



HAL
open science

Optimisation de microporteurs pour l'amplification de cellules souches mésenchymateuses et étude des propriétés ostéogéniques de nouveaux biomatériaux bactéricides

Tristan Le Clainche

► **To cite this version:**

Tristan Le Clainche. Optimisation de microporteurs pour l'amplification de cellules souches mésenchymateuses et étude des propriétés ostéogéniques de nouveaux biomatériaux bactéricides. Biotechnologies. Université Grenoble Alpes [2020-..], 2020. Français. NNT : 2020GRALV008 . tel-03123322

HAL Id: tel-03123322

<https://theses.hal.science/tel-03123322>

Submitted on 27 Jan 2021

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.

THÈSE

Pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE GRENOBLE ALPES

Spécialité : **BIOTECHNOLOGIE**

Arrêté ministériel : 25 mai 2016

Présentée par

Tristan LE CLAINCHE

Thèse dirigée par **Jean-Luc COLL** et codirigée par **Véronique FRACHET**, École
Pratique des Hautes Études

préparée au sein du **Laboratoire CRI IAB - Centre de Recherche Epigenetics,
Chronic Diseases, Cancer - Institute for Advanced Biosciences** dans l'**École
Doctorale Chimie et Sciences du Vivant**

**Optimisation de microporteurs pour l'amplification de cellules
souches mésenchymateuses et étude des propriétés
ostéogéniques de nouveaux biomatériaux bactéricides**

**Optimisation of microcarriers for mesenchymal stem cells
amplification and study of osteogenic properties of new
bactericidal biomaterials**

Thèse soutenue publiquement le **17 Septembre 2020**,

devant le jury composé de :

Monsieur Jean-Luc COLL

DIRECTEUR DE RECHERCHE, INSERM DELEGATION ALPES, Directeur de thèse

Madame Véronique MARTEL-FRACHET

MAITRE DE CONFERENCES HDR, UNIVERSITE GRENOBLE ALPES,

Co-directrice de thèse

Madame SOPHIE PARK

PROFESSEUR DES UNIV – PRATICIEN HOSP., CHU GRENOBLE ALPES, Présidente

Monsieur EMMANUEL BELAMIE

DIRECTEUR D'ETUDES, ECOLE PRATIQUE DES HAUTES ETUDES – PARIS,
Examineur

Madame JOELLE AMEEDÉ

DIRECTRICE DE RECHERCHE, INSERM BORDEAUX, Rapportrice

Madame DANIELE NOEL

DIRECTRICE DE RECHERCHE, INSERM DELEGATION LANGUEDOC-
ROUSSILLON, Rapportrice



Remerciements

Je voudrais remercier toutes les personnes qui ont contribué directement ou indirectement aux étapes qui m'ont permis d'arriver jusqu'ici, sans vous je ne serais pas là ou j'en suis aujourd'hui.

En premier lieu je voudrais remercier *Véronique Frachet, Jean-Luc Coll* et *Tarek Fathallah*, mes directeurs de thèse. Je vous remercie sincèrement de la confiance que vous m'avez accordée ces dernières années. Je vous remercie de votre soutien permanent, de votre aide et de vos conseils et en même temps de la liberté qui m'a été offerte dans la gestion de ces différents projets. Ça a été un réel plaisir de travailler avec vous au quotidien et j'espère vous avoir rendu un minimum de ce que vous m'avez donné.

Je tiens à remercier chaleureusement *Danièle Noël, Joëlle Amédée, Sophie Park* et *Emmanuel Belamie* d'avoir accepté d'évaluer mon travail. J'espère que vous prendrez autant de plaisir à lire ce manuscrit que j'en ai pris à l'écrire.

Je tiens à remercier *Anaïck Moisan, Denver Linklater* et *Elena Ivanova*, nos collaborateurs, sans qui ces différents projets n'auraient jamais pu être réalisés.

Je souhaite à nouveau remercier du fond du cœur *Véronique* et aussi *Sule* pour vos conseils et votre bonne humeur (et vos délicieux plats !), non pas ces trois mais cinq dernières années. Même si je reste un éternel enfant, on peut dire que vous m'avez bien vu grandir.

Je remercie toutes les personnes des équipes 2 et 5 pour la bonne ambiance, les conseils, l'escalade, les randos, les pauses café, les apéros, les petits dej' et plein d'autres choses. Merci aux compagnons de repas du midi *Véronique, Sule, Amélie, Benjamin, Quentin, Camila*, aux membres du BDE (merci *Maxime* !) *Veronica, Ghadir, Jonathan et Estelle* et aux collègues de la salle de culture *Morgane, Laetitia, Mélanie, Lucie, Mans, Malika, Anne-Sophie, Amélie, Tao, Sylvie, Béatrice* (promis pour mon post-doc je mettrai la musique moins fort !) et à pleins d'autres.

Je tiens à vraiment remercier *Kalina, Alex, Paul, Daphné, Naghmeh, Estelle, Camila, Domenico, Francesco, Mohamed, Keerthi, Arindam* et pleins d'autres pour tous les supers moments qu'on a passé au labo et en dehors. Dans une thèse, l'enrichissement humain et au moins aussi important que l'enrichissement scientifique et vous y avez énormément contribué. *Cheers* !

Je souhaite remercier *Alexandre, Michael, Norbert, Véronique G., Sylvain, Dalenda, Nathalie* et toutes les personnes qui contribuent quotidiennement au bon fonctionnement de l'IAB. Sans vous rien ne serait possible donc merci pour tout votre travail.

Je remercie *Jacques* et *Mylène* pour leurs conseils et (surtout) leur patience m'ayant permis de maîtriser à peu près les microscopes sur lesquels j'ai travaillé, c'était clairement pas gagné !

Je tiens à remercier tous mes anciens collègues du Mc Donald's de Voreppe et notamment *Stéphane* avec qui j'ai partagé les fermetures du samedi soir. Même si l'on s'est un peu perdus de vue ces derniers temps, sache que je suis très heureux des différents moments que l'on a passé ensemble et que la phrase de Mandela « Je ne perds jamais, soit je gagne, soit j'apprends » ne m'a jamais quittée.

Je tiens à remercier du fond du cœur *Hervé, Michel* et plus récemment *Serge* pour m'avoir transmis leur amour pour la musique, élément très important de ma vie et qui m'a accompagné chaque jour de cette thèse. Je remercie aussi tous les potes des orchestres, ça serait trop long de tous vous citer mais sachez que je vous remercie infiniment.

Je remercie du fond du cœur mon *Caillou, Fab(s), Damien, Totti, Chloé, Margaux, Aurore, Marie, Thomas, Mehdi, Maxime, Zeek, Pauline, Amina, Adeline, Aymeric, Karina, Anna, Simon, Thibault*,

Stouf, Yoann, Clémentine, Cindy, Pierre, Nico(s)... Merci à vous tous d'être là depuis tant d'années, merci pour les cuites, les festivals, les nouvel ans, les moments inoubliables et à venir (apparemment il y a un mariage qui arrive...), merci aussi pour votre soutien dans les moments plus difficiles comme on en a tous.

Soyez heureux et prenez soin de vous et de tous ceux qui vous entourent.

Enfin, je souhaite vous remercier de tout mon être, ma famille. Merci à ma mère, ma tante et ma grand-mère, merci à ma sœur *Cynthia* et à sa chérie *Lulu*, merci à mon frangin *Quentin*, sa chérie *Mimi* et à leur magnifique fille *Agathe*. Les mots me manquent pour vous dire à quel point je vous remercie pour tout ce que vous avez fait pour moi, et ce que vous avez fait de moi, par votre éducation et votre amour. Merci simplement d'être là jour après jour. Je suis arrivé jusqu'ici grâce à vous et je n'irai nulle part sans vous. Je vous aime.

À vous qui n'êtes plus là mais qui ne m'avez jamais quitté et ne me quitterez jamais.

Table des matières

Synthèse bibliographique.....	8
1. La thérapie cellulaire.....	8
1.1. Introduction.....	8
1.2. Les types de cellules souches utilisées en thérapie cellulaire.	11
1.2.1. Les cellules souches embryonnaires (ES).....	11
1.2.2. Les cellules souches pluripotentes induites (iPS).....	14
1.2.3. Les cellules souches hématopoïétiques (CSH).....	17
1.2.4. Les cellules souches mésenchymateuses (CSM).....	21
2. La culture cellulaire à grande échelle.....	26
2.1. Aspects généraux.....	26
2.2. Les bioréacteurs.....	27
2.2.1. Introduction.....	27
2.2.2. Les procédés de culture en bioréacteur.....	29
2.2.3. Les bioréacteurs à usage unique.....	30
2.3. Le cas des cellules adhérentes : amplification sur microporteurs.....	31
3. L'amplification des CSM à grande échelle.....	36
3.1. Introduction.....	36
3.2. Adaptation des procédés de culture pour l'amplification des CSM.....	36
3.2.1. Développement de nouveaux milieux de culture.....	36
3.2.1.1. Criblage de nouveaux milieux de culture.....	37
3.2.1.2. Test de nouveaux suppléments en remplacement du SVF.....	37
3.2.2. Les microporteurs utilisés pour l'amplification des CSM.....	39
3.2.2.1. Fonctionnalisation des microporteurs.....	40
3.2.2.2. Propriétés mécaniques des supports.....	41
3.2.2.3. Tissus décellularisés.....	44
3.2.3. Adaptation des paramètres du bioréacteur.....	46
3.2.3.1. Adaptation de l'agitation et stress mécanique.....	46
3.2.3.2. Régulation de l'oxygénation.....	47
3.2.4. La récupération des cellules.....	47
3.2.4.1. Utilisation d'enzymes de dissociation.....	48
3.2.4.2. Développement de microporteurs facilitant la récupération des CSM.....	48
3.2.4.2.1. Microporteurs biodégradables.....	48
3.2.4.2.2. Microporteurs thermosensibles.....	50
4. Vers une thérapie acellulaire : l'utilisation de vésicules extracellulaires.....	51

4.1.	Introduction.....	51
4.1.1.	Description des différents types d'EV et de leur biogénèse.....	51
4.1.2.	Les EV dans la communication cellulaire.....	54
4.1.3.	Isolement et caractérisation des EV.....	54
4.1.4.	Utilisation clinique des EV.....	56
4.2.	Les EV issues de CSM : effets thérapeutiques et intérêts cliniques.....	56
4.2.1.	Le sécrétome des CSM.....	56
4.2.2.	Amélioration de la production d'EV par les CSM.....	58
5.	Les biomatériaux en thérapie cellulaire.....	61
5.1.	Introduction.....	61
5.2.	Les biomatériaux ostéoconducteurs.....	64
5.2.1.	Introduction.....	64
5.2.2.	Association des biomatériaux avec des molécules bioactives.....	66
5.2.3.	Association des biomatériaux avec des métaux ostéogéniques.....	66
5.2.4.	Les biomatériaux de titane en régénération osseuse.....	67
5.3.	Les biomatériaux antibactériens.....	69
5.3.1.	Introduction.....	69
5.3.2.	Association des biomatériaux avec des antibiotiques.....	69
5.3.3.	Association des biomatériaux avec des métaux antibactériens.....	70
5.3.4.	Association des biomatériaux à une combinaison antibiotiques-métaux.....	72
5.3.5.	Association des biomatériaux avec des molécules naturelles.....	72
5.3.6.	Biomatériaux intrinsèquement antibactériens.....	72
	Objectifs du travail de thèse.....	75
	Partie I : Développement de microporteurs innovants pour l'amplification à grande échelle d'ASC..	76
1.	Sélection du milieu de culture et de la fonctionnalisation des microporteurs.....	76
1.1.	Matériel et méthodes.....	76
1.2.	Résultats.....	76
2.	Développement et caractérisation de microporteurs innovants pour l'amplification d'ASC en culture tridimensionnelle dynamique.....	77
2.1.	Article 1.....	77
3.	Discussion et perspectives.....	111
3.1.	Intérêt des microporteurs disques pour l'amplification et la récupération des ASC.....	111
3.2.	Propriétés mécaniques des microporteurs disques développés.....	113
3.3.	Apports de la fonctionnalisation des microporteurs.....	114
3.4.	Vers un procédé de culture libre de tout composant d'origine animale.....	115
3.5.	Limites actuelles.....	117
3.6.	Perspectives.....	118

Partie II : Etude du comportement d'ASC sur des biomatériaux de titane nanostructurés.	120
1. Article 2.	120
2. Discussion et perspectives.	155
2.1. Potentiel des biomatériaux de titane nanostructurés en tant que supports d'amplification d'ASC.	155
2.2. Intérêt des biomatériaux nanostructurés pour la régénération osseuse.	155
Partie III : Impact des conditions de culture d'ASC sur la production de vésicules extracellulaires (EV).	158
1. Matériel et méthodes.	158
2. Résultats.	159
2.1. Visualisation des EV par microscopie électronique.	159
2.2. Caractérisation des EV par NTA.	160
2.3. Evaluation de la présence de Flotilline-1.	161
3. Discussion et perspectives.	162
3.1. Impact des conditions de culture sur la productivité des ASC.	162
3.2. Intérêts et limites de la méthode d'isolement utilisée.	163
3.3. Perspectives.	164
Discussion générale.	165
Conclusion	167
Annexes	168
Liste des figures	174
Liste des tableaux.	177
Liste des abréviations.	178
Bibliographie.	181

Synthèse bibliographique

1. La thérapie cellulaire.

1.1. Introduction.

La thérapie cellulaire (TC) correspond à l'utilisation de cellules en tant que médicament, dans un but thérapeutique. Ces cellules sont généralement utilisées afin de remédier à un manque ou un dysfonctionnement d'un tissu ou d'un organe chez un patient. Historiquement, la transfusion sanguine est la première thérapie cellulaire efficace ayant été réalisée par le docteur James Blundell, en 1818.

Aujourd'hui, la TC fait principalement appel à des cellules primitives ou progénitrices ayant gardé un potentiel de pluripotence : les cellules souches.

Les cellules souches (CS) sont des cellules indifférenciées, dotées à la fois d'une capacité d'auto-renouvellement et de différenciation. Ces capacités permettent leur maintien dans notre organisme tout en assurant le développement et le renouvellement de certains tissus et organes. Cellules rares, les CS sont impliquées dans le développement de tout organisme multicellulaire. Ces cellules sont classées en fonction de leur capacité à donner différents types cellulaires (Tableau 1).

Classification	Capacités des cellules	Exemple
Totipotence	Donnent tous les types cellulaires de l'organisme, sans exception	ovocyte
Pluripotence	Donnent tous les types cellulaires de l'organisme exceptées les annexes embryonnaires	Cellules souches embryonnaires
Multipotence	Donnent tout types cellulaires d'un lignage spécifique	Cellules souches neuronales
Unipotence	Donnent un seul type de cellules	Cellules satellites

Tableau 1 : Classification des différents types de cellules souches et de leurs capacités de différenciation.

Bien que les propriétés des CS aient été utilisées pour la première fois en 1956, avec la réalisation de la première transplantation de moelle osseuse par Edward Donnall Thomas, il fallut attendre le début des années 70 pour que ces cellules soient isolées. De nos jours, plusieurs types de CS sont connus et utilisés en thérapie cellulaire. Sont notamment retrouvées : les cellules souches embryonnaires (ES), les cellules souches mésenchymateuses (CSM), les cellules souches hématopoïétiques (CSH) ou encore les cellules souches pluripotentes induites (iPS). Ces différents types de CS seront décrits plus précisément dans les paragraphes suivants.

Deux mécanismes d'action principaux des CS en thérapie cellulaire ont été décrits, sans pour autant faire consensus. Le premier requiert le greffage de ces cellules au site affecté afin de remplacer les cellules endogènes ayant subi les lésions. Le second consiste plutôt à la stimulation des tissus endogènes par les cellules injectées, grâce à la sécrétion de facteurs trophiques tels que des cytokines et des facteurs de croissance [1].

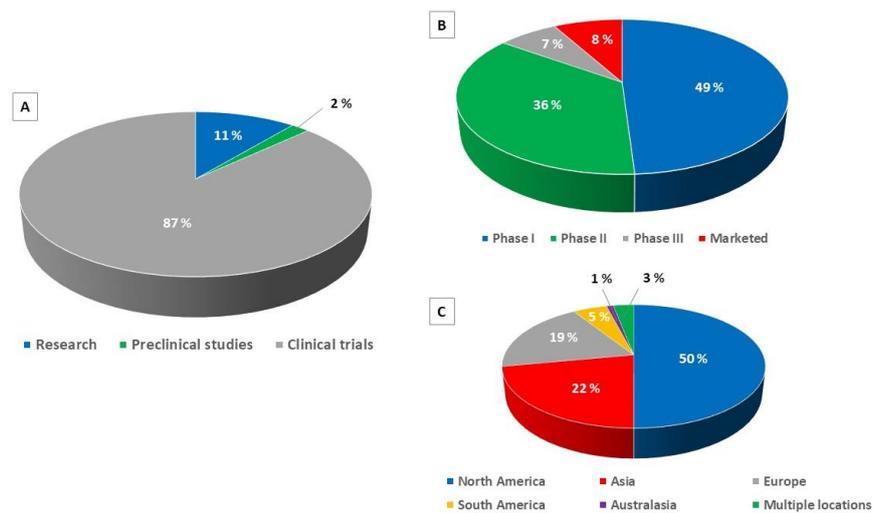
En TC, deux alternatives sont possibles : la thérapie autologue et la thérapie allogénique. La thérapie autologue consiste à traiter le patient avec ses propres CS. En pratique, il s'agit de prélever des cellules chez le patient, puis de les amplifier *in vitro* avant de les réinjecter. Elle limite considérablement les réactions auto-immunes et les risques infectieux. De plus, les cellules sont utilisées directement après leur amplification donc le risque de transformation tumorigénique, plutôt observé lors de culture et/ou de conservation prolongée [2], est aussi diminué. Cependant, ce type de thérapie impose des contraintes logistiques mais aussi pour le patient. Premièrement, la quantité de CS *in situ* étant très limitée, une quantité importante de tissu est susceptible d'être prélevée chez

un patient devant recevoir une thérapie autologue. Dans le cas d'un prélèvement de moelle osseuse, ce procédé est particulièrement douloureux et peut aussi induire des effets secondaires au niveau de ce tissu, notamment inflammatoires. Enfin, le patient doit être hospitalisé deux fois dans un court laps de temps, ce qui peut l'affecter physiquement et émotionnellement. Cela pose aussi des contraintes logistiques pour l'hôpital.

