, Sikavitsas VI, van den Dolder J, Sheffield TL, Ambrose CG, Jansen JA & Mikos AG (2002). Fluid flow increases mineralized matrix deposition in 3D perfusion culture of marrow stromal osteoblasts in a dose-dependent manner. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**, 12600–12605.
- Baraniak PR & McDevitt TC (2010). Stem cell paracrine actions and tissue regeneration. *Regen Med* **5**, 121–143.
- Barry F, Boynton RE, Liu B & Murphy JM (2001). Chondrogenic Differentiation of Mesenchymal Stem Cells from Bone Marrow: Differentiation-Dependent Gene Expression of Matrix Components. *Exp Cell Res* **268**, 189–200.
- Bartmann C, Rohde E, Schallmoser K, Pürstner P, Lanzer G, Linkesch W & Strunk D (2007). Two steps to functional mesenchymal stromal cells for clinical application. *Transfusion (Paris)* **47**, 1426–1435.

- Basciano L, Nemos C, Foliguet B, de Isla N, de Carvalho M, Tran N & Dalloul A (2011). Long term culture of mesenchymal stem cells in hypoxia promotes a genetic program maintaining their undifferentiated and multipotent status. *BMC Cell Biol* **12**, 12.
- Battiwalla M & Hematti P (2009). Mesenchymal stem cells in hematopoietic stem cell transplantation. *Cytotherapy* **11**, 503–515.
- Baynat C, Andro C, Vincent J-P, Moynot J-C, Perchoc A, Schiele P, Guillemot E, Buisson P, Dubrana F & Gunepin F-X (2012). Substitut méniscal de type Actifit®. Expérience brestoise de dix cas. *Rev Chir Orthopédique Traumatol* **98**, S144–S149.
- Beaufils, Boisrenoult, Charrois, Jouve, Pujol & Wajsfisz (2011). Réparation et remplacement méniscal. Available at: <http://www.maitrise-orthopedique.com/articles/reparation-et-remplacement-meniscal-21>.
- Beckermann BM, Kallifatidis G, Groth A, Frommhold D, Apel A, Mattern J, Salnikov AV, Moldenhauer G, Wagner W, Diehlmann A, Saffrich R, Schubert M, Ho AD, Giese N, Büchler MW, Friess H, Büchler P & Herr I (2008). VEGF expression by mesenchymal stem cells contributes to angiogenesis in pancreatic carcinoma. *Br J Cancer* **99**, 622–631.
- Beederman M et al. (2013). BMP signaling in mesenchymal stem cell differentiation and bone formation. *J Biomed Sci Eng* **06**, 32–52.
- Beegle J, Lakatos K, Kalomoiris S, Stewart H, Isseroff RR, Nolte JA & Fierro FA (2015). Hypoxic Preconditioning of Mesenchymal Stromal Cells Induces Metabolic Changes, Enhances Survival and Promotes Cell Retention in Vivo. *Stem Cells Dayt Ohio*; DOI: 10.1002/stem.1976.
- Bensidhoum M, Chapel A, Francois S, Demarquay C, Mazurier C, Fouillard L, Bouchet S, Bertho JM, Gourmelon P, Aigueperse J, Charbord P, Gorin NC, Thierry D & Lopez M (2004). Homing of in vitro expanded Stro-1- or Stro-1+ human mesenchymal stem cells into the NOD/SCID mouse and their role in supporting human CD34 cell engraftment. *Blood* **103**, 3313–3319.
- Bernardo ME, Avanzini MA, Perotti C, Cometa AM, Moretta A, Lenta E, Del Fante C, Novara F, de Silvestri A, Amendola G, Zuffardi O, Maccario R & Locatelli F (2007). Optimization of in vitro expansion of human multipotent mesenchymal stromal cells for cell-therapy approaches: further insights in the search for a fetal calf serum substitute. *J Cell Physiol* **211**, 121–130.
- Berniakovich I & Giorgio M (2013). Low oxygen tension maintains multipotency, whereas normoxia increases differentiation of mouse bone marrow stromal cells. *Int J Mol Sci* **14**, 2119–2134.
- Bey E, Prat M, Duhamel P, Benderitter M, Brachet M, Trompier F, Battaglini P, Ernou I, Boutin L, Gourven M, Tissedre F, Créa S, Mansour CA, de Revel T, Carsin H, Gourmelon P & Lataillade J-J (2010). Emerging therapy for improving wound repair of severe radiation burns using local bone marrow-derived stem cell administrations. *Wound Repair Regen Off Publ Wound Heal Soc Eur Tissue Repair Soc* **18**, 50–58.

- Bianco P, Cao X, Frenette PS, Mao JJ, Robey PG, Simmons PJ & Wang C-Y (2013). The meaning, the sense and the significance: translating the science of mesenchymal stem cells into medicine. *Nat Med* **19**, 35–42.
- Bibby SRS & Urban JPG (2004). Effect of nutrient deprivation on the viability of intervertebral disc cells. *Eur Spine J Off Publ Eur Spine Soc Eur Spinal Deform Soc Eur Sect Cerv Spine Res Soc* **13**, 695–701.
- Bieback K, Hecker A, Kocaömer A, Lannert H, Schallmoser K, Strunk D & Klüter H (2009). Human alternatives to fetal bovine serum for the expansion of mesenchymal stromal cells from bone marrow. *Stem Cells Dayt Ohio* **27**, 2331–2341.
- Birch JR & Racher AJ (2006). Antibody production. *Adv Drug Deliv Rev* **58**, 671–685.
- Birmingham E, Niebur GL, McHugh PE, Shaw G, Barry FP & McNamara LM (2012). Osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells is regulated by osteocyte and osteoblast cells in a simplified bone niche. *Eur Cell Mater* **23**, 13–27.
- Blackburn TA & Craig E (1980). Knee anatomy: a brief review. *Phys Ther* **60**, 1556–1560.
- Bland E, Dréau D & Burg KJL (2013). Overcoming hypoxia to improve tissue-engineering approaches to regenerative medicine. *J Tissue Eng Regen Med* **7**, 505–514.
- Boecker AH, van Neerven SGA, Scheffel J, Tank J, Altinova H, Seidensticker K, Deumens R, Tolba R, Weis J, Brook GA, Pallua N & Bozkurt A (2015). Pre-differentiation of mesenchymal stromal cells in combination with a microstructured nerve guide supports peripheral nerve regeneration in the rat sciatic nerve model. *Eur J Neuroscin/a – n/a*.
- Bonab MM, Alimoghaddam K, Talebian F, Ghaffari SH, Ghavamzadeh A & Nikbin B (2006). Aging of mesenchymal stem cell in vitro. *BMC Cell Biol* **7**, 14.
- Boris V. Afanasyev EE (2009). A.J. Friedenstein, founder of the mesenchymal stem cell concept. *Cell Ther Transplant*.
- Bouffi C, Thomas O, Bony C, Giteau A, Venier-Julienne M-C, Jorgensen C, Montero-Menei C & Noël D (2010). The role of pharmacologically active microcarriers releasing TGF-beta3 in cartilage formation in vivo by mesenchymal stem cells. *Biomaterials* **31**, 6485–6493.
- Boulic E (2015). *Les greffons osseux allogéniques en chirurgie d'apposition. A propos d'une étude histologique réalisée au CHRU de Brest*. (thesis). UFR d'odontologie de Brest, Brest.
- Bradley MP, Fadale PD, Hulstyn MJ, Muirhead WR & Lifrak JT (2007). Porcine small intestine submucosa for repair of goat meniscal defects. *Orthopedics* **30**, 650–656.
- Buckwalter JA, Glimcher MJ, Cooper RR & Recker R (1996). Bone biology. I: Structure, blood supply, cells, matrix, and mineralization. *Instr Course Lect* **45**, 371–386.

- Buyel JF, Twyman RM & Fischer R (2015). Extraction and downstream processing of plant-derived recombinant proteins. *Biotechnol Adv*; DOI: 10.1016/j.biotechadv.2015.04.010.
- Byrne B (2015). *Pichia pastoris* as an expression host for membrane protein structural biology. *Curr Opin Struct Biol* **32**, 9–17.
- Capelli C, Domenghini M, Borleri G, Bellavita P, Poma R, Carobbio A, Micò C, Rambaldi A, Golay J & Inrona M (2007). Human platelet lysate allows expansion and clinical grade production of mesenchymal stromal cells from small samples of bone marrow aspirates or marrow filter washouts. *Bone Marrow Transplant* **40**, 785–791.
- Caplan AI (2010). What's in a name? *Tissue Eng Part A* **16**, 2415–2417.
- Cashman TJ, Gouon-Evans V & Costa KD (2013). Mesenchymal stem cells for cardiac therapy: practical challenges and potential mechanisms. *Stem Cell Rev* **9**, 254–265.
- Centeno CJ, Busse D, Kisiday J, Keohan C, Freeman M & Karli D (2008). Increased knee cartilage volume in degenerative joint disease using percutaneously implanted, autologous mesenchymal stem cells. *Pain Physician* **11**, 343–353.
- Chabasse C, Bailly X, Rousselot M & Zal F (2006). The multigenic family of the extracellular hemoglobin from the annelid polychaete *Arenicola marina*. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol* **144**, 319–325.
- Chai YC, Roberts SJ, Desmet E, Kerckhofs G, van Gastel N, Geris L, Carmeliet G, Schrooten J & Luyten FP (2012). Mechanisms of ectopic bone formation by human osteoprogenitor cells on CaP biomaterial carriers. *Biomaterials* **33**, 3127–3142.
- Chartrain M & Chu L (2008). Development and production of commercial therapeutic monoclonal antibodies in Mammalian cell expression systems: an overview of the current upstream technologies. *Curr Pharm Biotechnol* **9**, 447–467.
- Chen AK-L, Reuveny S & Oh SKW (2013). Application of human mesenchymal and pluripotent stem cell microcarrier cultures in cellular therapy: Achievements and future direction. *Biotechnol Adv* **31**, 1032–1046.
- Chen B, Lin H, Wang J, Zhao Y, Wang B, Zhao W, Sun W & Dai J (2007). Homogeneous osteogenesis and bone regeneration by demineralized bone matrix loading with collagen-targeting bone morphogenetic protein-2. *Biomaterials* **28**, 1027–1035.
- Chen C-T, Hsu S-H & Wei Y-H (2010). Upregulation of mitochondrial function and antioxidant defense in the differentiation of stem cells. *Biochim Biophys Acta* **1800**, 257–263.
- Chen FK, McLenachan S, Edel M, Da Cruz L, Coffey PJ & Mackey DA (2014). iPS Cells for Modelling and Treatment of Retinal Diseases. *J Clin Med* **3**, 1511–1541.
- Chen H-T, Lee M-J, Chen C-H, Chuang S-C, Chang L-F, Ho M-L, Hung S-H, Fu Y-C, Wang Y-H, Wang H-I, Wang G-J, Kang L & Chang J-K (2012). Proliferation and



- differentiation potential of human adipose-derived mesenchymal stem cells isolated from elderly patients with osteoporotic fractures. *J Cell Mol Med* **16**, 582–593.
- Chen J-Y, Scerbo M & Kramer G (2009). A Review of Blood Substitutes: Examining The History, Clinical Trial Results, and Ethics of Hemoglobin-Based Oxygen Carriers. *Clin Sao Paulo Braz* **64**, 803–813.
- Chen L-B, Jiang X-B & Yang L (2004). Differentiation of rat marrow mesenchymal stem cells into pancreatic islet beta-cells. *World J Gastroenterol WJG* **10**, 3016–3020.
- Chevallier N, Anagnostou F, Zilber S, Bodivit G, Maurin S, Barrault A, Bierling P, Hernigou P, Layrolle P & Rouard H (2010). Osteoblastic differentiation of human mesenchymal stem cells with platelet lysate. *Biomaterials* **31**, 270–278.
- Chouteau J, Bignon A, Chavassieux P, Chevalier J, Melin M, Fantozzi G, Boivin G, Hartmann D & Carret J-P (2003). [Cellular culture of osteoblasts and fibroblasts on porous calcium-phosphate bone substitutes]. *Rev Chir Orthopédique Réparatrice Appar Mot* **89**, 44–52.
- Clark LC & Gollan F (1966). Survival of mammals breathing organic liquids equilibrated with oxygen at atmospheric pressure. *Science* **152**, 1755–1756.
- Cook JA & Fox MH (1988). Effects of acute pH 6.6 and 42.0 degrees C heating on the intracellular pH of Chinese hamster ovary cells. *Cancer Res* **48**, 497–502.
- Cook JL, Fox DB, Malaviya P, Tomlinson JL, Kuroki K, Cook CR & Kladakis S (2006). Long-term outcome for large meniscal defects treated with small intestinal submucosa in a dog model. *Am J Sports Med* **34**, 32–42.
- Cooper CA, Maga EA & Murray JD (2015). Production of human lactoferrin and lysozyme in the milk of transgenic dairy animals: past, present, and future. *Transgenic Res*; DOI: 10.1007/s11248-015-9885-5.
- Cordaro L & Terheyden H (2014). *Procédures d'augmentation de la crête alvéolaire en implantologie: Une approche en plusieurs temps*. Quintessence Publishing Company.
- Croutze R, Jomha N, Uludag H & Adesida A (2013). Matrix forming characteristics of inner and outer human meniscus cells on 3D collagen scaffolds under normal and low oxygen tensions. *BMC Musculoskelet Disord* **14**, 353.
- Csaki C, Matis U, Mobasheri A & Shakibaei M (2009). Co-culture of canine mesenchymal stem cells with primary bone-derived osteoblasts promotes osteogenic differentiation. *Histochem Cell Biol* **131**, 251–266.
- Cui JH, Chang H-G & Kim Y-C (2012a). The effects of monolayer subculture on the phenotype and growth of degenerated human intervertebral disc cells. *Tissue Eng Regen Med* **9**, 92–100.
- Cui X, Hasegawa A, Lotz M & D'Lima D (2012b). Structured three-dimensional co-culture of mesenchymal stem cells with meniscus cells promotes meniscal phenotype without hypertrophy. *Biotechnol Bioeng* **109**, 2369–2380.

- Cukierman E, Pankov R, Stevens DR & Yamada KM (2001). Taking cell-matrix adhesions to the third dimension. *Science* **294**, 1708–1712.
- Daar AS & Greenwood HL (2007). A proposed definition of regenerative medicine. *J Tissue Eng Regen Med* **1**, 179–184.
- Day B, Mackenzie WG, Shim SS & Leung G (1985). The vascular and nerve supply of the human meniscus. *Arthrosc J Arthrosc Relat Surg* **1**, 58–62.
- Deschepper M, Manassero M, Oudina K, Paquet J, Monfoulet L-E, Bensidhoum M, Logeart-Avramoglou D & Petite H (2013). Proangiogenic and prosurvival functions of glucose in human mesenchymal stem cells upon transplantation. *Stem Cells Dayt Ohio* **31**, 526–535.
- Deschepper M, Oudina K, David B, Myrtil V, Collet C, Bensidhoum M, Logeart-Avramoglou D & Petite H (2011). Survival and function of mesenchymal stem cells (MSCs) depend on glucose to overcome exposure to long-term, severe and continuous hypoxia. *J Cell Mol Med* **15**, 1505–1514.
- Devine SM, Cobbs C, Jennings M, Bartholomew A & Hoffman R (2003). Mesenchymal stem cells distribute to a wide range of tissues following systemic infusion into nonhuman primates. *Blood* **101**, 2999–3001.
- deZengotita VM, Schmelzer AE & Miller WM (2002). Characterization of hybridoma cell responses to elevated pCO<sub>2</sub> and osmolality: intracellular pH, cell size, apoptosis, and metabolism. *Biotechnol Bioeng* **77**, 369–380.
- Dickerson RE (2008). Max Perutz and the secret of life, by Georgina Ferry. *Protein Sci Publ Protein Soc* **17**, 377–379.
- Dimitriou R, Mataliotakis GI, Angoules AG, Kanakaris NK & Giannoudis PV (2011). Complications following autologous bone graft harvesting from the iliac crest and using the RIA: a systematic review. *Injury* **42 Suppl 2**, S3–S15.
- D’Ippolito G, Diabira S, Howard GA, Roos BA & Schiller PC (2006). Low oxygen tension inhibits osteogenic differentiation and enhances stemness of human MIAMI cells. *Bone* **39**, 513–522.
- Djurasovic M, Aldridge JW, Grumbles R, Rosenwasser MP, Howell D & Ratcliffe A (1998). Knee joint immobilization decreases aggrecan gene expression in the meniscus. *Am J Sports Med* **26**, 460–466.
- Dodson BP & Levine AD (2015). Challenges in the translation and commercialization of cell therapies. *BMC Biotechnol* **15**, 70.
- Dominici M, Le Blanc K, Mueller I, Slaper-Cortenbach I, Marini F, Krause D, Deans R, Keating A, Prockop D & Horwitz E (2006). Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy* **8**, 315–317.
- Dorai H, Ellis D, Keung YS, Campbell M, Zhuang M, Lin C & Betenbaugh MJ (2010). Combining high-throughput screening of caspase activity with anti-apoptosis genes

- for development of robust CHO production cell lines. *Biotechnol Prog* **26**, 1367–1381.
- Dorozhkin SV (2010). Amorphous calcium (ortho)phosphates. *Acta Biomater* **6**, 4457–4475.
- Doucet C, Ernou I, Zhang Y, Llense J-R, Begot L, Holy X & Lataillade J-J (2005). Platelet lysates promote mesenchymal stem cell expansion: A safety substitute for animal serum in cell-based therapy applications. *J Cell Physiol* **205**, 228–236.
- Dubey N, Bentini R, Islam I, Cao T, Castro Neto AH & Rosa V (2015). Graphene: A Versatile Carbon-Based Material for Bone Tissue Engineering. *Stem Cells Int* **2015**, 804213.
- Dumitrescu AL (2011). Bone Grafts and Bone Graft Substitutes in Periodontal Therapy. In *Chemicals in Surgical Periodontal Therapy*, pp. 73–144. Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg. Available at: [http://link.springer.com/10.1007/978-3-642-18225-9\\_2](http://link.springer.com/10.1007/978-3-642-18225-9_2) [Accessed October 5, 2015].
- Duncan RL & Turner CH (1995). Mechanotransduction and the functional response of bone to mechanical strain. *Calcif Tissue Int* **57**, 344–358.
- Duval C (2014). Recherche de marqueurs spécifiques des fibrochondrocytes par spectrométrie de masse.
- de Duve C (1996). *Poussière de vie: Une histoire du vivant*. Fayard.
- Ejtehadifar M, Shamsasenjan K, Movassaghpour A, Akbarzadehlaleh P, Dehdilani N, Abbasi P, Molaeipour Z & Saleh M (2015). The Effect of Hypoxia on Mesenchymal Stem Cell Biology. *Adv Pharm Bull* **5**, 141–149.
- Fairbank TJ (1948). Knee joint changes after meniscectomy. *J Bone Joint Surg Br* **30B**, 664–670.
- Fan F & Wood KV (2007). Bioluminescent assays for high-throughput screening. *Assay Drug Dev Technol* **5**, 127–136.
- Farley JR, Hall SL, Tanner MA & Wergedal JE (1994). Specific activity of skeletal alkaline phosphatase in human osteoblast-line cells regulated by phosphate, phosphate esters, and phosphate analogs and release of alkaline phosphatase activity inversely regulated by calcium. *J Bone Miner Res* **9**, 497–508.
- Farrell MJ, Shin JI, Smith LJ & Mauck RL (2015). Functional consequences of glucose and oxygen deprivation on engineered mesenchymal stem cell-based cartilage constructs. *Osteoarthr Cartil OARS Osteoarthr Res Soc* **23**, 134–142.
- Figueroa B, Ailor E, Osborne D, Hardwick JM, Reff M & Betenbaugh MJ (2007). Enhanced cell culture performance using inducible anti-apoptotic genes E1B-19K and Aven in the production of a monoclonal antibody with Chinese hamster ovary cells. *Biotechnol Bioeng* **97**, 877–892.

- Fischer B, Sumner I & Goodenough P (1993). Isolation, renaturation, and formation of disulfide bonds of eukaryotic proteins expressed in *Escherichia coli* as inclusion bodies. *Biotechnol Bioeng* **41**, 3–13.
- Flemming A, Schallmoser K, Strunk D, Stolk M, Volk H-D & Seifert M (2011). Immunomodulative efficacy of bone marrow-derived mesenchymal stem cells cultured in human platelet lysate. *J Clin Immunol* **31**, 1143–1156.
- Florencio-Silva R, Sasso GR da S, Sasso-Cerri E, Simões MJ, Cerri PS, rgio, Florencio-Silva R, Sasso GR da S, Sasso-Cerri E, Simões MJ, Cerri PS & rgio (2015). Biology of Bone Tissue: Structure, Function, and Factors That Influence Bone Cells, Biology of Bone Tissue: Structure, Function, and Factors That Influence Bone Cells. *BioMed Res Int BioMed Res Int* **2015**, **2015**, e421746.
- Fransson M, Brännström J, Duprez I, Essand M, Le Blanc K, Korsgren O & Magnusson PU (2015). Mesenchymal stromal cells support endothelial cell interactions in an intramuscular islet transplantation model. *Regen Med Res* **3**, 1.
- Fréchette J-P, Martineau I & Gagnon G (2005). Platelet-rich plasmas: growth factor content and roles in wound healing. *J Dent Res* **84**, 434–439.
- Frey AD, Shepherd M, Jokipii-Lukkari S, Häggman H & Kallio PT (2011). The single-domain globin of *Vitreoscilla*: augmentation of aerobic metabolism for biotechnological applications. *Adv Microb Physiol* **58**, 81–139.
- Friedenstein AJ, Chailakhyan RK, Latsinik NV, Panasyuk AF & Keiliss-Borok IV (1974). Stromal cells responsible for transferring the microenvironment of the hemopoietic tissues. Cloning in vitro and retransplantation in vivo. *Transplantation* **17**, 331–340.
- Fuerst G, Gruber R, Tangl S, Sanroman F & Watzek G (2003). Enhanced bone-to-implant contact by platelet-released growth factors in mandibular cortical bone: a histomorphometric study in minipigs. *Int J Oral Maxillofac Implants* **18**, 685–690.
- Furumatsu T, Kanazawa T, Yokoyama Y, Abe N & Ozaki T (2011). Inner meniscus cells maintain higher chondrogenic phenotype compared with outer meniscus cells. *Connect Tissue Res* **52**, 459–465.
- Galderisi U, Giordano A & Paggi MG (2010). The bad and the good of mesenchymal stem cells in cancer: Boosters of tumor growth and vehicles for targeted delivery of anticancer agents. *World J Stem Cells* **2**, 5–12.
- Gamblin A-L, Brennan MA, Renaud A, Yagita H, Lézot F, Heymann D, Trichet V & Layrolle P (2014). Bone tissue formation with human mesenchymal stem cells and biphasic calcium phosphate ceramics: the local implication of osteoclasts and macrophages. *Biomaterials* **35**, 9660–9667.
- Gargaud M (2005). *L'environnement de la terre primitive*. Presses Univ de Bordeaux.
- Gerngross TU (2004). Advances in the production of human therapeutic proteins in yeasts and filamentous fungi. *Nat Biotechnol* **22**, 1409–1414.

- Giannoudis PV, Dinopoulos H & Tsiridis E (2005). Bone substitutes: an update. *Injury* **36** Suppl 3, S20–S27.
- Gille JJ & Joenje H (1992). Cell culture models for oxidative stress: superoxide and hydrogen peroxide versus normobaric hyperoxia. *Mutat Res* **275**, 405–414.
- Glueck M, Gardner O, Czekanska E, Alini M, Stoddart MJ, Salzman GM & Schmal H (2015). Induction of Osteogenic Differentiation in Human Mesenchymal Stem Cells by Crosstalk with Osteoblasts. *BioResearch Open Access* **4**, 121–130.
- Gomes PS & Fernandes MH (2011). Rodent models in bone-related research: the relevance of calvarial defects in the assessment of bone regeneration strategies. *Lab Anim* **45**, 14–24.
- Gomord V, Chamberlain P, Jefferis R & Faye L (2005). Biopharmaceutical production in plants: problems, solutions and opportunities. *Trends Biotechnol* **23**, 559–565.
- Gonçalves F da C, Paz AH da R, Lora PS, Passos EP & Cirne-Lima EO (2012). Dynamic culture improves MSC adhesion on freeze-dried bone as a scaffold for bone engineering. *World J Stem Cells* **4**, 9–16.
- Grayson WL, Zhao F, Bunnell B & Ma T (2007). Hypoxia enhances proliferation and tissue formation of human mesenchymal stem cells. *Biochem Biophys Res Commun* **358**, 948–953.
- Grayson WL, Zhao F, Izadpanah R, Bunnell B & Ma T (2006). Effects of hypoxia on human mesenchymal stem cell expansion and plasticity in 3D constructs. *J Cell Physiol* **207**, 331–339.
- Guo W, Liu S, Zhu Y, Yu C, Lu S, Yuan M, Gao Y, Huang J, Yuan Z, Peng J, Wang A, Wang Y, Chen J, Zhang L, Sui X, Xu W & Guo Q (2015). Advances and Prospects in Tissue-Engineered Meniscal Scaffolds for Meniscus Regeneration. *Stem Cells Int* **2015**, 517520.
- Haider HK & Ashraf M (2008). Strategies to promote donor cell survival: Combining preconditioning approach with stem cell transplantation. *J Mol Cell Cardiol* **45**, 554–566.
- Hanks JH & Bang FB (1971). Obituary Dr. George Otto Gey 1899–1970. *Cancer Res* **31**, 1316–1316.
- Heidemann R, Lütkemeyer D, Büntemeyer H & Lehmann J (1998). Effects of dissolved oxygen levels and the role of extra- and intracellular amino acid concentrations upon the metabolism of mammalian cell lines during batch and continuous cultures. *Cytotechnology* **26**, 185–197.
- Heino TJ, Hentunen TA & Väänänen HK (2004). Conditioned medium from osteocytes stimulates the proliferation of bone marrow mesenchymal stem cells and their differentiation into osteoblasts. *Exp Cell Res* **294**, 458–468.

- Hoffman SJ, Looker DL, Roehrich JM, Cozart PE, Durfee SL, Tedesco JL & Stetler GL (1990). Expression of fully functional tetrameric human hemoglobin in *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **87**, 8521–8525.
- Holtorf HL, Datta N, Jansen JA & Mikos AG (2005). Scaffold mesh size affects the osteoblastic differentiation of seeded marrow stromal cells cultured in a flow perfusion bioreactor. *J Biomed Mater Res A* **74**, 171–180.
- Holy CE, Shoichet MS & Davies JE (2000). Engineering three-dimensional bone tissue in vitro using biodegradable scaffolds: investigating initial cell-seeding density and culture period. *J Biomed Mater Res* **51**, 376–382.
- Huang H-L, Hsing H-W, Lai T-C, Chen Y-W, Lee T-R, Chan H-T, Lyu P-C, Wu C-L, Lu Y-C, Lin S-T, Lin C-W, Lai C-H, Chang H-T, Chou H-C & Chan H-L (2010). Trypsin-induced proteome alteration during cell subculture in mammalian cells. *J Biomed Sci* **17**, 36.
- Huebsch N, Arany PR, Mao AS, Shvartsman D, Ali OA, Bencherif SA, Rivera-Feliciano J & Mooney DJ (2010). Harnessing traction-mediated manipulation of the cell/matrix interface to control stem-cell fate. *Nat Mater* **9**, 518–526.
- Huheey JE, Keiter EA & Keiter RL (2000). *Chimie inorganique*. De Boeck Supérieur.
- Hung S-P, Ho JH, Shih Y-RV, Lo T & Lee OK (2012). Hypoxia promotes proliferation and osteogenic differentiation potentials of human mesenchymal stem cells. *J Orthop Res Off Publ Orthop Res Soc* **30**, 260–266.
- Hutmacher DW (2000). Scaffolds in tissue engineering bone and cartilage. *Biomaterials* **21**, 2529–2543.
- Hynes R (2013). The Molecular Basis of Cell Adhesion in Normal and Pathological Situations. *HHMI.org*. Available at: <https://www.hhmi.org/research/molecular-basis-cell-adhesion-normal-and-pathological-situations> [Accessed October 12, 2015].
- Ibrahim M (2013). *Recherche de biomarqueurs d'exposition et d'effet à des cancérigènes de l'environnement par spectrométrie de masse*. (Co-tutelle thesis). Chimie biologique et applications thérapeutiques - Université de Starsbourg et université Libanaise, Université de Starsbourg.
- Ikebe C & Suzuki K (2014). Mesenchymal Stem Cells for Regenerative Therapy: Optimization of Cell Preparation Protocols. *BioMed Res Int* **2014**, e951512.
- Ischiropoulos H & Al-Mehdi AB (1995). Peroxynitrite-mediated oxidative protein modifications. *FEBS Lett* **364**, 279–282.
- Ivanovic Z (2009). Hypoxia or in situ normoxia: The stem cell paradigm. *J Cell Physiol* **219**, 271–275.
- Jahagirdar BN & Verfaillie CM (2005). Multipotent adult progenitor cell and stem cell plasticity. *Stem Cell Rev* **1**, 53–59.