La thérapie allogénique consiste, elle, à traiter un patient avec des cellules provenant d'un ou plusieurs donneurs. En comparaison avec la thérapie autologue, le risque d'effets secondaires est accru. Cependant, cette thérapie allogénique semble être plus adaptée à une future utilisation en routine. En effet, suite à leur prélèvement et amplification, les CS sont conservées dans des banques en attendant d'être utilisées et sont directement disponibles pour le patient. La thérapie allogénique permet donc de traiter des pathologies aiguës ou chroniques alors que la thérapie autologue, qui nécessite un délai entre le prélèvement et la réinjection des cellules, est quant à elle plutôt adaptée aux pathologies chroniques. De plus, la thérapie allogénique permet une standardisation de la production des produits thérapeutiques, et donc une potentielle réduction des coûts associés aux traitements.

De nombreuses études impliquent l'utilisation de CS en TC au niveau mondial (Figure 1).

I)



II)

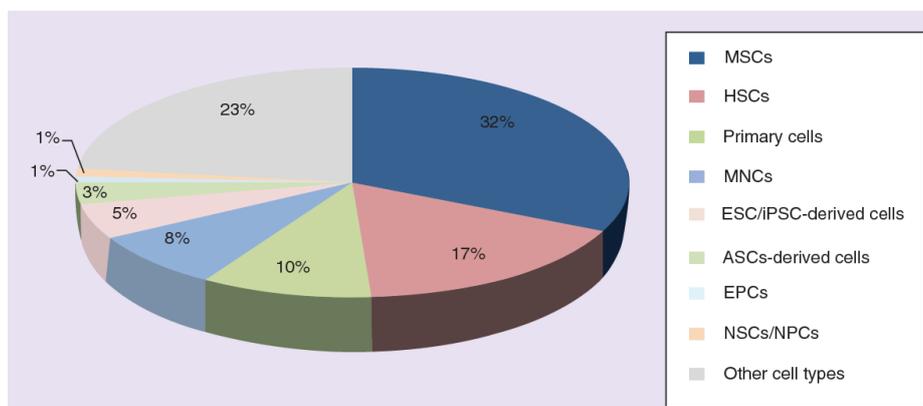


Figure 1 : La thérapie cellulaire. I) Essais de thérapie cellulaire en fonction de leur phase de développement. (A) Répartition selon le type de recherche effectué ; (B) Dans le cas d'études cliniques, répartition selon la phase d'étude et (C) selon le pays. Les études cliniques représentent une part très importante (87%) de la globalité des études réalisées, recherche académique comprise (I-A). Ces études prennent leur origine en industrie pour 44% d'entre elles, contre 56 % dans des organisations à but non lucratif. La plupart des études sont en phase précoce de développement ; les phases I et II représentent à elles seules 85% des essais cliniques (I-B). L'Amérique du nord est le pôle le plus actif dans le domaine des TC (50% des essais cliniques), suivie par l'Asie (22%) et l'Europe (19%) (I-C). II) Les types de cellules utilisées en thérapie cellulaire : MSCs : cellules souches mésenchymateuses ; HSCs : cellules souches hématopoïétiques ; MNCs : cellules mononuclées ; ESC : cellules souches embryonnaires ; iPSC : cellules souches pluripotentes induites ; ASCs : cellules souches mésenchymateuses issues de tissu adipeux ; EPCs : cellules progénitrices endothéliales ; NSCs : cellules souches neurales ; NPCs : cellules progénitrices neurales. Modifié d'après Buzhor et al. [1].

Les CS sont principalement étudiées en Amérique du nord. En effet, 585 essais cliniques impliquant les CS étaient en cours en Amérique du nord en 2017, contre 195 et 227 pour la totalité de l'Europe et de l'Asie respectivement [3].

Près de la moitié des études concernent l'utilisation de CSM, qu'elles proviennent de la moelle osseuse ou du tissu adipeux. Cela est probablement dû aux nombreuses propriétés de ces cellules, qui seront décrites dans le paragraphe 1.2.4. Enfin, 54% des études utilisent des cellules de source autologue, contre 46% des cellules de source allogénique.

Les CS ont été étudiées dans le traitement de très nombreux types de pathologies (Figure 2).

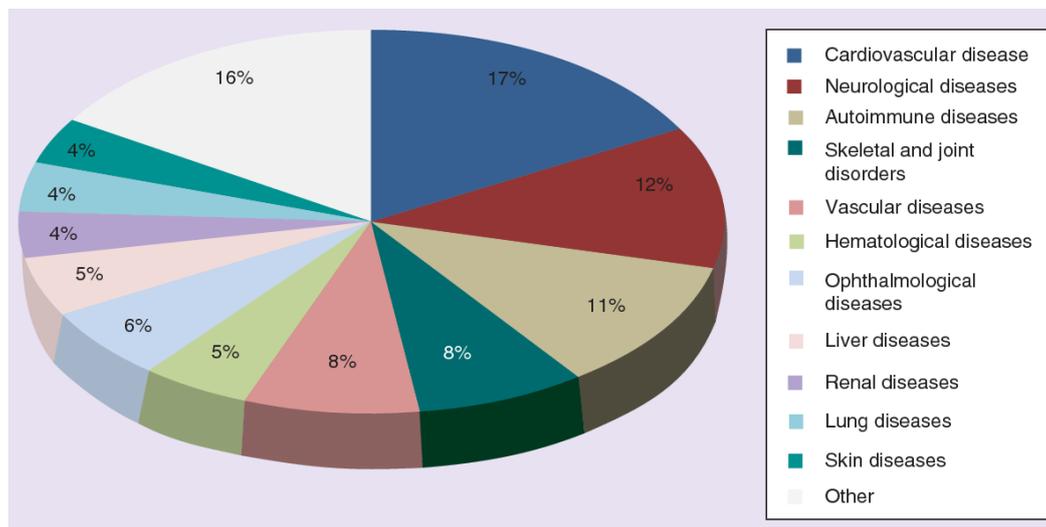


Figure 2 : Les pathologies traitées par thérapie cellulaire. Les maladies cardiovasculaires sont les plus étudiées en thérapie cellulaire, suivies par les pathologies neurologiques et auto-immunes. D'après Buzhor et al. [1].

Dans la catégorie "Autres", qui représente 16% des études réalisées à cette période, sont notamment retrouvées les pathologies cancéreuses. Grâce à leur tropisme tumoral [4], les CSM ont notamment été étudiées en tant que vecteurs de molécules thérapeutiques d'intérêt vers les tumeurs [5]. Les CSH, quant à elles, sont utilisées dans le traitement de la leucémie ou du myélome [6].

Malgré leur potentiel, très peu de TC ont obtenu à ce jour une autorisation de mise sur le marché. Cela est dû au manque de recul à long terme concernant leur efficacité et leur sécurité, ainsi qu'aux contraintes logistiques et réglementaires liées à l'utilisation de matériel vivant. Mises en place en 1978 en France, les réglementations BPF (Bonnes pratiques de fabrication) ont notamment pour vocation de limiter les risques de contamination. Cela implique une standardisation des procédés impliqués dans la production du produit thérapeutique, que ce soit au niveau de l'amplification des cellules, de leur conservation ou de la formulation du produit fini.

En Europe, la première thérapie cellulaire ayant obtenu une autorisation de mise sur le marché est Holoclar® (2014) [3]. Ce traitement est prescrit chez l'adulte dans le traitement d'une

déficience en cellules souches limbiques suite à des brûlures oculaires. Il s'agit d'une thérapie autologue dont le déroulement est décrit dans la Figure 3.

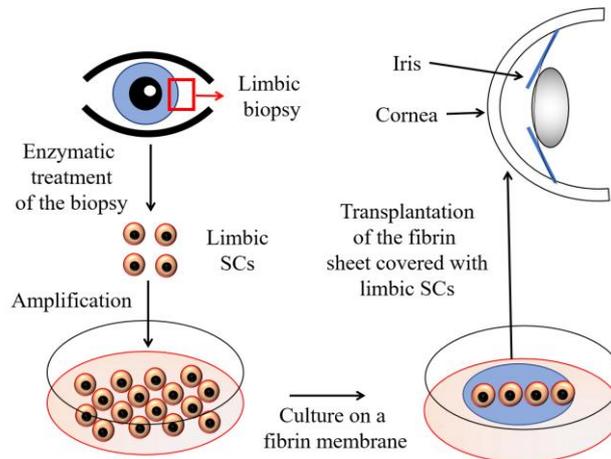


Figure 3 : Etapes du traitement par thérapie cellulaire Holoclar®. En premier lieu, un échantillon de limbe, zone située sous la cornée, est prélevé chez le patient. Suite à un traitement enzymatique, les cellules souches limbiques sont isolées, puis amplifiées in vitro. Ces cellules sont cultivées sur une membrane de fibrine et l'ensemble est ensuite transplanté sur la zone lésée. D'après Arrighi et al. [3].

Un obstacle majeur à l'utilisation des CS à plus grande échelle est lié à des questions éthiques. Concernant cet aspect, Iñigo de Miguel-Berriain a, de mon point de vue, soulevé de nombreuses questions toujours non résolues ou ne faisant pas consensus [7]. Ces limites concernent principalement les cellules souches embryonnaires (ES) et les cellules souches pluripotentes induites (iPS) et seront décrits dans les paragraphes 1.2.1. et 1.2.2. En France, les évolutions récentes tendent cependant vers une facilitation de la recherche sur les CS au niveau juridique.

1.2. Les types de cellules souches utilisées en thérapie cellulaire.

1.2.1. Les cellules souches embryonnaires (ES).

Les ES sont obtenues chez l'embryon, au stade blastocyste (Figure 4).

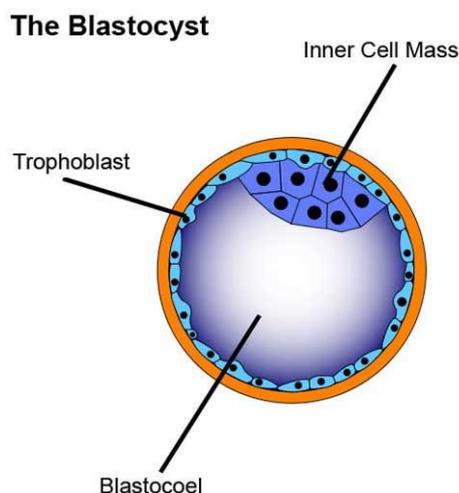


Figure 4 : Représentation d'un blastocyste d'où sont extraites les ES. Lors du développement embryonnaire, la fertilisation de l'ovocyte par un spermatozoïde conduit à la formation d'un zygote, ou organisme unicellulaire. Après trois jours de division cellulaire, une étape de compaction va avoir lieu, formant la morula. L'étape de cavitation qui a lieu entre les jours 4 et 5 post-fertilisation, forme le blastocyste, composé pour sa partie externe du trophoblaste, tissu à l'origine des annexes embryonnaires. Sa partie interne est quant à elle composée du blastocœle, une cavité, ainsi que de la masse cellulaire interne (MCI). Ce sont les cellules de la MCI, pluripotentes, qui vont être extraites puis utilisées en tant que cellules souches embryonnaires.

Isolées pour la première fois en 1998, les ES humaines sont utilisées dans de nombreuses applications. Celles-ci s'étendent de l'étude des mécanismes à l'origine des échecs de fécondation, ou de développement embryonnaire, au criblage de nouvelles drogues thérapeutiques en passant bien sûr par la TC [8].

Au niveau phénotypique, les ES se caractérisent par l'expression des marqueurs spécifiques SSEA-3 et SSEA-4, ainsi que des facteurs de transcription oct3, oct4 et nanog. Au contraire, le marqueur SSEA-1, spécifique des CSH, doit être absent chez ces cellules [9].

L'une des contraintes majeures à l'utilisation d'ES est que les techniques utilisées pour leur isolement et leur amplification *in vitro* nécessitent l'utilisation de composants xénogéniques. Concernant l'isolement des ES, la technique majoritairement utilisée est l'immunochirurgie, qui fait appel à des anticorps antisérum humain ou encore des éléments du complément porcins. Elle est donc difficilement transposable en clinique [9]. Pour pallier ce problème, des techniques d'isolement et de dissociation de la MCI, mécaniques et enzymatiques, ont été développées, telle qu'une méthode d'isolement au laser de la MCI [10].

Pour leur amplification *in vitro*, les ES sont souvent cultivées en présence de cellules nourricières d'origine murine. Même si plusieurs cellules nourricières humaines ont été testées au début des années 2000, ce n'est que récemment qu'une matrice composée de laminine et de E-cadhérine permettant une isolement et une amplification efficace de ces cellules, a été développée [11]. Enfin, les ES ont une propension à acquérir des altérations génétiques en cours de culture. Des trisomies au niveau des chromosomes 12, 17, 20 et X, retrouvées aussi chez certains carcinomes embryonnaires, ont été observées [12]. L'effet de la durée de culture des ES sur leur variation génétique est contradictoire. De plus, l'utilisation de méthodes de dissociations enzymatiques semble promouvoir ces altérations génétiques, contrairement à une méthode de dissociation plus mécanique [8].

En tant que cellules pluripotentes, les ES vont être amenées, au cours du développement embryonnaire, à se différencier en de nombreux types de tissus différents (Figure 5). *In situ*, ces procédés de différenciation font appel à plusieurs types d'effecteurs extrinsèques et intrinsèques, qui par leurs actions finement régulées dans l'espace (zone de l'embryon) et dans le temps, vont permettre à l'embryon de se différencier et de se développer [13,14]. Parmi les facteurs intrinsèques, on peut citer des modifications épigénétiques spécifiques telles que l'acétylation ou la méthylation des histones H3K4, H3K27 et H3K9 [14].

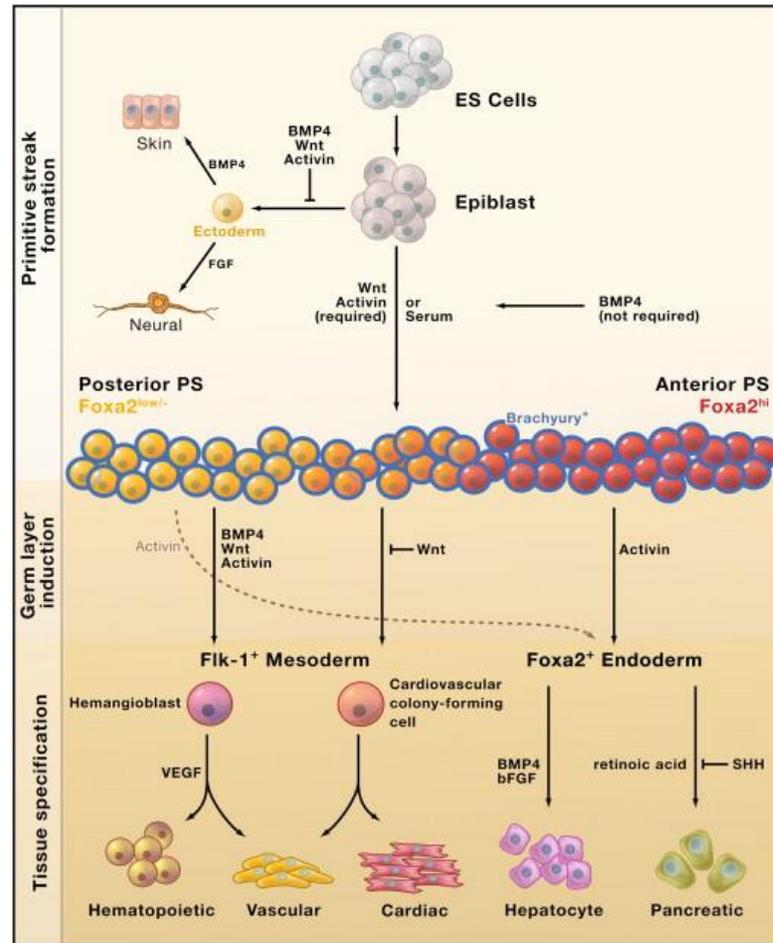


Figure 5 : Facteurs extrinsèques impliqués dans la spécification des tissus. Le contrôle spatiotemporel des facteurs extrinsèques BMPs, Activin/Nodal et Wnt dans les cellules ES conduit à la formation des différents tissus lors du développement embryonnaire. D'après Murry and Keller [13].

Même si les mécanismes moléculaires impliqués dans ce développement précoce sont encore flous, les connaissances acquises ont permis de développer des protocoles adéquats pour différencier les ES *in vitro*. Ainsi, de nombreux types cellulaires incluant les cardiomyocytes, les cellules hématopoïétiques, les cellules pancréatiques, ou neuronales ont pu être obtenus *in vitro* à partir d'ES [9,13]. Cependant, les ES peuvent former des tératomes *in vivo* [15], qui sont des tumeurs bénignes caractérisées par leur structure désordonnée. Elles sont composées de tissus issus des trois lignages embryonnaires : l'ectoderme, le mésoderme et l'endoderme. Bien que cette propriété caractérise le potentiel pluripotent des ES, elle souligne aussi l'importance de pouvoir différencier les cellules *in vitro* avant leur injection dans le cadre d'une utilisation clinique.

Les ES sont utilisées principalement dans quatre pathologies : le diabète de type 1, les atteintes médullaires, la dégénérescence maculaire liée à l'âge (DMLA) et l'infarctus du myocarde [16]. Concernant le diabète de type 1, Viacyte, une entreprise de San Diego, a associé les propriétés des cellules PEC-01 au procédé d'encapsulation Encaptra afin de créer VC-01, le premier dispositif de thérapie cellulaire pour le diabète de type 1 utilisant des ES [17]. Un schéma est présenté dans la Figure 6 ci-dessous.

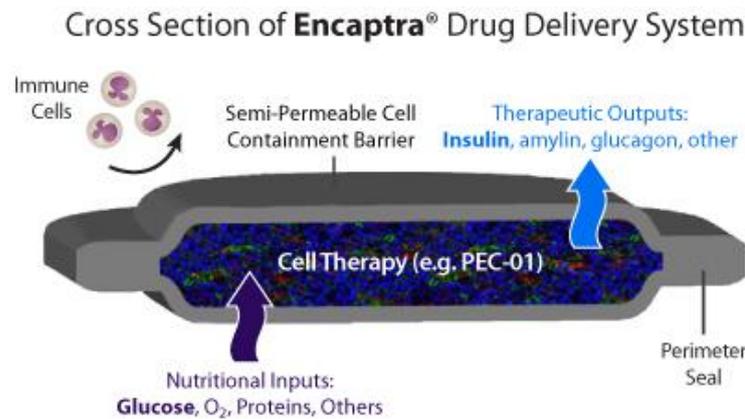


Figure 6 : Description du dispositif VC-01, composé du système de vectorisation Encaptra et des cellules ES différenciées PEC-01. Encaptra permet de protéger les cellules PEC-01 du système immunitaire du patient tout en permettant aux nutriments tels que le glucose de pénétrer en son enceinte. En temps "qu'îlots de Langerhans artificiels" les cellules PEC-01 vont, en réponse aux stimuli induits par le glucose, sécréter de l'insuline afin de réguler la glycémie du patient.

Concernant l'infarctus du myocarde, l'équipe de Philippe Menasché (hôpital européen George Pompidou, Paris), a réalisé en 2014 la première TC de cette pathologie, en utilisant des cellules ES différenciées en progéniteurs cardiaques associées à un patch de fibrine. Geron et Asterias Biotherapeutics, deux entreprises Californiennes, ont étudié les cellules OPC1 dans le cadre de deux essais cliniques pour le traitement d'atteintes médullaires. Les cellules OPC1 sont des précurseurs d'oligodendrocytes dérivés de cellules ES. Lors de l'étude de phase I menée par Geron en 2009, aucune complication n'a été observée chez les 4 patients traités par ces cellules. L'étude de phase I/II Scistar, menée par Asterias Biotherapeutics en 2014, a également démontré des résultats encourageants chez les 25 patients traités. Enfin, les essais de phase I/II menés par les compagnies Ocata et Cell Cure Neurosciences représentent les principales études en ophtalmologie, pour le traitement de la DMLA notamment [16].

Cependant, l'utilisation clinique des ES est limitée par certaines contraintes éthiques [7], en particulier concernant le statut de l'embryon. De nombreux critères d'évaluations ont été développés afin de mieux le caractériser, mais aucun de ces critères ne semble être actuellement accepté par l'ensemble de la communauté scientifique. Concernant l'utilisation des embryons, le débat est plutôt tourné vers le contexte dans lequel ces embryons sont utilisés. En effet, il semble de nos jours que l'utilisation d'un embryon soit immorale uniquement dans le cas où celui-ci a été créé avec pour but premier d'être étudié. Au contraire, dans le cas d'embryons surnuméraires issus d'une procréation médicalement assistée (PMA) par exemple, il semble aujourd'hui que leur utilisation soit moralement acceptée par la communauté scientifique. En France, l'article 14 du projet de loi de bioéthique, visant à faciliter la recherche sur l'embryon, a été voté le 4 octobre 2019. Suite à cette loi, les ES ont été juridiquement distinguées de l'embryon. De plus, la recherche sur ces cellules est passée d'un régime dérogatoire à un régime déclaratif, sur consentement des "parents". Ce projet de loi devrait à l'avenir faciliter les recherches sur les ES d'un point de vue administratif.

1.2.2. Les cellules souches pluripotentes induites (iPS).

Bien que les ES aient représenté une réelle avancée dans le traitement de plusieurs pathologies, les contraintes éthiques concernant l'utilisation d'embryons sont toujours d'actualité dans de nombreux pays. De plus, l'obtention de cellules pluripotentes autologues est impossible, ce qui pose des contraintes au niveau thérapeutique, mais aussi pour l'étude de pathologies *in vitro*.

Dans ce contexte, la découverte, par Shinya Yamanaka, des cellules pluripotentes induites (iPS) a représenté une avancée sans précédent, lui valant le prix Nobel de Médecine en 2012. Les iPS sont des cellules somatiques ayant été traitées pour exprimer certains facteurs connus pour maintenir la pluripotence chez l'embryon et les cellules ES, en partant de l'hypothèse que ces mêmes facteurs

pourraient induire cette pluripotence chez des cellules différenciées. Partant de 24 gènes candidats, ces chercheurs ont *in fine* caractérisé 4 facteurs permettant à eux seuls l'obtention de cellules pluripotentes. Il s'agit des facteurs de transcription oct4, sox2, klf4 et c-myc. Après leur transfection par les gènes codants pour ces quatre facteurs et leur culture dans des conditions similaires à celles utilisées pour les ES, des cellules fibroblastiques murines [18] puis humaines [19] ont présenté des caractéristiques similaires aux ES. Des capacités de croissance et de différenciation identiques ont été observées *in vitro* et enfin, des tératomes ont été obtenus suite à l'injection de ces cellules *in vivo*, caractérisant leur pluripotence. Les iPS étaient nées.

Grâce à leur mode d'obtention, plus éthique, et le fait que des iPS autologues peuvent être créées, leur utilisation est rapidement devenue complémentaire de celles des ES dans de nombreux types d'applications [20,21]. Concernant leur utilisation thérapeutique, plusieurs essais cliniques ont déjà vu le jour. Le premier, un essai clinique Japonais en 2013, a étudié l'efficacité de cellules rétinienne issues d'iPS dans le traitement de la DMLA [22]. Depuis, d'autres études ont démarré dans le traitement de la maladie du greffon contre l'hôte (GvHD), la maladie de Parkinson ou encore l'infarctus du myocarde [23]. Cependant, leur utilisation thérapeutique demeure à ce jour limitée à cause de leur potentielle instabilité génétique. En tant que cellules pluripotentes, les iPS ont tendance à développer des anomalies génétiques. Celles-ci sont identiques à celles décrites pour les ES [12,24].

De plus, la création d'iPS repose sur un procédé de reprogrammation qui comporte des incertitudes. Par exemple, l'intégration des facteurs de transcription nécessaires à la reprogrammation s'est faite initialement par des méthodes dites intégratives, dans lesquelles les gènes nécessaires à l'expression de ces facteurs de transcription sont insérés à l'aide de virus. Or, comme souligné par Takahashi *et al.*, plus de 20 intégrations virales peuvent être retrouvées dans une même cellule [18,19]. Ce procédé est à l'origine d'insertion d'ADN viral dans le génome cellulaire dont les effets à long terme sont encore peu compris. De plus, la réactivation de c-myc, l'un des 4 facteurs utilisés dans la reprogrammation, a été à l'origine de l'apparition de tumeurs chez plusieurs clones d'iPS [25]. Son utilisation dans le cadre clinique n'est donc pas envisageable et son absence affecte l'efficacité de reprogrammation. Plusieurs autres alternatives ont été étudiées. Des méthodes non intégratives de transfection directe d'ADN, de vecteurs épisomaux, ou d'autres virus non intégratifs tels que le virus de Sendai ont été utilisés. Des méthodes dites transitoires, utilisant des transposons ou des systèmes d'excision de type Cre-Lox ont aussi été étudiées [12,26]. Enfin, des méthodes n'utilisant pas d'ADN, mais des protéines, des miRNA ou encore des effecteurs moléculaires ont été développées. Par exemple, l'utilisation des miRNA 291-3p, 294 et 295 ont permis l'obtention d'iPS sans utilisation de c-myc [20]. De plus, l'utilisation de petites molécules a permis d'augmenter la capacité de reprogrammation tout en limitant le nombre de gènes utilisés. Ainsi, l'utilisation simultanée de l'acide valproïque, la tranylcypromine, CHIR99021, un inhibiteur de GSK3- β et le VC6, un inhibiteur de TGF- β , a permis l'obtention d'iPS suite à la transfection d'oct4 uniquement [27].

Malgré ces alternatives, le phénomène de reprogrammation reste encore peu compris, en particulier en ce qui concerne de nombreuses modifications génétiques et épigénétiques, qui sont observées chez les iPS, sans pour autant connaître leurs causes et conséquences sur la physiologie des cellules [24]. De plus, et bien que de nombreux outils aient été développés afin de détecter ces anomalies, telles que le séquençage nouvelle génération (NGS), il manque actuellement un consensus permettant de discriminer quelles mutations vont être importantes ou non [12]. Ainsi, l'essai clinique décrit ci-dessus, dans lequel des iPS ont été utilisées pour traiter la DMLA, a été interrompu avant d'être repris en 2016, car des mutations ont été trouvées dans les cellules utilisées.

Pour ces différentes raisons, la TC n'est qu'un domaine minoritaire de l'utilisation des iPS (Figure 7).

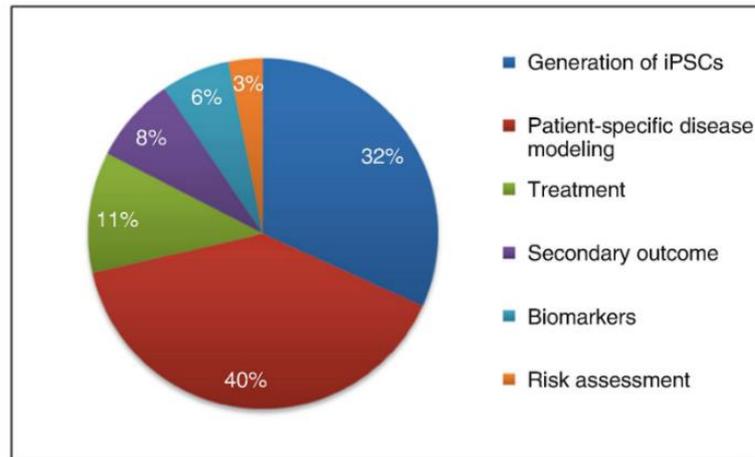


Figure 7 : L'utilisation des iPS en recherche et en clinique. La thérapie cellulaire ne représente que 11% des études sur les iPS. Ces cellules sont majoritairement utilisées dans d'autres applications, telles que l'étude de pathologies, le "drug discovery", l'étude toxicologique ou l'évaluation de risques de certains médicaments. D'après Kavyasudha et al. [26].

Concernant l'étude de pathologies ou "disease modeling", les iPS représentent une avancée majeure puisqu'avant leur découverte, l'obtention de cellules pluripotentes spécifiques d'un patient particulier était impossible. Par exemple, lorsque des patients atteints de la maladie d'Alzheimer ou de Parkinson présentent des symptômes, les cellules nerveuses sont déjà fortement endommagées. Il était donc particulièrement complexe d'étudier l'origine de cette dégénération. Aujourd'hui, ces pathologies font l'objet d'intenses recherches via l'utilisation d'iPS différenciées [26]. Le "disease modeling" permet aussi de tester différentes drogues et d'évaluer leur potentiel thérapeutique, telles que la kinétine, une hormone végétale utilisée dans le traitement du syndrome de Riley-Day, une maladie neuronale héréditaire (Figure 8).

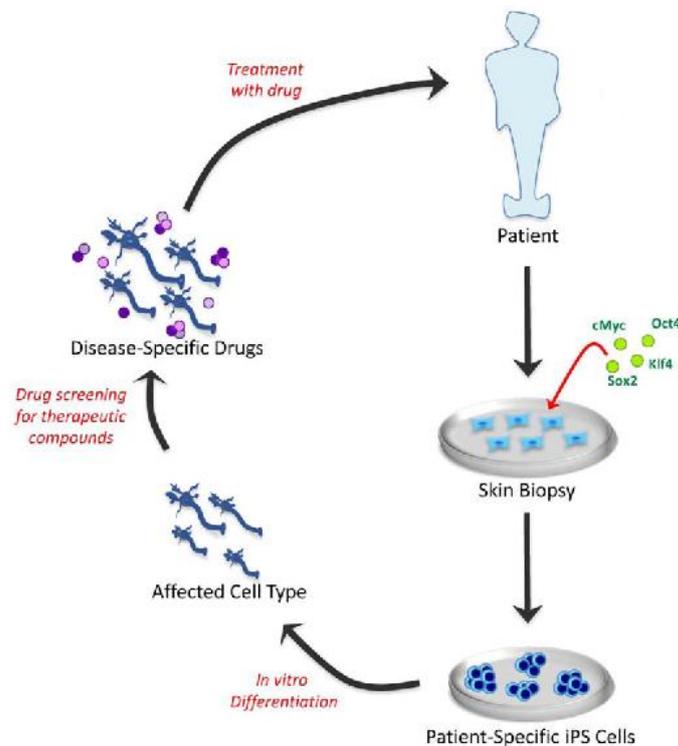


Figure 8 : Utilisation des iPS patients spécifiques pour le développement de nouvelles drogues thérapeutiques. Suite à leur reprogrammation, les iPS spécifiques du patient à traiter sont différenciées en type cellulaire affecté par la pathologie. Ces cellules représentent le modèle in vitro parfait pour le test de molécules personnalisées. Modifié d'après Robinton et Daley [24].

Enfin, les iPS sont utilisées dans la prévention de risques via l'évaluation toxicologique de molécules déjà développées et qui doivent entrer en essai clinique. En effet, les cellules neuronales, les cardiomyocytes ou les hépatocytes, sont des types cellulaires pouvant facilement être obtenus à partir d'iPS [13,20]. Les effets secondaires de drogues au niveau neuronal, cardiaque ou hépatique étant les causes principales d'arrêt lors des essais cliniques, les iPS permettraient un gain de temps et d'argent dans le développement de drogues thérapeutiques [21]. Des réponses plus spécifiques peuvent aussi être obtenues grâce à ces modèles issus d'iPS, telles que l'optimisation du dosage de certaines drogues, les tests sur cellules d'enfants ou encore les tests ethnies dépendants [20,24].

Malgré les progrès réalisés dans l'utilisation des iPS, de nombreuses questions restent à élucider. Selon les protocoles par lesquels les iPS sont reprogrammées, leurs caractéristiques génétiques, épigénétiques et biologiques vont être affectées de manière conséquente. Suivant leurs cellules d'origine, les iPS vont aussi avoir une capacité de différenciation orientée. Par exemple, des iPS issues de prostate auront une capacité de différenciation en cellules de prostate supérieure à celle observées pour des iPS issues de la peau [28]. Ces résultats soulèvent la question de "mémoire somatique" des iPS, et démontrent que ces cellules, bien que similaires aux ES dans leur pluripotence, n'en restent pas moins uniques de par le procédé de reprogrammation par lequel elles ont été créées. Il manque donc un consensus concernant les modalités de reprogrammation, de culture *in vitro* et de différenciation des iPS. Quel protocole de reprogrammation utiliser afin de limiter son impact sur les cellules ? Faut-il réadapter certains protocoles de culture et de différenciation en comparaison avec les ES ? Quel est le seuil de sécurité pour la thérapie ? Les réponses à ces questions seront fondamentales pour améliorer l'efficacité et la sécurité des iPS.

Enfin, au niveau éthique, le statut des iPS est encore peu compris [7]. En effet, suite à la génération de souris mâles à partir d'iPS [29], le statut pluripotent et non totipotent de ces cellules a été remis en cause. Néanmoins, ces idéologies ont été contrées par des arguments citant la technique utilisée dans ces études, la complémentation tétraploïde. La complémentation tétraploïde consiste à intégrer les iPS dans un embryon tétraploïde puis à l'injecter dans l'utérus d'une femelle. Le caractère tétraploïde de l'embryon, créé artificiellement, compromet sa faculté à donner les tissus intra-embryonnaires, mais n'inhibe pas la formation du placenta et des annexes. À l'avenir, le statut de ces cellules devra tout de même être clarifié au niveau éthique.

1.2.3. Les cellules souches hématopoïétiques (CSH).

Historiquement, les CSH sont les premières cellules souches à avoir été découvertes. Au début des années 60, Till et McCulloch ont démontré la présence "d'unités d'auto-renouvellement du système hématopoïétique" chez des souris irradiées et transplantées. Près de dix ans plus tard, celles-ci furent décrites comme CS, capables d'engendrer les différentes lignées du système hématopoïétique [6]. Les CSH ont la capacité de se différencier en la totalité des différents types de cellules sanguines (Figure 9).

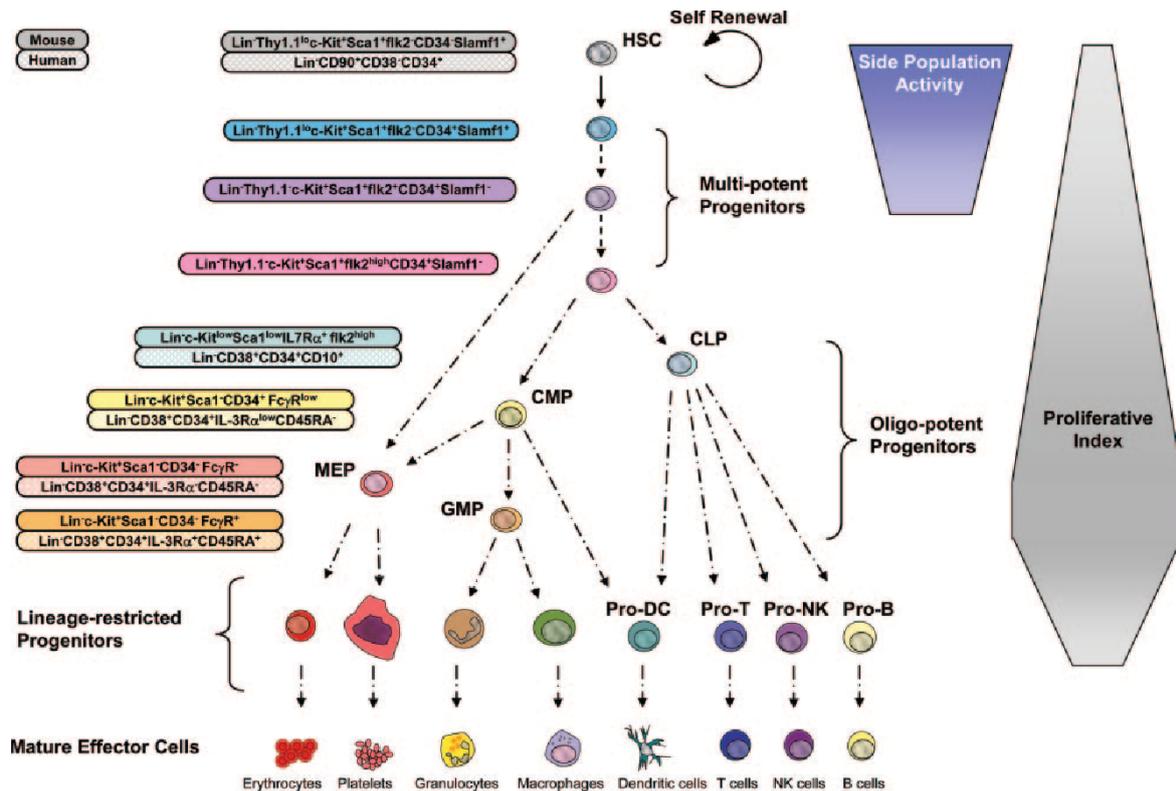


Figure 9 : Différenciation des CSH en effecteurs du système hématopoïétique. Les CSH ne se différencient pas directement en cellules effectrices matures. Le procédé de différenciation passe par de nombreux progéniteurs, multipotents en premier lieu, puis en progéniteurs lymphoïdes ou myéloïdes et enfin en progéniteurs restreints qui sont des cellules unipotentes. Ces différents progéniteurs, CSH comprises, identifiés par l'expression de marqueurs bien distincts, sont caractérisés par des propriétés de différenciation, de prolifération et d'auto-renouvellement très différentes. D'après Bryder et al. [30].

Ce système de différenciation en "poupées russes" permet de produire un nombre très important de cellules différenciées tout en limitant au maximum la prolifération des CSH, mais aussi de répondre plus rapidement aux besoins de l'organisme. Environ $1,5 \times 10^6$ cellules sanguines sont produites chaque seconde chez l'adulte [30].