- Janssen YM, Van Houten B, Borm PJ & Mossman BT (1993). Cell and tissue responses to oxidative damage. *Lab Invest J Tech Methods Pathol* **69**, 261–274.
- Jayapal K, Wlaschin K, Hu W-S & Yap M (2007). Recombinant Protein Therapeutics from CHO Cells - 20 Years and Counting. *CHO Consort SBE Spec Ed* 40–47.
- Jochems CEA, van der Valk JBF, Stafleu FR & Baumans V (2002). The use of fetal bovine serum: ethical or scientific problem? *Altern Lab Anim ATLA* **30**, 219–227.
- Jones DL & Wagers AJ (2008). No place like home: anatomy and function of the stem cell niche. *Nat Rev Mol Cell Biol* **9**, 11–21.
- Jonsdottir-Buch SM, Lieder R & Sigurjonsson OE (2013). Platelet lysates produced from expired platelet concentrates support growth and osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells. *PLoS One* **8**, e68984.
- Jorgensen C & Noël D (2011). Mesenchymal stem cells in osteoarticular diseases. *Regen Med* **6**, 44–51.
- Justesen J, Stenderup K, Eriksen EF & Kassem M (2002). Maintenance of osteoblastic and adipocytic differentiation potential with age and osteoporosis in human marrow stromal cell cultures. *Calcif Tissue Int* **71**, 36–44.
- Kamga C, Krishnamurthy S & Shiva S (2012). Myoglobin and Mitochondria: A relationship bound by Oxygen and Nitric Oxide. *Nitric Oxide* **26**, 251–258.
- Kasper FK, Liao J, Kretlow JD, Sikavitsas VI & Mikos AG (2008). Flow perfusion culture of mesenchymal stem cells for bone tissue engineering. In *StemBook*. Harvard Stem Cell Institute, Cambridge (MA). Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK27082/> [Accessed September 8, 2015].
- Kelly BT, Robertson W, Potter HG, Deng X-H, Turner AS, Lyman S, Warren RF & Rodeo SA (2007). Hydrogel meniscal replacement in the sheep knee: preliminary evaluation of chondroprotective effects. *Am J Sports Med* **35**, 43–52.
- Kerins DM (1994). Role of the perfluorocarbon Fluosol-DA in coronary angioplasty. *Am J Med Sci* **307**, 218–221.
- Kern S, Eichler H, Stoeve J, Klüter H & Bieback K (2006). Comparative Analysis of Mesenchymal Stem Cells from Bone Marrow, Umbilical Cord Blood, or Adipose Tissue. *STEM CELLS* **24**, 1294–1301.
- Kim BS, Putnam AJ, Kulik TJ & Mooney DJ (1998). Optimizing seeding and culture methods to engineer smooth muscle tissue on biodegradable polymer matrices. *Biotechnol Bioeng* **57**, 46–54.
- Kim DH, Yoo KH, Choi KS, Choi J, Choi S-Y, Yang S-E, Yang Y-S, Im HJ, Kim KH, Jung HL, Sung KW & Koo HH (2005). Gene expression profile of cytokine and growth factor during differentiation of bone marrow-derived mesenchymal stem cell. *Cytokine* **31**, 119–126.
- Kim M, Kim C, Choi YS, Kim M, Park C & Suh Y (2012). Age-related alterations in mesenchymal stem cells related to shift in differentiation from osteogenic to

- adipogenic potential: implication to age-associated bone diseases and defects. *Mech Ageing Dev* **133**, 215–225.
- Köhler G & Milstein C (1975). Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature* **256**, 495–497.
- Kolf CM, Cho E & Tuan RS (2007). Mesenchymal stromal cells. Biology of adult mesenchymal stem cells: regulation of niche, self-renewal and differentiation. *Arthritis Res Ther* **9**, 204.
- Komarova SV, Ataullakhanov FI & Globus RK (2000). Bioenergetics and mitochondrial transmembrane potential during differentiation of cultured osteoblasts. *Am J Physiol Cell Physiol* **279**, C1220–C1229.
- Křenek P, Šamajová O, Luptovčíak I, Doskočilová A, Komis G & Šamaj J (2015). Transient plant transformation mediated by *Agrobacterium tumefaciens*: Principles, methods and applications. *Biotechnol Adv*; DOI: 10.1016/j.biotechadv.2015.03.012.
- Kretzmer G (2002). Industrial processes with animal cells. *Appl Microbiol Biotechnol* **59**, 135–142.
- Kuo K-C, Lin R-Z, Tien H-W, Wu P-Y, Li Y-C, Melero-Martin JM & Chen Y-C (2015). Bioengineering vascularized tissue constructs using an injectable cell-laden enzymatically crosslinked collagen hydrogel derived from dermal extracellular matrix. *Acta Biomater*; DOI: 10.1016/j.actbio.2015.09.002.
- Kurano N, Leist C, Messi F, Kurano S & Fiechter A (1990). Growth behavior of Chinese hamster ovary cells in a compact loop bioreactor: 1. Effects of physical and chemical environments. *J Biotechnol* **15**, 101–111.
- Lam AT-L, Chen AK-L, Ting SQ-P, Reuveny S & Oh SK-W (2015). Integrated processes for expansion and differentiation of human pluripotent stem cells in suspended microcarriers cultures. *Biochem Biophys Res Commun*; DOI: 10.1016/j.bbrc.2015.09.079.
- Lance C (2013). *Respiration et photosynthèse: Histoire et secrets d'une équation*. EDP Sciences.
- Le Blanc K, Frassoni F, Ball L, Locatelli F, Roelofs H, Lewis I, Lanino E, Sundberg B, Bernardo ME, Remberger M, Dini G, Egeler RM, Bacigalupo A, Fibbe W, Ringdén O & Developmental Committee of the European Group for Blood and Marrow Transplantation (2008). Mesenchymal stem cells for treatment of steroid-resistant, severe, acute graft-versus-host disease: a phase II study. *Lancet Lond Engl* **371**, 1579–1586.
- Lee H-S, Huang G-T, Chiang H, Chiou L-L, Chen M-H, Hsieh C-H & Jiang C-C (2003). Multipotential Mesenchymal Stem Cells from Femoral Bone Marrow Near the Site of Osteonecrosis. *STEM CELLS* **21**, 190–199.
- Lee JM, Mhaweche-Fauceglia P, Lee N, Parsanian LC, Lin YG, Gayther SA & Lawrenson K (2013a). A three-dimensional microenvironment alters protein expression and



- chemosensitivity of epithelial ovarian cancer cells in vitro. *Lab Investig J Tech Methods Pathol* **93**, 528–542.
- Lee MW, Kim DS, Yoo KH, Kim HR, Jang IK, Lee JH, Kim SY, Son MH, Lee SH, Jung HL, Sung KW & Koo HH (2013b). Human bone marrow-derived mesenchymal stem cell gene expression patterns vary with culture conditions. *Blood Res* **48**, 107.
- Le Gall T, Polard V, Rousselot M, Lotte A, Raouane M, Lehn P, Opolon P, Leize E, Deutsch E, Zal F & Montier T (2014). In vivo biodistribution and oxygenation potential of a new generation of oxygen carrier. *J Biotechnol*; DOI: 10.1016/j.jbiotec.2014.07.008.
- Leotot J, Coquelin L, Bodivit G, Bierling P, Hernigou P, Rouard H & Chevallier N (2013). Platelet lysate coating on scaffolds directly and indirectly enhances cell migration, improving bone and blood vessel formation. *Acta Biomater* **9**, 6630–6640.
- Le Pape F, Bossard M, Dutheil D, Rousselot M, Polard V, Férec C, Leize E, Delépine P & Zal F (2015). Advancement in recombinant protein production using a marine oxygen carrier to enhance oxygen transfer in a CHO-S cell line. *Artif Cells Nanomedicine Biotechnol* 1–10.
- Li F, Vijayasankaran N, Shen AY, Kiss R & Amanullah A (2010). Cell culture processes for monoclonal antibody production. *mAbs* **2**, 466–479.
- Li H, Dai K, Tang T, Zhang X, Yan M & Lou J (2007). Bone regeneration by implantation of adipose-derived stromal cells expressing BMP-2. *Biochem Biophys Res Commun* **356**, 836–842.
- Lillico SG, Sherman A, McGrew MJ, Robertson CD, Smith J, Haslam C, Barnard P, Radcliffe PA, Mitrophanous KA, Elliot EA & Sang HM (2007). Oviduct-specific expression of two therapeutic proteins in transgenic hens. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**, 1771–1776.
- Liu C, Abedian R, Meister R, Haasper C, Hurschler C, Krettek C, von Lewinski G & Jagodzinski M (2012). Influence of perfusion and compression on the proliferation and differentiation of bone mesenchymal stromal cells seeded on polyurethane scaffolds. *Biomaterials* **33**, 1052–1064.
- Looker D, Abbott-Brown D, Cozart P, Durfee S, Hoffman S, Mathews AJ, Miller-Roehrich J, Shoemaker S, Trimble S & Fermi G (1992). A human recombinant haemoglobin designed for use as a blood substitute. *Nature* **356**, 258–260.
- Lopes JP, Fiarresga A, Silva Cunha P, Feliciano J & Cruz Ferreira R (2013). Terapia celular cardíaca com células mesenquimatosas. *Rev Port Cardiol* **32**, 43–47.
- Lubiniecki (1990). *Large-Scale Mammalian Cell Culture Technology*. CRC Press.
- Luca AC, Mersch S, Deenen R, Schmidt S, Messner I, Schäfer K-L, Baldus SE, Huckenbeck W, Piekorz RP, Knoefel WT, Krieg A & Stoecklein NH (2013). Impact of the 3D microenvironment on phenotype, gene expression, and EGFR inhibition of colorectal cancer cell lines. *PloS One* **8**, e59689.

- Lu H-F, Lim WS, Zhang P-C, Chia SM, Yu H, Mao H-Q & Leong KW (2005). Galactosylated poly(vinylidene difluoride) hollow fiber bioreactor for hepatocyte culture. *Tissue Eng* **11**, 1667–1677.
- Luo F, Hou T-Y, Zhang Z-H, Xie Z, Wu X-H & Xu J-Z (2013). Effects of initial cell density and hydrodynamic culture on osteogenic activity of tissue-engineered bone grafts. *PloS One* **8**, e53697.
- Lv F-J, Tuan RS, Cheung KMC & Leung VYL (2014). Concise Review: The Surface Markers and Identity of Human Mesenchymal Stem Cells. *STEM CELLS* **32**, 1408–1419.
- Makris EA, Hadidi P & Athanasiou KA (2011). The knee meniscus: structure-function, pathophysiology, current repair techniques, and prospects for regeneration. *Biomaterials* **32**, 7411–7431.
- Malard O, Guicheux J, Bouler J-M, Gauthier O, Beauvillain de Montreuil C, Aguado E, Pilet P, LeGeros R & Daculsi G (2005). Calcium phosphate scaffold and bone marrow for bone reconstruction in irradiated area: a dog study. *Bone* **36**, 323–330.
- Malda J, Martens DE, Tramper J, van Blitterswijk CA & Riesle J (2003). Cartilage tissue engineering: controversy in the effect of oxygen. *Crit Rev Biotechnol* **23**, 175–194.
- Mallet V, Dutheil D, Polard V, Rousselot M, Leize E, Hauet T, Goujon JM & Zal F (2014). Dose-Ranging Study of the Performance of the Natural Oxygen Transporter HEMO2 Life in Organ Preservation. *Artif Organs*; DOI: 10.1111/aor.12307.
- Martin I, Wendt D & Heberer M (2004). The role of bioreactors in tissue engineering. *Trends Biotechnol* **22**, 80–86.
- Mauck RL, Martinez-Diaz GJ, Yuan X & Tuan RS (2007). Regional multilineage differentiation potential of meniscal fibrochondrocytes: implications for meniscus repair. *Anat Rec Hoboken NJ 2007* **290**, 48–58.
- McBeath R, Pirone DM, Nelson CM, Bhadriraju K & Chen CS (2004). Cell shape, cytoskeletal tension, and RhoA regulate stem cell lineage commitment. *Dev Cell* **6**, 483–495.
- McDermott ID (2010). What tissue bankers should know about the use of allograft meniscus in orthopaedics. *Cell Tissue Bank* **11**, 75–85.
- McDevitt CA & Webber RJ (1990). The ultrastructure and biochemistry of meniscal cartilage. *Clin Orthop* **8–18**.
- McNicholas MJ, Rowley DI, McGurty D, Adalberth T, Abdon P, Lindstrand A & Lohmander LS (2000). Total meniscectomy in adolescence. A thirty-year follow-up. *J Bone Joint Surg Br* **82**, 217–221.
- Meents H, Enenkel B, Eppenberger HM, Werner RG & Fussenegger M (2002). Impact of coexpression and coamplification of sICAM and antiapoptosis determinants bcl-2/bcl-x(L) on productivity, cell survival, and mitochondria number in CHO-DG44 grown in suspension and serum-free media. *Biotechnol Bioeng* **80**, 706–716.

- Menard C, Pacelli L, Bassi G, Dulong J, Bifari F, Bezier I, Zanoncello J, Ricciardi M, Latour M, Bourin P, Schrezenmeier H, Sensebé L, Tarte K & Krampera M (2013). Clinical-grade mesenchymal stromal cells produced under various GMP processes differ in their immunomodulatory properties: Standardization of immune quality controls. *Stem Cells Dev* **130125210100007**.
- Messner K & Gao J (1998). The menisci of the knee joint. Anatomical and functional characteristics, and a rationale for clinical treatment. *J Anat* **193**, 161–178.
- Meyerrose T, Olson S, Pontow S, Kalomoiris S, Jung Y, Annett G, Bauer G & Nolte JA (2010). Mesenchymal stem cells for the sustained in vivo delivery of bioactive factors. *Adv Drug Deliv Rev* **62**, 1167–1174.
- Minor LK (2006). *Handbook of Assay Development in Drug Discovery*. CRC Press.
- Mitton D, Rappeneau J & Bardonnet R (2005). Effect of a supercritical CO<sub>2</sub> based treatment on mechanical properties of human cancellous bone. *Eur J Orthop Surg Traumatol* **15**, 264–269.
- Mohyeldin A, Garzón-Muvdi T & Quiñones-Hinojosa A (2010). Oxygen in Stem Cell Biology: A Critical Component of the Stem Cell Niche. *Cell Stem Cell* **7**, 150–161.
- Molina Grima E, Chisti Y & Moo-Young M (1997). Characterization of shear rates in airlift bioreactors for animal cell culture. *J Biotechnol* **54**, 195–210.
- Mosna F, Sensebé L & Krampera M (2010). Human bone marrow and adipose tissue mesenchymal stem cells: a user's guide. *Stem Cells Dev* **19**, 1449–1470.
- Muller B, Bourdais G, Reidy B, Bencivenni C, Massonneau A, Condamine P, Rolland G, Conejero G, Rogowsky P & Tardieu F (2006). Association of Specific Expansins with Growth in Maize Leaves Is Maintained under Environmental, Genetic, and Developmental Sources of Variation. *PLANT Physiol* **143**, 278–290.
- Murata M, Yudoh K & Masuko K (2008). The potential role of vascular endothelial growth factor (VEGF) in cartilage: How the angiogenic factor could be involved in the pathogenesis of osteoarthritis? *Osteoarthritis Cartilage* **16**, 279–286.
- Naaijken BA, Niessen HWM, Prins H-J, Krijnen PAJ, Kokhuis TJA, de Jong N, van Hinsbergh VWM, Kamp O, Helder MN, Musters RJP, van Dijk A & Juffermans LJM (2012). Human platelet lysate as a fetal bovine serum substitute improves human adipose-derived stromal cell culture for future cardiac repair applications. *Cell Tissue Res* **348**, 119–130.
- Nauta AJ & Fibbe WE (2007). Immunomodulatory properties of mesenchymal stromal cells. *Blood* **110**, 3499–3506.
- Nazirkar G, Singh S, Dole V & Nikam A (2014). Effortless Effort in Bone Regeneration: A Review. *J Int Oral Health JIOH* **6**, 120–124.
- Nerurkar NL, Han W, Mauck RL & Elliott DM (2011). Homologous structure-function relationships between native fibrocartilage and tissue engineered from MSC-seeded nanofibrous scaffolds. *Biomaterials* **32**, 461–468.

- Neuhuber B, Swanger SA, Howard L, Mackay A & Fischer I (2008). Effects of plating density and culture time on bone marrow stromal cell characteristics. *Exp Hematol* **36**, 1176–1185.
- Newell LF, Deans RJ & Maziarz RT (2014). Adult adherent stromal cells in the management of graft-versus-host disease. *Expert Opin Biol Ther* **14**, 231–246.
- Neyret, Ait Si Selmi, Bussiere, Potel, Dubrana F, Chambat, Barnouin & Verdonk (2007). Optimisation de la greffe de chondrocytes autologues grâce à une matrice tridimensionnelle : Le Cartipatch. *Académie Chir Mag* **6**, 5–9.
- Ng F, Boucher S, Koh S, Sastry KSR, Chase L, Lakshmipathy U, Choong C, Yang Z, Vemuri MC, Rao MS & Tanavde V (2008). PDGF, TGF- $\beta$ , 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 MSCs into adipogenic, chondrogenic, and osteogenic lineages. *Blood* **112**, 295–307.
- Obradovic B, Carrier RL, Vunjak-Novakovic G & Freed LE (1999). Gas exchange is essential for bioreactor cultivation of tissue engineered cartilage. *Biotechnol Bioeng* **63**, 197–205.
- Olivier S & Mehtali M (2009). Les systèmes alternatifs de production d'anticorps monoclonaux thérapeutiques: Avantages espérés pour le futur. *MS Médecine Sci* **25**, 1163–1168.
- Omasa T, Onitsuka M & Kim W-D (2010). Cell engineering and cultivation of chinese hamster ovary (CHO) cells. *Curr Pharm Biotechnol* **11**, 233–240.
- Ormandy EH, Dale J & Griffin G (2011). Genetic engineering of animals: Ethical issues, including welfare concerns. *Can Vet J* **52**, 544–550.
- Osz-Papai J, Radu L, Abdulrahman W, Kolb-Cheynel I, Troffer-Charlier N, Birck C & Poterszman A (2015). Insect cells-baculovirus system for the production of difficult to express proteins. *Methods Mol Biol Clifton NJ* **1258**, 181–205.
- Pabbruwe MB, Kafienah W, Tarlton JF, Mistry S, Fox DJ & Hollander AP (2010). Repair of meniscal cartilage white zone tears using a stem cell/collagen-scaffold implant. *Biomaterials* **31**, 2583–2591.
- Papadimitropoulos A, Piccinini E, Brachat S, Braccini A, Wendt D, Barbero A, Jacobi C & Martin I (2014). Expansion of human mesenchymal stromal cells from fresh bone marrow in a 3D scaffold-based system under direct perfusion. *PloS One* **9**, e102359.
- Papadimitropoulos A, Riboldi SA, Tonnarelli B, Piccinini E, Woodruff MA, Huttmacher DW & Martin I (2013). A collagen network phase improves cell seeding of open-pore structure scaffolds under perfusion. *J Tissue Eng Regen Med* **7**, 183–191.
- Paquet J, Deschepper M, Moya A, Logeart-Avramoglou D, Boisson-Vidal C & Petite H (2015). Oxygen Tension Regulates Human Mesenchymal Stem Cell Paracrine Functions. *Stem Cells Transl Med* **4**, 809–821.

- Parmar K, Mauch P, Vergilio J-A, Sackstein R & Down JD (2007). Distribution of hematopoietic stem cells in the bone marrow according to regional hypoxia. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**, 5431–5436.
- Paschos NK, Brown WE, Eswaramoorthy R, Hu JC & Athanasiou KA (2015). Advances in tissue engineering through stem cell-based co-culture. *J Tissue Eng Regen Med* **9**, 488–503.
- Passweg JR, Chalandon Y, Lehmann T, Kindler V & Tichelli A (2010). Les cellules souches de sang de cordon ombilical. *Paediatr* **21**, 52–55.
- Pattappa G, Heywood HK, de Bruijn JD & Lee DA (2011). The metabolism of human mesenchymal stem cells during proliferation and differentiation. *J Cell Physiol* **226**, 2562–2570.
- Pazzano D, Mercier KA, Moran JM, Fong SS, DiBiasio DD, Rulfs JX, Kohles SS & Bonassar LJ (2000). Comparison of chondrogenesis in static and perfused bioreactor culture. *Biotechnol Prog* **16**, 893–896.
- Pereira H, Caridade SG, Frias AM, Silva-Correia J, Pereira DR, Cengiz IF, Mano JF, Oliveira JM, Espregueira-Mendes J & Reis RL (2014). Biomechanical and cellular segmental characterization of human meniscus: building the basis for Tissue Engineering therapies. *Osteoarthr Cartil OARS Osteoarthr Res Soc* **22**, 1271–1281.
- Petite H (2002). La bio-ingénierie de la régénération osseuse. *médecine/sciences* **18**, 995–1002.
- Phadke A, Hwang Y, Hee Kim S, Hyun Kim S, Yamaguchi T, Masuda K & Varghese S (2013). Effect of scaffold microarchitecture on osteogenic differentiation of human mesenchymal stem cells. *Eur Cell Mater* **25**, 114–129.
- Pham QP, Sharma U & Mikos AG (2006). Electrospun poly(epsilon-caprolactone) microfiber and multilayer nanofiber/microfiber scaffolds: characterization of scaffolds and measurement of cellular infiltration. *Biomacromolecules* **7**, 2796–2805.
- Phelan K & May KM (2015). Basic techniques in Mammalian cell tissue culture. *Curr Protoc Cell Biol Editor Board Juan Bonifacino Al* **66**, 1.1.1–1.1.22.
- Piattelli A, Scarano A, Corigliano M & Piattelli M (1996). Comparison of bone regeneration with the use of mineralized and demineralized freeze-dried bone allografts: a histological and histochemical study in man. *Biomaterials* **17**, 1127–1131.
- Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, Jaiswal RK, Douglas R, Mosca JD, Moorman MA, Simonetti DW, Craig S & Marshak DR (1999). Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science* **284**, 143–147.
- Pittenger MF & Martin BJ (2004). Mesenchymal stem cells and their potential as cardiac therapeutics. *Circ Res* **95**, 9–20.

- Pollack A (2012). A Stem-Cell-Based Drug Gets Approval in Canada. *N Y Times*. Available at: <http://www.nytimes.com/2012/05/18/health/a-stem-cell-based-drug-gets-approval-in-canada.html> [Accessed September 30, 2015].
- Ponte AL, Marais E, Gallay N, Langonné A, Delorme B, Héroult O, Charbord P & Domenech J (2007). The in vitro migration capacity of human bone marrow mesenchymal stem cells: comparison of chemokine and growth factor chemotactic activities. *Stem Cells Dayt Ohio* **25**, 1737–1745.
- Pontes Soares C, Midlej V, de Oliveira MEW, Benchimol M, Costa ML & Mermelstein C (2012). 2D and 3D-organized cardiac cells shows differences in cellular morphology, adhesion junctions, presence of myofibrils and protein expression. *PLoS One* **7**, e38147.
- Primrose S & Twyman R (2004). *Principes de génie génétique*. De Boeck Supérieur.
- Prins H-J, Braat AK, Gawlitta D, Dhert WJA, Egan DA, Tijssen-Slump E, Yuan H, Coffey PJ, Rozemuller H & Martens AC (2014). In vitro induction of alkaline phosphatase levels predicts in vivo bone forming capacity of human bone marrow stromal cells. *Stem Cell Res* **12**, 428–440.
- Rahman MS, Akhtar N, Jamil HM, Banik RS & Asaduzzaman SM (2015). TGF- $\beta$ /BMP signaling and other molecular events: regulation of osteoblastogenesis and bone formation. *Bone Res* **3**, 15005.
- Ramdasi S, Sarang S & Viswanathan C (2015). Potential of Mesenchymal Stem Cell based application in Cancer. *Int J Hematol-Oncol Stem Cell Res* **9**, 95–103.
- Rasini V, Dominici M, Kluba T, Siegel G, Lusenti G, Northoff H, Horwitz EM & Schäfer R (2013). Mesenchymal stromal/stem cells markers in the human bone marrow. *Cytotherapy*; DOI: 10.1016/j.jcyt.2012.11.009.
- Ren J, Wang H, Tran K, Civini S, Jin P, Castiello L, Feng J, Kuznetsov SA, Robey PG, Sabatino M & Stroncek DF (2015). Human bone marrow stromal cell confluence: effects on cell characteristics and methods of assessment. *Cytotherapy* **17**, 897–911.
- Research C for BE and (n.d.). Blood Guidances - Withdrawn - Draft Guidance for Industry: Criteria for Safety and Efficacy Evaluation of Oxygen Therapeutics as Red Blood Cell Substitutes. Available at: <http://www.fda.gov/BiologicsBloodVaccines/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/Guidances/Blood/ucm074920.htm> [Accessed July 31, 2015].
- Richter C, Gogvadze V, Laffranchi R, Schlapbach R, Schweizer M, Suter M, Walter P & Yaffee M (1995). Oxidants in mitochondria: from physiology to diseases. *Biochim Biophys Acta BBA - Mol Basis Dis* **1271**, 67–74.
- Riess JG (2006). Perfluorocarbon-based oxygen delivery. *Artif Cells Blood Substit Immobil Biotechnol* **34**, 567–580.

- Rijk PC (2004). Meniscal allograft transplantation--part I: background, results, graft selection and preservation, and surgical considerations. *Arthrosc J Arthrosc Relat Surg Off Publ Arthrosc Assoc N Am Int Arthrosc Assoc* **20**, 728–743.
- Rodkey WG, DeHaven KE, Montgomery WH, Baker CL, Beck CL, Hormel SE, Steadman JR, Cole BJ & Briggs KK (2008). Comparison of the collagen meniscus implant with partial meniscectomy. A prospective randomized trial. *J Bone Joint Surg Am* **90**, 1413–1426.
- Roth AD, Elmer J, Harris DR, Huntley J, Palmer AF, Nelson T, Johnson JK, Xue R, Lannutti JJ & Viapiano MS (2014). Hemoglobin regulates the migration of glioma cells along poly( $\epsilon$ -caprolactone)-aligned nanofibers. *Biotechnol Prog* **30**, 1214–1220.
- Rousselot M, Delpy E, Drieu La Rochelle C, Lagente V, Pirow R, Rees J-F, Hagege A, Le Guen D, Hourdez S & Zal F (2006). Arenicola marina extracellular hemoglobin: a new promising blood substitute. *Biotechnol J* **1**, 333–345.
- Rubio-Azpeitia E & Andia I (2014). Partnership between platelet-rich plasma and mesenchymal stem cells: in vitro experience. *Muscles Ligaments Tendons J* **4**, 52–62.
- Rubio D, Garcia-Castro J, Martín MC, Fuente R de la, Cigudosa JC, Lloyd AC & Bernad A (2005). Spontaneous Human Adult Stem Cell Transformation. *Cancer Res* **65**, 3035–3039.
- Rumpler M, Woesz A, Dunlop JWC, van Dongen JT & Fratzl P (2008). The effect of geometry on three-dimensional tissue growth. *J R Soc Interface R Soc* **5**, 1173–1180.
- Sacchetti B, Funari A, Michienzi S, Di Cesare S, Piersanti S, Saggio I, Tagliafico E, Ferrari S, Robey PG, Riminucci M & Bianco P (2007). Self-renewing osteoprogenitors in bone marrow sinusoids can organize a hematopoietic microenvironment. *Cell* **131**, 324–336.
- Sanchez-Adams J, Willard VP & Athanasiou KA (2011). Regional variation in the mechanical role of knee meniscus glycosaminoglycans. *J Appl Physiol Bethesda Md* **111**, 1590–1596.
- Sandberg J (2010). Regen Biologics slams FDA for revoking Menaflex approval | OrthoSpineNews. Available at: <http://www.orthospinenews.com/regen-biologics-slams-fda-for-revoking-menaflex-approval/> [Accessed October 9, 2015].
- Sandmann GH, Eichhorn S, Vogt S, Adamczyk C, Aryee S, Hoberg M, Milz S, Imhoff AB & Tischer T (2009). Generation and characterization of a human acellular meniscus scaffold for tissue engineering. *J Biomed Mater Res A* **91**, 567–574.
- Santucci J, Boulic E, Nagot V, Bleuzit S, Quintin-Rouet I & Leize-Zal E (2015). Human histologic study of bone allograft used for maxillary reconstruction. *Soumis J Dent*.

- Satija NK, Singh VK, Verma YK, Gupta P, Sharma S, Afrin F, Sharma M, Sharma P, Tripathi RP & Gurudutta GU (2009). Mesenchymal stem cell-based therapy: a new paradigm in regenerative medicine. *J Cell Mol Med* **13**, 4385–4402.
- Sekiya I, Larson BL, Smith JR, Pochampally R, Cui J-G & Prockop DJ (2002). Expansion of human adult stem cells from bone marrow stroma: conditions that maximize the yields of early progenitors and evaluate their quality. *Stem Cells Dayt Ohio* **20**, 530–541.
- Sensebé L, Gadelorge M & Fleury-Cappellesso S (2013). Production of mesenchymal stromal/stem cells according to good manufacturing practices: a review. *Stem Cell Res Ther* **4**, 1–6.
- Seth G, Hossler P, Yee JC & Hu W-S (2006). Engineering cells for cell culture bioprocessing--physiological fundamentals. *Adv Biochem Eng Biotechnol* **101**, 119–164.
- Shadrin IY, Yoon W, Li L, Shepherd N & Bursac N (2015). Rapid fusion between mesenchymal stem cells and cardiomyocytes yields electrically active, non-contractile hybrid cells. *Sci Rep*; DOI: 10.1038/srep12043.
- Shamloo A, Mohammadaliha N & Mohseni M (2015). Integrative Utilization of Microenvironments, Biomaterials and Computational Techniques for Advanced Tissue Engineering. *J Biotechnol* **212**, 71–89.
- Shanskii YD, Sergeeva NS, Sviridova IK, Kirakozov MS, Kirsanova VA, Akhmedova SA, Antokhin AI & Chissov VI (2013). Human platelet lysate as a promising growth-stimulating additive for culturing of stem cells and other cell types. *Bull Exp Biol Med* **156**, 146–151.
- Sharma RR, Pollock K, Hubel A & McKenna D (2014). Mesenchymal stem or stromal cells: a review of clinical applications and manufacturing practices. *Transfusion (Paris)* **54**, 1418–1437.
- Shen TJ, Ho NT, Simplaceanu V, Zou M, Green BN, Tam MF & Ho C (1993). Production of unmodified human adult hemoglobin in *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**, 8108–8112.
- Shima WN, Ali AM, Subramani T, Mohamed Alitheen NB, Hamid M, Samsudin AR & Yeap SK (2015). Rapid growth and osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells isolated from human bone marrow. *Exp Ther Med* **9**, 2202–2206.
- Siddappa R, Licht R, van Blitterswijk C & de Boer J (2007). Donor variation and loss of multipotency during in vitro expansion of human mesenchymal stem cells for bone tissue engineering. *J Orthop Res* **25**, 1029–1041.
- Sikavitsas VI, Bancroft GN, Lemoine JJ, Liebschner MAK, Dauner M & Mikos AG (2005). Flow perfusion enhances the calcified matrix deposition of marrow stromal cells in biodegradable nonwoven fiber mesh scaffolds. *Ann Biomed Eng* **33**, 63–70.
- Simpson DA, Thomas NP & Aichroth PM (1986). Open and closed meniscectomy. A comparative analysis. *J Bone Joint Surg Br* **68-B**, 301–304.