Les CSH comptent parmi les cellules les plus rares de notre organisme. Dans la moelle osseuse, leur niche principale, on en compte seulement une pour 10 000 cellules. Ces cellules ont donc la capacité de migrer dans le système vasculaire vers les zones où elles sont requises. Elles sont aussi quiescentes la plupart du temps et leur activation n'a lieu que lorsque nécessaire [31]. Cela permet de prévenir leur épuisement ainsi que l'apparition de mutations, potentiellement à l'origine de leucémies. Ces propriétés sont dues à la composition et aux propriétés de la niche dans laquelle ces CSH résident (Figure 10).

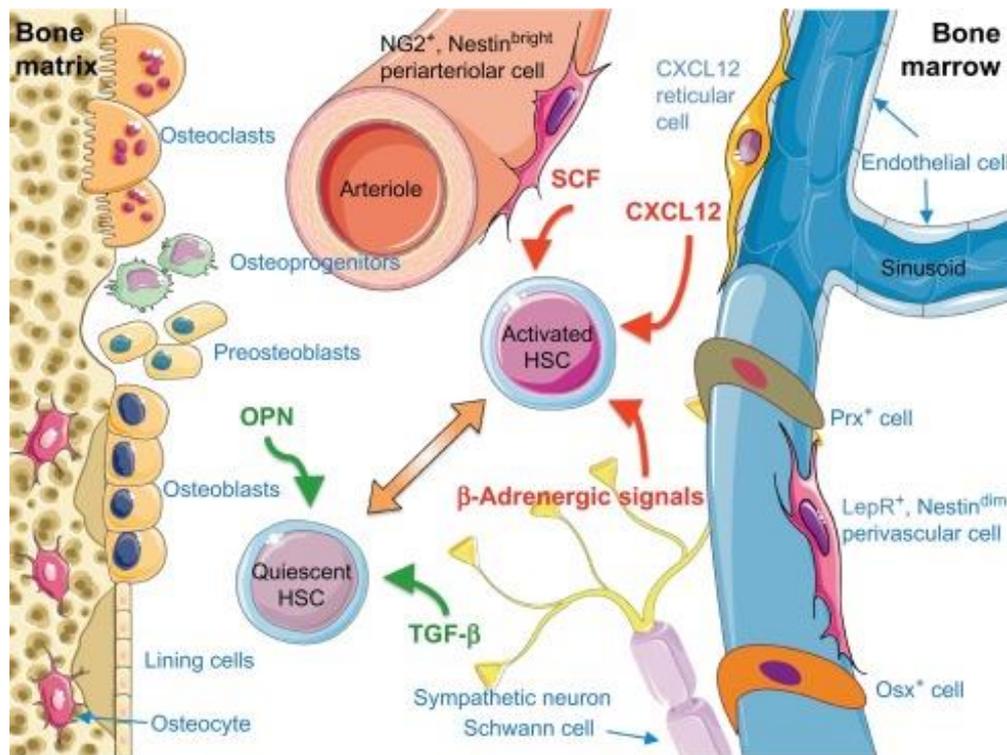


Figure 10 : La niche des cellules souches hématopoïétiques. Il s'agit d'un environnement très complexe, composé de différents tissus et de différents types cellulaires qui vont fortement influencer le phénotype des CSH (quiescentes vs activées) et leur capacité de migration et de "homing", c'est à dire la capacité des CSH à interagir à nouveau avec une niche d'intérêt. D'après Yu et Scadden [32].

Décrite en 1978, la niche des CSH est composée principalement de deux zones : la zone endostéale et la zone vasculaire. Ces zones sont composées de nombreux types de cellules différents ayant toutes un rôle particulier dans le comportement des CSH. Par exemple, il semblerait que les CSH, notamment quiescentes, résident principalement aux abords de la zone dite endostéale. Cela s'explique par une forte concentration en calcium, essentiel à la rétention des cellules, ainsi qu'une forte hypoxie, responsable de la quiescence des cellules [31]. La zone vasculaire, ou sinusoidale est quant à elle principalement composée de cellules endothéliales (CE) [33] qui, via la sécrétion de facteurs angiocrines, vont réguler la différenciation, le renouvellement et la maintenance des CSH. La zone vasculaire est une frontière entre la moelle osseuse et la circulation sanguine. Son ouverture et sa fermeture sont régulées de manière dynamique. Ainsi, lorsque la chimiokine CXCL12 (ou SDF-1) est sécrétée par les cellules stromales de la moelle osseuse, elle va interagir avec le récepteur membranaire CXCR4, présent à la surface des CSH, permettant leur maintien dans la niche. Au contraire, l'inhibition de cette interaction conduit à la mobilisation des CSH, qui sont libérées et peuvent alors migrer grâce à la circulation sanguine.

Les CSH sont les premières CS dont l'utilisation thérapeutique de routine a été acceptée. Principalement dédiées aux pathologies sanguines telles que les cancers du sang, les CSH sont utilisées de deux manières principales en thérapie : par transplantation de cellules souches hématopoïétiques (HSCT) et pour la thérapie génique.

L'HSCT consiste à la transplantation de CSH, généralement de manière allogénique, à un patient. Une fois isolées, les CSH sont réinjectées au patient par voie intraveineuse. Dans la circulation sanguine, ces cellules vont migrer vers leur niche via le phénomène de "homing", et remplacer les cellules malades. Les principales pathologies traitées par HSCT sont les cancers du sang tels que les lymphomes, les myélomes ou les leucémies. En 2006, près de 90% de pathologies traitées par HSCT allogénique concernait l'une de ces pathologies [6]. Plus rarement, l'HSCT est utilisée dans le traitement de pathologies non tumorales telles que l'aplasie ou divers syndromes

d'immunodéficience. Enfin, cette thérapie peut être utilisée à la suite d'une chimiothérapie afin de restaurer les fonctions hématopoïétiques du patient, notamment dans le traitement de pathologies lymphoïdes.

Trois sources principales sont utilisées pour le prélèvement des CSH : la moelle osseuse, le sang périphérique et le sang de cordon. Concernant la moelle osseuse, les CSH sont collectées à partir de la crête iliaque postérieure sous anesthésie générale. Plusieurs aspirations sont nécessaires afin d'obtenir une quantité suffisante de cellules, soit environ 2×10^8 cellules mononuclées par kg, pour une utilisation thérapeutique [34]. Cette méthode de prélèvement étant très douloureuse pour le donneur, le sang périphérique lui est aujourd'hui préféré. Les CSH étant quasiment inexistantes dans ce tissu, une étape de mobilisation des cellules est réalisée avant prélèvement afin d'augmenter la quantité de CSH dans le sang. Plusieurs molécules sont utilisées en clinique : le granulocyte-colony stimulating factor (G-CSF), découvert en 1988 et le plérixafor dont l'utilisation fut approuvée par la Food and Drug Administration (FDA) en 2008. Ces molécules, de manière synergique, vont inhiber l'interaction des effecteurs CXCL12 avec leurs récepteurs CXCR4 et permettre la libération des CSH de leur niche. Même si cette méthode de prélèvement est plus longue (jusqu'à plusieurs jours pour les thérapies autologues), elle est également bien moins douloureuse et ne nécessite pas d'anesthésie générale. De plus, une prise de greffe plus rapide a été observée en comparaison avec des cellules issues de moelle osseuse. Enfin, le sang de cordon représente aussi une bonne alternative pour le prélèvement de CSH. En comparaison avec les autres sources de prélèvement, les CSH du sang de cordon sont relativement naïves au niveau immunologique et limitent les risques de GvHD. Ceci est très important dans le cas de transplantation allogénique, où moins de 30% des patients ont accès à un donneur HLA compatible. Cependant, la prise de greffe est plus longue dans le cas de traitement par des cellules issues de cette source [6].

Les CSH sont très rares et ne représentent qu'une partie infime du prélèvement réalisé chez le donneur. Pour contourner cette limite, ces cellules doivent être purifiées et amplifiées *in vitro*. Concernant leur purification, plusieurs techniques de centrifugation ou de tri, magnétique ou par cytométrie en flux, ont été développées. Ces dernières, bien que plus spécifiques, demeurent complexes à mettre en œuvre car les différentes cellules du système hématopoïétique expriment de nombreux marqueurs en commun (Figure 9). Concernant la culture des CSH *in vitro*, suivant la méthode utilisée, différentes populations de cellules hématopoïétiques vont être sélectionnées. Le résultat thérapeutique étant dépendant de la population de cellules hématopoïétiques injectée, la sélection de conditions de culture optimales est donc primordiale et d'autant plus complexe. Deux alternatives ont été testées : la culture en présence de cytokines hématopoïétiques telles que la thrombopoïétine ou le stem cell factor, ou la coculture avec des cellules stromales, naturellement présentes dans la niche des CSH [33].

Malgré ses qualités, l'HSCT n'est pas anodine et de nombreux effets secondaires sont observés chez les patients, y compris à long terme [6]. Parmi les effets les plus courants, les infections, qui peuvent être bactériennes ou virales. Celles-ci sont dues au statut immunodéprimé du patient lors de la période de prise de greffe. Le GvHD est aussi observé à long terme chez la moitié des patients ayant été traités par une HSCT [6]. Malgré la présence de traitements [35], le GvHD demeure la première cause de morbidité et de mortalité observée chez ces patients. Cependant, il peut s'avérer bénéfique chez certains cancers non-répondants aux thérapies classiques. En effet, il a déjà été observé que suite à une HSCT chez des patients présentant différents types de cancers, mêmes métastatiques, la réaction de GvHD était orientée contre la tumeur. Cette réaction, appelée GvT (pour Graft versus Tumor effect), a été observée chez des patients présentant un cancer rénal, métastatique ou non [36,37]. Dans ce cas bien spécifique, l'un des principaux défis sera de maximiser le GvT, tout en diminuant au maximum les risques de GvHD chronique.

La seconde limite rencontrée est la capacité de "homing" des cellules. En effet, les CSH sont injectées en intraveineuse et doivent migrer dans la circulation sanguine pour s'implanter dans leur

niche. Ce n'est qu'une fois implantées qu'elles pourront se renouveler, se différencier et permettre la reconstitution du système immunitaire du patient. Durant cette période de transit, les patients sont immunodéprimés, et sujets à des risques d'anémie ou d'infections compromettant l'issue du traitement. Il est donc nécessaire d'améliorer ce processus de "homing". Nous avons déjà vu que l'interaction entre le ligand CXCL12 et le récepteur CXCR4 des CSH a pour effet de maintenir les cellules dans leur niche. Plusieurs stratégies ont vu le jour afin de favoriser cette interaction. L'incorporation de CXCR4 dans les radeaux lipidiques, domaines de la membrane cellulaire, a par exemple été démontré comme favorisant l'intégration des CSH dans leur niche [38]. Chauffer légèrement les cellules fait partie des effets favorisant cette incorporation et est utilisé en tant que traitement initial à l'injection. Le DPP-4 et la PGE2 (Prostaglandine E2) sont également deux facteurs favorisant l'interaction CXCL12/CXCR4 et font actuellement l'objet d'essais cliniques [33].

En conclusion, la transplantation des CSH représente une réelle avancée dans le traitement de nombreuses maladies du sang, et même de certains types de cancers non sanguins. La compréhension du rôle de l'environnement naturel des CSH sur leur activité a permis d'améliorer l'efficacité des traitements et de réduire ses effets secondaires. Cependant, même si la plupart des patients répondeurs retrouvent une qualité de vie considérée comme bonne, l'HSCT influe sur la vie des patients à long terme, voire à vie [6].

1.2.4. Les cellules souches mésenchymateuses (CSM).

L'histoire des cellules souches mésenchymateuses (CSM) débute en 1976 suite à la découverte de cellules issues de moelle osseuse, distinctes des CSH grâce à leur rapide adhérence au plastique, et caractérisées par leur croissance sous forme de colonies fibroblastiques [39]. Quelques années plus tard, ces cellules ont démontré des capacités à générer *in vivo* de multiples tissus squelettiques, conduisant les chercheurs à nommer ces cellules "cellules souches ostéogéniques", ou "cellules souches stromales de moelle osseuse". Ce n'est qu'à la fin des années 90 que le terme "cellules souches mésenchymateuses", proposé initialement par Al Caplan, gagna en popularité. Aujourd'hui, même si ce terme reste encore quelque peu controversé d'un point de vue développemental, il demeure populaire pour une grande partie de la communauté scientifique. Trois critères d'identification des CSM ont été définis par la société internationale pour la thérapie cellulaire (ISCT) [40]. Tout d'abord, ces cellules doivent adhérer au plastique dans des conditions normales de culture *ex vivo*. Ensuite, elles doivent être positives à plus de 95% pour les marqueurs membranaires CD105, CD73 et CD90, et négatives, à l'exception de 2% maximum de la population, pour l'expression des marqueurs CD45, CD34, CD14, CD19 et du HLA de classe II. Enfin, ces cellules doivent être capables, en conditions adéquates, de se différencier en ostéoblastes, en adipocytes et en chondrocytes *in vitro*. L'évaluation de cette différenciation est généralement réalisée par marquage histologique (Figure 11).

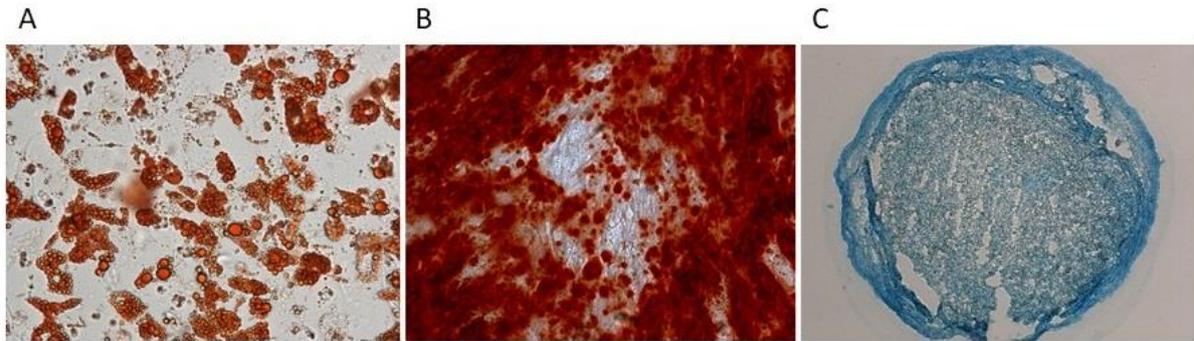


Figure 11 : Marquage histologique de CSM différenciées *in vitro*. Adipocytes (marqués à l'Oil Red O) (A), Ostéoblastes (marqués à l'Alizarin Red) (B), Chondrocytes (coupes marquées au Bleu Alcian) (C). Données personnelles.

Même si la moelle osseuse représente encore aujourd'hui la principale source de CSM, il est connu qu'un grand nombre de tissus de notre organisme contiennent ces cellules. Ainsi, les CSM ont déjà été isolées à partir de tissu adipeux, de pulpe dentaire, de placenta ou de cordon ombilical [41]. De plus, les progrès réalisés dans la culture de ces cellules *in vitro* ont permis l'obtention, à partir de CSM, de nombreux types cellulaires tels que des hépatocytes, des cardiomyocytes ou des cellules neuronales et de la peau [42].

Les CSM ont également, à l'état non différencié, une capacité d'immunomodulation [43]. Ces cellules peuvent interagir avec les différents composants du système immunitaire, qu'ils soient impliqués dans la réponse innée ou adaptative (Figure 12).

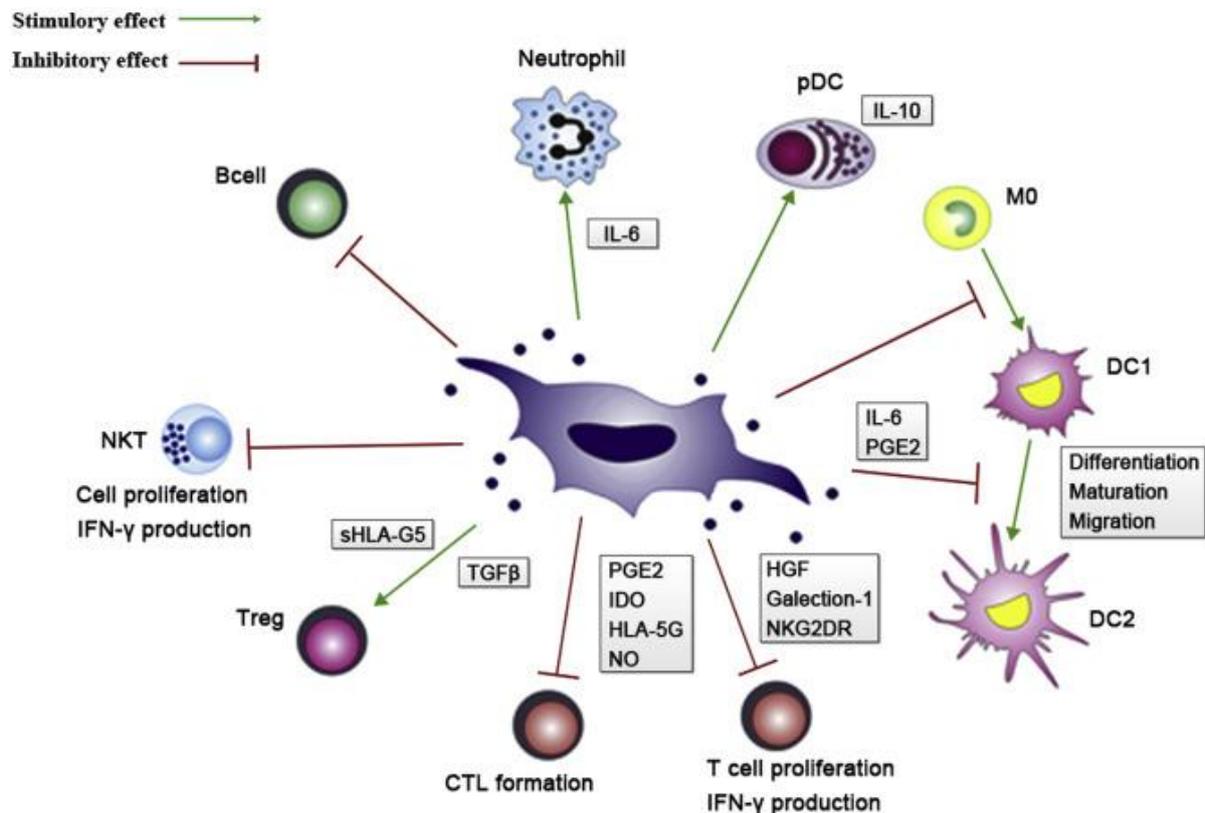


Figure 12 : Interaction des CSM avec les différents composants du système immunitaire et origine des capacités immunomodulatrices de ces cellules. Ces interactions peuvent être soit directes, via un contact cellule-cellule, soit par la sécrétion de plusieurs facteurs, dont la prostaglandine E2 (PGE2), l'indoleamine 2,3-dioxygénase (IDO), l'hépatocyte growth factor (HGF) ou le TGF- β . D'après Zhao et al. [43].