- Sivasubramaniyan K, Harichandan A, Schumann S, Sobiesiak M, Lengerke C, Maurer A, Kalbacher H & Bühring H-J (2013). Prospective isolation of mesenchymal stem cells from human bone marrow using novel antibodies directed against Sushi domain containing 2. *Stem Cells Dev* **22**, 1944–1954.
- Smani Y, Labrude P, Vigneron C & Faivre B (2007). Les transporteurs d'oxygène à base d'hémoglobine et les tentatives de substituer les globules rouges. *Transfus Clin Biol* **14**, 464–473.
- Sohni A & Verfaillie CM (2013). Mesenchymal Stem Cells Migration Homing and Tracking. *Stem Cells Int* **2013**, e130763.
- Soler E, Thépot D, Rival-Gervier S, Jolivet G & Houdebine L-M (2006). Preparation of recombinant proteins in milk to improve human and animal health. *Reprod Nutr Dev* **46**, 579–588.
- Song X, Xie Y, Liu Y, Shao M & Wang W (2015). Beneficial Effects of Coculturing Synovial Derived Mesenchymal Stem Cells with Meniscus Fibrochondrocytes Are Mediated by Fibroblast Growth Factor 1: Increased Proliferation and Collagen Synthesis. *Stem Cells Int* **2015**, e926325.
- Son M & Levenston ME (2012). Discrimination of meniscal cell phenotypes using gene expression profiles. *Eur Cell Mater* **23**, 195–208.
- Sotiropoulou PA, Perez SA, Salagianni M, Baxevanis CN & Papamichail M (2006a). Cell culture medium composition and translational adult bone marrow-derived stem cell research. *Stem Cells Dayt Ohio* **24**, 1409–1410.
- Sotiropoulou PA, Perez SA, Salagianni M, Baxevanis CN & Papamichail M (2006b). Characterization of the Optimal Culture Conditions for Clinical Scale Production of Human Mesenchymal Stem Cells. *STEM CELLS* **24**, 462–471.
- Spees JL, Gregory CA, Singh H, Tucker HA, Peister A, Lynch PJ, Hsu S-C, Smith J & Prockop DJ (2004). Internalized antigens must be removed to prepare hypoimmunogenic mesenchymal stem cells for cell and gene therapy. *Mol Ther J Am Soc Gene Ther* **9**, 747–756.
- Spence RK, McCoy S, Costabile J, Norcross ED, Pello MJ, Alexander JB, Wisdom C & Camishion RC (1990). Fluosol DA-20 in the treatment of severe anemia: randomized, controlled study of 46 patients. *Crit Care Med* **18**, 1227–1230.
- Steadman JR & Rodkey WG (2005). Tissue-engineered collagen meniscus implants: 5- to 6-year feasibility study results. *Arthrosc J Arthrosc Relat Surg Off Publ Arthrosc Assoc N Am Int Arthrosc Assoc* **21**, 515–525.
- Stenderup K, Justesen J, Clausen C & Kassem M (2003). Aging is associated with decreased maximal life span and accelerated senescence of bone marrow stromal cells. *Bone* **33**, 919–926.
- Stopp S, Bornhäuser M, Ugarte F, Wobus M, Kuhn M, Brenner S & Thieme S (2013). Expression of the melanoma cell adhesion molecule in human mesenchymal

- stromal cells regulates proliferation, differentiation, and maintenance of hematopoietic stem and progenitor cells. *Haematologica* **98**, 505–513.
- Stowell CP, Levin J, Spiess BD & Winslow RM (2001). Progress in the development of RBC substitutes. *Transfusion (Paris)* **41**, 287–299.
- Studený M, Marini FC, Dembinski JL, Zompetta C, Cabreira-Hansen M, Bekele BN, Champlin RE & Andreeff M (2004). Mesenchymal stem cells: potential precursors for tumor stroma and targeted-delivery vehicles for anticancer agents. *J Natl Cancer Inst* **96**, 1593–1603.
- Sundin M, Ringdén O, Sundberg B, Nava S, Götherström C & Blanc KL (2007). No alloantibodies against mesenchymal stromal cells, but presence of anti-fetal calf serum antibodies, after transplantation in allogeneic hematopoietic stem cell recipients. *Haematologica* **92**, 1208–1215.
- Swiech K, de Freitas MCC, Covas DT & Picanço-Castro V (2015). Recombinant glycoprotein production in human cell lines. *Methods Mol Biol Clifton NJ* **1258**, 223–240.
- Taichman RS, Reilly MJ & Emerson SG (2000). The Hematopoietic Microenvironment: Osteoblasts and The Hematopoietic Microenvironment. *Hematol Amst Neth* **4**, 421–426.
- Tanavde V, Vaz C, Rao MS, Vemuri MC & Pochampally RR (2015). Research using Mesenchymal Stem/Stromal Cells: quality metric towards developing a reference material. *Cytotherapy* **17**, 1169–1177.
- Tangvoranuntakul P, Gagneux P, Diaz S, Bardor M, Varki N, Varki A & Muchmore E (2003). Human uptake and incorporation of an immunogenic nonhuman dietary sialic acid. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**, 12045–12050.
- Tan S, Fang JY, Yang Z, Nimni ME & Han B (2014). The synergetic effect of hydrogel stiffness and growth factor on osteogenic differentiation. *Biomaterials* **35**, 5294–5306.
- They A, Bléry P, Malard O, Pilet P, Sourice S, Corre P, Guicheux J, Weiss P & Espitalier F (2015). Role of the stromal vascular fraction from adipose tissue in association with a phosphocalcic scaffold in bone regeneration in an irradiated area. *J Cranio-Maxillo-fac Surg Off Publ Eur Assoc Cranio-Maxillo-fac Surg* **43**, 1169–1176.
- Tienen TG, Heijkants RGJC, de Groot JH, Schouten AJ, Pennings AJ, Veth RPH & Buma P (2006). Meniscal replacement in dogs. Tissue regeneration in two different materials with similar properties. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater* **76B**, 389–396.
- Timmers L, Lim SK, Hoefler IE, Arslan F, Lai RC, van Oorschot AAM, Goumans MJ, Strijder C, Sze SK, Choo A, Piek JJ, Doevendans PA, Pasterkamp G & de Kleijn DPV (2011). Human mesenchymal stem cell-conditioned medium improves cardiac function following myocardial infarction. *Stem Cell Res* **6**, 206–214.

- Toma C, Pittenger MF, Cahill KS, Byrne BJ & Kessler PD (2002). Human mesenchymal stem cells differentiate to a cardiomyocyte phenotype in the adult murine heart. *Circulation* **105**, 93–98.
- Tremper KK (2002). Perfluorochemical “Red Blood Cell Substitutes” The Continued Search for an Indication. *J Am Soc Anesthesiol* **97**, 1333–1334.
- Trojahn Kølle S-F, Oliveri RS, Glovinski PV, Kirchhoff M, Mathiasen AB, Elberg JJ, Andersen PS, Drzewiecki KT & Fischer-Nielsen A (2013). Pooled human platelet lysate versus fetal bovine serum—investigating the proliferation rate, chromosome stability and angiogenic potential of human adipose tissue-derived stem cells intended for clinical use. *Cytotherapy* **15**, 1086–1097.
- Trouillas M, Prat M, Doucet C, Ernou I, Laplace-Builhé C, Blancard PS, Holy X & Lataillade J-J (2013). A new platelet cryoprecipitate glue promoting bone formation after ectopic mesenchymal stromal cell-loaded biomaterial implantation in nude mice. *Stem Cell Res Ther* **4**, 1.
- Tsai AG, Intaglietta M, Sakai H, Delpy E, La Rochelle CD, Rousselot M & Zal F (2012). Microcirculation and NO-CO studies of a natural extracellular hemoglobin developed for an oxygen therapeutic carrier. *Curr Drug Discov Technol* **9**, 166–172.
- Tsuji K, Steindler KA & Harrison SJ (1980). Limulus amoebocyte lysate assay for detection and quantitation of endotoxin in a small-volume parenteral product. *Appl Environ Microbiol* **40**, 533–538.
- Tsurushima H, Marushima A, Suzuki K, Oyane A, Sogo Y, Nakamura K, Matsumura A & Ito A (2010). Enhanced bone formation using hydroxyapatite ceramic coated with fibroblast growth factor-2. *Acta Biomater* **6**, 2751–2759.
- Utting JC, Robins SP, Brandao-Burch A, Orriss IR, Behar J & Arnett TR (2006). Hypoxia inhibits the growth, differentiation and bone-forming capacity of rat osteoblasts. *Exp Cell Res* **312**, 1693–1702.
- Valença S dos S, Kloss ML, Bezerra FS, Lanzetti M, Silva FL & Porto LC (2007). Effects of hyperoxia on Wistar rat lungs. *J Bras Pneumol* **33**, 655–662.
- Vandamme K, Holy X, Bensidhoum M, Logeart-Avramoglou D, Naert IE, Duyck JA & Petite H (2011). In vivo molecular evidence of delayed titanium implant osseointegration in compromised bone. *Biomaterials* **32**, 3547–3554.
- Van der Bracht, Verdonk R, Verbruggen G, Elewaut D & Verdonk P (2007). Cell-Based Meniscus Tissue Engineering. In *Topics in tissue engineering*, pp. 1–13. Ashammakhi N Reis R & Chiellini E.
- Vázquez-Salat N & Houdebine L-M (2013). Will GM animals follow the GM plant fate? *Transgenic Res* **22**, 5–13.
- Verdonk PCM, Forsyth RG, Wang J, Almqvist KF, Verdonk R, Veys EM & Verbruggen G (2005). Characterisation of human knee meniscus cell phenotype. *Osteoarthr Cartil OARS Osteoarthr Res Soc* **13**, 548–560.

- Vernejoul M & Marie P (1993). Cellules osseuses et remodelage osseux. *médecine/sciences* **9**, 1192.
- Vertelov G, Kharazi L, Muralidhar M, Sanati G, Tankovich T & Kharazi A (2013). High targeted migration of human mesenchymal stem cells grown in hypoxia is associated with enhanced activation of RhoA. *Stem Cell Res Ther* **4**, 5.
- Vinatier C, Bouffi C, Merceron C, Gordeladze J, Brondello J-M, Jorgensen C, Weiss P, Guicheux J & Noël D (2009). Cartilage tissue engineering: towards a biomaterial-assisted mesenchymal stem cell therapy. *Curr Stem Cell Res Ther* **4**, 318–329.
- Vinatier C, Magne D, Weiss P, Trojani C, Rochet N, Carle GF, Vignes-Colombeix C, Chadjichristos C, Galera P, Daculsi G & Guicheux J (2005). A silanized hydroxypropyl methylcellulose hydrogel for the three-dimensional culture of chondrocytes. *Biomaterials* **26**, 6643–6651.
- Visnjic D, Kalajzic Z, Rowe DW, Katavic V, Lorenzo J & Aguila HL (2004). Hematopoiesis is severely altered in mice with an induced osteoblast deficiency. *Blood* **103**, 3258–3264.
- Volkmer E, Otto S, Polzer H, Saller M, Trappendreher D, Zagar D, Hamisch S, Ziegler G, Wilhelmi A, Mutschler W & Schieker M (2012). Overcoming hypoxia in 3D culture systems for tissue engineering of bone in vitro using an automated, oxygen-triggered feedback loop. *J Mater Sci Mater Med* **23**, 2793–2801.
- Vrancken ACT, Buma P & van Tienen TG (2013). Synthetic meniscus replacement: a review. *Int Orthop* **37**, 291–299.
- Wang S, Chang Q, Kong X & Wang C (2015). The Chondrogenic Induction Potential for Bone Marrow-Derived Stem Cells between Autologous Platelet-Rich Plasma and Common Chondrogenic Induction Agents: A Preliminary Comparative Study. *Stem Cells Int* **2015**, e589124.
- Wei L-C, Gao S-G, Xu M, Jiang W, Tian J & Lei G-H (2012). A novel hypothesis: the application of platelet-rich plasma can promote the clinical healing of white-white meniscal tears. *Med Sci Monit Int Med J Exp Clin Res* **18**, HY47–HY50.
- Wessman SJ & Levings RL (1998). Collective experiences of adventitious viruses of animal-derived raw materials and what can be done about them. *Cytotechnology* **28**, 43–48.
- Wislet-Gendebien S, Hans G, Leprince P, Rigo J-M, Moonen G & Rogister B (2005). Plasticity of cultured mesenchymal stem cells: switch from nestin-positive to excitable neuron-like phenotype. *Stem Cells Dayt Ohio* **23**, 392–402.
- Wu X c., Chen Y m., Li Y d., Li O, Zhu L, Qian C d., Tao X l. & Teng Y (2011). Constitutive expression of Vitreoscilla haemoglobin in *Sphingomonas elodea* to improve gellan gum production. *J Appl Microbiol* **110**, 422–430.
- Xu B, Zhang J, Brewer E, Tu Q, Yu L, Tang J, Krebsbach P, Wieland M & Chen J (2009). Osterix Enhances BMSC-associated Osseointegration of Implants. *J Dent Res* **88**, 1003–1007.

- Yamada KM, Pankov R & Cukierman E (2003). Dimensions and dynamics in integrin function. *Braz J Med Biol Res Rev Bras Pesqui Médicas E Biológicas Soc Bras Biofísica Al* **36**, 959–966.
- Yamasaki T, Deie M, Shinomiya R, Yasunaga Y, Yanada S & Ochi M (2008). Transplantation of meniscus regenerated by tissue engineering with a scaffold derived from a rat meniscus and mesenchymal stromal cells derived from rat bone marrow. *Artif Organs* **32**, 519–524.
- Yourek G, Hussain MA & Mao JJ (2007). Cytoskeletal changes of mesenchymal stem cells during differentiation. *ASAIO J Am Soc Artif Intern Organs 1992* **53**, 219–228.
- Yu H, Adesida AB & Jomha NM (2015). Meniscus repair using mesenchymal stem cells - a comprehensive review. *Stem Cell Res Ther* **6**, 86.
- Zal F, Green BN, Lallier FH & Toulmond A (1997a). Investigation by electrospray ionization mass spectrometry of the extracellular hemoglobin from the polychaete annelid *Alvinella pompejana*: an unusual hexagonal bilayer hemoglobin. *Biochemistry (Mosc)* **36**, 11777–11786.
- Zal F, Green BN, Lallier FH, Vinogradov SN & Toulmond A (1997b). Quaternary structure of the extracellular haemoglobin of the lugworm *Arenicola marina*: a multi-angle-laser-light-scattering and electrospray-ionisation-mass-spectrometry analysis. *Eur J Biochem FEBS* **243**, 85–92.
- Zal F & Rousselot M (2014). Extracellular Hemoglobins from Annelids, and their Potential Use in Biotechnology. In *Outstanding Marine Molecules*, ed. Barre SL & Kornprobst J-M, pp. 361–376. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA. Available at: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/9783527681501.ch16/summary> [Accessed September 15, 2014].
- Zhang H-Y, Liu R, Xing Y-J, Xu P, Li Y & Li C-J (2013). Effects of hypoxia on the proliferation, mineralization and ultrastructure of human periodontal ligament fibroblasts in vitro. *Exp Ther Med* **6**, 1553–1559.
- Zhou X, Feng W, Qiu K, Chen L, Wang W, Nie W, Mo X & He C (2015). BMP-2 Derived Peptide and Dexamethasone Incorporated Mesoporous Silica Nanoparticles for Enhanced Osteogenic Differentiation of Bone Mesenchymal Stem Cells. *ACS Appl Mater Interfaces* **7**, 15777–15789.
- Zhu J (2012). Mammalian cell protein expression for biopharmaceutical production. *Biotechnol Adv* **30**, 1158–1170.
- Zur G, Linder-Ganz E, Elsner JJ, Shani J, Brenner O, Agar G, Hershman EB, Arnoczky SP, Guilak F & Shterling A (2011). Chondroprotective effects of a polycarbonate-urethane meniscal implant: histopathological results in a sheep model. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc Off J ESSKA* **19**, 255–263.

# **Annexes**



# Annexe 1

## Liste des gènes analysés avec les plaques PCR Array (Qiagen®)

| GENE SYMBOL | Refseq       | Description  |
|-------------|--------------|--|
| ABCB1       | NM_000927    | ATP-binding cassette, sub-family B (MDR/TAP), member 1                                       |
| ACTA2       | NM_001613    | Actin, alpha 2, smooth muscle, aorta   |
| ALCAM       | NM_001627    | Activated leukocyte cell adhesion molecule   |
| ANPEP       | NM_001150    | Alanyl (membrane) aminopeptidase   |
| ANXA5       | NM_001154    | Annexin A5   |
| BDNF        | NM_001709    | Brain-derived neurotrophic factor  |
| BGLAP       | NM_199173    | Bone gamma-carboxylglutamate (gla) protein   |
| BMP2        | NM_001200    | Bone morphogenetic protein 2   |
| BMP4        | NM_130851    | Bone morphogenetic protein 4   |
| BMP6        | NM_001718    | Bone morphogenetic protein 6   |
| BMP7        | NM_001719    | Bone morphogenetic protein 7   |
| CASP3       | NM_004346    | Caspase 3, apoptosis-related cysteine peptidase  |
| CD44        | NM_000610    | CD44 molecule (Indian blood group)   |
| COL1A1      | NM_000088    | Collagen, type I, alpha 1  |
| CSF2        | NM_000758    | Colony stimulating factor 2 (granulocyte-macrophage)   |
| CSF3        | NM_000759    | Colony stimulating factor 3 (granulocyte)  |
| CTNNA1      | NM_001904    | Catenin (cadherin-associated protein), beta 1, 88kDa   |
| EGF         | NM_001963    | Epidermal growth factor  |
| ENG         | NM_000118    | Endoglin   |
| ERBB2       | NM_004448    | erythroblastic leukemia viral oncogene homolog 2   |
| FGF10       | NM_004465    | Fibroblast growth factor 10  |
| FGF2        | NM_002006    | Fibroblast growth factor 2 (basic)   |
| FUT1        | NM_000148    | Fucosyltransferase 1 (galactoside 2-alpha-L-fucosyltransferase, H blood group)               |
| FUT4        | NM_002033    | Fucosyltransferase 4 (alpha (1,3) fucosyltransferase, myeloid-specific)                      |
| FZD9        | NM_003508    | Frizzled family receptor 9   |
| GDF15       | NM_004864    | Growth differentiation factor 15   |
| GDF5        | NM_000557    | Growth differentiation factor 5  |
| GDF6        | NM_001001557 | Growth differentiation factor 6  |
| GDF7        | NM_182828    | Growth differentiation factor 7  |
| GTF3A       | NM_002097    | General transcription factor IIIA  |
| HAT1        | NM_003642    | Histone acetyltransferase 1  |
| HDAC1       | NM_004964    | Histone deacetylase 1  |
| HGF         | NM_000601    | Hepatocyte growth factor (hepatoietin A; scatter factor)                                     |
| HNF1A       | NM_000545    | HNF1 homeobox A  |
| ICAM1       | NM_000201    | Intercellular adhesion molecule 1  |
| IFNG        | NM_000619    | Interferon, gamma  |
| IGF1        | NM_000618    | Insulin-like growth factor 1 (somatomedin C)   |
| IL10        | NM_000572    | Interleukin 10   |
| IL1B        | NM_000576    | Interleukin 1, beta  |
| IL6         | NM_000600    | Interleukin 6 (interferon, beta 2)   |
| INS         | NM_000207    | Insulin  |
| ITGA6       | NM_000210    | Integrin, alpha 6  |
| ITGAV       | NM_002210    | Integrin, alpha V (vitronectin receptor, alpha polypeptide, antigen CD51)                    |
| ITGAX       | NM_000887    | Integrin, alpha X (complement component 3 receptor 4 subunit)                                |
| ITGB1       | NM_002211    | Integrin, beta 1 (fibronectin receptor, beta polypeptide, antigen CD29 includes MDF2, MSK12) |
| JAG1        | NM_000214    | Jagged 1   |
| KAT2B       | NM_003884    | K(lysine) acetyltransferase 2B   |
| KDR         | NM_002253    | Kinase insert domain receptor (a type III receptor tyrosine kinase)                          |
| KITLG       | NM_003994    | KIT ligand   |
| LIF         | NM_002309    | Leukemia inhibitory factor (cholinergic differentiation factor)                              |
| MCAM        | NM_006500    | Melanoma cell adhesion molecule  |
| MMP2        | NM_004530    | Matrix metalloproteinase 2 (gelatinase A, 72kDa gelatinase, 72kDa type IV collagenase)       |
| NES         | NM_006617    | Nestin   |
| NGFR        | NM_002507    | Nerve growth factor receptor   |
| NOTCH1      | NM_017617    | Notch 1  |
| NTSE        | NM_002526    | 5-nucleotidase, ecto (CD73)  |
| NUDT6       | NM_007083    | Nudix (nucleoside diphosphate linked moiety X)-type motif 6                                  |
| PDGFRB      | NM_002609    | Platelet-derived growth factor receptor, beta polypeptide                                    |
| PIGS        | NM_033198    | Phosphatidylinositol glycan anchor biosynthesis, class S                                     |
| POU5F1      | NM_002701    | POU class 5 homeobox 1   |
| PPARG       | NM_015869    | Peroxisome proliferator-activated receptor gamma   |
| PROM1       | NM_006017    | Prominin 1   |
| PTK2        | NM_005607    | PTK2 protein tyrosine kinase 2   |
| PTPRC       | NM_002838    | Protein tyrosine phosphatase, receptor type, C   |
| RHOA        | NM_001664    | Ras homolog gene family, member A  |
| RUNX2       | NM_004348    | Runt-related transcription factor 2  |
| SLC17A5     | NM_012434    | Solute carrier family 17 (anion/sugar transporter), member 5                                 |
| SMAD4       | NM_005359    | SMAD family member 4   |
| SMURF1      | NM_020429    | SMAD specific E3 ubiquitin protein ligase 1  |
| SMURF2      | NM_022739    | SMAD specific E3 ubiquitin protein ligase 2  |
| SOX2        | NM_003106    | SRY (sex determining region Y)-box 2   |
| SOX9        | NM_000346    | SRY (sex determining region Y)-box 9   |
| TBX5        | NM_181486    | T-box 5  |
| TERT        | NM_198253    | Telomerase reverse transcriptase   |
| TGFB1       | NM_000660    | Transforming growth factor, beta 1   |
| TGFB3       | NM_003239    | Transforming growth factor, beta 3   |
| THY1        | NM_006288    | Thy-1 cell surface antigen   |
| TNF         | NM_000594    | Tumor necrosis factor  |
| VCAM1       | NM_001078    | Vascular cell adhesion molecule 1  |
| VEGFA       | NM_003376    | Vascular endothelial growth factor A   |
| VIM         | NM_003380    | Vimentin   |
| VWF         | NM_000552    | Von Willebrand factor  |
| WNT3A       | NM_033131    | Wingless-type MMTV integration site family, member 3A  |
| ZFP42       | NM_174900    | Zinc finger protein 42 homolog (mouse)   |
| ACTB        | NM_001101    | Actin, beta  |
| B2M         | NM_004048    | Beta-2-microglobulin   |
| GAPDH       | NM_002046    | Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase   |
| HPRT1       | NM_000194    | Hypoxanthine phosphoribosyltransferase 1   |
| RPLP0       | NM_001002    | Ribosomal protein, large, P0   |
| HGDC        | SA_00105     | Human Genomic DNA Contamination  |



## Annexe 2

### Axe complémentaire : Caractérisation des cellules méniscales

L'une des principales difficultés lorsque l'on souhaite avoir recours à l'ingénierie tissulaire pour réparer un tissu complexe comme le ménisque, c'est d'identifier un type cellulaire capable de recréer après implantation *in vivo*, la distribution cellulaire du tissu d'origine. Les CSM s'imposent comme les candidates idéales en raison de leur plasticité naturelle. Il est admis qu'elles sont capables de se différencier en fibroblastes et en chondrocytes, cependant la voie de différenciation fibrochondrocytaire est peu caractérisée, de même que ce type cellulaire. Différentes voies de communication sont impliquées dans les processus de différenciation cellulaire, notamment la communication paracrine, qui s'effectue par la sécrétion de facteurs solubles (Paschos *et al.*, 2015). Dans cette partie du projet nous avons développé trois axes de caractérisation, basés sur une analyse comparative entre les chondrocytes, les fibrochondrocytes, les fibroblastes et les CSM indifférenciées: **1/** Induction de la différenciation fibrochondrocytaire par co-culture des CSM avec des cellules méniscales, suivie de l'analyse des profils d'expression transcriptomique obtenus en PCRq, **2/** recherche de marqueurs spécifiques par analyse en électrophorèse bidimensionnelle et **3/** recherche de marqueurs spécifiques par analyse de mélanges protéiques en spectrométrie de masse.

Ces deux derniers axes s'inscrivent dans une approche protéomique. Il s'agit de l'étude de l'ensemble des protéines (*i.e.*, protéome), de l'échantillon considéré (organes, fluides, tissus, cellules) à un instant donné, dans un environnement et des conditions donnés (état physiopathologique, stimuli extérieurs). Ces deux approches fonctionnent selon le même principe, elles débutent par une étape d'extraction protéique à partir des échantillons biologiques à analyser, suivie de l'utilisation de techniques séparatives telles que **2/** l'électrophorèse bidimensionnelle ou **3/** la chromatographie liquide. La quantification et l'identification protéique sont ensuite réalisées en spectrométrie de masse à partir **2/** de spots d'intérêt (de 1 à plusieurs protéines selon la résolution du gel) ou **3/** d'un mélange protéique plus complexe, digérés par des protéases. Ces deux approches sont testées en parallèle pour identifier la plus adaptée pour la détection de biomarqueurs pour la caractérisation cellulaire.

## **1. Isolement et culture des chondrocytes, fibrochondrocytes et fibroblastes**

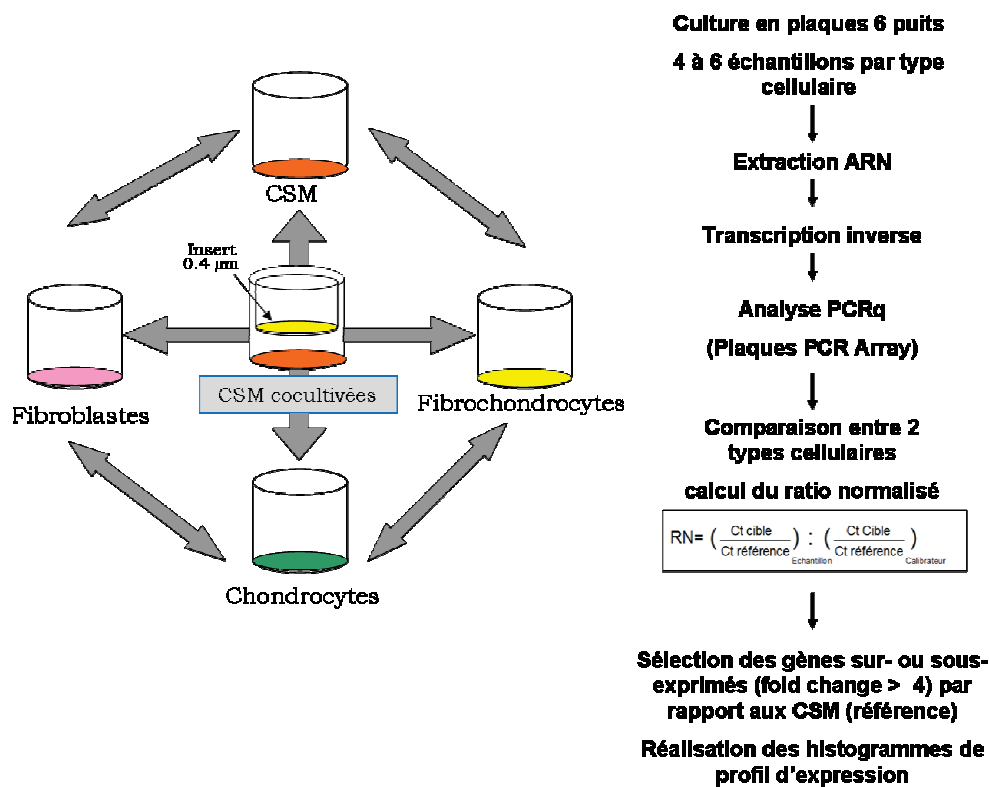
Les échantillons sont obtenus par l'intermédiaire du service de chirurgie orthopédique de l'hôpital de la Cavale Blanche. Les chondrocytes sont isolés à partir de cartilages humains, collectés lors de gestes opératoires au niveau des condyles fémoraux ou des plateaux tibiaux. Les fibrochondrocytes sont isolés à partir de ménisques humains, provenant de méniscectomies partielles ou totales. Les fibrochondrocytes et les chondrocytes sont isolés à partir d'une technique plus simple, et moins agressive que la digestion enzymatique, qui consiste à faire migrer les cellules hors des échantillons. De fins morceaux de tissu sont découpés au scalpel puis mis en culture dans du DMEM supplémenté. Les cellules colonisent le fond des flasques en 2 semaines, pour constituer une culture primaire en monocouche. Le milieu de culture est renouvelé 2 fois par semaine et ce, durant 3 passages.

Les fibroblastes sont obtenus à partir d'échantillons provenant d'abdominoplasties traités au Laboratoire de Neurosciences de Brest (LNB). Les explants de peau sont digérés par une solution de lipase (Invitrogen™) pendant une nuit à 4°C. Le derme et l'épiderme sont ensuite séparés et dissociés avec un mélange de collagénase IV (Sigma®) et de Trypsine/EDTA (Invitrogen™). Les cellules sont collectées à la suite d'une centrifugation et de plusieurs lavages. Elles sont ensuiteensemencées dans du milieu DMEM F-12 (Lonza®) supplémenté. En fonction des protocoles réalisés, les cellules seront cultivées en plaques 6 puits, en flasques de 175 cm<sup>2</sup> ou en triple-flasques (Corning®) jusqu'aux passages 2 ou 3.

## **2. Analyse de la voie de différenciation fibrochondrocytaire**

D'après différentes études, la co-culture de CSM avec des cellules différenciées, pourrait constituer une nouvelle approche en ingénierie tissulaire, tant au niveau du maintien de l'inflammation, qu'au niveau de l'homéostasie tissulaire (Baraniak & McDevitt, 2010; Paschos *et al.*, 2015). La co-culture consiste à cultiver plusieurs types cellulaires distincts dans un même environnement. Cette cohabitation peut être directe, en mélangeant les types cellulaires dans un même milieu de culture, incitant ainsi les contacts cellulaires, ou elle peut être indirecte, en les séparant par une membrane, favorisant dans ce cas une communication par la sécrétion de facteurs solubles (paracrine). Dans notre étude nous souhaitons cellulariser un substitut méniscal avec des CSM, or ne sachant pas le devenir de ces cellules dans un

environnement méniscal, nous avons mis en place un système de co-culture indirecte entre les CSM et les cellules de ménisque. Notre objectif étant de mettre en évidence si la libération locale de messagers par les fibrochondrocytes, pouvait à elle seule induire une différenciation cellulaire et ce, dans le but de mieux appréhender le devenir des substituts cellularisés *in vivo*. La figure 74 illustre le principe de l'analyse réalisée.



**Figure 74 - Principe de l'analyse du potentiel fibrochondrocytaire des CSM.** Les CSM sont co-cultivées indirectement avec des fibrochondrocytes, en plaques 6 puits. Le profil d'expression génique des CSM co-cultivées est ensuite comparé avec celui des CSM témoin et celui des fibrochondrocytes. Une comparaison est aussi réalisée avec des types cellulaires proches de ce dernier, les fibroblastes et les chondrocytes.

## 2.1. Matériel et méthodes

### 2.1.1. Système de co-culture CSM / fibrochondrocytes

Les CSM sontensemencées dans des plaques 6 puits à une concentration de 4000 cellules/cm<sup>2</sup> pour un volume final de 5 mL de milieu DMEM par puits. Les plaques sont placées 1 h à l'incubateur (37°C, 5% CO<sub>2</sub>) pour permettre aux CSM d'adhérer au fond des

puits. Après ce délai, des inserts de culture cellulaire (0,4  $\mu\text{m}$  de porosité) (Millicell®, Merck Millipore) sont disposés au-dessus des puits contenant les CSM. Ces derniers sont ensemencés avec 4000 fibrochondrocytes/cm<sup>2</sup>. La taille des fibrochondrocytes étant considérablement supérieure à celle des pores, seuls les facteurs paracrines pourront exercer une influence sur le comportement cellulaire. Des puits témoins contenant uniquement des CSM ou des fibrochondrocytes, sont cultivés en parallèle. Chaque condition est réalisée au minimum 3 fois. Le milieu de culture est renouvelé 2 fois par semaine pendant 3 semaines.