Par exemple, via la sécrétion de PGE2, les CSM sont capables d'inhiber la prolifération des cellules mononuclées de sang périphérique (PBMC), ainsi que leur production d'IFN- γ [44]. Par l'action de ce même facteur, les CSM inhibent la transformation des monocytes en cellules dendritiques [45]. Ces cellules, via la sécrétion d'interleukine 6 (IL-6) préservent l'entrée en apoptose des neutrophiles [46]. Enfin, via l'activation de la voie de signalisation STAT3, associée à une inhibition de la voie dépendante de NF- κ B, ces cellules induisent la polarisation des macrophages vers leur forme anti-inflammatoire M2 [47]. *In vivo*, ce potentiel d'immunomodulation a été démontré dans plusieurs modèles de pathologies inflammatoires et auto-immunes telles que le GvHD [48] le diabète de type 1 [49]. Ainsi, suite à l'injection de CSM issues de moelle osseuse chez des modèles murins hyperglycémiques, une régénération des cellules pancréatiques β a été observée, conduisant à une stabilisation de la glycémie chez ces souris.

Les CSM ont aussi l'avantage d'être facilement isolables, notamment dans le cas de cellules provenant du tissu adipeux (ASC) [50] et très facilement amplifiables *ex vivo* grâce à leurs caractéristiques fibroblastiques. De plus, et contrairement aux ES et aux iPS, ces cellules ne forment pas spontanément de tératomes *in vivo* et ont un potentiel de tumorigénèse bien moins important que celles-ci. Une potentielle altération génétique des CSM lors de leur expansion prolongée n'est cependant pas à exclure [51]. La sénescence, phénomène lié au vieillissement cellulaire, est la principale altération physiologique observée chez les CSM lors de leur culture *in vitro* [52]. Plusieurs phénomènes moléculaires de raccourcissement des télomères, de cassure de l'ADN ou de perturbation de l'organisation chromatinienne, vont induire l'activation de cascades de signalisation conduisant à un arrêt de prolifération des cellules. Au niveau morphologique, les cellules sénescents sont caractérisées par une forme étirée et élargie, un noyau de grande taille contenant les *foci* de dommage à l'ADN γ H2AX et 53BP1, et une positivité à la β -galactosidase. Elles présentent aussi un sécrétome spécifique, contenant notamment le Growth Related Oncogene (GRO), les interleukines 8 et 23 (IL8, IL12) ou la Macrophage-Derived Chemokine (MDC). Enfin, la sénescence va affecter les CSM au niveau fonctionnel. On note aussi une altération de leur capacité de différenciation, de migration, de "homing" et d'immunomodulation. Dans une moindre mesure, une augmentation du potentiel tumorigénique peut aussi lui être associée [52]. L'apparition de sénescence reste néanmoins dépendante de nombreux facteurs incluant l'âge du donneur, l'origine des cellules ou encore les conditions de culture et il est aujourd'hui possible, via différents outils physico-chimiques et pharmacologiques, de limiter ce phénomène [52].

Pour toutes ces raisons, les CSM sont aujourd'hui très largement étudiées en préclinique et clinique [53,54] pour le traitement de pathologies très variées. Ainsi, ces études ont permis de comprendre certains mécanismes biologiques et physiologiques associés aux effets thérapeutiques des CSM. Par exemple, la réduction des plaques β -amyloïdes semble être associée à la sécrétion du facteur GDF-15 par les CSM dans le modèle de maladie d'Alzheimer développé par Kim *et al.* [55]. En 2016, 493 essais cliniques impliquant des CSM avaient été décrits [53]. La Figure 13 ci-dessous en représente une classification par phase d'étude et par type de pathologie. Au-delà des pathologies citées, les CSM peuvent également être utilisées à la suite de transplantation d'organes. C'est le cas des transplantations rénales et pulmonaires pour lesquelles 11 études ont été enregistrées. Les CSM représentent aussi une alternative de choix en cancérologie. Le tropisme des CSM pour l'environnement tumoral a en effet été décrit [4] et ces cellules ont donc déjà été étudiées pour le traitement de différents cancers *in vitro* et *in vivo* [5]. Associés à une chimiothérapie de cisplatine et pémétréxed, des CSM porteuses de protéines TRAIL sont étudiées dans le traitement de patients atteint de cancers pulmonaires. Cet essai clinique (appelé TACTICAL) de phase I/II a démarré en 2017 (Identifiant ClinicalTrials.gov : NCT03298763). Même si la plupart des études cliniques impliquant les CSM sont essentiellement en phase clinique initiale (phases I et II), le nombre d'études utilisant ces cellules n'a jamais cessé d'augmenter depuis plus de dix ans [54]. Actuellement, environ 1000 essais sont en cours à l'échelle mondiale [56].

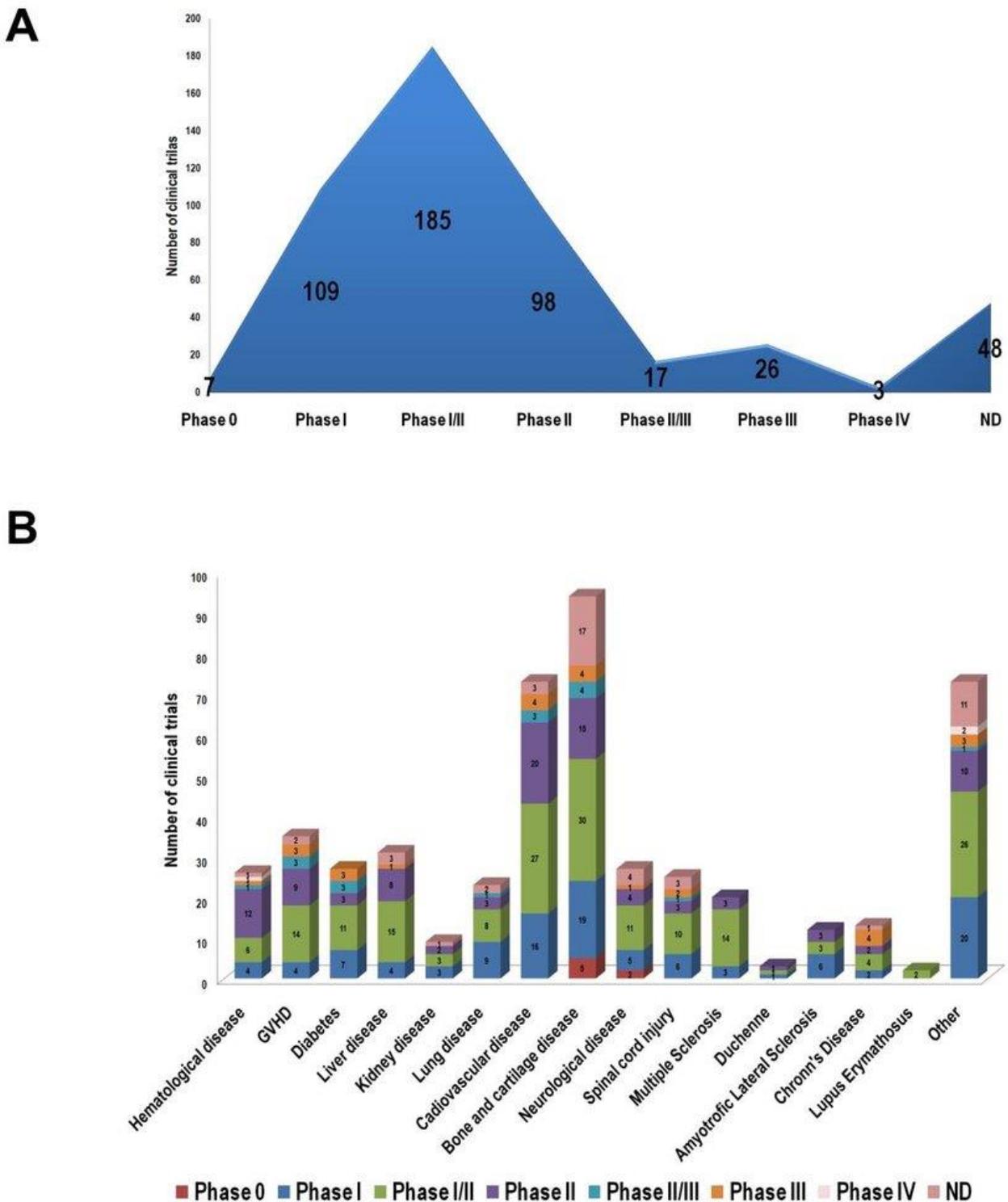


Figure 13 : Essais cliniques utilisant des CSM en 2016. Classification par phase d'étude (A) et par type de pathologie traitée (B) des 493 essais cliniques impliquant des CSM. Principalement étudiées dans la régénération osseuse et dans le traitement de pathologies cardiovasculaires, les CSM sont aussi utilisées pour leur capacités immunomodulatrices dans le traitement de pathologies auto-immunes comme le GvHD, le Diabète, la maladie de Crohn ou le Lupus. D'après Squillaro et al. [53].

Pour conclure ce chapitre sur la thérapie cellulaire, un tableau comparatif des avantages et des limites de chaque type cellulaire décrit vous est présenté (Tableau 2). À noter que la réalisation de ce tableau fait suite à une interprétation personnelle de la littérature.

Type cellulaire	Aspects liés à l'isolement et à l'amplification		Aspects liés à l'utilisation clinique		Contraintes éthiques
	Disponibilité dans l'organisme et isolement	Capacité d'amplification <i>ex vivo</i>	Spectre d'action thérapeutique	Nocivité*	
ES	-	++	+++	++	+++
iPS	+++	++	+++	++	+
CSH	+	+	+	+	-
CSM	++	+++	++	+	-

Tableau 2 : Tableau comparatif des avantages et des contraintes liées à l'utilisation de cellules souches à visée thérapeutique allant de leur capacité d'isolement et de culture *ex vivo* à différents aspects de leur utilisation clinique. Pour chaque critère, le meilleur compromis apparaît en gris. Nocivité* : tumorigénèse, stabilité génétique, senescence, réactions immunitaires.

2. La culture cellulaire à grande échelle.

2.1. Aspects généraux.

Bien que la culture 2D réalisée en boîtes de culture soit largement utilisée dans l'amplification de cellules adhérentes, son utilisation est vite limitée lorsqu'une quantité plus importante de cellules est requise du fait du nombre de boîtes nécessaires. En plus d'être coûteuse et fastidieuse, cette technique conduit à un environnement cellulaire hétérogène selon la boîte, ainsi qu'à une augmentation des risques de contamination par le manipulateur. Deux alternatives à la culture en boîte ont été développées : les "cell stacks" et les "roller bottles" [57]. Sous forme de gratte-ciel, les "cell stacks" permettent d'augmenter significativement la surface de culture jusqu'à 25 440 cm². Cependant, une hétérogénéité de l'environnement est observée selon l'étage dans lequel les cellules se trouvent, notamment au niveau des échanges gazeux. Développés dans les années 30, les "rollers bottles" permettent une augmentation de surface jusqu'à 350 000 cm². Sous agitation, ce système permet d'éviter l'agrégation des cellules observée dans les boîtes et les "cell stacks", ainsi qu'une augmentation des échanges gazeux.

Bien que ces deux systèmes limitent considérablement les coûts et les risques de contamination, l'absence d'un suivi des paramètres physicochimiques tels que le pH ou la quantité d'oxygène dans le milieu, représente une limite commune à l'utilisation de ces outils et les bioréacteurs sont maintenant les systèmes les plus utilisés en industrie.

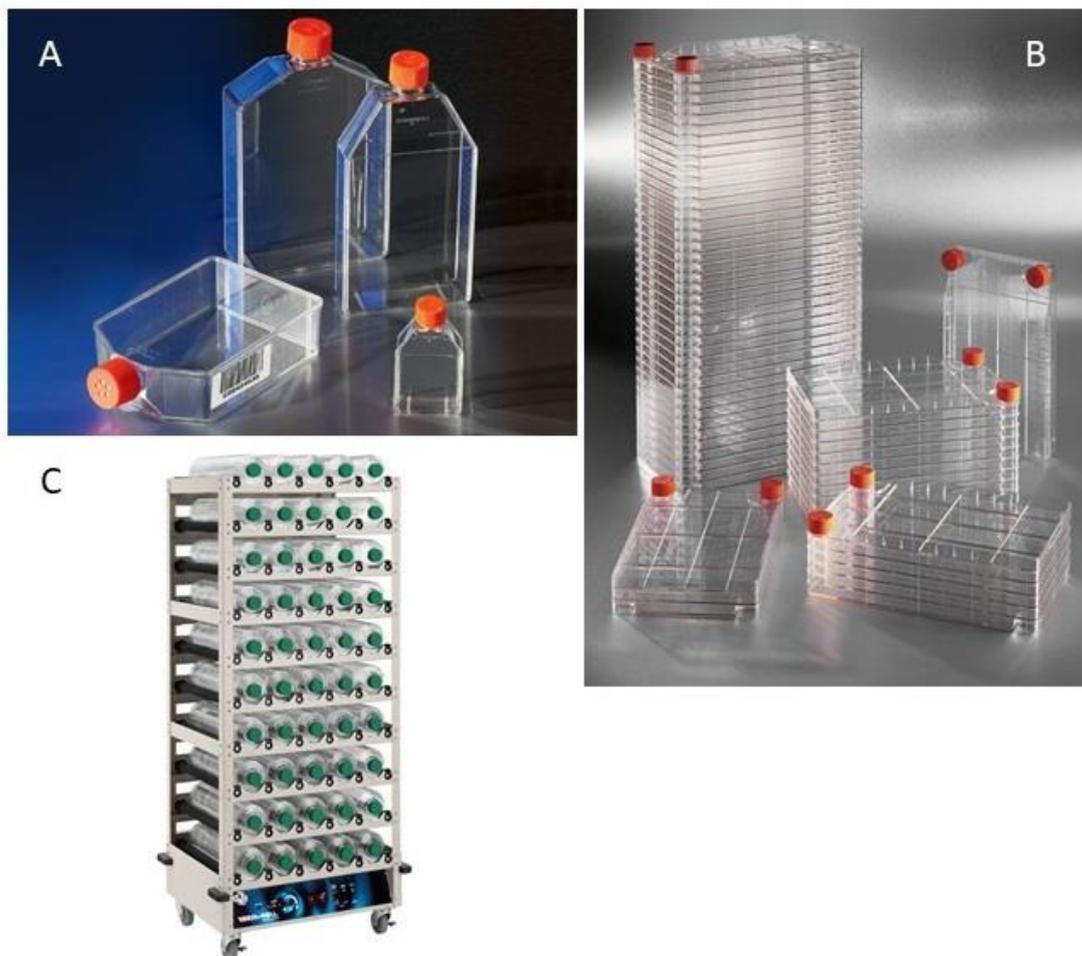


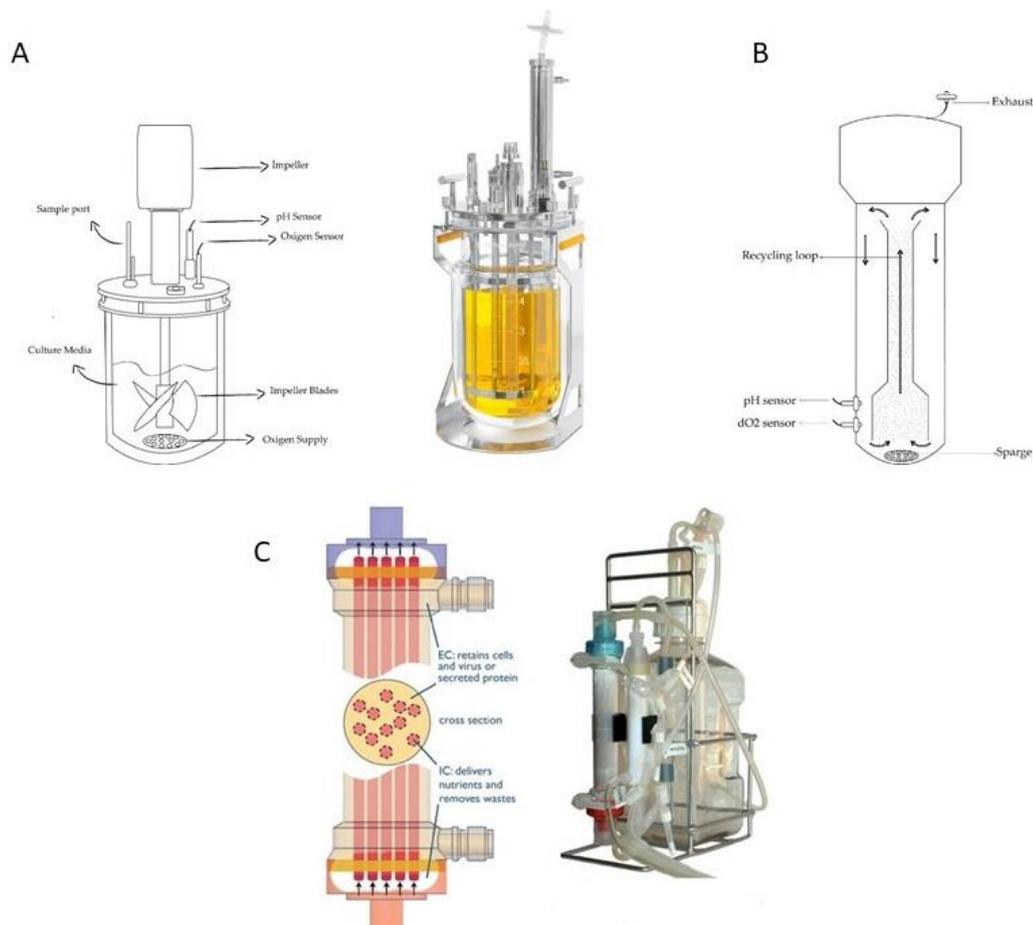
Figure 14 : Représentation des T-flasks Corning® (A), CellSTACK® Corning® (B) et du Roller Bottle Versa-Roll (C) utilisés dans l'amplification cellulaire.