### **2.1.2. Analyse du profil transcriptomique des CSM co-cultivées**

L'ARN des CSM co-cultivées, des CSM témoins et des fibrochondrocytes témoins, est extrait avec le kit RNeasy® Mini Plus selon le protocole du fabricant. Pour cette analyse, nous avons préféré travailler en plaque PCR Array (chapitre III. 2.3), ce qui permettait de visualiser la variation de l'expression de 84 gènes en une seule analyse. Nous avons pris comme référence la moyenne des niveaux d'expression pour 6 échantillons de CSM puis comparé ces valeurs avec celles de 5 échantillons de CSM co-cultivées et celles des 4 échantillons de cellules cibles, les fibrochondrocytes. Un parallèle est réalisé avec 2 types cellulaires proches des fibrochondrocytes, les chondrocytes et les fibroblastes (3 échantillons/type cellulaire). Les résultats sont présentés sous forme de ratios d'expression normalisés par rapport à l'expression de RLP13A, en considérant les CSM indifférenciées comme échantillon de référence (ratio = 1). L'analyse statistique est réalisée avec le test de Student (\*  $p < 0.05$ ).

Les profils d'expression génique sont analysés en parallèle pour les CSM natives, co-cultivées, les fibrochondrocytes, les chondrocytes et les fibroblastes.

## **2.2. Résultats**

Des expériences de co-culture ont été réalisées en plaque 6 puits avec des CSM et des fibrochondrocytes (50 : 50). Des puits témoins sont ensemencés en parallèle avec des CSM ou des fibrochondrocytes. Nous avons réalisé 5 expériences de co-culture en duplicat. Ne sachant pas si les facteurs paracrines présents dans le milieu des co-cultures allaient orienter les CSM vers la voie de différenciation fibrochondrocytaire, fibroblastique ou chondrocytaire, nous avons inclus ces deux derniers types cellulaires dans l'analyse comparative. Des expériences de PCR quantitatives en plaques PCR Array sont réalisées pour chaque modèle cellulaire

(CSM, M, C, F et CSM co-cultivées), avec 3 à 6 réplicats biologiques par groupe. Une fois l'analyse des différents échantillons effectuée, les valeurs des Ct sont reportées en colonne, les unes à la suite des autres, dans un tableau Excel prédéfini. Ce dernier est exporté en ligne (<http://pcrdataanalysis.sabiosciences.com/pcr/arrayanalysis.php>) pour réaliser l'analyse avec le logiciel RT<sup>2</sup> Profiler PCR Array Data Analysis. Dans un premier temps il faut vérifier si les contrôles d'efficacité, de reproductibilité et contamination sont valides (Figure 75A). Les échantillons invalides sont retirés de l'analyse, car susceptibles de biaiser l'interprétation des résultats. Le logiciel permet ensuite de réaliser une sélection automatique ou manuelle, du gène de référence, parmi les 5 présents dans la plaque (Figure 75B). Il est aussi possible d'effectuer une recherche dans la totalité de la plaque. Le gène de référence ne doit pas être régulé dans les conditions testées, et son niveau d'expression doit être stable entre les types cellulaires analysés. La sélection de ce gène de référence est importante puisqu'il s'agit ici d'estimer un niveau d'expression relative, c'est-à-dire une variation de l'expression d'un gène entre deux échantillons. Aucun des gènes présents dans la plaque (gènes de ménage et gènes cibles) n'a été sélectionné par la recherche automatique. Cela s'explique par l'hétérogénéité des populations comparées provenant de 4 sources tissulaires différentes. En analysant visuellement les valeurs proposées, nous avons néanmoins sélectionné *RPL0* car il présentait l'expression la plus stable (Figure 75B). Les Ct cibles sont alors tous rapportés au gène de référence, ce rapport cible/référence de chaque échantillon est ensuite normalisé par le rapport cible/référence de l'échantillon calibrateur, ici le groupe de réplicats CSM. C'est la méthode du  $\Delta\Delta Ct$ . Le logiciel a ensuite généré des résultats sous forme de « Fold-change » ou de « Fold-regulation ». Nous avons traité les résultats de « Fold-regulation » car cela permet de discuter de valeurs de sous- ou surexpression et non de ratios de variation d'expression. Les analyses sont réalisées par groupe ou par échantillon, l'analyse par groupe permet d'obtenir la moyenne des « Fold-regulation » entre les réplicats biologiques d'un groupe et l'analyse par réplicats, permet d'avoir les valeurs de « Fold-regulation » pour chaque réplicats et ainsi déterminer l'échantillon qui pose problème lors de l'analyse statistique.

**A**

Quality Checks Performed

| Test Performed               | M10P1 | M10P1 | M4P1 | M3P3 | M5P1 |
|------------------------------|-------|-------|------|------|------|
| 1. PCR Array Reproducibility | Pass  | Pass  | Pass | Pass | Pass |
| 2. RT Efficiency             | Pass  | Pass  | Pass | Pass | Pass |
| 3. Genomic DNA Contamination | Pass  | Pass  | Pass | Pass | Pass |

- Ramambar to check each experimental group
- If 'Inquiry' is displayed then see the Troubleshooting Guide of the PCR Array User Manual/Handbook or Contact Technical Support at 888-503-3187.

Calculations Supporting Data Above

1. PCR Array Reproducibility:

| Array            | M10P1 | M10P1 | M4P1  | M3P3  | M5P1  | AVG   | ST DEV |
|------------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|--------|
| Average Ct (PPC) | 18.55 | 18.91 | 18.24 | 18.1  | 18.3  | 18.42 | 0.27   |
| ST DEV Ct (PPC)  | 0.01  | 0.05  | 0.04  | 0.04  | 0.05  | 0.04  | --     |
| Average Ct (RTC) | 21.29 | 21.55 | 21.26 | 22.03 | 22.57 | 21.7  | 0.38   |
| ST DEV Ct (RTC)  | 0.08  | 0.01  | 0.1   | 0.17  | 0.19  | 0.11  | --     |

Criteria for the PCR Array Reproducibility: if the Average PPC Ct is 20±2 and no two arrays have Average PPC Ct are > 2 away from one another then the sample and group Pass.

2. Reverse Transcription Control (RTC):

| Array                        | M10P1 | M10P1 | M4P1 | M3P3 | M5P1 |
|------------------------------|-------|-------|------|------|------|
| Delta Ct (AVG RTC - AVG PPC) | 2.84  | 2.74  | 3.02 | 3.93 | 3.87 |
| RT Efficiency                | Pass  | Pass  | Pass | Pass | Pass |

Criteria: If Delta Ct (AVG RTC - AVG PPC) <= 5, RT Efficiency reports 'Pass'; otherwise, RT Efficiency reports 'Inquiry'.

See the Troubleshooting Guide of the PCR Array User Manual or Contact Technical Support at 888-503-3187.

3. Genomic DNA Contamination (GDC):

| Array       | M10P1 | M10P1 | M4P1 | M3P3 | M5P1 |
|-------------|-------|-------|------|------|------|
| Ct(GDC)     | 35    | 35    | 35   | 35   | 35   |
| Genomic DNA | Pass  | Pass  | Pass | Pass | Pass |

Criteria: If Ct(GDC) >= 35, then the GDC QC reports 'Pass'; if Ct(GDC) < 35, then the GDC QC reports 'Inquiry'.

See the Troubleshooting Guide of the PCR Array User Manual or Contact Technical Support at 888-503-3187.

Manual Selection Normalized by:

This method allows researchers to select their own internal control / housekeeping / normalization genes for the analysis. Select either the use of the Geometric or Arithmetic Mean consistently across experiments. As a general guide, only select genes with small changes in their expression across different sample groups (differences in Ct values less than 1).

**B**

| Position                | Gene Symbol | Control Gene                        | Control Group |        |         |                |         |         |                  | Group 1 |       |       |       |       | Group 2 |       |       | Group 3 |       |       |       |
|-------------------------|-------------|-------------------------------------|---------------|--------|---------|----------------|---------|---------|------------------|---------|-------|-------|-------|-------|---------|-------|-------|---------|-------|-------|-------|
|                         |             |                                     | CSM6P2        | CSM7P1 | CSM10P3 | CSM13P3 témoin | CSM57P1 | CSM55P2 | CSM10P2 normoxie | CSM8P1  | M10P1 | M10P1 | M4P1  | M3P3  | M5P1    | F4P2  | F2P2  | F3P2    | C3P1  | C3P3  | C4P1  |
| H01                     | ACTB        | <input type="checkbox"/>            | 16.83         | 16.25  | 16.06   | 14.53          | 15.79   | 15.74   | 15.88            | 15.94   | 15.16 | 15.69 | 15.85 | 18.20 | 15.64   | 15.86 | 15.12 | 17.90   | 19.08 | 15.77 | 15.29 |
| H02                     | B2M         | <input type="checkbox"/>            | 19.26         | 18.71  | 19.65   | 19.52          | 18.41   | 19.23   | 18.83            | 19.22   | 18.95 | 18.83 | 18.37 | 20.56 | 18.63   | 19.26 | 18.78 | 20.47   | 21.22 | 18.32 | 19.92 |
| H03                     | GAPDH       | <input type="checkbox"/>            | 18.25         | 17.99  | 17.33   | 16.24          | 16.62   | 15.93   | 18.27            | 18.43   | 15.88 | 16.37 | 17.92 | 19.35 | 18.77   | 16.76 | 17.76 | 18.81   | 21.94 | 17.68 | 17.27 |
| H04                     | HPRT1       | <input type="checkbox"/>            | 23.16         | 24.61  | 24.74   | 23.67          | 24.83   | 24.00   | 24.90            | 23.76   | 23.46 | 23.07 | 23.38 | 26.44 | 24.71   | 24.50 | 24.47 | 24.97   | 27.34 | 23.11 | 24.43 |
| H05                     | RPLP0       | <input checked="" type="checkbox"/> | 16.49         | 16.20  | 16.58   | 16.31          | 16.56   | 15.96   | 17.13            | 16.88   | 15.92 | 16.52 | 16.32 | 16.96 | 16.57   | 17.26 | 16.83 | 17.70   | 17.90 | 16.03 | 16.87 |
| Arithmetic Mean         |             |                                     | 16.49         | 16.20  | 16.58   | 16.31          | 16.56   | 15.96   | 17.13            | 16.88   | 15.92 | 16.52 | 16.32 | 16.96 | 16.57   | 17.26 | 16.83 | 17.70   | 17.90 | 16.03 | 16.87 |
| Avg. of Arithmetic Mean |             |                                     | 16.50         |        |         |                |         |         |                  | 16.50   |       |       |       |       | 17.05   |       |       | 17.12   |       |       |       |
| Geometric Mean          |             |                                     | 16.49         | 16.20  | 16.58   | 16.31          | 16.56   | 15.96   | 17.13            | 16.88   | 15.92 | 16.52 | 16.32 | 16.96 | 16.57   | 17.26 | 16.83 | 17.70   | 17.90 | 16.03 | 16.87 |
| Avg. of Geometric Mean  |             |                                     | 16.50         |        |         |                |         |         |                  | 16.50   |       |       |       |       | 17.05   |       |       | 17.12   |       |       |       |

**Figure 75 – Aperçu des données et sélection du gène de ménage pour l'analyse en PCR Array.**

**A)** Exemple de données obtenues dans l'onglet « Data Overview » pour les répliqués de fibrochondrocytes. Le terme « pass » signifie que les échantillons sont validés pour la reproductibilité de la PCR, l'efficacité de la RT et l'absence de contamination à l'ADN génomique. PPC : Positive PCR Control ; RTC : Reverse transcription Control ; HGDC : Human Genomic DNA Contamination. **B)** Sélection manuelle du gène de ménage parmi ACTB (Actin beta), B2M (Beta-2-microglobulin), GAPDH (Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase), HPRT1 (Hypoxanthine phosphoribosyl transferase 1) et RPL0 (Ribosomal protein, large, P0).

Cette dernière est réalisée avec le test de Student et permet de déterminer si un transcrite est différentiellement régulé entre 2 conditions. Les valeurs de surexpression supérieures à 2 pour les gènes cibles, par rapport à la référence CSM, sont indiquées en rouge et celles qui sont inférieures à - 2 sont en bleu. Le tableau 19 regroupe les gènes sous- ou surexprimés par les groupes testés par rapport aux CSM (calibrateur). Le détail des résultats obtenus est présenté dans le tableau 20.

Pour les chondrocytes, 17 gènes d'expression différentielle sont sélectionnés (7>2 et 10<-2), 14 pour les fibrochondrocytes (7>2 et 7<-2), 31 pour les fibroblastes (11>2 et 20<-2) et 23 pour les CSM co-cultivées avec des fibrochondrocytes (3>2 et 20<-2). Les p-value correspondantes sont présentées en face des ratios d'expression. A noter qu'une partie non négligeable des résultats est significative, principalement pour les co-cultures (65% de résultats significatifs pour 5 réplicats). Plusieurs similitudes apparaissent entre les profils d'expression sélectionnés, comme par exemple le transcrite ABCB1, qui est surexprimé de manière significative dans les groupes C, F et M mais pas dans les co-cultures, avec respectivement une Fold-regulation de 8, 52 et 3. Il faudrait cependant exploiter des données issues d'une quantité de réplicats plus importante pour pouvoir en tirer des conclusions. Les transcrits MCAM, NGFR, BGLAP et FUT4 sont sous-exprimés dans les 4 groupes par rapport au CSM, tandis que KDR est surexprimé. Parmi les 84 gènes analysés, seuls deux sont dérégulés uniquement dans le groupe C (SOX2 et VEGFA), 2 surexprimés dans le groupe M (FGF10 et ICAM1), 12 pour le groupe CC et 18 pour les fibroblastes.

**Tableau 19 - Synthèse des résultats de PCR quantitative.** Les valeurs de sur- et de sous-expression des gènes cibles des plaques PCR Array (Qiagen®) sont calculées pour chaque gène cible par rapport au groupe CSM. Les valeurs sélectionnées sont supérieures à 2 (rouge) ou inférieures à -2 (bleu). A chaque valeur est associé une valeur-p (p-value), calculée avec le test de Student. Sont considérées comme significatives, les valeurs < 0.05.

| Chondrocytes (n = 3) vs CSM |                 |          | Fibroblastes (n = 3) vs CSM |                 |          | CSM co-cultivées (n = 5) vs CSM |                 |          |
|-----------------------------|-----------------|----------|-----------------------------|-----------------|----------|---------------------------------|-----------------|----------|
| Gene Symbol                 | Fold Regulation | p-value  | Gene Symbol                 | Fold Regulation | p-value  | Gene Symbol                     | Fold Regulation | p-value  |
| ABCB1                       | 8,0371          | 0,029382 | ABCB1                       | 52,3457         | 0,012218 | IL6                             | 2,8674          | 0,177267 |
| FGF10                       | 4,0903          | 0,836252 | ANPEP                       | 3,6666          | 0,008383 | KDR                             | 2,5324          | 0,157929 |
| KDR                         | 63,6579         | 0,046358 | BMP7                        | 14,7684         | 0,003901 | WNT3A                           | 2,3202          | 0,168765 |
| PPARG                       | 8,2376          | 0,024611 | CSF2                        | 34,0336         | 0,001339 | ALCAM                           | -3,1969         | 0,00856  |
| SOX2                        | 2,395           | 0,027834 | CSF3                        | 15,6105         | 0,013956 | BGLAP                           | -4,9075         | 0,075999 |
| TBX5                        | 26,888          | 0,055858 | HGF                         | 10,6213         | 0,039584 | BMP4                            | -7,078          | 0,041092 |
| WNT3A                       | 3,3455          | 0,104578 | KDR                         | 15,6707         | 0,016203 | CASP3                           | -2,9248         | 0,007642 |
| BGLAP                       | -3,6723         | 0,157152 | NES                         | 4,5877          | 0,001556 | COL1A1                          | -5,6091         | 0,109685 |
| COL1A1                      | -2,0865         | 0,469463 | PPARG                       | 5,9198          | 0,087659 | ENG                             | -4,8158         | 0,007461 |
| FUT4                        | -2,5413         | 0,180624 | TBX5                        | 303,5006        | 0,002273 | ERBB2                           | -9,3358         | 0,00831  |
| HGF                         | -2,3748         | 0,215186 | VWF                         | 3,6301          | 0,013857 | FUT4                            | -10,1183        | 0,000866 |
| IL1B                        | -2,5887         | 0,512195 | ALCAM                       | -3,1095         | 0,021732 | GDF15                           | -9,1331         | 0,233187 |
| MCAM                        | -2,7574         | 0,96229  | BDNF                        | -8,4431         | 0,110191 | ITGA6                           | -4,2987         | 0,380413 |
| NGFR                        | -13,2385        | 0,10139  | BGLAP                       | -4,8121         | 0,144193 | ITGAV                           | -2,9622         | 0,018718 |
| PDGFRB                      | -5,8428         | 0,018077 | BMP2                        | -4,0778         | 0,317309 | MCAM                            | -19,1154        | 0,055424 |
| RUNX2                       | -10,8779        | 0,104494 | BMP4                        | -16,1859        | 0,06358  | MMP2                            | -3,7293         | 0,003277 |
| VEGFA                       | -3,2166         | 0,033513 | FGF10                       | -8,0619         | 0,377254 | NES                             | -4,5072         | 0,019278 |
|                             |                 |          | FUT4                        | -3,8341         | 0,225947 | NGFR                            | -7,683          | 0,044186 |
|                             |                 |          | GDF15                       | -8,4822         | 0,353538 | NOTCH1                          | -6,0863         | 0,005662 |
|                             |                 |          | GDF5                        | -17,4146        | 0,054483 | PDGFRB                          | -18,0009        | 0,000913 |
|                             |                 |          | GDF6                        | -60,8281        | 0,140964 | RUNX2                           | -4,0325         | 0,147142 |
|                             |                 |          | GDF7                        | -8,187          | 0,312322 | TGFB1                           | -4,1315         | 0,005691 |
|                             |                 |          | IGF1                        | -57,1494        | 0,128657 | THY1                            | -5,4056         | 0,043767 |
|                             |                 |          | IL10                        | -6,2574         | 0,197895 |                                 |                 |          |
|                             |                 |          | IL6                         | -6,3987         | 0,503456 |                                 |                 |          |
|                             |                 |          | ITGA6                       | -4,6339         | 0,106791 |                                 |                 |          |
|                             |                 |          | JAG1                        | -5,3765         | 0,002543 |                                 |                 |          |
|                             |                 |          | MCAM                        | -4,122          | 0,167221 |                                 |                 |          |
|                             |                 |          | BMP4                        | -13,0261        | 0,085249 |                                 |                 |          |
|                             |                 |          | SOX9                        | -6,6192         | 0,024589 |                                 |                 |          |
|                             |                 |          | VCAM1                       | -456,1401       | 0,190651 |                                 |                 |          |

| Fibrochondrocytes (n = 5) vs CSM |                 |          |
|----------------------------------|-----------------|----------|
| Gene Symbol                      | Fold Regulation | p-value  |
| ABCB1                            | 2,8586          | 0,008616 |
| BMP2                             | 2,3374          | 0,209537 |
| CSF3                             | 5,2529          | 0,184097 |
| FGF10                            | 25,579          | 0,006326 |
| KDR                              | 3,5587          | 0,105745 |
| PPARG                            | 9,4102          | 0,002002 |
| TBX5                             | 44,7833         | 0,013117 |
| BGLAP                            | -3,5324         | 0,115574 |
| BMP4                             | -2,6015         | 0,164113 |
| FUT4                             | -2,5971         | 0,024676 |
| GDF15                            | -3,3833         | 0,267335 |
| MCAM                             | -7,2803         | 0,016226 |
| NGFR                             | -4,5211         | 0,302647 |
| NOTCH1                           | -2,5684         | 0,028346 |

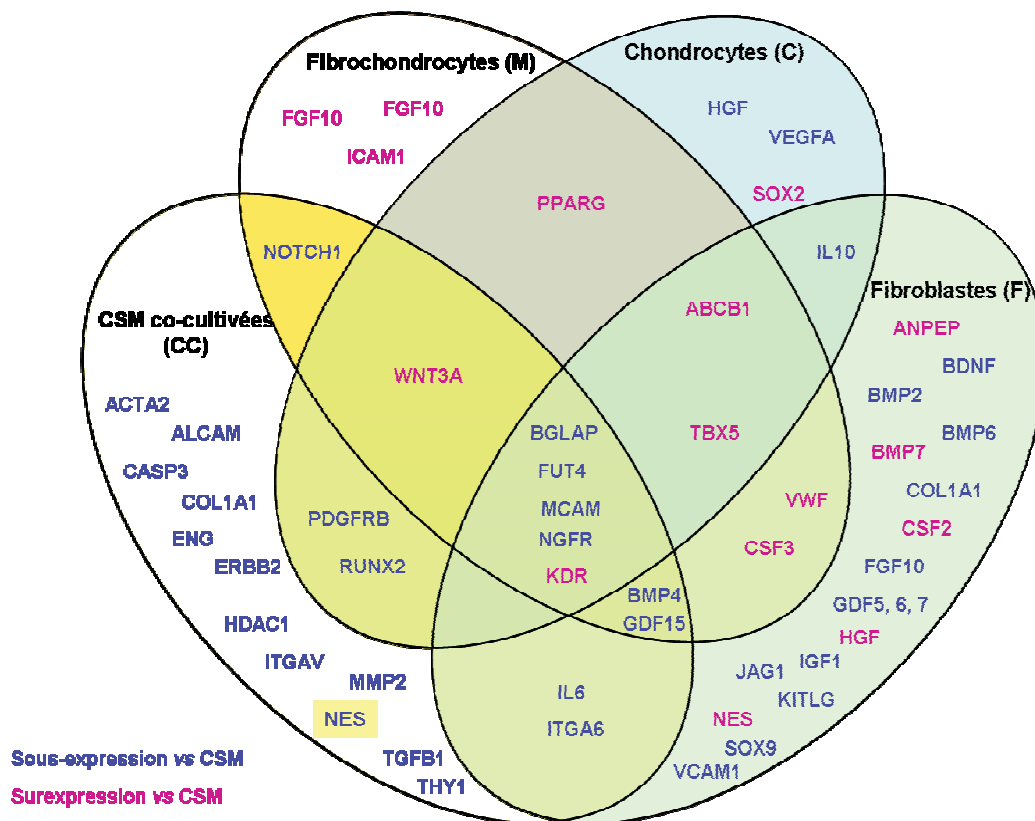


**Tableau 20 - « Fold-regulation » de tous les transcrits analysés.**

Valeurs moyennes des « fold-regulation » et les valeurs-p (*p-values*) correspondantes, obtenues pour les répliqués des différents modèles cellulaires de l'étude. L'abondance relative des transcrits est exprimée en valeurs de « fold-regulation », représentant le taux de régulation d'un transcrite du groupe test (gène cible) par rapport au groupe contrôle (CSM) (calibrateur). Le niveau d'expression de ce dernier aura été normalisé au préalable avec une référence interne *RPL0*. Les valeurs-p sont calculées avec le test statistique de Student pour l'ensemble des répliqués. Les valeurs-p inférieures à 0.05 sont indiquées en rouge, de même que les « fold-regulation » supérieures à 2. Ceux inférieurs à -2 sont indiqués en bleu.

| Symbole | Fibrochondrocytes |          | Fibroblastes |          | Chondrocytes |          | CSM co-cultivées |          |
|---------|-------------------|----------|--------------|----------|--------------|----------|------------------|----------|
|         | Fold Reg          | valeur-p | Fold Reg     | valeur-p | Fold Reg     | valeur-p | Fold Reg         | valeur-p |
| ABCB1   | 2,753             | 0,009    | 60,402       | 0,019    | 7,739        | 0,029    | 1,386            | 0,084    |
| ACTA2   | -1,597            | 0,251    | -1,246       | 0,723    | -1,762       | 0,380    | -3,736           | 0,111    |
| ALCAM   | -1,288            | 0,491    | -3,020       | 0,036    | 1,169        | 0,371    | -3,684           | 0,009    |
| ANPEP   | 1,309             | 0,678    | 3,892        | 0,012    | -1,151       | 0,999    | -3,656           | 0,193    |
| ANKA5   | 1,269             | 0,698    | 1,666        | 0,047    | 1,215        | 0,402    | -1,193           | 0,337    |
| BDNF    | -1,021            | 0,898    | -7,840       | 0,110    | 1,178        | 0,896    | -1,860           | 0,380    |
| BGLAP   | -3,762            | 0,116    | -5,125       | 0,144    | -3,911       | 0,157    | -5,798           | 0,076    |
| BMP2    | 1,268             | 0,210    | -5,747       | 0,317    | -1,167       | 0,888    | -3,227           | 0,280    |
| BMP4    | -2,236            | 0,164    | -13,925      | 0,041    | 1,178        | 0,195    | -8,228           | 0,041    |
| BMP6    | 1,131             | 0,513    | -7,597       | 0,226    | -1,857       | 0,795    | -2,261           | 0,198    |
| BMP7    | -1,000            | 0,964    | 14,693       | 0,007    | 1,326        | 0,181    | 1,366            | 0,080    |
| CASP3   | -1,395            | 0,172    | -1,404       | 0,349    | -1,914       | 0,180    | -3,896           | 0,008    |
| CD44    | 1,118             | 0,891    | -1,076       | 0,662    | 1,100        | 0,711    | -2,970           | 0,008    |
| COL1A1  | -1,249            | 0,311    | 1,581        | 0,941    | -1,783       | 0,469    | -6,068           | 0,110    |
| CSF2    | 1,479             | 0,777    | -3,915       | 0,019    | -1,095       | 0,847    | 7,857            | 0,277    |
| CSF3    | 5,472             | 0,184    | 16,261       | 0,022    | 1,067        | 0,642    | 1,607            | 0,228    |
| CTNNA1  | -1,612            | 0,164    | -2,409       | 0,143    | -1,493       | 0,722    | -4,661           | 0,059    |
| EGF     | -2,358            | 0,474    | -1,872       | 0,210    | 1,353        | 0,186    | -1,499           | 0,569    |
| ENG     | -1,119            | 0,514    | -2,742       | 0,054    | -1,309       | 0,601    | -6,666           | 0,007    |
| ERBB2   | -1,791            | 0,047    | -2,301       | 0,176    | -1,420       | 0,666    | -14,446          | 0,008    |
| FGF10   | 17,888            | 0,011    | -11,662      | 0,377    | 2,830        | 0,636    | -1,463           | 0,559    |
| FGF2    | -1,106            | 0,670    | -1,004       | 0,613    | -1,668       | 0,421    | -1,962           | 0,139    |
| FUT1    | -2,457            | 0,109    | -1,374       | 0,453    | 1,593        | 0,295    | -1,689           | 0,299    |
| FUT4    | -2,681            | 0,012    | -4,254       | 0,226    | -2,620       | 0,161    | -17,668          | 0,001    |
| FZD9    | -1,542            | 0,721    | 1,396        | 0,307    | 1,759        | 0,470    | -1,041           | 0,171    |
| GDF15   | 3,638             | 0,287    | 9,621        | 0,364    | 1,080        | 0,639    | 16,271           | 0,233    |
| GDF5    | -1,288            | 0,629    | -19,332      | 0,043    | 1,057        | 0,901    | -4,062           | 0,039    |
| GDF6    | -2,647            | 0,192    | -8,288       | 0,141    | -1,310       | 0,679    | -2,806           | 0,888    |
| GDF7    | -1,477            | 0,748    | -8,071       | 0,317    | 2,088        | 0,541    | -4,007           | 0,262    |
| GTF3A   | -1,072            | 0,999    | 1,290        | 0,261    | -1,175       | 0,907    | -1,076           | 0,941    |
| HAT1    | 1,209             | 0,911    | 1,622        | 0,078    | 1,089        | 0,664    | 1,481            | 0,087    |
| HDAC1   | 1,168             | 0,772    | 1,125        | 0,741    | 1,215        | 0,539    | -3,738           | 0,128    |
| HGF     | 1,410             | 0,372    | 7,351        | 0,057    | -3,431       | 0,215    | -2,810           | 0,278    |
| HNF1A   | -1,180            | 0,369    | 1,441        | 0,230    | 1,146        | 0,667    | 1,347            | 0,240    |
| ICAM1   | 2,344             | 0,256    | -1,247       | 0,649    | 1,780        | 0,951    | -1,536           | 0,672    |
| IFNG    | 1,172             | 0,362    | 1,589        | 0,063    | 1,675        | 0,197    | 1,385            | 0,088    |
| IGF1    | 1,307             | 0,990    | -61,874      | 0,129    | -1,711       | 0,291    | 1,196            | 0,709    |
| IL10    | -1,166            | 0,486    | -8,442       | 0,198    | -1,908       | 0,344    | -1,601           | 0,177    |
| IL1B    | 1,209             | 0,896    | -4,662       | 0,497    | -3,243       | 0,512    | -1,377           | 0,906    |
| IL6     | -1,015            | 0,920    | -7,200       | 0,600    | -1,001       | 0,606    | 2,057            | 0,261    |
| INS     | 1,022             | 0,838    | 1,663        | 0,027    | 1,323        | 0,222    | 1,260            | 0,173    |
| ITGAE   | -2,091            | 0,352    | -4,226       | 0,107    | -1,467       | 0,418    | -3,786           | 0,380    |
| ITGAV   | -1,082            | 0,710    | -1,229       | 0,581    | -1,201       | 0,601    | -3,563           | 0,019    |
| ITGAX   | 1,016             | 0,905    | 1,706        | 0,010    | 1,343        | 0,170    | 1,261            | 0,133    |
| ITGB1   | 1,042             | 0,677    | -1,358       | 0,402    | -1,261       | 0,779    | -1,627           | 0,063    |
| JAG1    | -1,563            | 0,147    | -5,461       | 0,004    | 1,920        | 0,091    | -1,973           | 0,023    |
| KAT2B   | 1,103             | 0,743    | 1,077        | 0,897    | 1,077        | 0,741    | 2,439            | 0,054    |
| KDR     | 3,412             | 0,106    | 16,024       | 0,026    | 60,834       | 0,046    | 2,632            | 0,169    |
| KITLG   | -1,076            | 0,629    | 2,207        | 0,073    | -2,289       | 0,101    | -3,539           | 0,033    |
| LIF     | 1,732             | 0,293    | -3,212       | 0,679    | -1,035       | 0,461    | 1,891            | 0,225    |
| MCAM    | -5,857            | 0,016    | -3,316       | 0,167    | -2,219       | 0,662    | -17,630          | 0,055    |
| MMP2    | -1,198            | 0,477    | -2,542       | 0,071    | -1,712       | 0,199    | -5,628           | 0,003    |
| NES     | 1,616             | 0,286    | 4,285        | 0,003    | -1,915       | 0,329    | -8,256           | 0,019    |
| NGFR    | -3,026            | 0,303    | -6,719       | 0,065    | -8,861       | 0,101    | -5,111           | 0,044    |
| NOTCH1  | -2,468            | 0,028    | -1,060       | 0,963    | -1,889       | 0,261    | -6,980           | 0,008    |
| NTSE    | 1,006             | 0,812    | -1,136       | 0,886    | 1,234        | 0,576    | -1,358           | 0,607    |
| NUDT5   | -1,230            | 0,380    | 1,167        | 0,714    | 1,216        | 0,630    | -1,209           | 0,686    |
| PDGFRB  | -1,966            | 0,093    | 1,533        | 0,223    | -4,495       | 0,018    | -37,681          | 0,001    |
| PIGS    | -1,263            | 0,240    | -1,177       | 0,764    | -1,121       | 0,942    | -2,772           | 0,015    |
| POU5F1  | -1,324            | 0,268    | -1,572       | 0,397    | -1,096       | 0,949    | -2,429           | 0,095    |
| PPARG   | 5,331             | 0,004    | 3,354        | 0,124    | 4,667        | 0,025    | -1,964           | 0,629    |
| PROM1   | 1,449             | 0,161    | 1,738        | 0,004    | 1,182        | 0,337    | 1,688            | 0,046    |
| PTK2    | 1,176             | 0,440    | 1,248        | 0,346    | 1,163        | 0,440    | -2,875           | 0,004    |
| PTPRC   | -1,000            | 0,006    | 1,651        | 0,014    | 1,320        | 0,105    | 1,362            | 0,001    |
| RHOA    | -1,394            | 0,089    | -1,050       | 0,902    | 1,029        | 0,612    | -1,350           | 0,071    |
| RUNX2   | -2,766            | 0,126    | -1,799       | 0,230    | -9,719       | 0,104    | -4,174           | 0,147    |
| SLC17A6 | 1,077             | 0,601    | 1,794        | 0,099    | -1,137       | 0,801    | -2,007           | 0,010    |
| SMAD4   | -1,236            | 0,172    | -1,136       | 0,637    | -1,301       | 0,276    | -2,546           | 0,002    |
| SMURF1  | -1,198            | 0,891    | 1,051        | 0,762    | -1,456       | 0,617    | -4,103           | 0,004    |
| SMURF2  | -1,077            | 0,987    | 1,204        | 0,940    | -1,078       | 0,635    | -2,745           | 0,080    |
| SOX2    | 1,384             | 0,302    | 1,620        | 0,249    | 2,743        | 0,028    | -1,094           | 0,669    |
| SOX9    | -1,260            | 0,748    | -6,086       | 0,030    | 1,122        | 0,321    | -1,089           | 0,689    |
| TBX6    | 39,000            | 0,020    | 264,646      | 0,004    | 29,446       | 0,006    | -2,130           | 0,270    |
| TERT    | -1,004            | 0,986    | 1,603        | 0,012    | 1,347        | 0,174    | 1,293            | 0,128    |
| TGFB1   | -1,604            | 0,084    | -1,886       | 0,214    | -1,462       | 0,479    | -6,162           | 0,008    |
| TGFB3   | 1,498             | 0,469    | -2,167       | 0,191    | 1,174        | 0,894    | -3,319           | 0,149    |
| THY1    | -1,345            | 0,408    | -1,344       | 0,759    | 1,072        | 0,348    | -6,435           | 0,044    |
| TNF     | -1,021            | 0,862    | 1,566        | 0,063    | 1,335        | 0,217    | 1,289            | 0,209    |
| VCAM1   | -2,111            | 0,311    | -405,437     | 0,225    | -1,178       | 0,684    | -2,235           | 0,669    |
| VEGFA   | -1,992            | 0,963    | -2,497       | 0,100    | -3,257       | 0,034    | 1,245            | 0,197    |
| VIM     | -1,328            | 0,215    | 2,207        | 0,010    | -1,087       | 0,790    | -1,889           | 0,018    |
| VWF     | 1,412             | 0,632    | 3,639        | 0,020    | -1,124       | 0,919    | -1,781           | 0,312    |
| WNT3A   | 1,574             | 0,237    | 1,693        | 0,012    | 3,271        | 0,105    | 2,300            | 0,169    |
| ZFP42   | -1,192            | 0,516    | -2,965       | 0,489    | -1,765       | 0,613    | -3,119           | 0,367    |

La co-culture induit une sous-expression significative de certains transcrits analysés, parmi lesquels BMP4 (-7), FUT4 (-10), MCAM (-19), NGFR (-7), PDGFR (-18) et NOTCH1 (-6). Seuls IL6, KDR et WNT3A, apparaissent surexprimés et cela non significativement. La figure 76 ci-dessous reprend les différents transcrits cibles d'intérêt. Chaque groupe de réplicats est représenté par un cercle. Les zones de chevauchement entre les cercles correspondent aux transcrits co-régulés de la même façon entre deux groupes. On remarque que les CSM co-cultivées (CC) partagent des similitudes avec les 3 groupes testés. CC sous exprime en commun avec M, le transcrit NOTCH1, il partage RUNX2 et PDGFR avec C, et IL6 et ITGA6 avec F. Pour deux transcrits, HGF et NES, les résultats sont contradictoires entre plusieurs groupes. HGF est surexprimé pour le groupe F, alors qu'il est sous-exprimé pour C. De la même manière, NES est surexprimé par F et est sous-exprimé pour CC. Cela indique la différence entre le groupe F et les groupes C et CC.



**Figure 76 – Diagramme de Venn représentant les intersections entre les profils de PCR quantitative obtenus.** Les cercles orange, bleu, vert et jaune, représentent respectivement les transcrits sélectionnés pour les groupes C, M, F et CC. Les zones d'intersections des cercles concernent des transcrits avec une même « tendance » de co-régulation, sous- ou surexpression, entre les groupes correspondants. Les groupes C et F étant éloignés, les gènes cibles sont notés dans un encadré de la couleur du groupe correspondant (ex : ABCB1 qui est surexprimé par C, M et F). Le cercle central regroupe les transcrits co-régulés pour les 4 groupes d'intérêt.

Le panel de 84 gènes testés dans cette approche n'a pas permis d'identifier la voie de différenciation induite par la co-culture, mais cette étude permet de confirmer le changement de phénotype des CSM.

### 3. Caractérisation par électrophorèse bidimensionnelle

L'électrophorèse bidimensionnelle (2D) est une technique permettant de séparer des mélanges plus ou moins complexes de protéines, en conditions dénaturantes. Son principe repose sur la combinaison d'une séparation non-dénaturante, selon leur point isoélectrique (pI), en première dimension, suivie d'une migration en gel dénaturant, en deuxième dimension (séparation selon la taille). Cette technique analytique présente un très grand pouvoir résolutif puisqu'elle permet de séparer et de visualiser simultanément plusieurs milliers de protéines issues de mélanges complexes. Elle constitue l'approche séparative la plus adaptée à l'identification de protéines par spectrométrie de masse (Ibrahim, 2013). Elle a été mise en œuvre pour notre projet, afin d'établir une signature 2D pour chaque type cellulaire étudié et ainsi tenter de mettre en évidence des spots d'expression différentielle, pouvant constituer des marqueurs potentiels. Ces travaux ont été réalisés avec le plateau technique de Purification et Etude d'Interactions Protéiques de Brest (PurIProB, UMR 1078, Brest). Quatre échantillons indépendants ont été étudiés par type cellulaire. La figure 77 ci-dessous résume les différentes étapes de l'analyse protéomique en électrophorèse 2D.

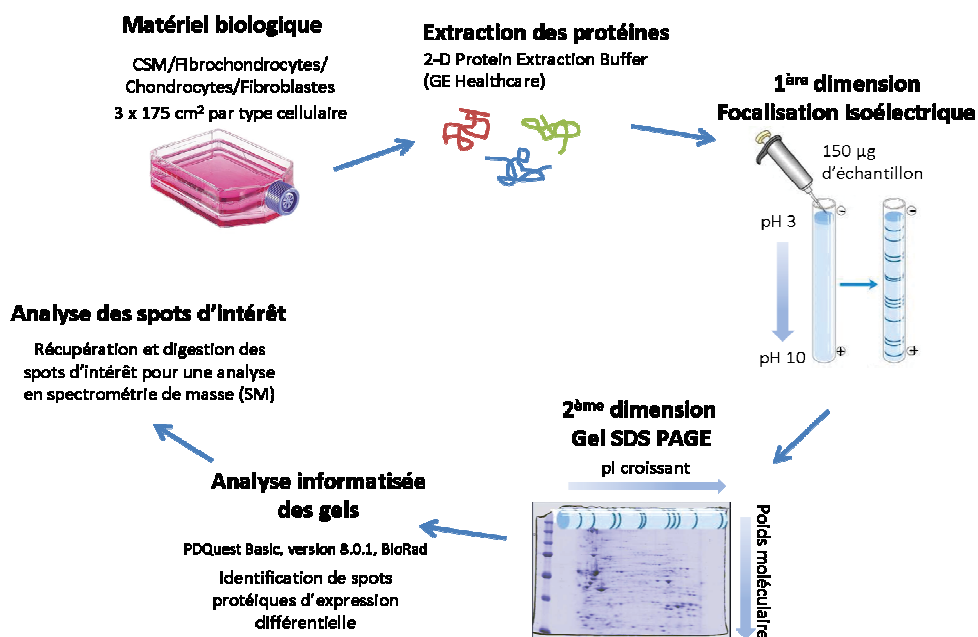


Figure 77 - Approche protéomique par électrophorèse bidimensionnelle pour la caractérisation cellulaire.

## 3.1. Matériel et méthodes

### 3.1.1. Extraction des protéines

Par échantillon, 3 flasques de 175cm<sup>2</sup> à confluence sont grattées à l'aide d'un râteau. Les cellules sont poolées puis culottées par centrifugation à 1000 g pendant 8 min à 4°C. Le culot cellulaire est pesé, puis repris dans du tampon 2D Protein Extraction Buffer (GE Healthcare), un mélange d'urée (< 8 M), de thiourée (< 5 M) et de CHAPS (< 10 %) auquel sont ajoutés extemporanément un agent réducteur (DTT, 40 mM), des inhibiteurs de protéases (1/100<sup>e</sup>) et un IPG Buffer (2 %) (GE Healthcare). Ce dernier va fournir les ampholytes nécessaires à la solubilisation des protéines dans la gamme de pH appropriée. La lyse cellulaire est complétée par une sonication des échantillons pendant 1 à 2 minutes sur glace. Le lysat est ensuite centrifugé à 16000 g pendant 15 min à 4 °C. Les protéines sont dosées avec le kit 2D Quant Kit (GE Healthcare) selon les spécifications du fabricant. Le surnageant est stocké à -80 °C.

### 3.1.2. Première dimension : Isoélectrofocalisation

La focalisation isoélectrique (IEF) des protéines, constitue la première dimension de l'électrophorèse 2D. Les protéines, en quantité connue, sont déposées sur des strips à pH immobilisé (3-10 NL, Immobiline™ DryStrip, GE-Healthcare), 150 µg par échantillon. La 1<sup>ère</sup> dimension est réalisée dans un IPGphor™ (Ettan IPGphor, GE Healthcare), au cours de laquelle, sous l'influence d'un courant électrique, les protéines vont migrer dans le gradient de pH immobilisé. Ces dernières vont se déplacer dans le gel jusqu'à atteindre un pH correspondant à leur point isoélectrique, où leur charge globale devient nulle.

### 3.1.3. Deuxième dimension : gel SDS-PAGE

L'électrophorèse SDS-PAGE (Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis) s'effectue en conditions dénaturantes, avec l'utilisation d'un tampon Tris-Glycine contenant du SDS, appelé tampon de migration ou tampon de Laemmli. Le SDS (CH<sub>3</sub>-(CH<sub>2</sub>)<sub>10</sub>-CH<sub>2</sub>-O-SO<sub>3</sub><sup>-</sup> Na<sup>+</sup>) est un détergent anionique qui se fixe sur les protéines, masquant leurs charges, et les transformant en complexes anioniques. Au cours de la seconde dimension, les protéines vont migrer du strip vers un gel de polyacrylamide, selon leur poids

moléculaire. Ce déplacement se fait sous l'influence d'un courant électrique de la cathode (haut du gel) vers l'anode (bas du gel). Cette migration est réalisée en présence d'un marqueur de poids moléculaires (Precision Plus Protein Standards, all blue 10-250 kDa, BioRad) qui va permettre d'apprécier la masse moléculaire des spots observés. Après migration, le gel est démoulé et les protéines sont fixées dans le gel à l'aide d'une solution composée d'éthanol et d'acide acétique. Les protéines fixées sont révélées par une coloration au bleu de Coomassie (Coomassie Blue G-250, Sigma®), l'intensité de la coloration des spots sera proportionnelle à la quantité d'échantillon protéique. Les gels sont numérisés avec le scanner GS-800 (Bio-Rad) couplé au logiciel QuantityOne 1-D Analysis (Bio-Rad) pour reproduire l'intensité, la taille et la position des spots protéiques. Ils sont par la suite stockés à 4 °C à court terme dans de l'eau ultra pure.

#### **3.1.4. Analyse des gels 2D**

Elle débute par la digitalisation des gels, étape pendant laquelle les images expérimentales des gels 2D sont transformées en images numériques, utilisables par ordinateur. Le traitement des données est réalisé avec le logiciel PDQuest™ (version 8.0.1, Bio-Rad). Une première étape consiste à redimensionner tous les gels à l'aide d'un calque et d'un marqueur d'alignement préalablement défini. Ceci afin que tous les gels entrant dans l'analyse fassent la même taille (L x l) et soient superposables. Après paramétrage, PDQuest™ va identifier un certain nombre de spots par gel et sélectionner automatiquement un gel qui constituera le « Master Gel ». Cette image synthétique est utilisée comme matrice de référence et est enrichie de tous les spots alignés des autres gels de l'analyse. Les résultats sont représentés sous forme d'un tableau reprenant notamment le nombre total de spots identifiés par gel, la quantité de spots en commun entre chaque échantillon et le « Master Gel » et le coefficient de corrélation (Corr Coeff). Ce dernier permet d'apprécier la proximité des gels d'un même groupe. Un Corr Coeff > 0.7 indique que les échantillons sont suffisamment proches pour poursuivre l'analyse. Le logiciel PDQuest™ permet de réaliser plusieurs types d'analyses : « Qualitative » (présence/absence de spots entre deux groupes de gels), ou encore « Quantitative » (variation de l'intensité d'un spot entre deux groupes de gels). Ces dernières permettront de mettre en évidence des variations du protéome entre les différents types cellulaires d'intérêt. L'analyse statistique utilisée par le logiciel est le test de Student (\*p<0.05). Par la suite, les spots apparaissant comme caractéristique d'un type cellulaire pourront être analysés en spectrométrie de masse (MS pour mass spectrometry). Il

s'agit d'une technique d'analyse physico-chimique qui renseigne sur l'identité et la concentration des espèces chimiques analysées, à l'état pur ou en mélange. En raison des délais impartis, nous n'avons pu finaliser cette analyse avant la rédaction de ce manuscrit.

### 3.2. Résultats

L'approche protéomique par électrophorèse bidimensionnelle est réalisée à partir de 4 réplicats biologiques pour un même modèle cellulaire (CSM, C, M et F). Il s'agit d'une étude préliminaire ayant pour objectif de mettre au point une méthodologie pour identifier l'expression différentielle de protéines entre plusieurs types d'échantillons, après migration sur des gels 2D.

Les images numérisées des gels sont redimensionnées avec le logiciel PDQuest<sup>TM</sup>, de manière à s'aligner les unes avec les autres et à éliminer les bords des gels, lesquels pourraient présenter un biais au cours de la détection. Pour une grande majorité des gels réalisés, on observe la présence d'un bruit de fond non homogène principalement sous la forme de traînées. Ces imperfections reflètent le plus souvent la présence de sels lors de la première dimension, d'impuretés dans l'eau ultra pure utilisée pour la préparation des divers tampons ou encore d'un défaut d'acquisition. Le bruit de fond est partiellement corrigé avant de débiter l'analyse, cependant cela ne permet pas de se débarrasser des problèmes d'estimation des frontières délimitant certains spots protéiques. Après paramétrage, le logiciel détecte pour chaque gel, la totalité de ce qu'il considère comme étant des spots protéiques.

Dans un second temps, une mise en correspondance (« Matching ») des taches protéiques entre les différents gels est établie et permet de réaliser un Master Gel. Ce dernier regroupe les spots identiques, détectés entre les différents échantillons. Un exemple de Master Gel entre les chondrocytes et les fibrochondrocytes est illustré dans la figure 78A ci-après. PDQuest<sup>TM</sup> va par la suite créer un tableau de résultats regroupant la quantité totale de spots identifiés pour chacun des gels, pris en compte pour l'analyse. Dans l'exemple de la figure 78A, le gel correspondant à l'échantillon 16 de chondrocytes (C16) est sélectionné comme Master Gel.

Le logiciel procède de la même manière pour toutes les analyses différentielles effectuées entre deux groupes de réplicats, en sélectionnant un Master Gel parmi les 8 gels 2D. L'image synthétique créée avec le Master Gel, est utilisée comme référence pour la quantification des spots présents sur les autres gels de l'analyse. La figure 78B représente un exemple de résultats générés par cette analyse pour les groupes C et M, utilisant le groupe de

réplicats C comme groupe contrôle. Une moyenne de  $460 \pm 67$  spots est détectée pour les 4 réplicats de C, et  $463 \pm 64$  spots, pour ceux de M. PDQuest™ va attribuer un numéro SSP (Standard Spot Number) à chaque spot détecté, spécifique de sa localisation (pI, masse moléculaire).

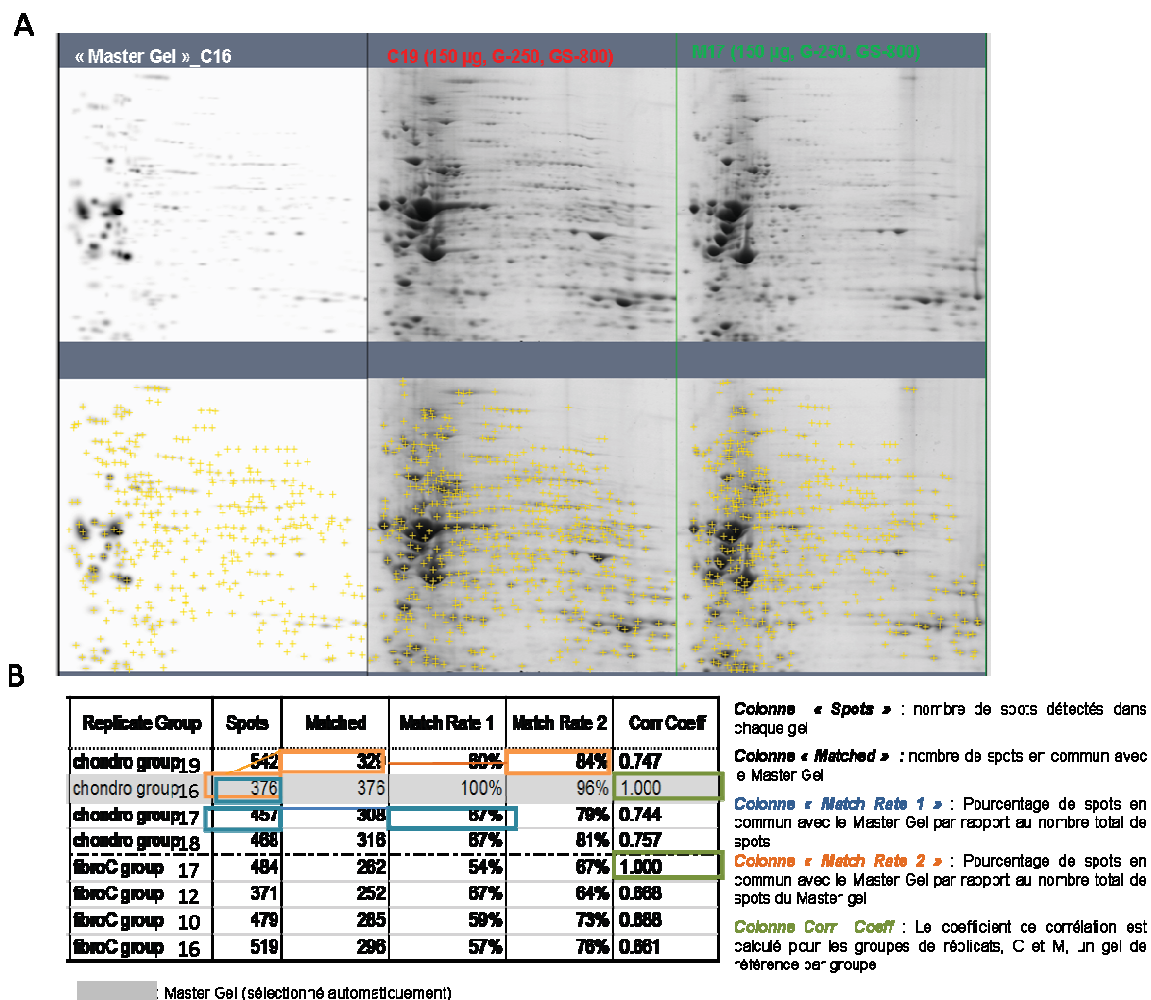
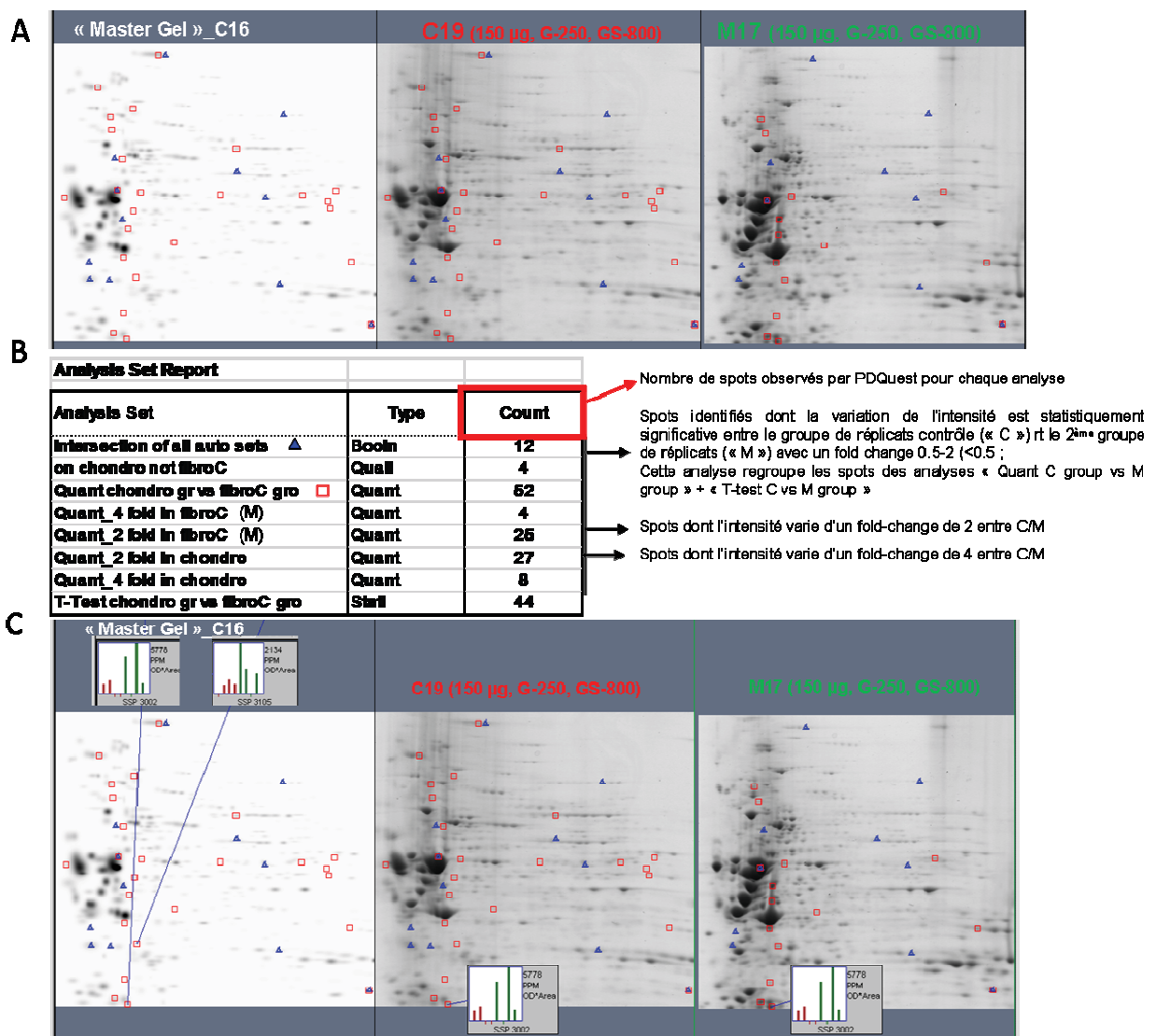


Figure 78 – Exemples de Master Gel et d'un résumé d'identification entre deux groupes de répliqués.

Le pourcentage de correspondance (Match) entre ces spots et le nombre de spots comptabilisés pour le Master gel (376 dans notre exemple), est calculé. La dernière colonne du tableau renseigne sur le coefficient de corrélation pour chacun des groupes de répliqués, en considérant un répliqué par groupe comme référence (=1). Des valeurs supérieures à 0.7 signifient que les échantillons analysés dans un même groupe sont suffisamment proches pour que l'analyse puisse être poursuivie. Dans cet exemple les coefficients de corrélation calculés pour le groupe répliqués « M » sont légèrement inférieurs à 0.7 (0.661-0.688). Toutefois, dans le cadre de cette étude préliminaire, il a été choisi de poursuivre l'analyse.

Le but de l'analyse par PDQuest™ est de mettre en évidence des spots différentiels entre les différents groupes de réplicats. Plusieurs types d'analyses peuvent être conduites, lesquelles reposent sur différents critères : intensité du spot 2 ou 4 fois supérieure ou encore absence/présence de spots dans un groupe de réplicats par rapport au groupe contrôle.

Dans le rapport d'analyse présenté ci-dessous (Figure 79A,B), selon PDQuest™, 25 spots présenteraient une intensité 2 fois supérieure pour le groupe M par rapport au groupe contrôle C. Seulement 5 spots montreraient une intensité 4 fois supérieure pour le groupe M versus le groupe contrôle C. Enfin, seulement 4 spots ne seraient pas retrouvés dans le groupe C versus le groupe M.



**Figure 79 – Exemple de présentation d'un rapport d'analyses (tableau/figure).** Dans cet exemple, les spots positifs pour les analyses « Quant chondro vs fibrochondro » sont localisés par un carré rouge et ceux positifs pour « intersection of all auto sets », par un triangle bleu.



Suite à cette analyse, il a été choisi de vérifier un par un et visuellement une grande partie des spots sélectionnés (Figure 79C). A chaque spot aligné correspond un histogramme comportant 8 barres, 4 rouges (pour les réplicats C) et 4 verts (pour les réplicats M). L'échelle est en unités PPM (parts per million), qui correspond à une normalisation des densités détectées. Si les 4 barres vertes sont supérieures aux rouges, cela signifie que la ou les protéine(s) qui compose(nt) cette tache protéique, est/sont plus fortement exprimée(s) par le groupe de réplicats M. Pour certains spots, il n'est pas rare d'observer un phénomène de co-migration de protéines au sein d'une même tâche protéique, seule une analyse en spectrométrie de masse permettra de réaliser l'identification. Les réplicats biologiques sont comparés entre eux (CSM/F, CSM/C, CSM/M, F/C, F/M, C/M) selon le principe précédemment exposé. La pertinence de la sélection est vérifiée en analysant les histogrammes d'intensité protéique correspondant aux spots identifiés. Suite à cela, des spots différentiels sont sélectionnés pour chaque groupe de réplicats. Les résultats obtenus sont présentés dans l'annexe 3.

Une analyse approfondie a été entreprise sur certains spots afin d'identifier les protéines correspondantes :

- 1- CSM / fibroblastes: (3704) ; (4401) ; (8002)
- 2- CSM / chondrocytes: (!)
- 3- CSM / fibrochondrocytes: (9001) ; (?)
- 4- fibroblastes / chondrocytes: (!) ; (6101) ; (2004)
- 5- fibroblastes / fibrochondrocytes: (3401) ; (?) ; (2003)
- 6- chondrocytes / fibrochondrocytes: (!)

Les numéros SSP sont différents d'une analyse à l'autre, car ils dépendent de la quantité totale de spots détectés. Par exemple, pour les comparaisons 4 et 5, les spots (2004) et (2003) correspondent à une tâche protéique identique. Pour l'analyse en spectrométrie de masse, les gels 2D seront à nouveau réalisés pour chaque groupe de réplicats (2 gels par modèle cellulaire) afin d'avoir suffisamment de matériel protéique pour l'analyse spectrométrique.

## 4. Recherche de marqueurs en spectrométrie de masse

Contrairement à l'analyse 2D, qui permet essentiellement l'identification des protéines, la MS s'inscrit dans la protéomique dite quantitative. Elle permet de comparer les quantités relatives de protéines, entre plusieurs échantillons. La culture cellulaire ainsi que l'extraction des protéines membranaires sont réalisées par nos soins, le reste de l'analyse est réalisé conjointement au Laboratoire de Spectrométrie de Masse des Interactions et des Systèmes (LSMIS, UMR 7140, Strasbourg) dirigé par le Dr. E Leize-Wagner et à la plateforme protéomique de l'IBMC (Institut de Biologie Moléculaire de Cellulaire, RFC 1589, Strasbourg). Ils ont utilisé une technique sans marquage (= label-free), selon deux approches analytiques, la quantification dite MS1 et la quantification de spectres MS/MS. Le principe simplifié de l'approche générale est schématisé dans la figure 80 ci-dessous.

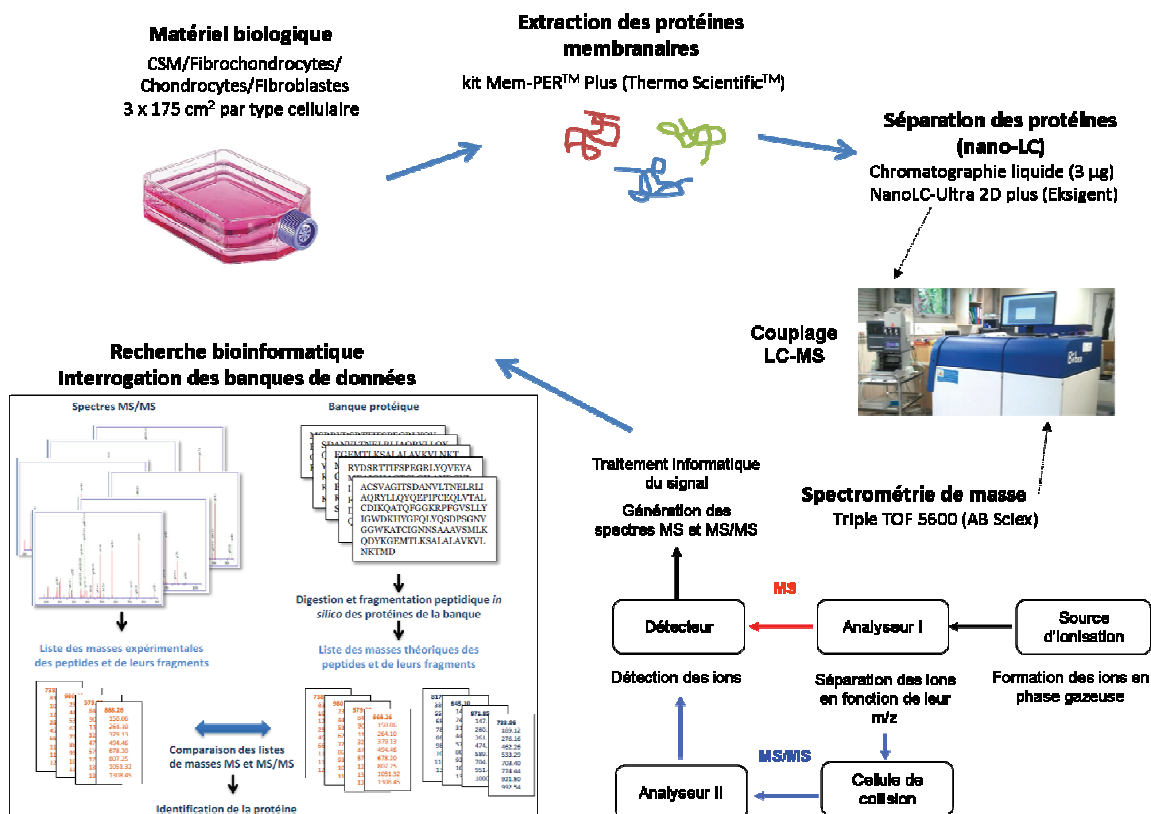


Figure 80 - Approche protéomique par couplage LC-MS pour la caractérisation cellulaire.