2.2. Les bioréacteurs.

2.2.1. Introduction.

Historiquement, la production de bière ou de fromage, qui fait appel à un mélange de microorganismes dans une réaction appelée fermentation, est le premier procédé de bio fabrication ayant été développé [58]. Durant la première partie du 20^{ème} siècle, les bioprocédés ont principalement été utilisés dans la production de métabolites tels que les acides aminés, les molécules organiques ou les antibiotiques. L'émergence de nouvelles biotechnologies permet aujourd'hui la production de molécules très complexes, telles que des protéines. Le principe repose sur l'intégration d'un gène codant pour une protéine d'intérêt dans une cellule productrice, qui va être sélectionnée puis amplifiée. Une fois produite, cette protéine, dite recombinante, est récupérée puis purifiée. Ainsi l'insuline, molécule très complexe, a été produite sous forme recombinante dès 1976 par l'entreprise Genentech. Cependant, les rendements étant très faibles, une quantité importante de cellules productrices est nécessaire à l'obtention de rendements adéquats. Dans cette optique, des systèmes d'amplification cellulaire tridimensionnels ont été développés, les bioréacteurs.

Les bioréacteurs sont composés de trois éléments principaux : le récipient, généralement retrouvé sous forme de cuve en verre ou en acier inoxydable, le système d'agitation et le système de capteurs. Ces derniers, sous forme de sondes, vont permettre la mesure et la régulation du pH, de la température et de la concentration en O₂ ou en CO₂. Aujourd'hui, de nombreux types de bioréacteurs différents ont été développés, dont une liste non exhaustive vous est présentée dans la Figure 15.



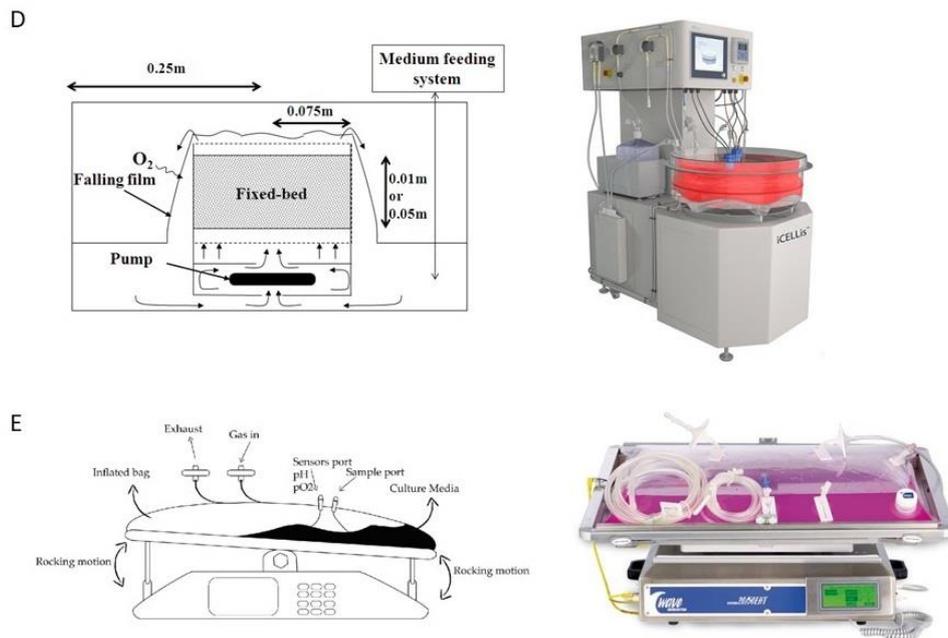


Figure 15 : Schémas explicatifs et images des principaux types de bioréacteurs utilisés en bio fabrication : Bioréacteur à hélice : UniVessel® (A), bioréacteur “airlift” (B), bioréacteur à fibres creuses : HF Primer™ (C), bioréacteur à lit fixe : iCELLis® (D), bioréacteurs à vague : WAVE Bioreactor™ (E). Schémas d’après les références [59].

Le bioréacteur à hélice est le premier type à avoir été développé. Son principal atout est sa versatilité. Il est adapté à la culture de cellules en suspension ou adhérentes sur microporteurs, il peut facilement être mis à l’échelle et être utilisé dans le cadre de procédés de perfusion. De plus, sa méthode d’agitation permet une grande homogénéité de culture. Cependant, l’utilisation d’une hélice engendre un stress mécanique important pour les cellules, même si ce stress peut être limité par l’ajout de surfactant dans le milieu, ou en modifiant les paramètres d’agitation [60].

Afin de limiter ce stress mécanique, des alternatives tels que les bioréacteurs à vague ou les bioréacteurs “airlift” ont été développés. Dans les bioréacteurs “airlift”, l’agitation est induite par l’oxygénation, permettant une réduction significative du stress mécanique [60]. Cependant, la faible puissance d’agitation induit la formation d’une zone morte et donc une hétérogénéité du milieu de culture. À forte densité cellulaire, un stress considérable peut également être appliqué aux cellules, lorsque la taille des bulles d’air n’excède pas 2 mm de diamètre. Dans ce cas, les paramètres d’aération doivent être modifiés afin d’augmenter la taille des bulles.

Enfin, certains types de bioréacteurs impliquent l’immobilisation des cellules cultivées : c’est le cas du bioréacteur à lit fixe ou à fibres creuses. Dans ce dernier, les cellules sont cultivées dans un cylindre composé de fibres d’environ 200 μm de diamètre, alignées parallèlement. Les cellules sont cultivées entre les fibres. Le milieu de culture est acheminé via le lumen de ces fibres, permettant l’apport en nutriments, alors que les déchets cellulaires sont excrétés par ce même lumen. Ce système permet donc un renouvellement permanent du milieu de culture et l’accumulation d’une quantité pouvant aller jusqu’à 10^9 cellules/ml [60].

Parmi les principales molécules produites en bioréacteurs, sont notamment retrouvés les anticorps monoclonaux [61] tels que le rituximab, un anti-CD20 indiqué dans le traitement du lymphome non-Hodgkinien, le trastuzumab, un anti-HER2 utilisé contre le cancer du sein ou encore le nivolumab, un anti-PD1 indiqué dans le traitement du mélanome. Pour ces protéines complexes, comme pour la plupart des protéines recombinantes, la lignée cellulaire CHO (Chinese Hamster Ovary) est la principale cellule-hôte utilisée [62]. De nombreux travaux d’ingénierie cellulaire ont été réalisés

afin d'améliorer la production de protéines recombinantes en cellules CHO. La production de vaccins représente aussi une des applications majeures de la culture cellulaire en bioréacteur [63]. Développés dans les années 40, les premiers vaccins étaient développés dans des œufs de poule embryonnés. Bien que cette méthode de production soit encore utilisée aujourd'hui pour une trentaine de vaccins, la production en bioréacteurs représente une alternative de choix, notamment dans le cas d'épidémies où une production rapide et importante est nécessaire [63]. Enfin, une application plus récente des bioréacteurs est l'amplification de cellules souches à visée de thérapie cellulaire. Cet aspect sera développé dans le chapitre 3.

2.2.2. Les procédés de culture en bioréacteurs.

Dans le développement d'un procédé dédié à la production d'une molécule d'intérêt, il est fondamental de sélectionner :

- La lignée cellulaire la plus adaptée
- Le milieu de culture (notamment xeno-free)
- Le type d'agitation
- L'aération
- Le microporteur dans le cas des cellules adhérentes

Depuis la mise en place de l'initiative PAT (pour Process Analytical Technology) par la FDA en 2004, une attention particulière est portée à l'impact des paramètres de procédés de production (ou inputs) sur sa reproductibilité, sa performance, et sur la qualité du produit fini (output). En effet, l'influence de la saturation en air, du pH ou encore de la quantité de CO₂ dissous sur le métabolisme, la croissance et la viabilité des cellules, mais aussi sur la qualité du produit fini, peut-être analysé [61].

Dans le cas de procédés de production industrialisés, les volumes de culture peuvent aller jusqu'à plusieurs milliers de litres. Pour des raisons économiques, écologiques et logistiques évidentes, il est nécessaire de mettre au point les procédés à échelle réduite, ou "scale-down". Aujourd'hui, les bioréacteurs à hélice demeurent probablement les plus adaptés, puisque de nombreuses versions de volumes sont commercialisées et utilisées (Figure 16).



Figure 16 : Gamme de bioréacteurs Sartorius représentant des bioréacteurs à hélice de différents volumes.

Bien que la plupart des caractérisations et des validations de procédés soient aujourd'hui faites à petite échelle, la validation finale du procédé doit obligatoirement être réalisée dans le système de culture final. Au niveau réglementaire, 3 et 5 cultures preuves de concept doivent être réalisées aux Etats-Unis et en France respectivement pour que le procédé soit approuvé dans son utilisation.

Le suivi de culture en temps réel est aussi très important. Généralement réalisé suite à un prélèvement et à une mesure sur un appareil indépendant du bioréacteur, ce suivi permet le dosage de métabolites telles que le glucose, le lactate, la glutamine ou le glutamate. Cela évite l'accumulation des déchets métaboliques en adaptant le renouvellement de milieu (ou "feeding") [61]. En

comparaison avec les dosages biochimiques, les méthodes de spectroscopie ont plusieurs avantages. En premier lieu, elles ne nécessitent aucune modification ou altération de l'échantillon prélevé, ce qui permet la réutilisation de celui-ci. Via l'utilisation de sonde optiques, ces technologies peuvent être intégrées directement au bioréacteur, avantage considérable, notamment dans le cas de procédés continus (voir ci-après). Enfin, ces méthodes sont plus rapides que leurs homologues biochimiques [64].

Bien que les procédés de culture discontinus comme le "fed-batch" soient encore majoritairement utilisés en bio production, un autre système de culture, cette fois-ci continu, tend à prendre une place de plus en plus importante : la perfusion [65]. Le "fed-batch" consiste à rajouter manuellement du milieu de culture dans le bioréacteur, afin d'apporter les nutriments nécessaires à la croissance des cellules, mais aussi de limiter l'accumulation de déchets métaboliques délétères. Cette stratégie de culture demeure toujours la référence dans la production de nombreuses molécules d'intérêt. Cependant, l'ajout de milieu de culture conduit à une dilution de la biomasse et implique un temps de résidence du produit d'intérêt (métabolites, protéines, anticorps, virus...) aussi long que le procédé de production, pouvant altérer sa qualité et sa fonctionnalité, surtout dans le cas de produits instables. Dans, cette optique, le système de perfusion représente une alternative de choix (Figure 17) et de nombreuses molécules thérapeutiques actuellement sur le marché sont produites dans des bioréacteurs équipés de ce système, tels que l'abciximab (ReoPro®), l'infliximab (Remicade®), le golimumab (Simponi®) ou encore l'Interféron β -1a (Rebif®) [65].

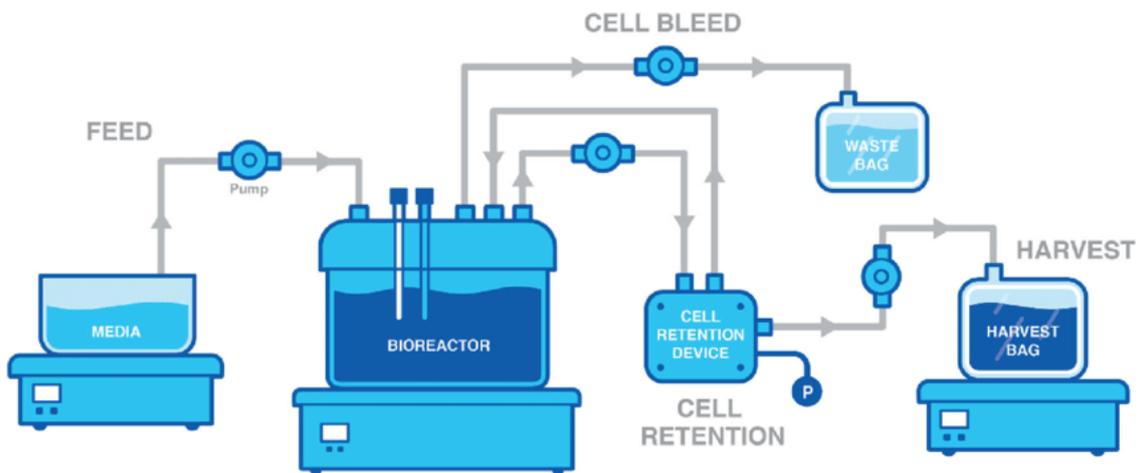


Figure 17 : Représentation du système de perfusion. Dans ce système, des flux entrant et sortant sont constamment appliqués. Ce système permet d'excréter de manière automatique le produit d'intérêt, mais aussi les déchets et les cellules lorsque celles-ci sont en trop grande quantité (cell bleed). De même, les nutriments nécessaires aux cellules sont constamment apportés (feed). Le dispositif de rétention cellulaire (cell retention device) permet de réintroduire dans le bioréacteur les cellules excrétées afin de maintenir une densité cellulaire adéquate. Deux dispositifs différents peuvent être utilisés : le TFF (pour tangential flow filtration) et l'ATF (pour alternating tangential flow). Ce second, via son flux alternatif, permet son auto-nettoyage, ce qui représente un avantage non négligeable. D'après Bausch et al. [66].

Bien que le système de perfusion soit une avancée importante, il présente quelques limites. En comparaison avec un système de "fed-batch", la quantité d'énergie nécessaire, la consommation d'eau, et l'émission de CO₂ sont nettement supérieures, même si le coût économique total est similaire entre ces deux procédés [67]. De plus, la perfusion nécessite une adaptation des milieux de culture et des lignées cellulaires utilisés. Enfin, sa mise à l'échelle est pour l'instant complexe, limitant son développement [65].

2.2.3. Les bioréacteurs à usage unique.

La production de molécules répondant au standard BPF nécessite une grande attention aux étapes de nettoyage, de stérilisation et de maintenance entre chaque production. Ces étapes, en plus

d'être laborieuses et longues, sont également coûteuses économiquement. Des bioréacteurs à usage unique ont donc été développés [68,69]. Apparue en 1996 avec le développement du bioréacteur à vague, de nombreux types de bioréacteurs à hélice et à lit fixe sont aujourd'hui développés sous ce format. Les bioréacteurs à usage unique permettent une réduction des risques de contamination, un gain de temps entre chaque culture, une réduction des coûts et de la qualification du personnel ou encore une baisse du temps nécessaire à un site de production pour devenir opérationnel [69]. Ce dernier aspect représente un avantage conséquent dans le cas de production de vaccins en contextes pandémiques [63]. Une filiale de l'entreprise Novavax, spécialisée dans la production de vaccins contre la grippe, n'utilise d'ailleurs que des bioréacteurs à usage unique. De plus, l'impact environnemental dû aux déchets plastiques semble être compensé par une importante réduction du coût énergétique liée à l'absence de nettoyage et de maintenance [69]. Enfin, les bioréacteurs à usage unique peuvent être développés sur des formats allant de l'ordre du millilitre, à plusieurs milliers de litres. L'utilisation de bioréacteurs à vague est même avantageuse puisqu'une gamme étendue de volumes peut être choisie en bloquant une partie du sac en début de culture [68]. Aucun transfert d'un bioréacteur à un autre n'est donc nécessaire en cours du procédé, ce qui limite les risques de contamination.

Cependant, bon nombre de producteurs sont toujours réticents à utiliser les bioréacteurs à usage unique dans leurs procédés. La principale raison à cela est le manque d'études sur les risques de contamination liés aux récipients utilisés pour la culture (composés extractibles et lessivables). Bien que celles-ci soient connues dans le cas des réacteurs en acier inoxydables, cela n'est pas forcément le cas pour les contenants en plastique. Il est donc fondamental de s'assurer que le récipient ne fixe aucun composant du milieu de culture et qu'au contraire, aucune substance provenant du sac, des capteurs ou des connecteurs ne soit libérée dans le milieu. Enfin, des obstacles restent à surmonter comme le développement de procédés de perfusion et l'étude de la stabilité à long terme des sacs dans le cas de cultures réalisées sur plusieurs semaines, voire plusieurs mois [68].

2.3. Le cas des cellules adhérentes : amplification sur microporteurs.

Dans de nombreux cas de bio production, les cellules utilisées sont adhérentes. C'est notamment le cas des cellules Vero ou MRC-5, utilisées dans la production de vaccins, ou des cellules souches utilisées en TC, comme les CSM [63]. Afin d'amplifier ces cellules dans des bioréacteurs, des biomatériaux microscopiques servant de supports d'adhérence et de prolifération ont été développés : les microporteurs.

Il s'agit de matrices, généralement sphériques, de diamètre allant de 100 à 300 μm . Les microporteurs permettent d'augmenter significativement la surface disponible pour les cellules pour un même volume de milieu comparativement à une boîte de culture. Cela engendre une réduction de l'espace de production et de stockage, de la manutention nécessaire à l'entretien du matériel et donc *in fine*, une réduction des coûts associés à l'amplification cellulaire. Ainsi, un gramme de microporteurs équivaut facilement à quinze flacons de 75 cm^2 [57].

Ce concept a pour la première fois été mentionné par Toon Van Wezel, un ingénieur Hollandais, qui a cultivé des fibroblastes sur des billes de Sephadex A-50 utilisées normalement en tant qu'échangeur d'ions [70]. Par la suite, plusieurs travaux ont eu pour but d'améliorer, de diversifier et d'étendre ce type d'outils de culture cellulaire [71]. Par exemple, à la fin des années 70, les travaux sur la diéthylaminoéthyle (DEAE) présente dans les Sephadex A-50 ont contribué à la création des microporteurs Cytodex® en 1981. À partir de 1986, les premiers microporteurs macroporeux ont été développés puis utilisés en bioréacteurs [71].

Aujourd'hui pléthore de microporteurs sont développés et commercialisés, caractérisés par différents paramètres (Figure 18).

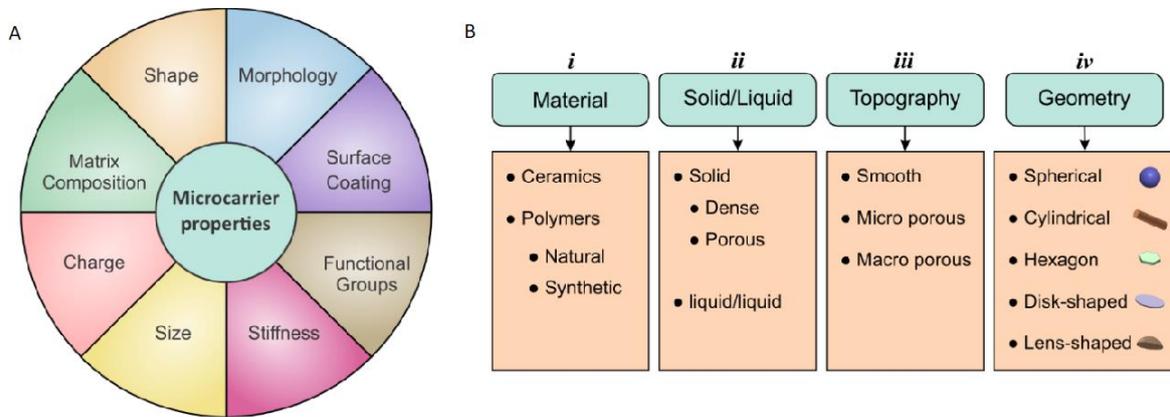


Figure 18 : Différentes caractéristiques (A) et classification (B) des microporteurs développés au niveau académique et industriel. Modifié d'après Tavassoli et al. [57].