## 4.1. Matériel et méthodes

### 4.1.1. Extraction et dosage des protéines membranaires

L'analyse portera sur 3 échantillons par type cellulaire, ils seront qualifiés de répliquats techniques. Pour faciliter la suite du manuscrit on appellera, « C » les chondrocytes, « M » les cellules de ménisque et « F » les fibroblastes. Pour cette première étape de MS, nous avons utilisé 3 flasques par échantillon cellulaire. Les cellules confluentes sont grattées au râteau puis culottées par une centrifugation à 500 g pendant 5 minutes. Pour une meilleure homogénéité des résultats, les extractions sont réalisées en même temps. A cet effet, les échantillons sont traités au fur et à mesure de l'approvisionnement en prélèvements chirurgicaux, et les culots cellulaires sont stockés à -80 °C jusqu'à l'étape d'extraction. Les culots sont décongelés sur glace, puis traités avec le kit Mem-PER™ Plus Membrane Protein Extraction (Thermo Scientific™) selon le protocole du fournisseur. Nous avons volontairement travaillé à partir de fractions protéiques enrichies en protéines membranaires, afin de diminuer la quantité totale de protéine à analyser, et ainsi faciliter le traitement des données. De plus, il est plus intéressant dans le cadre de ce projet de se concentrer sur l'identification de marqueurs membranaires, lesquels permettent de réaliser du phénotypage membranaire et du tri cellulaire. La méthode d'extraction du kit consiste dans un premier temps à perméabiliser les cellules pour qu'elles se vident de l'intégralité de leur contenu, puis de culoter les membranes. Le surnageant contenant les protéines cytoplasmiques peut être conservé et les membranes sont solubilisées. La fraction contenant les protéines membranaires solubilisées ( $\approx 500 \mu\text{l}$ ), est stockée à -80°C puis envoyée au LSMIS.

Une fois sur place, les échantillons sont dosés selon la méthode de Bradford, qui utilise la propriété du bleu de Coomassie pour quantifier les variations d'absorbance créées, lors de la fixation du réactif par les protéines (kit Bio-Rad). Cette étape est très importante si l'on souhaite débiter l'analyse avec une quantité de protéine standardisée et fiable.

### 4.1.2. Digestion liquide

Cette étape intervient avant la séparation peptidique par nano-chromatographie liquide. Les protéines sont précipitées à -20 °C dans une solution composée d'acétate d'ammonium et de méthanol, puis lavées avec une solution de composition similaire. Les

protéines sont culotées par centrifugation à 12000 g et le culot protéique obtenu est dénaturé en présence de DTT (dithiothréitol) à chaud. L'alkylation des cystéines est réalisée en présence d'iodoacétamine à l'abri de la lumière. Elle a pour objectif de protéger les groupements –SH pour éviter la renaturation naturelle des protéines. Pour terminer, les échantillons sont incubés en présence de trypsine sur la nuit à RT. Les culots sont séchés avec un speed vacuum puis repris dans une solution contenant de l'acide formique et de la  $\beta$ -galactosidase (AB Sciex).

#### **4.1.3. Séparation des peptides par nano-chromatographie liquide**

En amont de l'analyse MS, les protéines ainsi précipitées, lavées, modifiées et digérées, sont fractionnées en chromatographie liquide (LC) en phase inverse (nanoLC-Ultra 2D Plus, Eksigent) couplée à un module (cHiPLC nanoflex). La séparation est réalisée en fonction de leur hydrophobicité, au travers d'une colonne Chrom XP C18. Pour cela deux solvants sont appliqués dans la colonne, en proportions variables, l'un composé d'eau et d'acide formique, et l'autre composé d'acétonitrile et d'acide formique. Sans cette étape, la complexité du mélange peptidique obtenu ne permettrait pas l'analyse en spectrométrie de masse. C'est le couplage LC-MS, le MS utilisé à la plateforme protéomique de l'IBMC est le Triple TOF 5600 (AB Sciex). Ce MS permet de réaliser des mesures de masse précises et résolutive, et de réaliser des analyses MS simple ou en tandem (MS/MS).

#### **4.1.4. Analyse en spectrométrie de masse**

La spectrométrie de masse est une technique qui permet de mesurer les rapports de masse sur charge ( $m/z$ ) des molécules ionisées, et ainsi de détecter, d'identifier et de quantifier des protéines. Hautement sensible et spécifique, cette technique permet d'analyser des mélanges complexes. Elle comprend trois étapes principales, l'ionisation, le passage dans un analyseur (MS1) et la détection. Les données seront analysées en fonction de l'abondance relative des peptides ionisés détectés.

La spectrométrie MS/MS combine deux analyseurs (MS1 et MS2), séparés par une cellule de collision, permettant de dissocier les ions métastables (ions-fragments riches en information structurale). Le MS1 va sélectionner un ion en fonction de sa  $m/z$ , ce dernier va être accéléré et fragmenté dans la cellule de collision, en s'entrechoquant avec des molécules de gaz. Le second analyseur (MS2) va alors mesurer le rapport  $m/z$  des ions fragmentés. Cette

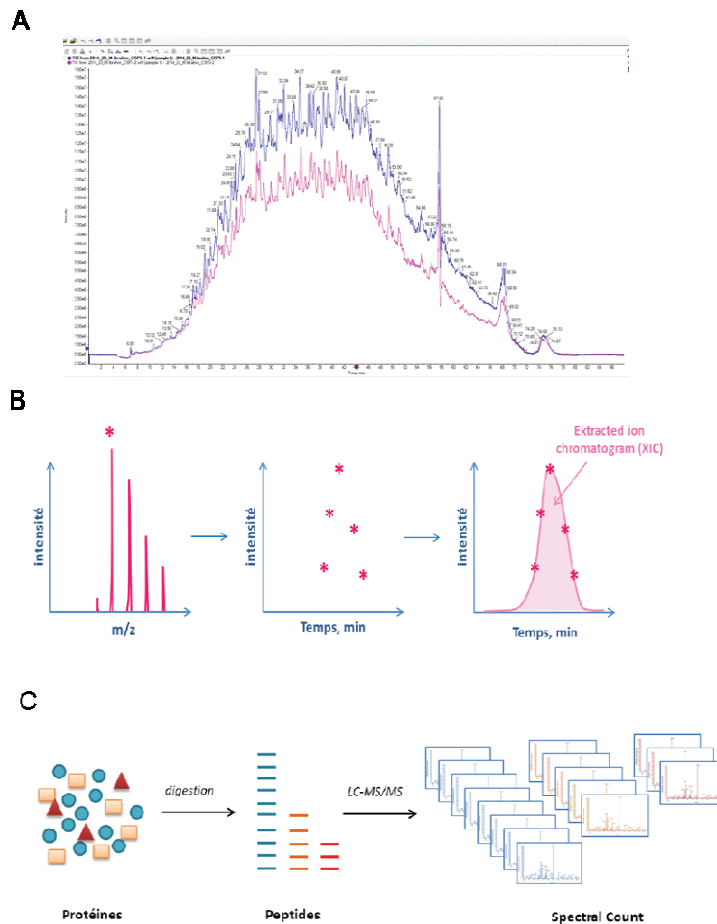
technique permet de séparer des composés de masses moléculaires différentes, au sein d'un mélange et aussi de générer d'avantage de données pour un même échantillon.

#### **4.1.5. Traitement des données**

Des moteurs de recherche vont effectuer une corrélation entre les spectres expérimentaux obtenus et les spectres théoriques, disponibles dans les banques de données. Ces derniers sont obtenus par digestion trypsique théorique de toutes les protéines présentes dans la banque interrogée. Les programmes de traitement de données vont permettre de rechercher parmi toutes les séquences peptidiques ainsi générées, celles qui correspondent au poids moléculaire des ions précurseurs fragmentés (ions parents issus de la cellule de collision).

Deux types d'analyses « label-free » sont utilisées, la MS1 et la Spectral Count (Figure 81). La quantification MS1 utilise l'information contenue dans le TIC (Total Ion Chromatogram), ce qui correspond à la somme des intensités de tous les pics MS détectés en fonction du temps (Figure 81A). L'élution de peptides identiques n'a pas lieu à un même instant  $t$ , mais dans un intervalle de temps. Pour un même peptide, il est alors possible de tracer une courbe représentant l'intensité du signal en fonction du temps. L'aire sous la courbe permet de calculer le courant ionique extrait, le XIC (eXtracted Ion Chromatogram) (Figure 81B). La mesure de l'aire d'un pic peptidique constitue une information quantitative, proportionnelle à la concentration des peptides dans l'échantillon analysé. Les peptides sont identifiés par un algorithme (MaxEnt, maximum entropy), grâce aux spectres MS/MS et à une base de données. Les XIC permettent par la suite, de comparer les quantités de protéines présentes entre différents échantillons.

La quantification Spectral Count est utilisée en parallèle de la MS1. Cette méthode permet d'évaluer la quantité relative des différents peptides en comptant le nombre de spectres MS/MS obtenus. Cela tient du fait que plus une protéine est abondante (pics les plus intenses en MS1), plus elle sera fragmentée (Figure 81C).



**Figure 81 – Méthodes d’analyses « label-free » MS1 et Spectral Count.** Les images A) et B) concernent la quantification MS1. A) Exemple de Total Ion Chromatogram (TIC) d’un mélange peptidique analysé par nanoLC-MS. B) Obtention d’un XIC à partir des données MS en fonction du temps. C) Principe de la méthode de quantification Spectral Count. (Duval, 2014)

## 4.2. Résultats

### 4.2.1.. Analyse en spectrométrie de masse : approches « Label-free » MS1 et Spectral Count

Les analyses « Label-free » MS1 et Spectral Count sont conduites à partir de 3 échantillons d’extraits protéiques par type cellulaire d’intérêt (chondrocytes « C », fibrochondrocytes « M », fibroblastes « F » et CSM). Initialement, 5 échantillons étaient prévus pour avoir un groupe statistique représentatif. Or, nous avons eu plusieurs contre temps qui nous ont conduits à revoir à la baisse la quantité d’échantillons pouvant être analysée. En effet, une contamination au CHAPS, un détergent zwitterionique a été détectée à la plateforme protéomique de l’IBMC (Figure 82A, B).



chromatographique (77min sur 120min) sur tous les spectres, lequel a été identifié comme étant du CHAPS. On y voit clairement les masses  $m/z=615.3990$  et  $1229.7931$ , (correspondant aux formes  $MH^+$  et  $(2M^+H)^+$ ). Le spectre MS/MS de l'ion  $m/z=615.3990$  présente le pattern caractéristique du CHAPS (2 groupes de 4 fragments).

Compte tenu de la durée nécessaire à l'analyse d'un échantillon, nous avons choisi de travailler sur 3 réplicats biologiques de chaque type d'échantillon (CSM, F, C et M). Une nouvelle préparation des échantillons a été pratiquée par la plateforme protéomique. Les extraits protéiques ont été précipités, puis retraités selon le protocole initial, à partir de  $5\mu g$  de matériel de départ. Le même gradient LC et la même configuration MS, sont utilisés pour l'injection nanoLC-MS/MS (Eksigent Chip module + TripleTOF 5600). Une amélioration des TIC est observée, bien que du CHAPS reste visible, mais en quantité bien moindre par rapport à la première préparation (Figure 82B). On distingue un signal convenable pour les peptides de l'échantillon, séparés entre 20 et 90 minutes.

#### 4.2.2. Méthode label-free MS1

L'identification est réalisée avec le logiciel Protein Pilot (AB Sciex) qui utilise l'algorithme Paragon. Ce dernier identifie les protéines présentes dans les échantillons à partir de leurs spectres MS et MS/MS avec la base de données UniProt, taxonomie *Homo Sapiens*. Les résultats de l'analyse sont présentés dans un tableau qui réunit des informations sur les peptides et protéines identifiées, l'intensité et le temps de rétention des ions précurseurs ainsi que le pourcentage de confiance estimé par l'algorithme. Les spectres et les diverses données sont importés dans le logiciel PeakView (AB Sciex) pour extraire les XIC de chaque peptide des protéines importées.

Une fois les protéines identifiées, sélectionnées et les XIC extraits, les données sont traitées avec le logiciel MarkerViw (AB Sciex) pour créer un XIC pour chaque protéine (moyenne XIC de tous les peptides correspondants). Avec les valeurs obtenues, il est alors possible de comparer les groupes de réplicats entre eux, deux à deux. Une protéine est considérée comme significativement surexprimée ou sous-exprimée si le ratio calculé est respectivement supérieur à 2 ou inférieur à 0.5.



### 4.2.3. Analyse Spectral Count

Les spectres obtenus pour les peptides des 12 échantillons sont importés dans le logiciel ProteinScape qui utilise l'algorithme MASCOT, lequel permet d'identifier les protéines à partir des spectres MS/MS. La base de données utilisée est la banque UniprotKB, taxonomie *Homo sapiens*. L'alignement des 12 échantillons (4 conditions en triplicat) a permis d'obtenir un tableau de résultats comportant 1821 protéines différentes avec une moyenne de 980 protéines par échantillon et un nombre brut de spectres variant entre 44 000 et 48 000 (Tableau 21 ci-dessous). Les spectres MS/MS non satisfaisants ne seront pas évoqués par la suite (par exemple un spectre identifié avec un seul peptide). Un spectre est jugé correct s'il présente une chaîne d'au moins 5 acides aminés identifiés et un signal de bruit de fond inférieur à 3. Une fois cette étape de vérification terminée, les données sont exportées et analysées selon la méthode du Spectral Count. Les protéines redondantes sont éliminées et le nombre de spectres obtenus par protéine est normalisé. La moyenne du nombre de spectres pour chaque protéine est calculée pour chaque type cellulaire, puis les ratios entre les moyennes obtenues sont déterminés. Un ratio est considéré comme fiable lorsque l'une des moyennes ayant servi à le calculer, est supérieure à 5 (Duval, 2014).

**Tableau 21 - Alignement des échantillons de la seconde injection avec le logiciel Proteinscape™.** Le coefficient de variation se calcule comme le ratio de l'écart-type rapporté à la moyenne, et s'exprime en pourcentage. Il permet de comparer le degré de variation entre les échantillons.

| Echantillon | Quantité de protéines identifiées | Coefficient de variation (CV) |
|-------------|-----------------------------------|-------------------------------|
| C16         | 828                               | 16 %                          |
| C17         | 1099                              |                               |
| C18         | 1123                              |                               |
| CSM47       | 1082                              | 8 %                           |
| CSM48       | 937                               |                               |
| CSM49       | 946                               |                               |
| F1          | 1025                              | 12 %                          |
| F5          | 1020                              |                               |
| F6          | 822                               |                               |
| M10         | 1000                              | 4 %                           |
| M12         | 948                               |                               |
| M15         | 924                               |                               |

La dernière étape de l'analyse MS consiste à croiser les deux méthodes de quantification et d'identifier manuellement les biomarqueurs en commun. Cela permet d'accroître la confiance que l'on peut accorder aux résultats. Seuls les biomarqueurs issus de ce croisement seront pris en considération (Figure 83).

| Entry Name | Descript               | C | CSM | M | F  | # replicates | QUANTIFICATION SPECTRAL COUNT |     |     |       |       |       |     |     |     |          | Ratio des XIC et p-value correspondantes |         |       |         |       |
|------------|------------------------|---|-----|---|----|--------------|-------------------------------|-----|-----|-------|-------|-------|-----|-----|-----|----------|--|---------|-------|---------|-------|
|            |                        |   |     |   |    |              | C16                           | C17 | C18 | CSM#7 | CSM#8 | CSM#9 | M10 | M12 | M15 | F1       | F5                                       | F8      | # Spc | # Spc   | # Spc |
| LA_HU/A    | Lupinus protein 1      | 2 | 1   | 1 | 22 | 2            | 5                             | 2   | 1   | 1     | 2     | 2     | 2   | 2   | 2   | 0.53370  | 0.47                                     | 0.39732 | 0.27  | 0.42417 | 0.32  |
| ARC05_H    | X-rayed 1              | 2 | 1   | 1 | 35 | 2            | 2                             | 1   | 1   | 2     | 2     | 2     | 2   | 2   | 2   | 0.41567  | 0.37                                     | 0.50738 | 0.48  | 0.42277 | 0.37  |
| ADA06_H    | Short-sh 1             | 2 | 2   | 2 | 19 | 2            | 1                             | 4   | 1   | 2     | 2     | 2     | 2   | 2   | 2   | 0.34713  | 0.22                                     | 0.38581 | 0.29  | 0.59599 | 0.60  |
| TC06_HU    | T-comp 1               | 3 | 3   | 3 | 66 | 2            | 1                             | 2   | 3   | 5     | 10    | 4     | 4   | 4   | 4   | 0.23072  | 0.28                                     | 0.21482 | 0.24  | 0.40419 | 0.48  |
| FBB_HU     | Fibrinogen beta d 1    | 1 | 1   | 1 | 84 | 2            | 1                             | 2   | 4   | 16    | 1     | 84    | 13  | 31  | 7   | 0.13352  | 0.21                                     | 0.12807 | 0.19  | 0.22110 | 0.34  |
| ER2_HUM    | Elongato 3             | 3 | 3   | 3 | 3  | 4            | 3                             | 1   | 1   | 4     | 4     | 4     | 4   | 4   | 4   | 0.52078  | 0.45                                     | 0.46760 | 0.39  | 0.54063 | 0.44  |
| TC0A_HU    | T-comp 2               | 1 | 2   | 2 | 43 | 4            | 1                             | 1   | 1   | 10    | 15    | 1     | 1   | 1   | 1   | 0.30823  | 0.27                                     | 0.33733 | 0.31  | 0.27527 | 0.21  |
| LVAG_HU    | Lyxosin 2              | 2 | 1   | 1 | 15 | 7            | 1                             | 1   | 1   | 10    | 15    | 1     | 1   | 1   | 1   | 0.09318  | 0.28                                     | 0.93903 | 0.98  | 0.29894 | 0.95  |
| REP5_HU    | Rib11 familyinte 1     | 1 | 1   | 1 | 2  | 2            | 1                             | 1   | 1   | 2     | 2     | 2     | 2   | 2   | 2   | 0.63022  | 0.67                                     | 0.41922 | 0.93  | 0.97119 | 1.04  |
| ARP2_HU    | Actin-ns 1             | 2 | 2   | 2 | 8  | 2            | 1                             | 1   | 1   | 2     | 2     | 2     | 2   | 2   | 2   | 0.70587  | 0.72                                     | 0.32757 | 0.22  | 0.72602 | 0.70  |
| COL12_HU   | Collectin 2            | 2 | 2   | 2 | 29 | 7            | 8                             | 1   | 8   | 8     | 29    | 7     | 10  | 20  | 14  | 0.67948  | 0.85                                     | 0.13671 | 0.33  | 0.62033 | 0.78  |
| HDGF_HU    | Hepatoma-derivet 1     | 1 | 1   | 1 | 92 | 38           | 23                            | 9   | 2   | 67    | 92    | 27    | 103 | 103 | 150 | 0.018481 | 0.40                                     | 0.47925 | 0.88  | 0.42632 | 1.90  |
| NEP_HUM    | Nephrin 3              | 1 | 1   | 1 | 5  | 1            | 1                             | 1   | 2   | 1     | 5     | 5     | 5   | 5   | 5   | 0.51507  | 0.75                                     | 0.09785 | 0.32  | 0.33345 | 0.65  |
| PLDX1_HU   | Plexin domain-coi 2    | 2 | 2   | 2 | 3  | 3            | 3                             | 3   | 3   | 3     | 3     | 3     | 3   | 3   | 3   | 0.018574 | 0.29                                     | 0.64339 | 1.16  | 0.75889 | 1.44  |
| CCR8_HU    | Cytochrome b-o1 1      | 1 | 1   | 1 | 1  | 3            | 3                             | 3   | 3   | 3     | 3     | 3     | 3   | 3   | 3   | 0.81548  | 0.82                                     | 0.14794 | 1.54  | 0.39968 | 1.40  |
| GSTP1_HU   | Glu tatic 2            | 1 | 1   | 1 | 2  | 3            | 2                             | 2   | 1   | 8     | 5     | 2     | 5   | 9   | 20  | 0.64028  | 1.22                                     | 0.17669 | 0.44  | 0.89280 | 1.07  |
| CS045_HU   | UPF0320 p 2            | 1 | 1   | 1 | 1  | 1            | 1                             | 1   | 1   | 1     | 1     | 1     | 1   | 1   | 1   | 0.34445  | 0.32                                     | 0.20558 | 0.95  | 0.22768 | 0.11  |
| PIC4L_HU   | Phosphatidylinosi 1    | 1 | 1   | 1 | 2  | 1            | 1                             | 1   | 1   | 2     | 2     | 2     | 2   | 2   | 2   | 0.64028  | 1.22                                     | 0.17669 | 0.44  | 0.89280 | 1.07  |
| GSTL2_HU   | Gamma-glutamyl 1       | 1 | 1   | 1 | 2  | 1            | 1                             | 1   | 1   | 2     | 2     | 2     | 2   | 2   | 2   | 0.24253  | 0.31                                     | 0.63868 | 1.32  | 0.15725 | 0.18  |
| MRGRP2_HU  | Misrelated G-prit 2    | 2 | 2   | 2 | 2  | 1            | 2                             | 2   | 2   | 1     | 2     | 2     | 1   | 5   | 5   | 0.34660  | 0.20                                     | 0.78046 | 0.77  | 0.70140 | 1.78  |
| KAT3_HU    | Kynurenic 2            | 2 | 2   | 2 | 2  | 2            | 2                             | 2   | 2   | 2     | 2     | 2     | 2   | 2   | 2   | 0.45637  | 0.82                                     | 0.61338 | 1.25  | 0.58389 | 1.60  |
| GUA_A_HU   | GM P synthase [beta] 1 | 1 | 1   | 1 | 1  | 9            | 9                             | 9   | 9   | 15    | 1     | 8     | 1   | 10  | 14  | 0.72276  | 0.72                                     | 0.43693 | 0.37  | 0.34113 | 0.22  |
| 14335_HU   | 14-3-3 o1 1            | 1 | 1   | 1 | 2  | 2            | 2                             | 2   | 2   | 2     | 2     | 2     | 2   | 2   | 2   | 0.45480  | 0.73                                     | 0.14115 | 0.84  | 0.18435 | 0.39  |
| ATL42_HU   | Atlastin-2 C 2         | 2 | 2   | 2 | 2  | 2            | 2                             | 2   | 2   | 2     | 2     | 2     | 2   | 2   | 2   | 0.13010  | 0.09                                     | 0.36048 | 0.48  | 0.47692 | 0.65  |
| SAA4_HU    | Serum amyloid A- 2     | 2 | 2   | 2 | 2  | 4            | 4                             | 4   | 4   | 3     | 2     | 2     | 2   | 4   | 4   | 0.45897  | 2.55                                     | 0.35127 | 0.10  | 0.30242 | 3.15  |
| ODPX_HU    | Pyruvate de 3          | 1 | 1   | 1 | 2  | 4            | 3                             | 2   | 2   | 3     | 2     | 2     | 2   | 2   | 2   | 0.60959  | 0.71                                     | 0.93172 | 1.05  | 0.69004 | 0.78  |
| SPRY1_HU   | SPRY do 1              | 1 | 1   | 1 | 2  | 4            | 3                             | 2   | 2   | 3     | 2     | 2     | 2   | 2   | 2   | 0.56334  | 0.71                                     | 0.43415 | 0.81  | 0.48939 | 0.98  |
| ALDOA_HU   | Fructos 3              | 3 | 3   | 3 | 2  | 10           | 10                            | 15  | 15  | 8     | 9     | 9     | 9   | 11  | 9   | 0.34888  | 0.22                                     | 0.42882 | 0.55  | 0.32776 | 0.18  |
| THIO_HU    | Thioredoxin OS=1 1     | 1 | 1   | 1 | 1  | 1            | 1                             | 1   | 1   | 1     | 1     | 1     | 1   | 1   | 1   | 0.36211  | 2.18                                     | 0.04959 | 5.89  | 0.38935 | 2.74  |
| FRP_HU     | Prostaglandin F2- 1    | 1 | 1   | 1 | 8  | 1            | 1                             | 1   | 1   | 8     | 8     | 8     | 8   | 8   | 8   | 0.36521  | 1.37                                     | 0.18574 | 0.87  | 0.21415 | 4.28  |
| GOLF3_HU   | Golgi phosphopro 1     | 1 | 1   | 1 | 2  | 1            | 1                             | 1   | 1   | 2     | 2     | 2     | 2   | 2   | 2   | 0.30447  | 0.14                                     | 0.94137 | 0.93  | 0.61343 | 0.57  |
| SEP15_HU   | KDI 2                  | 2 | 2   | 2 | 2  | 1            | 1                             | 1   | 1   | 2     | 2     | 2     | 2   | 2   | 2   | 0.32683  | 1.99                                     | 0.25305 | 0.43  | 0.40785 | 0.63  |
| OFUT1_HU   | GDP-1ucos 1            | 1 | 1   | 1 | 6  | 1            | 1                             | 1   | 1   | 3     | 6     | 6     | 6   | 6   | 6   | 0.10607  | 1.83                                     | 0.87012 | 0.91  | 0.54154 | 1.44  |
| ARP3_HU    | Actin-related prot 2   | 2 | 2   | 2 | 2  | 2            | 2                             | 2   | 2   | 3     | 2     | 2     | 2   | 2   | 2   | 0.29842  | 0.44                                     | 0.66069 | 0.80  | 0.56242 | 0.70  |
| PGF98_HU   | Plastin-1 2            | 2 | 2   | 2 | 3  | 2            | 2                             | 2   | 2   | 2     | 11    | 3     | 1   | 3   | 3   | 0.10883  | 0.56                                     | 0.88191 | 1.03  | 0.20753 | 4.83  |
| DXL1_HU    | Dynein 1               | 1 | 1   | 1 | 1  | 2            | 2                             | 2   | 2   | 4     | 2     | 2     | 2   | 2   | 2   | 0.34149  | 0.31                                     | 0.67757 | 0.72  | 0.84043 | 0.81  |
| TIT98_HU   | Transmembrane 1        | 1 | 1   | 1 | 1  | 1            | 1                             | 1   | 1   | 1     | 1     | 1     | 1   | 1   | 1   | 0.88445  | 1.12                                     | 0.23077 | 0.18  | 0.31720 | 0.28  |
| POFRA_HU   | Plastin 1              | 2 | 2   | 2 | 2  | 1            | 4                             | 3   | 3   | 2     | 19    | 2     | 5   | 5   | 18  | 0.22272  | 0.64                                     | 0.02869 | 0.58  | 0.44649 | 1.40  |

Figure 83 - Exemple de calcul de croisement de données “Label-free” MS1 et Spectral Count.

Feuille de calcul générée pour le groupe « M » après croisement des données par les deux méthodes de quantification.

Un total de 246 protéines sont retrouvées en commun entre les deux identifications, ces dernières sont classées selon leur p-value de la méthode MS1 (<0.05) et le nombre de spectres

moyen de la méthode Spectral Count et l'abondance. Celles dont les résultats se contredisent, sont écartées. Au total 36 protéines sont sélectionnées comme étant de potentiels marqueurs des fibroblastes, 7 pour les fibrochondrocytes, 2 pour les chondrocytes et 2 pour le CSM (Figure 84).

| Fibroblastes |               |     |   |        |        |        | Fibrochondrocytes |               |     |   |     |        |        |        |        |       |
|--------------|---------------|-----|---|--------|--------|--------|-------------------|---------------|-----|---|-----|--------|--------|--------|--------|-------|
| EntryName    | # triplicates |     |   | F/C    | F/CSM  | F/M    | EntryName         | # triplicates |     |   | M/C | M/CSM  | F/M    |        |        |       |
|              | C             | CSM | M |        |        |        |                   | C             | CSM | M |     |        |        |        |        |       |
| IA02_HUMAN   | 3             | 3   | 3 | 2,01   | 2,69   | 2,40   | LA_HUMAN          | 1             | 2   | 1 | 2   | M only | 0,10   |        |        |       |
| IA31_HUMAN   | 2             | 2   | 2 | 3,31   | 2,62   | 2,62   | KRC05_HUMAN       | 2             | 1   | 2 | 2   | 17,50  | 5,83   | 0,46   |        |       |
| ARF6_HUMAN   | 1             | 1   | 1 | F only | 7,00   | 3,50   | ACAD5_HUMAN       | 2             | 1   | 2 | 2   | 8,67   | 6,50   | 0,23   |        |       |
| CA2D1_HUMAN  | 1             | 1   | 2 | 2,71   | F only | 6,33   | TCR9_HUMAN        | 3             | 1   | 3 | 3   | 11,67  | 35,00  | 0,27   |        |       |
| CAN1_HUMAN   | 1             |     |   | 4,00   | F only | F only | FIBR_HUMAN        | 2             | 1   | 1 | 1   | M only | M only | 0,40   |        |       |
| CATC_HUMAN   |               |     | 1 | F only | F only | F only | EF2_HUMAN         | 3             | 3   | 3 | 3   | 3,05   | 3,74   | 0,50   |        |       |
| CNTN1_HUMAN  |               |     | 3 | F only | F only | F only | TFPA_HUMAN        | 2             | 1   | 2 | 3   | 6,29   | 44,00  | 0,20   |        |       |
| CPS1A_HUMAN  |               |     | 1 | F only | F only | F only | LYAG_HUMAN        | 2             | 2   | 1 | 1   | 3,13   | M only | 0,20   |        |       |
| DDAH1_HUMAN  |               |     | 2 | F only | F only | F only | RFPS_HUMAN        |               |     |   | 1   | M only | M only |        |        |       |
| DEST_HUMAN   | 1             | 1   | 2 | 5,00   | F only | 5,00   | ARP2_HUMAN        | 1             | 2   | 3 | 2   | 2,50   | 2,50   | 0,80   |        |       |
| DPP4_HUMAN   | 3             | 3   | 3 | 4,50   | 16,54  | 2,52   | COL12_HUMAN       | 2             | 2   | 3 | 3   | 2,47   | M only | 1,19   |        |       |
| DPYL2_HUMAN  | 1             | 1   | 2 | F only | 56,00  | 5,60   | HDC9_HUMAN        |               |     |   | 1   | M only | M only |        |        |       |
| EFG1_HUMAN   |               |     | 1 | F only | F only | F only | NEP_HUMAN         | 3             | 1   | 2 | 3   | 2,27   | 79,50  | 1,76   |        |       |
| FELN1_HUMAN  | 1             | 1   | 2 | 5,42   | 32,50  | 7,22   | RDX1_HUMAN        |               |     |   | 2   | M only | M only |        |        |       |
| FELN2_HUMAN  |               |     | 3 | F only | F only | F only | QCR3_HUMAN        |               |     |   | 1   | M only | M only |        |        |       |
| FFIL_HUMAN   |               |     | 1 | F only | F only | F only | GSTP1_HUMAN       | 2             | 1   | 3 | 3   | 3,00   | 19,00  | 2,27   |        |       |
| GELS_HUMAN   | 3             | 3   | 3 | 3,86   | 2,81   | 4,60   | CG055_HUMAN       | 2             | 1   |   |     | M only | 0,50   |        |        |       |
| IGKC_HUMAN   | 1             | 2   | 3 | 4,33   | F only | 2,60   | PICAL_HUMAN       |               |     |   | 1   | M only | M only |        |        |       |
| IMA1_HUMAN   | 1             |     | 1 | 2,00   | F only | F only | GGT5_HUMAN        |               |     |   | 1   | M only | M only |        |        |       |
| KIRRI_HUMAN  |               |     | 1 | F only | F only | F only | HNRGF_HUMAN       |               |     |   | 2   | 3      |        | 3,67   |        |       |
| LEMD2_HUMAN  |               |     | 1 | F only | F only | F only | KAT3_HUMAN        | 2             | 2   | 2 | 2   | M only | 0,50   | 1,25   |        |       |
| LRC32_HUMAN  |               |     | 1 | F only | F only | F only | GUAA_HUMAN        |               |     |   | 1   | M only | M only |        |        |       |
| MOXD1_HUMAN  |               |     | 1 | F only | F only | F only | 14330_HUMAN       | 1             | 2   | 2 | 3   | 2,55   | M only | 1,09   |        |       |
| PGFRB_HUMAN  |               |     | 1 | F only | F only | F only | ATLA2_HUMAN       | 1             | 2   | 2 | 1   | M only | 0,75   | 0,33   |        |       |
| PGH1_HUMAN   |               |     | 2 | 8,50   | 25,50  | 3,19   | SA44_HUMAN        |               |     |   | 2   | 1      |        | 0,87   |        |       |
| PXB2_HUMAN   | 1             | 1   | 2 | 3,53   | 35,00  | 4,38   | ODPX_HUMAN        | 3             | 1   | 1 | 1   | M only | 0,22   | 1,00   |        |       |
| PTX3_HUMAN   |               |     | 1 | F only | F only | F only | SPRY4_HUMAN       | 1             | 3   | 2 | 1   | 2,75   | 0,65   | 0,18   |        |       |
| PYRD2_HUMAN  |               |     | 1 | F only | F only | F only | ALDOA_HUMAN       | 3             | 3   | 3 | 3   | 2,74   | 2,82   | 0,30   |        |       |
| RASN_HUMAN   | 2             | 3   | 2 | 3,33   | 2,31   | 2,73   | THO_HUMAN         |               |     |   | 1   | 1      |        | 1,00   |        |       |
| RECK_HUMAN   | 2             | 1   | 2 | 4,56   | 36,50  | 4,56   | FRP_HUMAN         |               |     |   | 1   | 3      |        | 8,88   |        |       |
|              |               |     |   |        |        |        | GOLP3_HUMAN       |               |     |   | 1   |        |        | M only | M only |       |
|              |               |     |   |        |        |        | SEPI5_HUMAN       | 2             | 3   | 2 |     |        |        | 2,00   | 1,00   |       |
|              |               |     |   |        |        |        | OFUT1_HUMAN       |               |     |   | 1   | 1      |        | M only | 6,00   |       |
|              |               |     |   |        |        |        | ARP3_HUMAN        |               |     |   | 2   | 2      |        | M only | M only | 0,44  |
|              |               |     |   |        |        |        | PGFRB_HUMAN       |               |     |   | 1   | 2      | 3      | M only | 13,00  | 11,31 |
|              |               |     |   |        |        |        | DYL1_HUMAN        | 2             | 1   | 3 | 2   |        |        | 2,25   | 6,00   | 0,22  |
|              |               |     |   |        |        |        | T179B_HUMAN       |               |     |   | 1   |        |        | M only | M only |       |
|              |               |     |   |        |        |        | PGFRA_HUMAN       | 1             | 2   | 2 | 2   |        |        | 17,00  | 2,43   | 1,35  |
|              |               |     |   |        |        |        | SYVC_HUMAN        |               |     |   | 1   |        |        | M only | M only |       |
|              |               |     |   |        |        |        | ATF1_HUMAN        | 1             | 1   | 1 |     |        |        | 2,00   | 2,00   |       |
|              |               |     |   |        |        |        | MGLL_HUMAN        |               |     |   | 1   | 2      |        | M only | M only | 6,00  |
|              |               |     |   |        |        |        | GP18A_HUMAN       | 1             | 1   |   |     |        |        | 2,00   | M only |       |
|              |               |     |   |        |        |        | KAD3_HUMAN        | 3             | 3   | 3 | 3   |        |        | 3,30   | 1,32   | 0,56  |
|              |               |     |   |        |        |        | TCFB_HUMAN        | 3             | 3   | 1 | 3   |        |        | 12,57  | 11,00  | 0,20  |
|              |               |     |   |        |        |        | AC058_HUMAN       | 2             | 3   | 2 | 3   |        |        | 3,00   | 1,33   | 0,83  |

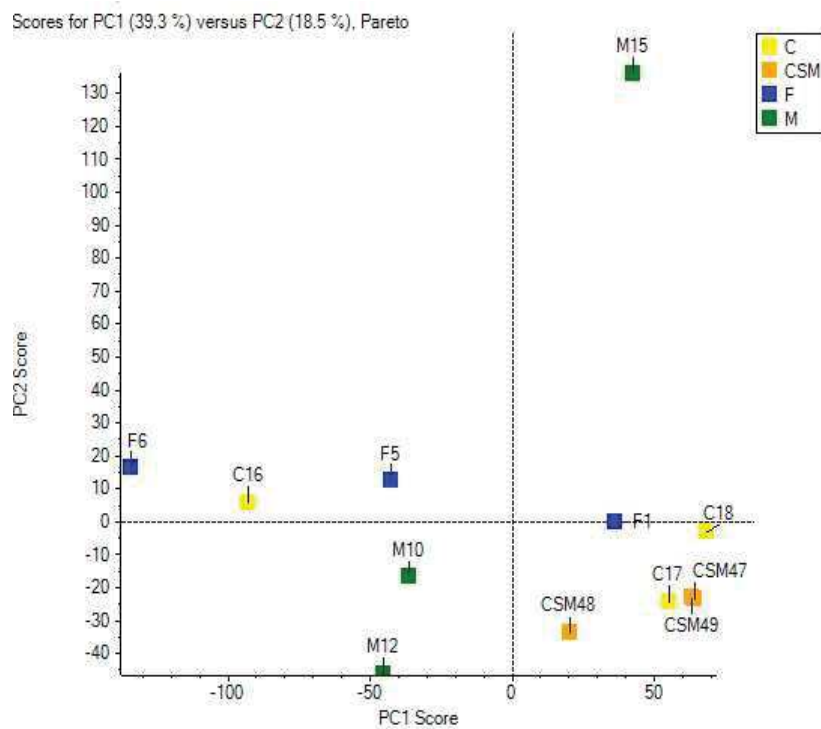
  

| CSM          |               |     |   |          |       |        | Chondrocytes |               |     |   |        |       |      |      |  |  |
|--------------|---------------|-----|---|----------|-------|--------|--------------|---------------|-----|---|--------|-------|------|------|--|--|
| EntryName    | # triplicates |     |   | RATIOS   |       |        | EntryName    | # triplicates |     |   | RATIOS |       |      |      |  |  |
|              | C             | CSM | M | CSM/C    | M/CSM | F/CSM  |              | C             | CSM | M | F      | CSM/C | M/C  | F/C  |  |  |
| ENRPP1_HUMAN | 3             | 3   | 3 | 3,54     | 0,29  | 0,02   | FIBA_HUMAN   | 1             | 1   | 1 | 2      | 0,02  | 0,08 | 0,08 |  |  |
| ABHD4_HUMAN  | 3             | 3   | 3 | 3,80     | 0,26  | 0,29   | K2C1_HUMAN   | 3             | 2   | 2 | 3      | 0,16  | 0,31 | 0,44 |  |  |
| MIF_HUMAN    | 1             | 2   | 3 | 2,33     | 0,71  | 1,71   | PCBP1_HUMAN  | 3             | 2   | 3 | 3      | 0,35  | 1,29 | 0,76 |  |  |
| ODBA_HUMAN   | 1             | 3   | 1 | 11,50    | 0,09  | 0,09   | NEP_HUMAN    | 3             | 1   | 2 | 3      | 0,03  | 2,27 | 4,00 |  |  |
| BACH1_HUMAN  | 3             | 3   | 3 | 2,92     | 0,37  |        | GSTP1_HUMAN  | 2             | 1   | 3 | 3      | 0,20  | 3,00 | 6,80 |  |  |
| PCCA_HUMAN   | 2             | 3   | 2 | 2,28     | 0,51  | 0,63   | PSMD2_HUMAN  | 3             | 1   | 2 | 3      | 0,27  | 0,80 | 1,13 |  |  |
| CAH5B_HUMAN  | 1             | 1   |   | 2,00     |       |        | APOL1_HUMAN  | 3             | 1   | 2 | 2      | 0,15  | 1,23 | 1,00 |  |  |
| CG055_HUMAN  | 2             | 1   |   | CSM only | 0,50  |        | COPA_HUMAN   | 3             | 2   | 2 | 3      | 0,33  | 0,22 | 1,11 |  |  |
| AMPL_HUMAN   | 2             | 3   | 3 | 2,35     | 0,73  | 0,93   | TLN1_HUMAN   | 3             | 3   | 3 | 3      | 0,22  | 1,25 | 1,73 |  |  |
| PYC_HUMAN    | 3             | 3   | 2 | 4,36     | 0,29  | 0,04   | RAB32_HUMAN  | 3             | 2   | 2 | 3      | 0,29  | 1,00 | 1,29 |  |  |
| KAT3_HUMAN   | 2             | 2   | 2 | CSM only | 0,80  | 1,00   | IGLL5_HUMAN  | 3             | 1   | 3 | 3      | 0,11  | 1,00 | 0,67 |  |  |
| ATLA2_HUMAN  | 2             | 2   | 1 | CSM only | 0,75  | 0,26   | CO1A1_HUMAN  | 2             | 2   | 3 | 3      | 0,27  | 0,94 | 0,49 |  |  |
| CD109_HUMAN  | 3             | 3   | 2 | 2,41     | 0,24  | 1,05   | SC65_HUMAN   | 3             | 3   | 1 | 2      | 0,31  | 0,38 | 0,50 |  |  |
| DCXR_HUMAN   | 3             | 3   | 1 | CSM only | 0,10  |        | MMP2_HUMAN   | 3             | 1   | 2 | 1      | 0,29  | 0,63 | 0,06 |  |  |
| RIM45_HUMAN  | 2             | 3   | 2 | 2,10     | 0,25  | 0,32   | PSMD1_HUMAN  | 2             | 2   | 2 | 3      | 0,23  | 1,15 | 1,92 |  |  |
| ODPX_HUMAN   | 3             | 1   | 1 | CSM only | 0,22  | 0,22   | NPC1_HUMAN   | 3             | 2   | 2 | 2      | 0,27  | 0,93 | 0,04 |  |  |
| SPRY4_HUMAN  | 1             | 3   | 2 | 4,25     | 0,65  | 0,12   | ARL8B_HUMAN  | 3             | 3   | 3 | 3      | 0,40  | 0,61 | 0,60 |  |  |
| MBOAT7_HUMAN | 1             |     |   | CSM only |       |        | SDPR_HUMAN   | 3             | 1   |   |        | 0,13  |      |      |  |  |
| SEPI5_HUMAN  | 2             | 3   | 2 | 2,00     | 1,00  |        | HMOX1_HUMAN  | 3             | 2   | 3 | 1      | 0,37  | 0,66 | 0,03 |  |  |
| OFUT1_HUMAN  | 1             | 1   |   | CSM only | 6,00  |        | FND3B_HUMAN  | 2             | 2   |   |        | 0,50  |      |      |  |  |
| HMGCL_HUMAN  | 3             | 3   | 2 | 2,07     | 0,57  | 0,31   | DHX9_HUMAN   | 2             | 3   | 3 | 2      | 0,41  | 0,33 | 0,78 |  |  |
| PGFRB_HUMAN  | 1             | 1   | 2 | CSM only | 13,00 | 147,00 | PPBT_HUMAN   | 2             | 2   | 3 |        | 0,47  | 0,83 |      |  |  |
| MUTA_HUMAN   | 1             | 3   | 1 | 53,00    | 0,02  | 0,21   | DHRS7_HUMAN  | 3             | 1   | 2 | 3      | 0,50  | 0,75 | 5,00 |  |  |
| BCAT2_HUMAN  | 3             | 3   | 3 | 2,78     | 0,32  | 0,36   | DYL1_HUMAN   | 2             | 1   | 3 | 2      | 0,25  | 2,25 | 0,50 |  |  |
| K1C9_HUMAN   | 1             | 1   | 1 | 2,00     | 0,60  | 0,60   | ALBU_HUMAN   | 3             | 3   | 3 | 3      | 0,16  | 1,18 | 1,58 |  |  |
| PGFRA_HUMAN  | 1             | 2   | 2 | 7,00     | 2,43  | 3,29   | TRA2B_HUMAN  | 1             | 2   |   |        | 0,50  |      |      |  |  |
| C1TM_HUMAN   | 3             | 3   | 3 | 2,56     | 0,36  | 0,61   | CCHL_HUMAN   | 3             | 1   | 1 | 3      | 0,33  | 0,33 | 1,67 |  |  |
| KAD3_HUMAN   | 3             | 3   | 3 | 2,50     | 1,32  | 0,74   | CAPG_HUMAN   | 3             | 2   | 3 | 3      | 0,16  | 0,74 | 0,32 |  |  |
| ACDSB_HUMAN  | 2             | 3   | 2 | 2,25     | 1,33  | 1,11   | SGMR1_HUMAN  | 3             | 1   | 2 | 1      | 0,13  | 0,50 | 0,13 |  |  |
| WFS1_HUMAN   | 1             | 1   |   | CSM only | 1,00  |        | CO6A1_HUMAN  | 3             | 3   | 3 | 3      | 0,35  | 0,97 | 1,47 |  |  |
| HTRA2_HUMAN  | 1             | 1   |   | CSM only | 0,33  |        | RS16_HUMAN   | 2             | 2   | 2 | 2      | 0,31  | 1,15 | 0,54 |  |  |
| EPOR_HUMAN   | 2             | 2   |   | CSM only | 3,00  |        | GLGM_HUMAN   | 3             | 3   | 3 | 3      | 0,36  | 0,85 | 0,66 |  |  |
| CAT2_HUMAN   | 1             | 3   | 2 | 2,67     | 0,63  | 0,88   | ITB5_HUMAN   | 3             | 3   | 3 | 3      | 0,26  | 0,67 | 0,53 |  |  |
| NU205_HUMAN  | 3             | 3   | 3 | 2,50     | 1,87  | 1,20   | MOXD1_HUMAN  | 3             | 1   | 2 | 3      | 0,10  | 0,80 | 4,65 |  |  |
| SF3A3_HUMAN  | 1             | 1   | 1 | 2,00     | 1,00  | 1,00   | ITA3_HUMAN   | 2             | 1   |   |        | 0,07  |      |      |  |  |
| SYVM_HUMAN   | 1             | 3   | 1 | 4,00     |       | 0,25   | CAPT_HUMAN   | 3             | 3   | 3 | 3      | 0,48  | 0,79 | 1,86 |  |  |
| TRFM_HUMAN   | 2             | 3   | 2 | 2,22     | 0,04  |        | ITA2_HUMAN   | 2             | 2   | 2 | 3      | 0,08  | 1,08 | 1,53 |  |  |
| MNP_HUMAN    | 3             | 2   | 3 | 3,06     | 0,33  | 0,61   | K2C7_HUMAN   | 3             | 1   |   |        | 0,13  | 0,63 |      |  |  |
| NFU1_HUMAN   | 3             |     |   | CSM only |       |        | BAX_HUMAN    | 2             | 2   | 2 | 3      | 0,25  | 0,75 | 1,56 |  |  |
| NDUS2_HUMAN  | 1             | 2   | 1 | 4,00     | 0,25  |        | RECK_HUMAN   | 2             | 1   | 2 | 3      | 0,13  | 1,00 | 4,56 |  |  |
| IVD_HUMAN    | 2             | 3   | 2 | 3,63     | 0,29  | 0,62   | VAT1_HUMAN   | 3             | 3   | 3 | 3      | 0,31  | 0,77 | 0,99 |  |  |
| NEUL_HUMAN   | 2             | 3   | 2 | 3,83     | 0,17  | 0,17   | TGM2_HUMAN   | 2             | 1   |   |        | 0,25  |      |      |  |  |
| RT63_HUMAN   | 1             |     |   | CSM only |       |        |              |               |     |   |        |       |      |      |  |  |

Figure 84 – Résumé des résultats obtenus après croisement des méthodes MS1 et Spectral Count. Les trois colonnes de droite représentent les ratios XIC.

Avant d'aller plus loin dans les interprétations, une analyse PCA (Analyses en Composantes Principales) a été effectuée à la plateforme sur les triplicats biologiques. Il s'agit d'une analyse statistique qui atteste de la reproductibilité des triplicats et de la différence entre deux conditions. Chaque échantillon est représenté par un carré de couleur. Si pour un même groupe ils sont proches, cela signifie qu'il y a peu de variabilité, et plus les groupes sont éloignés les uns des autres, plus les différences intergroupes seront élevées (Figure 85). Avec les résultats de l'analyse PCA, systématiquement un des échantillons des triplicats était éloigné des deux autres. En raison de la trop grande disparité entre les analyses réalisées, les résultats statistiques ne peuvent être considérés comme probants. Nous n'avons pu poursuivre notre approche.

Le traitement des données de ce type d'approches est très fastidieux, nécessitant beaucoup de temps. Plus on augmente le nombre de réplicats, plus les résultats peuvent être significatifs et ainsi permettre l'identification de réels biomarqueurs pour les fibrochondrocytes, mais aussi pour les autres types cellulaires analysés.



**Figure 85 – Analyse CPA réalisée sur les 9 échantillons.** L'analyse est réalisée avec les valeurs obtenues pour la quantification spectral Count. Les réplicats F1, C16 et M15 ne sont pas reproductibles.

## 5- Discussion sur les approches développées pour caractériser les cellules méniscales

Nous avons volontairement initié ce travail avec un système de co-culture indirecte. Ce choix a été motivé pour se rapprocher des conditions retrouvées *in vivo*. En effet, si l'on envisage de cellulariser en préimplantatoire des substituts méniscaux, avec des cellules multipotentes autologues, il est nécessaire d'appréhender l'influence des facteurs solubles sur ces dernières (le même raisonnement s'applique aux substituts osseux). L'idéal aurait été de travailler dans un modèle *in vivo*, en implantant directement les substituts cellularisés dans des défauts méniscaux, puis d'analyser au cours du temps l'évolution de la MEC et le phénotype cellulaire. Nous n'avions malheureusement pas cette possibilité au cours de ce projet. Nous nous sommes tournés vers un modèle *in vitro*, de co-culture indirecte, présentant l'avantage de reproduire la distance entre les cellules dans le substitut implanté et celles présentes dans l'environnement du tissu receveur, et ainsi mieux appréhender le devenir cellulaire. Les techniques de co-cultures sont utilisées au laboratoire, le plus souvent en contact direct en réalisant des pellets cellulaires. Ce type de co-cultures CSM/fibrochondrocytes a été réalisé par Cui et son équipe (Cui *et al.*, 2012b). Ils ont testé différents ratios cellulaires et ont sélectionné le ratio 50 : 50 comme favorisant la production de Col1 et Col2 ainsi que la sécrétion d'agrécane, et cela en présence de TGFβ3. Dans notre système de co-culture en plaques 6 puits, nous avons cherché à mettre en évidence le changement de profil d'expression transcriptomique, des CSM co-cultivées avec des fibrochondrocytes (ratio 50 : 50) en milieu standard. Le fait d'utiliser du LP pour l'apport de facteurs de croissance nous a semblé suffisant, car nous pouvions ainsi observer uniquement les changements liés au conditionnement du milieu par les fibrochondrocytes. Les co-cultures sont maintenues pendant 21 jours, durée standard des protocoles de différenciation *in vitro*. L'analyse en simultanée de 84 gènes associés au CSM (« stemness », différenciation, etc.) était un moyen simple et rapide d'obtenir un profil différentiel entre les CSM cultivées en milieu standard et en milieu conditionné par des fibrochondrocytes. L'analyse a été effectuée en parallèle avec des groupes de réplicats de fibrochondrocytes, de chondrocytes et de fibroblastes, afin d'identifier si les facteurs sécrétés par les fibrochondrocytes allaient orienter les CSM vers un type cellulaire en particulier. Nous avons déterminé que MCAM, FUT4, NGFR et BGLAP, sont sous-exprimés dans les 4 modèles cellulaires, par rapport au CSM. MCAM est une molécule d'adhésion fortement impliquée dans les phénomènes de migration cellulaire ainsi que dans la promotion de l'angiogenèse (Stopp *et al.*, 2013). Ces résultats sont concordants avec le fait que les CSM possèdent des propriétés pro-angiogéniques que n'ont pas les cellules différenciées. Etrangement

ce transcrit est plus fortement sous-exprimé dans le groupe CC par rapport aux 3 autres. Cela peut s'expliquer car les facteurs sécrétés peuvent avoir une action trophique sur les CSM en stimulant leur migration (Paschos *et al.*, 2015), la co-culture est donc susceptible d'induire la répression de MCAM. Etrangement, les groupes surexpriment tous KDR par rapport aux CSM. Or, il s'agit d'un facteur pro-angiogénique impliqué dans la différenciation ostéoblastique. Il est d'ailleurs retrouvé 63.5 fois plus exprimé dans le groupe C. KDR, aussi appelé VEGFR-2, est fortement exprimé par les cellules endothéliales, cependant il aurait aussi un rôle dans la survie chondrocytaire au cours de la formation osseuse endochondrale. Son niveau d'expression dans le cartilage serait fonction de l'âge de l'individu, avec un plateau à l'âge adulte, et un pic d'expression chez le sujet plus âgé, en raison de facteurs tels que l'hypoxie, l'inflammation locale et la charge mécanique (Murata *et al.*, 2008). Cela est en adéquation avec notre modèle cellulaire. En effet, les échantillons de résidus de fraisage, de ménisque et de cartilage, sont issus de patients âgés (60-65 ans). Ce point est possiblement révélateur d'un biais dans les résultats obtenus. En revanche, une diminution significative de l'expression de THY1 (CD90) et de TGF $\beta$ 1 est observée dans les CC. Ils sont tous deux utilisés comme marqueurs de l'état indifférencié des CSM. Cette sous-expression conforte l'idée d'un changement de phénotype cellulaire induit *via* la sécrétion de facteurs solubles par les fibrochondrocytes. D'autre part, dans cette analyse les groupes C, M et F partagent l'expression d'un certain nombre de transcrits. Cette technique n'a pas permis la mise en évidence de marqueurs spécifiques du groupe M, mais a néanmoins mis en évidence un profil différentiel d'expression transcriptomique entre les groupes CSM et CC, indiquant l'initiation d'une voie de différenciation. Les démarches auraient été facilitées si nous avions eu des marqueurs caractéristiques des fibrochondrocytes. C'est dans ce sens que nous avons développé des collaborations avec deux partenariats, l'un à Brest et l'autre à Strasbourg, pour entreprendre la recherche de biomarqueurs protéiques spécifiques des cellules méniscales. Il est rare qu'un seul marqueur soit suffisant pour caractériser un type cellulaire, il s'agit la plupart du temps d'un panel de marqueurs comme c'est le cas pour les CSM (Dominici *et al.*, 2006; Rasini *et al.*, 2013).

Dans le premier cas nous avons travaillé sur des extraits protéiques de lysats cellulaires totaux pour réaliser des gels d'électrophorèse 2D et ainsi comparer les profils protéiques des groupes CSM, C, M et F. Avec ce type de techniques, de nombreuses tâches ne sont pas détectables et représentent des protéines minoritaires. Dans notre cas nous avons détecté une moyenne de 300 à 500 spots par gel, cette une quantité inférieure à celle attendue. La gamme de pH de la première dimension, ainsi que la taille du gel de la seconde, permettent d'augmenter la résolution des spots. Il était difficile de cibler une gamme de pH en particulier, c'est pourquoi

nous avons choisi de travailler à partir de gels de petite taille (strip de 7 cm) dans une large gamme de pH (pH 3-10). Pour avoir une meilleure définition, il aurait fallu travailler sur une échelle de pH plus réduite, cependant il est difficile de combiner plusieurs gels de pH différents. Avec seulement 4 réplicats biologiques, nous avons pu obtenir des spots différentiels entre les différentes conditions et cela dans un temps réduit. L'analyse de ces spots par spectrométrie de masse sera effectuée ultérieurement. Dans nos conditions, il est fort probable que nous soyons confrontés à des phénomènes de co-migration protéique au sein d'un même spot. Par comparaison avec la 2D, la recherche de biomarqueurs par les techniques «Label-free» et Spectral Count s'est avérée plus complexe. Nous avons été contraints de réduire les réplicats à seulement 3 échantillons en raison de problèmes techniques et du temps imparti pour cette étude. La technique MS1 mesure une aire de pics peptidiques, tandis que la Spectral Count comptabilise un nombre de spectre. En général de telles applications sont réalisées pour caractériser des organismes plus simples comme les bactéries. Dans notre cas, il s'agissait de cellules provenant de patients différents, d'un âge différent et de tissus différents. A cela s'ajoute le fait que nous avons réalisé l'analyse sur peu d'échantillons, une cohorte plus représentative nous aurait probablement apporté de plus amples informations et une meilleure répétabilité. Les triplicats n'étant pas suffisamment proches, nous avons choisis de ne pas aller plus loin dans l'exploitation des résultats. Bien que ces méthodes soient intéressantes, les probabilités d'identifier des protéines d'expression différentielles semblent plus élevées en partant de spots visuellement identifiables, qu'en travaillant sur des échantillons protéiques complexes. Il faudrait fractionner l'extrait protéique en amont de l'analyse pour faciliter par la suite le traitement des données.

## Annexe 3

### Résultats d'électrophorèse bidimensionnelle

L'annexe 3 résume l'intégralité des résultats obtenus en gel 2D pour les différents groupes analysés, soit 6 comparaisons. Lors de l'analyse, l'intensité d'un spot proportionnelle à sa quantité protéique, est représentée par une barre. Chaque barre correspond à un gel du groupe de réplicats, apparaissant dans l'ordre où ils ont été intégrés à l'analyse (lecture de gauche à droite sur les histogrammes). Le nombre figurant en haut à droite correspond à l'intensité de la plus grande barre du graphique, la taille des autres barres est proportionnelle à cette dernière. Seul un représentant de chaque groupe de réplicats est utilisé pour illustrer les résultats. PDQuest™ Basic ne permet pas d'accumuler plusieurs histogrammes sur les images, mais uniquement un par gel. Les autres spots semblant pertinents sont donc annotés manuellement soit avec leur numéro SSP correspondant, si la détection est réalisée automatiquement ou par un symbole (? ou !), si le spot ne s'aligne pas avec le Master Gel, et est dans ce cas déterminé visuellement. Ceux sélectionnés pour l'analyse approfondie en 2D sont soulignés.