Les polymères, d'origine naturelle ou synthétique, sont les principaux matériaux utilisés dans la synthèse de microporteurs. Parmi les composés naturels, sont retrouvés la gélatine, le collagène, la cellulose, le chitosane ou l'alginate. Concernant leurs homologues synthétiques, le poly(lactide-co-glycolide) ou PLGA), le poly(hydroxyethylmethacrylate) ou PHEMA, l'acrylamide, le polystyrène ou le polyuréthane sont utilisés [72]. Les problèmes liés à l'utilisation de ces différents polymères sont similaires à celles décrites pour les autres biomatériaux (voir chapitre 5). Les polymères synthétiques sont peu chers et faciles à synthétiser de manière reproductible, mais ils manquent cruellement de sites permettant l'adhérence et la croissance cellulaire, contrairement aux polymères naturels. Cette limite est contournée par l'incorporation de motifs de reconnaissance à la surface des microporteurs synthétiques. Ces fonctionnalisations sont pour certaines similaires à celles mentionnées pour les biomatériaux dans le paragraphe 5.1. et sont également décrites plus spécifiquement dans le cas de l'amplification de CSM dans le paragraphe 3.2.2.1. Il existe en fait un très grand nombre de microporteurs de différentes compositions, formes, porosités, fonctionnalisations, surfaces, ou charges. Une liste non exhaustive est présentée dans le Tableau 3.

2.3. Le cas des cellules adhérentes : amplification sur microporteurs.

Solid Microcarriers				
Microcarrier	Manufacturer	Matrix/Coating	Shape & Dimension (μm)	Charge, Surface area (cm^2/g), Density (g/ml)
Cytodex 1	GE Healthcare/ Amersham Biosciences	Crosslinked Dextran/DEAE (Tertiary amine)	Spherical/D 190 \pm 58	+, 4400, 1.03
Cytodex 2	Amersham Biosciences	Dextran matrix with N,N,N-trimethyl-2-hydroxyaminopropyl groups	Spherical/D 135-200	NA, 1.04
Cytodex 3	GE Healthcare	Crosslinked Dextran/denatured porcine-skin collagen	Spherical/D 175 \pm 36	No charge, 2700, 1.04
Hillex [®]	SoloHill	Dextran/Cationic trimethyl ammonium	Spherical/D 160-180	+, NA, 1.11
Biosilon	Nunc	Polystyrene/None	Spherical/D 160-300	No charge, 255,
Collagen	SoloHill	Polystyrene/Type I porcine collagen (gelatin)	Spherical/D 125-212	No charge, 480, 1.02
Glass	SoloHill	Cross-linked polystyrene/High silica glass	Spherical/D 125-212	No charge, 360, 1.02
Plastic	SoloHill	Polystyrene/None	Spherical/D 125-212	No charge, 480, 1.02
PlasticPlus	SoloHill	Polystyrene/None	Spherical/D 125-212	+, 480, 1.02
Synthemax [®] II	Corning	Polystyrene conjugated with peptide/carboxylic acrylate conjugated with vitronectin peptide	Spherical/D 125-212	No charge, 360, 1.02
FACT III (FACT 102-L)	SoloHill	Polystyrene/Type I porcine collagen (gelatin)	Spherical/D 169 \pm 44	+, 480, 1.02
CGEN 102-L	Thermo Scientific	Polystyrene/Type I porcine collagen	Spherical/D 169 \pm 44	1.02
Hillex II-170	Thermo Scientific	Polystyrene/Triethylamine	Spherical/D 170 \pm 10	+, NA, 1.12
P Plus 102-L	Thermo Scientific	Polystyrene/None	Spherical/D 169 \pm 44	+, NA, 1.02
ProNectin [®] F (Pro-F 102-L)	SoloHill (Thermo Scientific)	Polystyrene/Recombinant fibronectin	Spherical/D 169 \pm 44	No charge, 480, 1.02
Hillex [®] CT	SoloHill	Polystyrene/Cationic trimethyl ammonium	Spherical/D 160-180	+, 515, 1.1
2D MicroHex	Nunc TM	Polystyrene/Tissue culture treated	Hexagon/L 125 \times W 25	Unspecified, 360, 1.05
SphereCol [®]	Advanced BioMatrix	Polystyrene/Type I human collagen (VitroCol [®])	Spherical/D 125–212	No charge, 1.03
Tosoh 65 PR	Tosoh Bioscience	Hydroxylated methacrylate/Protamine sulfate (cationic peptide)	Spherical/D 65 \pm 25	NA, 4200,
Tosoh 10 PR (TSKge1 Tresyl-5PW)	Tosoh Bioscience	Hydroxylated methacrylate/Protamine sulfate (cationic peptide)	Spherical/D 10	NA, 9000, NA
DE-52	Whatman TM	Cellulose/DEAE (Tertiary amine)	Cylindrical/L 130 \pm 60 \times D 35 \pm 7	+, 6800, 0.9
DE-53	Whatman TM	Cellulose/DEAE (Tertiary amine)	Cylindrical/L 130 \pm 60 \times D 35 \pm 7	+, 6800, 1.1
QA-52	Whatman TM	Cellulose/Quaternary ammonium	Cylindrical/L 130 \pm 60 \times D 35 \pm 7	+, 6800, 1.2
CM52	Whatman TM	Cellulose/Carboxymethyl	Cylindrical/L 130 \pm 60 \times D 35 \pm 7	+, 6800, NA
RapidCell	MP Biomedical	Glass/None	Spherical/D 150-210	No charge, 325,
G2767	Sigma Aldrich	Glass/Uncoated	Spherical/D 180 \pm 30	NA, NA, 1.03
G2517	Sigma Aldrich	Glass/Uncoated	Spherical/D 120 \pm 30	NA, NA, 1.03
G2892	Sigma Aldrich	Glass/Uncoated	Spherical/D 120 \pm 30	NA, NA, 1.04
Macro Porous Microcarriers				
Microcarrier	Manufacturer	Matrix/Coating	Shape & Dimension (μm) pore size (μm)	Charge, Surface area (cm^2/g), Density (g/ml)
Cultispher-G	Percell Biolytica (Hyclone) (Thermo Scientific)	Type I porcine Gelatin/None	Spherical/D 255 \pm 125	10–20 No charge, 40000, 1.04
Cultispher- S	Percell Biolytica (Thermo Scientific)	Gelatin/None	Spherical/D 255 \pm 125	10–20 No charge, 7500, 1.04
Cultispher- GL	Percell Biolytica (Thermo Scientific)	Gelatin/None	Spherical/D 255 \pm 125	50–70 NA, NA, 1.04
Cytopore 1, 2	GE HealthCare	Cross-linked cotton Cellulose/DEAE (Tertiary amine)	Spherical/D 240 \pm 40	30 +, 11000, 1.03
Fibra-cel	New Brunswick TM	Polyester non-woven fibre and polypropylene/None	Disk-shape/6000	NA NA, 120, NA
ImmobaSil FS, D, HD	Ashby Scientific	Silicone (HD+316L stainless steel)	800 \times 300 (FS, HD), 1000 \times 1000 (D)	50 \times 150 NA, NA, NA,
Microsphere Siran	Cellex Schott Glasswerke	Collagen/None Glass/None	500–600, 300–5000	20–40 NA, NA, NA, 10–400 NA, NA, NA,
Weighted				
Cytoline 1, 2	GE Healthcare/ Amersham Biosciences	Polyethylene and silica/None	Lens-shape/L 2.1 \pm 0.4 mm, W 0.75 \pm 0.35 mm	10–400 -, NA, 1.32

Tableau 3 : Microporteurs commerciaux classés selon leurs différentes propriétés et caractéristiques. D'après Tavassoli et al. [57].

Concernant leurs propriétés physiques, les microporteurs peuvent être divisés en deux catégories : les microporteurs solides et les microporteurs liquides. Dans un système utilisant les microporteurs liquides, une interface entre le milieu de culture, hydrophile, et un liquide hydrophobe est créée. Les perfluorocarbones, connus pour leur non-toxicité et leur capacité à fixer l'oxygène, sont utilisés en tant que liquides hydrophobes. Les cellules vont adhérer et se développer à cette interface. Pilarek *et al.* ont développé une interface de DMEM et de perfluorodécane (PFD) sur laquelle les cellules adhérentes A431, BHK-21, et C2C12 ont pu se développer [73]. Plus récemment, des CSM issues de moelle osseuse ont été cultivées à l'interface DMEM–FC40, un autre perfluorocarbène [74]. Même si une réduction de croissance cellulaire est observée en comparaison avec des conditions classiques de culture 2D, ces interfaces liquides-liquides ont l'avantage d'être facilement extensibles, de ne nécessiter aucune enzyme de dissociation pour la récupération des cellules et de ne pas être

limitées par le phénomène de confluence classiquement observé sur une surface solide [72]. Ces microporteurs liquides restent néanmoins bien moins utilisés que leurs homologues solides.

Selon leur topographie, les microporteurs peuvent être caractérisés de lisses, microporeux ou macroporeux [57]. Les microporteurs poreux ont l'avantage d'augmenter leur ratio surface-volume tout en protégeant les cellules des potentiels stress mécaniques appliqués par le bioréacteur. Cependant, un transport limité des nutriments et de l'oxygène et une accumulation des déchets métaboliques à l'intérieur de ces pores affectent la viabilité cellulaire. De plus, les cellules sont plus difficilement récupérables.

Enfin, les microporteurs peuvent être classés selon leur géométrie ou leur forme (Figure 19).

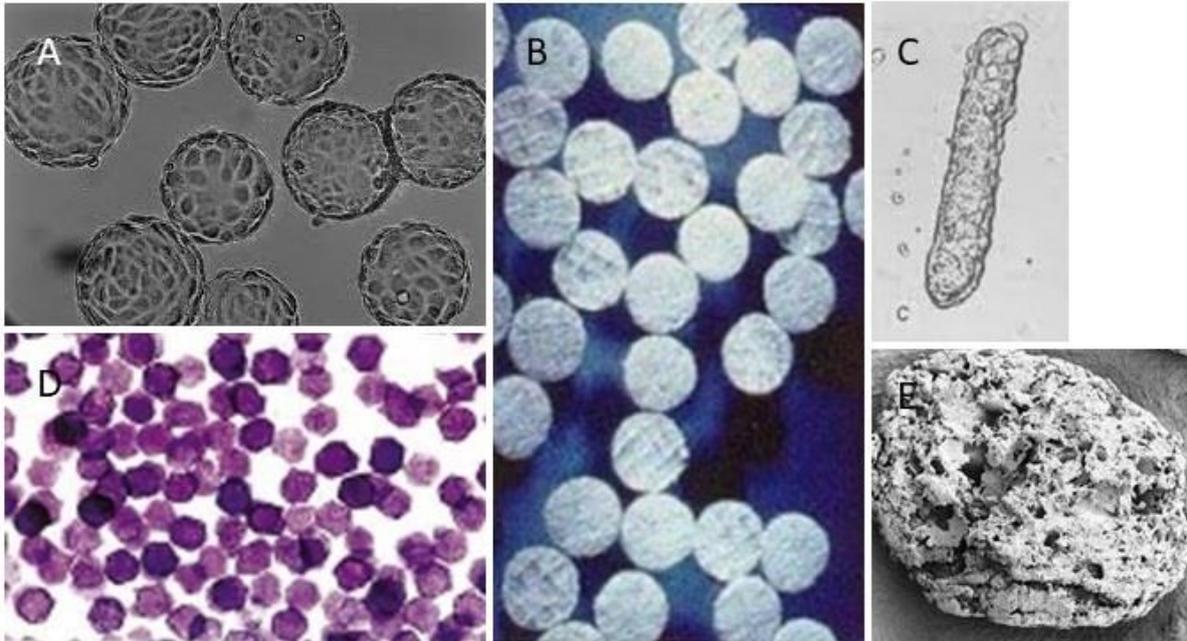


Figure 19 : Microporteurs de différentes formes : Cytodex 1 (GE Healthcare) de forme sphérique (A), Fibra-Cel (New Brunswick™) de forme disque (B), DE52 (Whatman™) de forme cylindrique (C), 2D MicroHex (Nunc™) de forme hexagonale et Cytoline 1 (GE Healthcare) de forme lentille (E).

Même si la plupart des microporteurs sont de forme sphérique, plusieurs études ont testé d'autres types de microporteurs. Par exemple, les microporteurs Fibra-Cel® ont été utilisés pour l'amplification de cellules Vero et la production de vaccin antirabique [75]. En comparaison avec une culture sur microporteurs sphériques Cytodex 1, une augmentation de la concentration cellulaire et du titre viral a été observée. Chen *et al.* ont quant à eux évalué la croissance d'ES sur 10 microporteurs différents dont les microporteurs cylindriques DE52, DE53, QA52 et CM52. Bien qu'une bonne capacité d'adhérence des cellules ait été observée sur ces microporteurs, un coating par du Matrigel® ou de la Laminine a cependant été nécessaire afin d'augmenter la croissance des cellules, mais également afin de maintenir leur caractère pluripotent. En présence de Matrigel®, un meilleur rendement cellulaire a été observé sur les microporteurs cylindrique et Cytodex 1 et 3, en comparaison avec des microporteurs sphériques de faible diamètre (Tosoh 65 PR et Tosoh 10 PR), ou macroporeux (Cytopore 2) [76].

De nombreux types de cellules animales adhérentes ont déjà été amplifiés sur microporteurs, qu'il s'agisse de cellules mammifères, aviaires, insectes, de cellules transformées ou dérivées telles que les iPS, ou encore tumorales [72]. Au-delà du bioréacteur à hélice, d'autres types de bioréacteurs tels que le bioréacteur à vague ou le bioréacteur à lit fixe peuvent être associés au microporteurs. Les microporteurs sont aussi utilisables en "roller bottles" ou en "spinner flasks". Enfin, la plupart des cellules, à l'exception notable des fibroblastes humains ou des hépatocytes, étant capables de se

transférer d'un microporteur à l'autre, il est possible, par l'ajout de milieu frais contenant de nouveaux microporteurs, de réaliser une extension de la culture lorsque l'on travaille en bioréacteur. [57,72].

Cependant, quelques défis restent encore à relever, en particulier le décollement des cellules en fin de culture. De plus, dans le cas des microporteurs sphériques, leur surface incurvée peut être limitante dans la capacité d'adhérence et de croissance des cellules. Par exemple, les CSM qui sont des cellules de grande taille, requièrent un diamètre de 150 μm au moins pour s'étaler. Enfin, influencer le potentiel thérapeutique des cellules souches en modifiant les caractéristiques intrinsèques des microporteurs sera d'un impact majeur dans le domaine des biothérapies dans les années avenir [57,72].

3. L'amplification des CSM à grande échelle.

3.1. Introduction.

Selon le patient et la pathologie traitée, la quantité de CSM nécessaire peut être très importante, pouvant atteindre 10^9 cellules par patient (Figure 20). Or, 10^6 CSM environ sont obtenues suite au prélèvement de 200 ml de tissu adipeux [77]. Afin d'obtenir une quantité de cellules suffisante pour la thérapie, une étape d'amplification de 10^2 à 10^3 fois est donc nécessaire, ce qui peut altérer le génotype et le phénotype des cellules [78]. Il est donc nécessaire d'adapter les méthodes de culture cellulaire à grande échelle aux CSM, afin de généraliser leur utilisation.

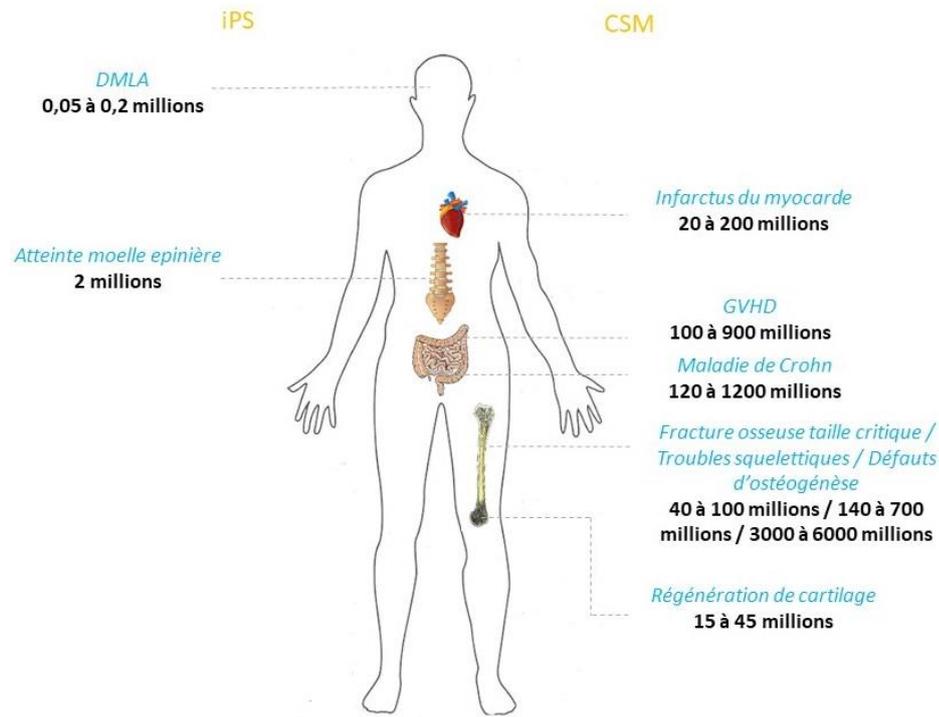


Figure 20 : Quantité de cellules souches nécessaires par patient selon la pathologie traitée. Les chiffres sont donnés en fonction du type de cellules utilisées : iPS ou CSM. Modifié d'après Tavassoli et al. [57].

3.2. Adaptation des procédés de culture pour l'amplification des CSM.

Ce chapitre présente de manière non exhaustive, les différents travaux ayant été réalisés afin d'adapter les paramètres de culture à l'amplification spécifique de CSM, et de caractériser leurs effets sur les cellules amplifiées.

3.2.1. Développement de nouveaux milieux de culture.

Généralement, les CSM sont cultivées dans du milieu DMEM supplémenté en sérum de veau fœtal (SVF), aujourd'hui reconnu comme potentiel vecteur de diverses pathologies. Malgré cela, près de 80% des essais recensés en 2014 utilisaient encore ce SVF comme supplément dans des procédés d'amplification des CSM à usage thérapeutique [79]. Cependant les formats BPF tendent à évoluer vers l'interdiction de ces sérums xénogéniques. Des alternatives au SVF pour l'amplification des CSM ont donc été développées. Deux axes de recherches sont étudiés : le criblage de nouveaux milieux de cultures et le test de nouveaux suppléments en remplacement du SVF.