#### 1- CSM vs fibroblastes

→ Master Gel = strip07533\_F4

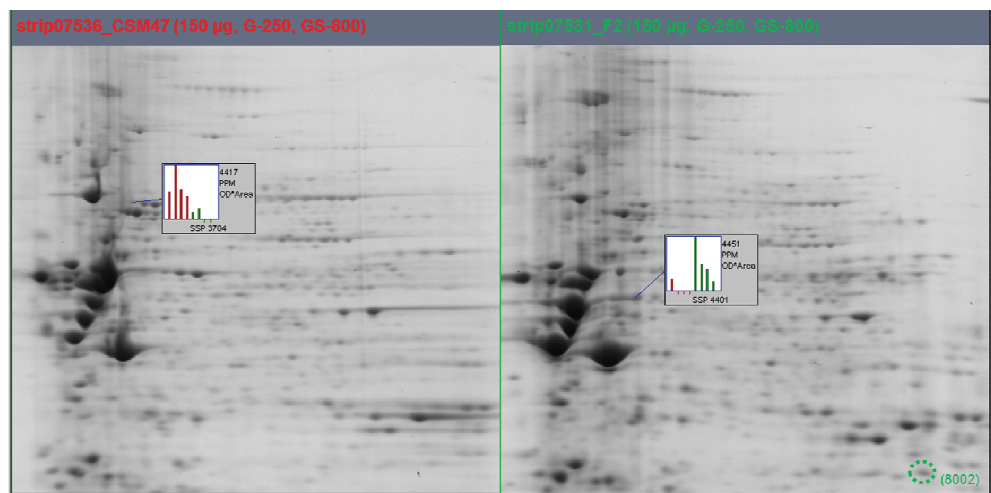
Experiment Summary Report - EXP00078 2015-10-28\_CSMvsFIBRO

| Gel Name                                      | Replicate Group | Spots | Matched | Match Rate 1 | Match Rate 2 | Corr Coeff |
|---|-----------------|-------|---------|--------------|--------------|------------|
| strip07536_CSM47_2D 2015-07-09 13hr 50min v2  | CSM group       | 412   | 255     | 61%          | 84%          | 0.765      |
| strip07537_CSM48_2D 2015-07-09 13hr 50min v2  | CSM group       | 331   | 232     | 70%          | 78%          | 0.755      |
| strip07538_CSM49_2D 2015-07-09 13hr 50min v2  | CSM group       | 266   | 222     | 77%          | 73%          | 0.719      |
| *strip07539_CSM50_2D 2015-07-08 13hr 50min v2 | CSM group       | 359   | 243     | 67%          | 80%          | 1.000      |
| strip07531_F2_2D 2015-07-10 15hr 31min v2     | FIBRO group     | 501   | 260     | 51%          | 85%          | 0.750      |
| strip07532_F3_2D 2015-07-10 15hr 31min v2     | FIBRO group     | 374   | 240     | 64%          | 79%          | 0.791      |
| *strip07533_F4_2D 2015-07-10 15hr 31min v2    | FIBRO group     | 284   | 284     | 100%         | 93%          | 1.000      |
| strip07535_F5_2D 2015-07-10 15hr 31min v2     | FIBRO group     | 306   | 215     | 70%          | 70%          | 0.781      |

Master Gel (automatically select Master Gel)

Analysis Set Report

| Analysis Set                                   | Type   | Count | Created             | Method            |
|--|--------|-------|---------------------|-------------------|
| Intersection of all auto sets on FIBRO not CSM | Boolin | 25    | 2015-10-28/11:28:54 | Intersection      |
| Quant_CSM group vs FIBRO group                 | Quant  | 1     | 2015-10-28/16:49:46 | On In B           |
| Quant_2fold in FIBRO                           | Quant  | 60    | 2015-10-28/11:28:54 | Outside limits    |
| Quant_4 fold in FIBRO                          | Quant  | 22    | 2015-10-28/16:54:16 | Above upper limit |
| T-Test CSM group vs FIBRO group                | Stat   | 5     | 2015-10-28/17:01:04 | Above upper limit |
|  |        | 63    | 2015-10-28/11:28:54 | Students t-test   |



Spots pertinents:

→ Quant\_2fold in « F »: SSP 4401, SSP 8002

→ Intersection of all auto sets: SSP 3704 (= « Quant CSM vs FIBRO » + « T-test CSM vs FIBRO »)



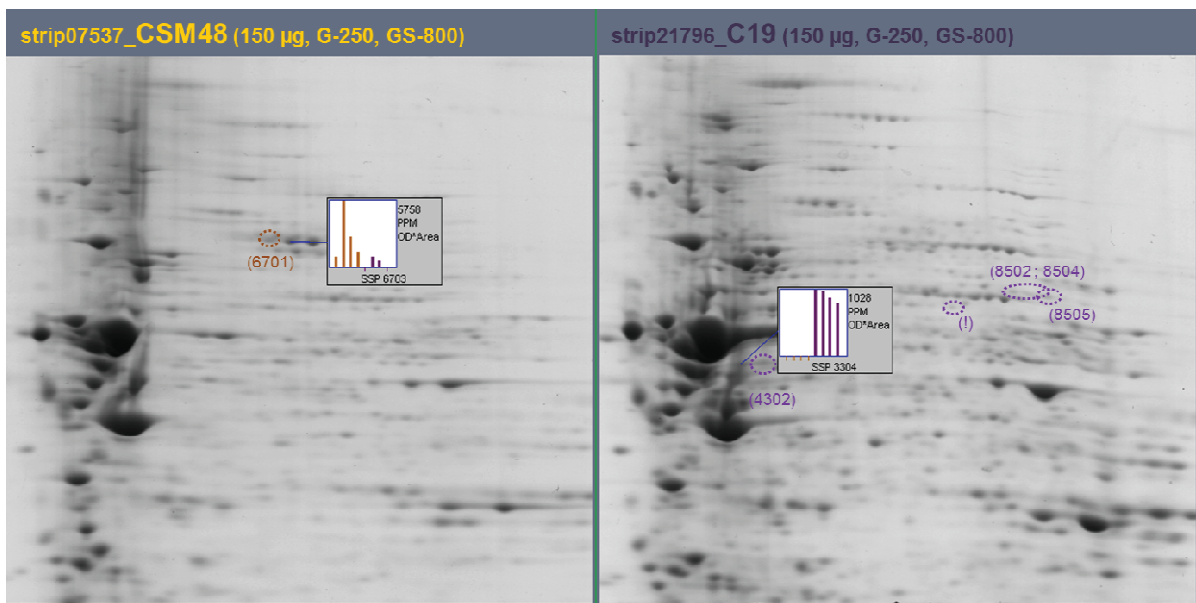
## 2- CSM vs chondrocytes

> Master Gel = strip07519\_C16

| Experiment Summary Report - EXP00074 2015-10-22_CSMvsCHONDRO |                 |       |         |              |              |            |  |
|--|-----------------|-------|---------|--------------|--------------|------------|--|
| Gel Name   | Replicate Group | Spots | Matched | Match Rate 1 | Match Rate 2 | Corr Coeff |  |
| strip07536_CSM47_2D 2015-07-09 13hr 50min v2                 | CSM group       | 439   | 274     | 62%          | 84%          | 0.781      |  |
| strip07537_CSM48_2D 2015-07-09 13hr 50min v2                 | CSM group       | 344   | 239     | 69%          | 73%          | 0.625      |  |
| strip07538_CSM49_2D 2015-07-09 13hr 50min v2                 | CSM group       | 295   | 216     | 73%          | 66%          | 0.675      |  |
| *strip07539_CSM50_2D 2015-07-09 13hr 50min v2                | CSM group       | 357   | 252     | 70%          | 77%          | 1.000      |  |
| 2D 2015-08-27 17hr 06min in_C19P2 v2                         | CHONDRO group   | 484   | 273     | 56%          | 84%          | 0.672      |  |
| *strip07519_C16P2_2D 2015-07-16 13hr 54min v2                | CHONDRO group   | 308   | 308     | 100%         | 95%          | 1.000      |  |
| strip07520_C17P2_2D 2015-07-16 13hr 54min v2                 | CHONDRO group   | 410   | 258     | 62%          | 79%          | 0.631      |  |
| strip07521_C18P2_2D 2015-07-16 13hr 54min v2                 | CHONDRO group   | 428   | 254     | 61%          | 81%          | 0.684      |  |

Master Gel (automatically select Master Gel)

| Analysis Set Report                              |       |       |                     |                   |
|--|-------|-------|---------------------|-------------------|
| Analysis Set                                     | Type  | Count | Created             | Method            |
| Intersection of all auto sets on CHONDRO not CSM | Quant | 16    | 2015-10-22/17:02:34 | Intersection      |
| Quant CSM group vs CHONDRO group                 | Quant | 62    | 2015-10-22/17:02:34 | Outside limits    |
| Quant_2 fold in CHONDRO                          | Quant | 31    | 2015-10-26/11:13:21 | Above upper limit |
| Quant_1 fold in CHONDRO                          | Quant | 6     | 2015-10-26/11:13:21 | Above upper limit |
| T-Test CSM group vs CHONDRO group                | Stat  | 44    | 2015-10-22/17:02:34 | Student's t-test  |



### Spots pertinents:

- Détecté dans le groupe « C » uniquement: **SSP 3304 (+ 4302)** (intensité très faible pour CSM47) ; **SSP 8505, 8504, 8502**
- (!): spot observé visuellement uniquement pour le modèle « C »
- Intersection of all auto sets: **SSP 6701 ; SSP 6703**

### 3- CSM vs fibrochondrocytes

→ Master Gel = strip21797\_M17

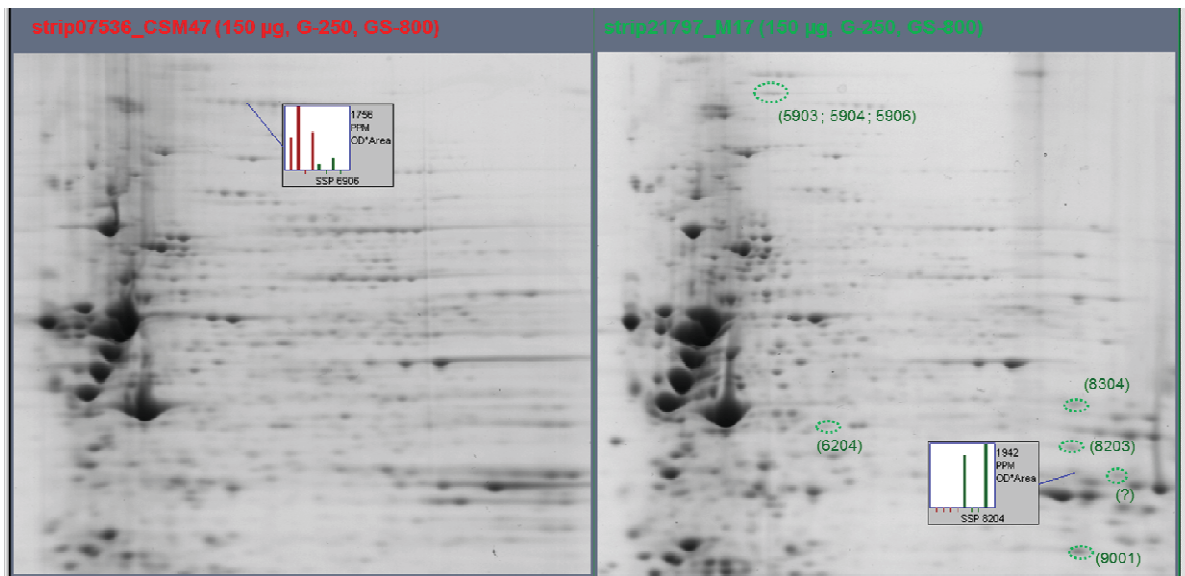
Experiment Summary Report - EXP00077 2015-10-26\_CSM vs FIBROCHONDRO

| Gel Name                                     | Replicate Group | Spots | Matched | Match Rate 1 | Match Rate 2 | Corr Coef |
|--|-----------------|-------|---------|--------------|--------------|-----------|
| strip07536_CSM47_2D 2015-07-09 13hr 50min v2 | CSM group       | 442   | 319     | 72%          | 74%          | 0.805     |
| strip07537_CSM48_2D 2015-07-09 13hr 50min v2 | CSM group       | 358   | 257     | 72%          | 59%          | 0.716     |
| strip07538_CSM49_2D 2015-07-09 13hr 50min v2 | CSM group       | 282   | 245     | 86%          | 56%          | 0.744     |
| strip07539_CSM50_2D 2015-07-09 13hr 50min v2 | CSM group       | 359   | 288     | 74%          | 92%          | 1.000     |
| strip07523_M12P2_2D 2015-07-07 4hr 33min v2  | fibroC group    | 416   | 416     | 100%         | 96%          | 1.000     |
| strip07524_M10P2_2D 2015-07-07 4hr 33min v2  | fibroC group    | 299   | 232     | 77%          | 53%          | 0.676     |
| strip07524_M10P2_2D 2015-07-07 4hr 33min v2  | fibroC group    | 422   | 279     | 66%          | 54%          | 0.620     |
| strip07526_M16P2_2D 2015-07-07 4hr 33min v2  | fibroC group    | 482   | 323     | 69%          | 74%          | 0.730     |

Master Gel (automatically select Master Gel)

Analysis Set Report

| Analysis Set                     | Type  | Count | Created             | Method            |
|----------------------------------|-------|-------|---------------------|-------------------|
| Intersection of all auto sets    | Booln | 21    | 2015-11-06/15:15:11 | Intersection      |
| on fibroC not CSM                | Quali | 2     | 2015-11-06/15:12:50 | On In B           |
| Quant_CSM group vs fibroC group  | Quant | 88    | 2015-11-06/15:13:36 | Outside limits    |
| Quant_2fold in fibroC            | Quant | 42    | 2015-11-06/15:15:45 | Above upper limit |
| Quant_4fold in fibroC            | Quant | 9     | 2015-11-06/15:16:19 | Above upper limit |
| T-test CSM group vs fibroC group | Statl | 41    | 2015-11-06/15:14:09 | Student's t-test  |



#### Spots pertinents:

- Détecté dans le groupe « M » uniquement: **SSP 8204** (faible intensité pour M16 et M17) ; **SSP 5903, 5904, 5906** (visuellement on détecte une faible intensité pour les CSM avec une mauvaise définition des spots)
- **(?)**: ce spot serait absent des modèles « CSM » et « F », mais retrouvé pour les modèles « C » (cf. C18) et « M » (cf. M16, M17)]
- Quant\_2fold in « M »: **SSP 8203 ; SSP 8304 ; SSP 9001 ; SSP 6204**
- Intersection of all auto sets: **SSP 6906 ; SSP 6204**

## 4- fibroblastes vs chondrocytes

> Master Gel = strip07519\_C16

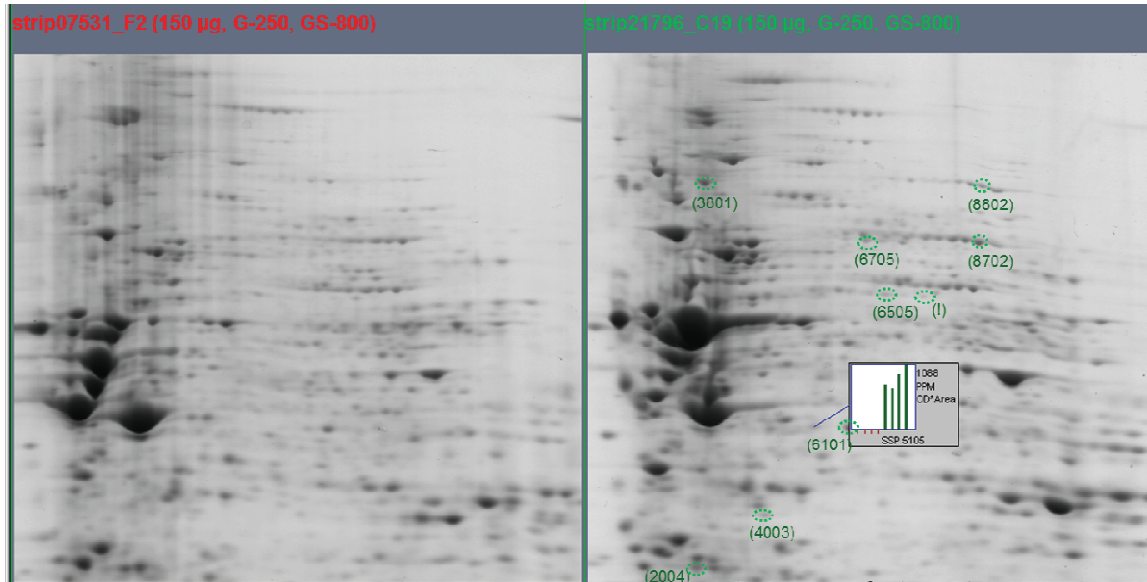
Experiment Summary Report - EXP00078 2015-11-02\_FIBROvsCHONDRO

| Gel Name                                     | Replicate Group | Spots | Matched | Match Rate 1 | Match Rate 2 | Corr Coef |
|--|-----------------|-------|---------|--------------|--------------|-----------|
| strip07531_F2_2D 2015-07-10 15hr 31min v2    | fibro group     | 507   | 263     | 51%          | 84%          | 0.748     |
| strip07532_F3_2D 2015-07-10 15hr 31min v2    | fibro group     | 372   | 235     | 63%          | 75%          | 0.773     |
| strip07533_F4_2D 2015-07-10 15hr 31min v2    | fibro group     | 287   | 212     | 73%          | 68%          | 1.000     |
| strip07535_F5_2D 2015-07-10 15hr 31min v2    | fibro group     | 317   | 221     | 69%          | 71%          | 0.800     |
| 2D 2015-08-27 17hr 08min_C19P2 v2            | chondro group   | 501   | 276     | 55%          | 89%          | 0.736     |
| strip07519_C16P2_2D 2015-07-16 13hr 54min v2 | chondro group   | 306   | 306     | 100%         | 98%          | 1.000     |
| strip07520_C17P2_2D 2015-07-16 13hr 54min v2 | chondro group   | 400   | 233     | 63%          | 81%          | 0.784     |
| strip07521_C18P2_2D 2015-07-16 13hr 54min v2 | chondro group   | 400   | 261     | 65%          | 84%          | 0.753     |

Master Gel (automatically select Master Gel)

Analysis Set Report

| Analysis Set                                       | Type  | Count | Created             | Method            |
|--|-------|-------|---------------------|-------------------|
| Intersection of all auto sets on chondro not fibro | Booln | 26    | 2015-11-02/11:19:36 | Intersection      |
| Quant fibro group vs chondro group                 | Quant | 69    | 2015-11-02/11:19:36 | Outside limits    |
| Quant_2 fold in chondro                            | Quant | 3     | 2015-11-02/16:06:22 | Above upper limit |
| Quant_2 fold in fibro                              | Quant | 38    | 2015-11-02/16:10:25 | Above upper limit |
| Quant_4 fold in chondro                            | Quant | 2     | 2015-11-02/16:12:42 | Above upper limit |
| Quant_4 fold in fibro                              | Quant | 7     | 2015-11-02/16:14:09 | Above upper limit |
| T-Test fibro group vs chondro group                | Stat  | 59    | 2015-11-02/11:19:36 | Student's t-test  |



### Spots pertinents:

- Détectés dans « C » mais pas dans « F »: **SSP 5105** ; **SSP 6308** (sous l'histogramme) ; **SSP 6505** ; (1): ce spot est observé uniquement dans le modèle « C ».
- Quant\_2fold in « C »: **SSP 2004** ; **SSP 3801** ; **SSP 4003** ; **SSP 6101** ; **SSP 6705** ; **SSP 8702** ; **SSP 8802**
- Intersection of all auto sets: **SSP 3801** ; **SSP 4003** ; **SSP 6101** ; **SSP 6705** ; **SSP 8702** ; **SSP 8802**

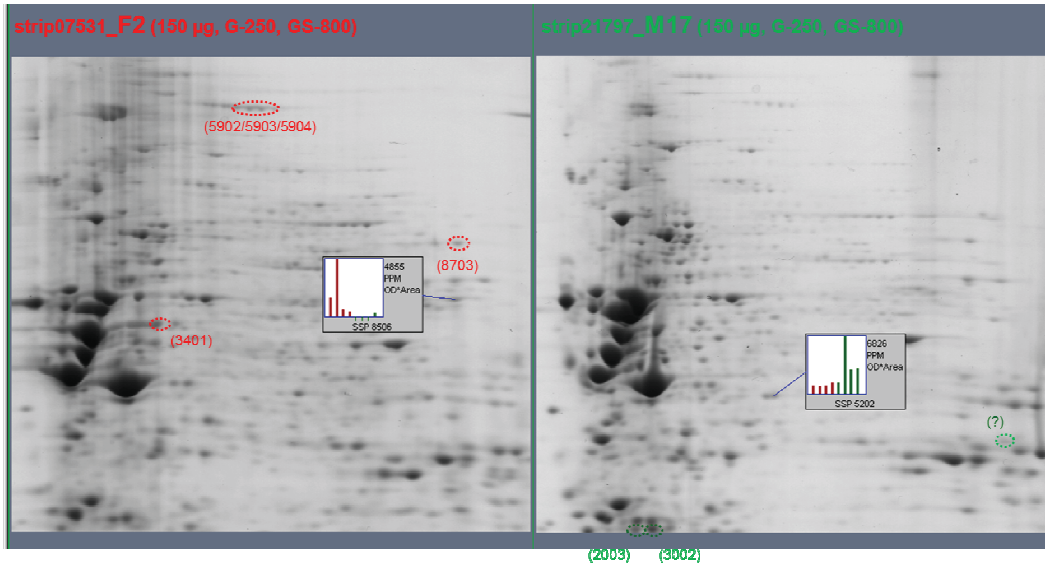
## 5- fibroblastes vs fibrochondrocytes

→ Master Gel = strip07533\_F4

| Experiment Summary Report - EXP000612015-11-03_FIBROvsFIBROCHONDRO |                 |       |         |              |              |            |
|--|-----------------|-------|---------|--------------|--------------|------------|
| Gel Name   | Replicate Group | Spots | Matched | Match Rate 1 | Match Rate 2 | Corr Coeff |
| strip07531_F2_2D 2015-07-10 15hr 31min v2                          | fibro group     | 508   | 264     | 51%          | 83%          | 0.761      |
| strip07532_F3_2D 2015-07-10 15hr 31min v2                          | fibro group     | 369   | 244     | 62%          | 79%          | 0.802      |
| strip07533_F4_2D 2015-07-10 15hr 31min v2                          | fibro group     | 297   | 297     | 100%         | 96%          | 1.000      |
| strip07535_F5_2D 2015-07-10 15hr 31min v2                          | fibro group     | 332   | 229     | 68%          | 74%          | 0.742      |
| strip07526_M16P2_2D 2015-07-17 14hr 33min v2                       | fibroC group    | 447   | 206     | 46%          | 65%          | 1.000      |
| strip07523_M12P2_2D 2015-07-17 14hr 33min v2                       | fibroC group    | 322   | 184     | 57%          | 58%          | 0.564      |
| strip07524_M10P2_2D 2015-07-17 14hr 33min v2                       | fibroC group    | 438   | 248     | 56%          | 78%          | 0.545      |
| strip07526_M16P2_2D 2015-07-17 14hr 33min v2                       | fibroC group    | 484   | 248     | 53%          | 80%          | 0.702      |

Master Gel (automatically select Master Gel)

| Analysis Set Report             |       |       |                     |                   |
|---------------------------------|-------|-------|---------------------|-------------------|
| Analysis Set                    | Type  | Count | Created             | Method            |
| Intersection of all auto sets   | Booln | 16    | 2015-11-03/10:43:17 | Intersection      |
| on fibro not fibroC             | Quali | 6     | 2015-11-03/14:45:03 | On In A           |
| Quant fibro grou vs fibroC gro  | Quant | 49    | 2015-11-03/10:43:17 | Outside limits    |
| Quant_2 fold in fibroC          | Quant | 23    | 2015-11-03/14:58:02 | Above upper limit |
| Quant_4 fold in fibroC          | Quant | 5     | 2015-11-03/14:58:48 | Above upper limit |
| Quant_2 fold in fibro           | Quant | 26    | 2015-11-03/14:59:43 | Above upper limit |
| Quant_4 fold in fibro           | Quant | 6     | 2015-11-03/15:00:16 | Above upper limit |
| T-Test fibro grou vs fibroC gro | Statl | 39    | 2015-11-03/10:43:17 | Student's t-test  |



### Spots pertinents:

- Détectés dans « M » mais pas dans « F »: (?): ce spot serait absent des modèles « CSM » et « F », mais présent pour les modèles « C » (cf. C18) et « M » (cf. M16, M17)]
- Quant\_2fold in « M »: **SSP 2003 + 3002 ; SSP 5202**
- Quant\_4fold in « F »: **SSP 8506 / Quant\_2fold in « F »: SSP 3401 ; SSP 8703 ; (+ 5902/5903/5904)**
- Intersection of all auto sets: **SSP 3401 ; SSP 5202 ; (+ 5902/5903/5904)**

## 6- chondrocytes vs fibrochondrocytes

> Master Gel = strip07519\_C16

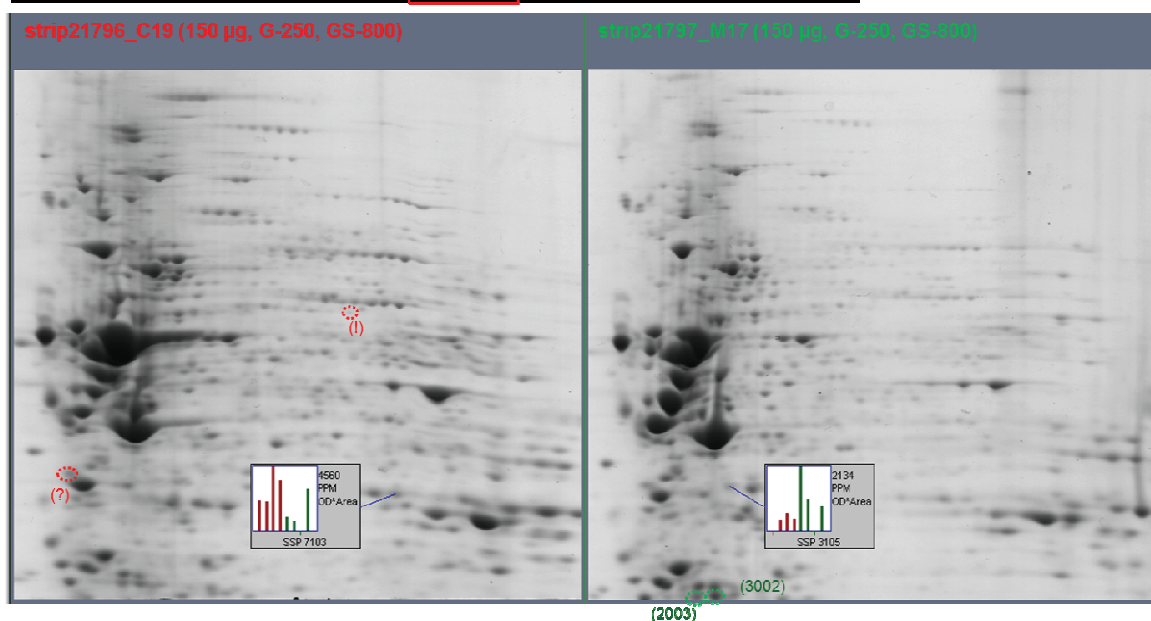
### Experiment Summary Report - EXP00082 2015-11-04\_CHONDROvsFIBROCHONDRO

| Gel Name                                      | Replicate Group | Spots | Matched | Match Rate 1 | Match Rate 2 | Corr Coeff |
|---|-----------------|-------|---------|--------------|--------------|------------|
| 2D 2015-08-27 17hr 08min_C18P2 v2             | chondro group   | 542   | 329     | 60%          | 84%          | 0.747      |
| *strip07519_C16P2_2D 2015-07-16 13hr 54min v2 | chondro group   | 376   | 376     | 100%         | 96%          | 1.000      |
| strip07520_C17P2_2D 2015-07-16 13hr 54min v2  | chondro group   | 457   | 308     | 67%          | 78%          | 0.744      |
| strip07521_C18P2_2D 2015-07-16 13hr 54min v2  | chondro group   | 468   | 313     | 67%          | 81%          | 0.757      |
| *2D 2015-08-27 17hr 08min_M17P2 v2            | fibroC group    | 484   | 282     | 54%          | 67%          | 1.000      |
| strip07523_M12P2_2D 2015-07-17 14hr 33min v2  | fibroC group    | 371   | 252     | 67%          | 64%          | 0.888      |
| strip07524_M10P2_2D 2015-07-17 14hr 33min v2  | fibroC group    | 479   | 285     | 59%          | 73%          | 0.888      |
| strip07526_M16P2_2D 2015-07-17 14hr 33min v2  | fibroC group    | 519   | 298     | 57%          | 76%          | 0.881      |

. Master Gel (automatically select Master Gel)

### Analysis Set Report

| Analysis Set                   | Type  | Count | Created             | Method            |
|--------------------------------|-------|-------|---------------------|-------------------|
| Intersection of all auto sets  | Booln | 12    | 2015-11-04/ 0:14:01 | Intersection      |
| on chondro not fibroC          | Quali | 4     | 2015-11-04/ 7:55:18 | On in A           |
| Quant chondro grvs fibroC gro  | Quant | 52    | 2015-11-04/ 0:14:01 | Outside limits    |
| Quant_4 fold in fibroC         | Quant | 4     | 2015-11-05/ 4:50:41 | Above upper limit |
| Quant_2 fold in fibroC         | Quant | 25    | 2015-11-05/ 5:14:34 | Above upper limit |
| Quant_2 fold in chondro        | Quant | 27    | 2015-11-05/ 5:14:56 | Above upper limit |
| Quant_4 fold in chondro        | Quant | 8     | 2015-11-05/ 5:15:30 | Above upper limit |
| T-Test chondro grvs fibroC gro | Stat  | 44    | 2015-11-04/ 0:14:01 | Student's t-test  |



### Spots pertinents:

- Détectés dans « C » mais pas dans « M »: (!) (spot observé que pour le modèle « C » par comparaison avec les autres modèles)
- Quant\_2fold in « M »: **SSP 3002 (+ 2003)** ; **SSP 3105**
- Quant\_2fold in « C »: **SSP 7103** ; (?) : même intensité pour M17 mais intensité moindre et mal définie pour M12, M10 et M16
- Intersection of all auto sets: **SSP 7103**



# **Evaluation de la contribution d'une hémoglobine marine dans la culture cellulaire et dans la cellularisation de substituts osseux et méniscaux par des cellules souches mésenchymateuses**

Fiona LE PAPE

## **Résumé**

Ce travail de thèse avait pour objectif le développement de systèmes de culture cellulaire, en 2D et en 3D, en mettant à profit les propriétés d'un transporteur d'oxygène marin, HEMOXCell®. Notre approche générale était articulée selon deux grands axes : un premier concernant l'évaluation de l'utilisation d'HEMOXCell® dans la culture de deux modèles cellulaires, et un second, utilisant les résultats obtenus à des fins d'ingénierie tissulaire. Dans le premier axe, l'évaluation de l'effet dose-réponse d'HEMOXCell® dans la culture des cellules CHO-S et des cellules souches mésenchymateuses (CSM), a permis de déterminer des concentrations de travail optimales, favorisant la viabilité et la prolifération cellulaire. Le modèle cellulaire CHO-S a contribué à la mise en place d'un test de performance de la molécule, et encouragé son utilisation dans des systèmes de bioproduction. Les essais menés sur les CSM ont quant à eux permis de valider l'innocuité de la molécule à de faibles doses et le maintien de l'état « souche ». L'idée d'associer les CSM à des supports poreux est prometteuse pour des applications d'ingénierie tissulaire, mais est soumise aux problèmes liés à l'oxygénation en profondeur des supports. Dans le second axe de ce projet, nous avons œuvré à améliorer la colonisation de substituts osseux et méniscaux, en culture statique et dynamique, en présence d'HEMOXCell®. Parallèlement, une étude a été menée pour tenter de caractériser les cellules méniscales. Les analyses de la colonisation des biomatériaux suggèrent un effet bénéfique d'HEMOXCell® lorsqu'il est utilisé en complément des milieux de différenciation cellulaire. Ce travail a contribué à améliorer la compréhension de ce transporteur d'oxygène et à l'élargissement de ses potentiels champs d'utilisation notamment dans un cadre thérapeutique.

**Mots clés** : culture cellulaire, transporteur d'oxygène, ingénierie tissulaire, cellules souches mésenchymateuses, prolifération cellulaire

## **Evaluation of the contribution of marine hemoglobin in cell culture and in the cellularization of bone and meniscal substitutes by mesenchymal stem cells**

### **Summary**

This work aimed to develop cell culture systems, in 2D and 3D, based on the properties of HEMOXCell®, a marine oxygen carrier. Our approach was articulated in two main parts: the first one dealing with the assessment of the use of HEMOXCell® in the culture of two cellular models, and the second one, exploiting the results obtained for tissue engineering purposes. In this first axis, the dose-response effect of HEMOXCell® in the CHO-S cells and mesenchymal stem cells (MSC) in vitro culture, allowed the identification of optimal working concentrations, which can promote cell viability and proliferation. The CHO-S model has contributed to the establishment of a performance test of the molecule, and encouraged its use for bioproduction stimulation. The tests performed on MSCs were used to validate the harmlessness of the molecule at low doses and the maintenance of "stemness". The idea to associate MSCs with porous scaffolds is a promising approach for tissue engineering applications, but it is confronted to the lack of oxygen in the depth of the substitutes. In the second part of this project, we worked at improving the cellularization of bone and meniscal substitutes, under static and dynamic culture systems, w/ and w/o HEMOXCell®. In parallel, a study was conducted to attempt to characterize the meniscal cells. Analyses of cellularized biomaterials suggest a beneficial effect of HEMOXCell® when used as a differentiation media supplement. This work contributed to improve this oxygen carrier understanding and to extend the field of its potential uses particularly for therapeutic applications.

**Keywords** : cell culture, oxygen carrier, tissue engineering, mesenchymal stem cells, cell proliferation.