3.2.1.1. Criblage de nouveaux milieux de culture.

Plusieurs milieux de culture “xeno-free” ont été développés (Tableau 4).

Milieu de culture	Fournisseur	Effet observé	Référence
StemPro MSC SFM™	Invitrogen	↓ Adaptation CSM ≈ Morphologie CSM = / ↓ Différenciation CSM ≈ Expression marqueurs phénotypiques = Capacité immunomodulatrices	[80,81]
TheraPEAK™ MSCGM-CD™	Lonza	↓ Adaptation CSM ≈ Morphologie CSM ≈ Expression marqueurs phénotypiques = / ↓ Différenciation CSM = Capacité immunomodulatrices	[80,81]
BD Mosaic™	BD Biosciences	= Adaptation CSM ≈ Morphologie CSM = / ↑ Prolifération CSM = Différenciation CSM ≈ Expression marqueurs phénotypiques = Capacité immunomodulatrices	[80,81]
MesenCult™-XF	Stemcell technologies	↑ Adaptation CSM ↑ Amplification ASC = Amplification CSM ≈ Morphologie CSM et ASC ≈ Expression marqueurs phénotypiques CSM et ASC = Différenciation ASC = / ↓ Différenciation CSM ↑ Différenciation adipogénique et ostéogénique ASC ↑ Senescence CSM = Capacité immunomodulatrices	[80–82]
Xuri™ MSC Medium	GE Healthcare	↓ Prolifération CSM ↓ Formation colonie CSM ≈ Expression marqueurs phénotypiques	[83]

Tableau 4 : Représentation de plusieurs milieux de culture utilisés pour l'amplification de CSM en condition “xeno-free” et de leur effet sur les cellules. ↓ : baisse ou moins bon ; ↑ : augmente ou meilleur ; = : égal ; ≈ : légère variation. Les effets ont été observés en comparaison avec les milieux DMEM 10% SVF [80–82] ou α-MEM 10% SVF [83].

Le milieu MesenCult™-XF apparaît comme l'une des alternatives les plus crédibles aux milieux de culture classiques, notamment pour l'amplification d'ASC. Cependant et même si ce milieu semble aussi être une bonne alternative pour la culture de CSM issues de moelle osseuse, des variations ont été observées au niveau de la capacité de différenciation des cellules, ainsi que de leur sénescence. Même si de telles différences peuvent être dues aux propriétés intrinsèques de ces différents types de CSM [84], et de leurs donneurs respectifs, une grande attention doit être portée au choix de milieu utilisé, pour un type de CSM particulier ou encore pour une application thérapeutique particulière.

3.2.1.2. Test de nouveaux suppléments en remplacement du SVF.

De nouveaux suppléments, généralement d'origine humaine, ont aussi été évalués en remplacement du SVF. Parmi ceux-ci : le lysat plaquettaire (Figure 21) [85,86], le sérum humain [86,87], ou encore le plasma de sang de cordon ombilical [88].

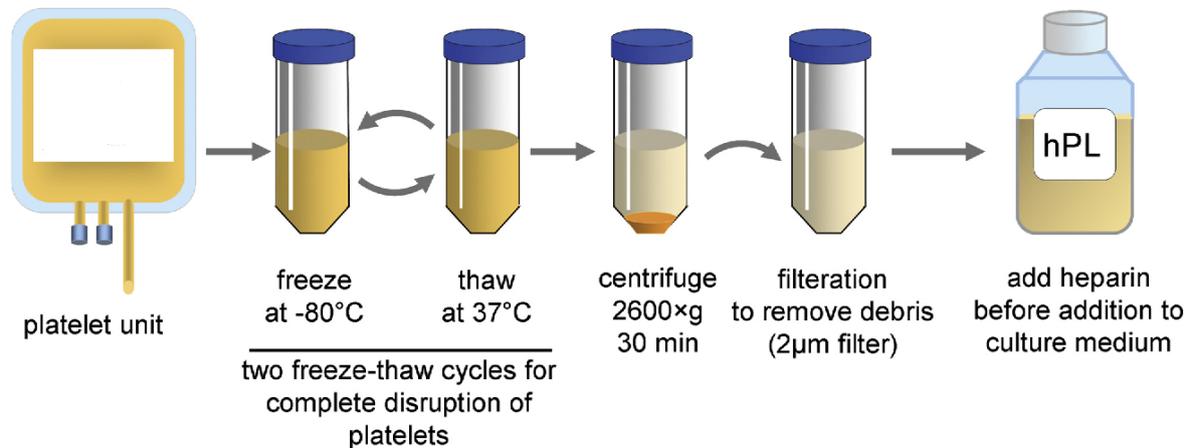


Figure 21 : Isolement de lysat plaquettaire à partir d'une unité plaquettaire. Le lysat plaquettaire est obtenu par de multiples cycles de congélation/décongélation et de centrifugation. D'après Hemedda et al. [89].

Le supplément le plus adéquat pour la culture de CSM semble être le lysat plaquettaire (LP). Une étude comparative a démontré que la supplémentation du milieu de culture en LP engendrait une meilleure croissance cellulaire que lors d'une supplémentation en sérum humain (SH) ou en SVF [86]. De plus, en ajoutant différents facteurs (hormones, lipides, chimiokines ou facteurs de croissance), une diminution du taux de LP jusqu'à 1,2% a été réalisée sans affecter la prolifération des CSM. Le remplacement du SVF en LP n'engendre aucune modification notable de l'ADN et n'induit pas de sénescence chez les cellules [85]. Cependant, suite à la culture des cellules en milieu supplémenté par 10% de LP, une réduction des capacités immunomodulatrices des CSM a été observée [90]. Enfin, le LP a été utilisé en cultures sous grade BPF [91]. Les cellules ont conservé leurs caractéristiques phénotypiques, leur capacité de différenciation et leur potentiel d'immunomodulation. Ces résultats démontrent qu'une supplémentation de milieu basal en LP pourrait être transposable cliniquement, dans le cadre de thérapie cellulaire, même si une attention particulière devra être portée à la fonctionnalité, et notamment à la capacité d'immunomodulation des CSM.

Malgré des résultats moins prometteurs, le SH représente également une alternative intéressante au SVF pour une culture à destination clinique. Par exemple, le SH a été utilisé pour une amplification en "spinner flasks" puis en bioréacteur dans des conditions totalement "xeno-free" [87]. Une bonne croissance cellulaire a été observée et les CSM ont conservé leur capacité d'immunomodulation et de différenciation. De plus, et bien qu'une augmentation d'expression du HLA-II ait été observée, les CSM cultivées en milieu DMEM-SH n'ont démontré aucune immunogénicité. Enfin, une cryopréservation prolongée jusqu'à 12 mois de ce sérum SH semble possible, sans pour autant altérer ses propriétés [92], ce qui représente un réel avantage logistique pour une utilisation clinique en routine.

Plus récemment, une équipe s'est intéressée à un nouveau type de complément, le plasma sanguin de cordon ombilical humain (hUCBP) [88], dont la composition au niveau moléculaire a été comparée à celle du SVF (Figure 22).

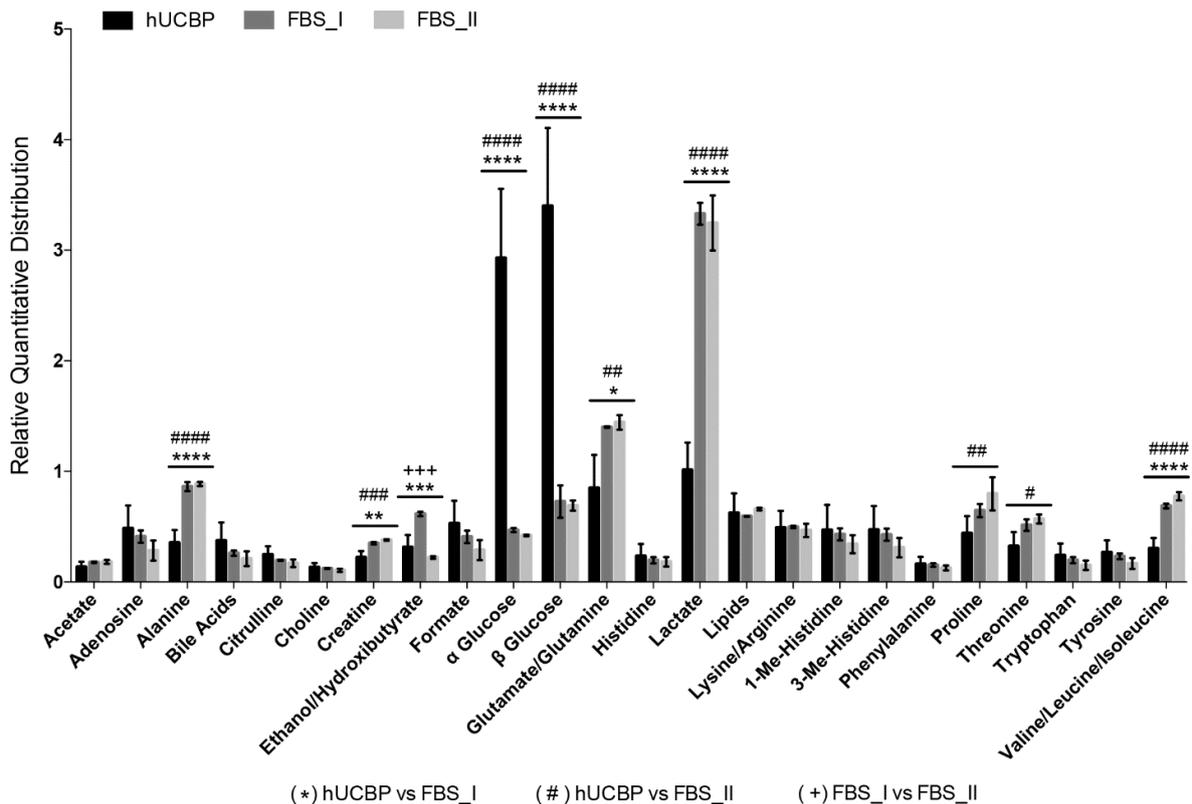


Figure 22 : Composition moléculaire de l'hUCBP et de deux lots de SVF différents. Ces compositions ont été déterminées par spectroscopie NMR. Concernant les différences notables, une plus grande quantité de glucose et une plus faible quantité de lactate sont observées dans l'hUCBP. D'après Caseiro et al. [88].

Ce supplément a été testé pour l'amplification de CSM issues de cordon ombilical et de pulpe dentaire. Des différences de prolifération cellulaire ont été observées suivant l'origine des cellules et de la concentration en hUCBP dans le milieu. Ainsi, une concentration optimale en hUCBP de 4 et 6% a été déterminée pour les cellules issues de cordon ombilical et de pulpe dentaire respectivement. En comparaison avec une culture en milieu supplémenté en SVF, les cellules ont conservé l'expression de leurs marqueurs de surface spécifiques ainsi qu'un même taux de cellules sénescences. Cependant, une augmentation de l'apoptose concentration-dépendante a été observée dans le cas d'une culture en hUCBP, quelle que soit l'origine des cellules. Une baisse de la capacité de différenciation ostéogénique a également été observée. Bien que ces derniers résultats soient contradictoires avec ceux obtenus par Ding *et al.* [93], ce type de supplément semble donc moins adapté à l'amplification de CSM *in vitro*.

Pour conclure, même si le LP semble être le plus efficace, l'ensemble des autres suppléments permettent la croissance des CSM *in vitro*, de manière comparable si ce n'est plus efficace que le SVF. Les aspects logistiques (temps d'isolement et de conservation des suppléments), éthiques (isolement à partir de sang humain, prélèvement chez le veau fœtal ou à partir de cordon ombilical) et économique (prix de ces suppléments en comparaison avec les milieux xeno-free ou le SVF) seront également à prendre en compte dans le choix du milieu de culture utilisé pour une future utilisation clinique à grande échelle.

3.2.2. Les microporteurs utilisés pour l'amplification des CSM.

Plusieurs microporteurs commerciaux ont été testés pour l'amplification des CSM. Schop *et al.* ont comparé la capacité d'adhérence de CSM de moelle osseuse sur 9 microporteurs différents et ont montré que les microporteurs Cytodex 1 étaient les plus performants [94]. Dans une étude plus récente réalisée en "spinner flask", ce sont les microporteurs Plastic de SoloHill qui sont apparus comme les plus adaptés [95]. Afin d'optimiser les microporteurs utilisés, il apparaît cependant

essentiel de tenir compte de l'environnement dans lequel évoluent normalement les CSM. *In vivo*, elles se développent dans des parties bien spécifiques de notre organisme appelées niches. Ces niches sont composées principalement de matrice extracellulaire (MEC), de cellules de soutien, de neurones et de vaisseaux sanguins (Figure 23). Ces niches représentent un microenvironnement qui va contrôler la survie et le devenir des CSM. En effet, les nombreux facteurs et protéines de la MEC vont représenter un gradient de signaux physiologiques et mécaniques nécessaires à leur croissance, leur renouvellement, leur prolifération, leur migration et leur différenciation. Ces signaux sont aujourd'hui connus et de nombreuses recherches ont été réalisées afin de créer des microporteurs les mimant.

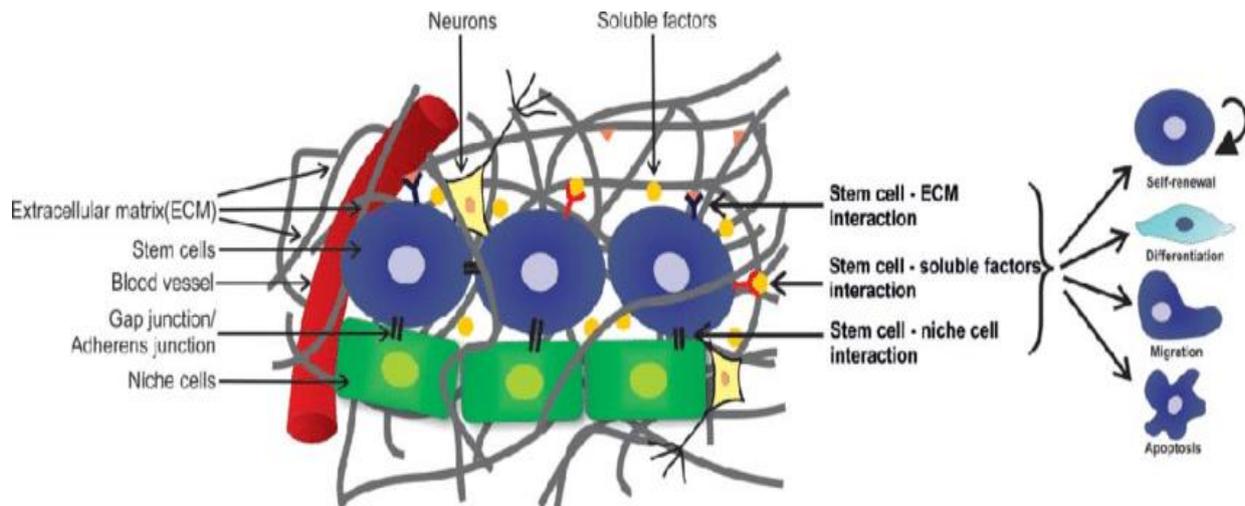


Figure 23 : Représentation d'une niche de cellules souches, de ses composants et de son impact sur la physiologie des cellules. D'après Jhala et Vasita [96]

3.2.2.1. Fonctionnalisation des microporteurs.

Une des manières de mimer le microenvironnement présent dans les niches des CSM est d'intégrer des composants de ce microenvironnement dans la matrice des microporteurs. Parmi ces composants, on retrouve notamment des facteurs solubles [97], souvent inducteurs de différenciation tels que la protéine BMP-2, impliquée dans la différenciation ostéogénique, ou encore le TGF- β , impliqué dans la différenciation chondrogénique des CSM. Lors d'une culture cellulaire à grande échelle, il n'est pas envisageable de diluer ces facteurs directement dans le milieu de culture et il est nécessaire de restreindre leur localisation à proximité des cellules. Ces facteurs peuvent donc être encapsulés dans des microporteurs biodégradables afin de permettre leur libération en cours de culture (voir paragraphe 3.2.4.2.1.). Une seconde méthode consiste à greffer directement ces facteurs à la surface des microporteurs ou des biomatériaux sur lesquels les cellules sont amplifiées.

Dans leur étude, Bertolo *et al.* ont notamment synthétisé des microporteurs de collagène fonctionnalisés avec du TGF- β [98]. Lors de leur culture sur ces microporteurs, les CSM ont démontré une expression accrue des gènes codants pour l'agrécan et le collagène de type 2. Une quantité plus importante de glycosaminoglycanes (GAG) a aussi été observée, traduisant la différenciation chondrogénique des cellules.

Associés à ces composants de la MEC, des matériaux, porteurs de charges ou non, peuvent aussi être intégrés aux microporteurs. Un des matériaux les plus utilisés pour l'amplification des CSM est l'hydroxyapatite (HAP) (Figure 24).

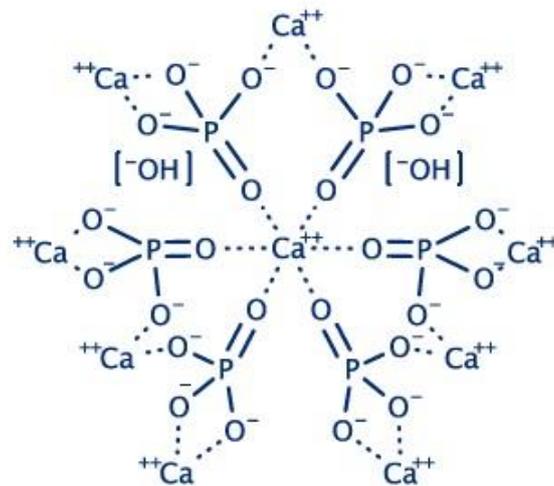


Figure 24 : Structure moléculaire de l'hydroxyapatite (HAP).

Le HAP, notamment associé au collagène, mais aussi à d'autres matériaux tels que le chitosane ou le poly-ε-caprolactone (PLC) a été étudié pour l'amplification de CSM *in vitro*, mais aussi dans des expérimentations de reconstruction osseuse *in vivo* [99]. Les résultats obtenus confirment que la présence de HAP dans le biomatériau ou le microporteur testé stimule la différenciation ostéogénique des CSM, que ce soit *in vitro* ou *in vivo*. Le HAP est naturellement présent dans plusieurs tissus, et notamment l'os dont il est le composant principal de la matrice minérale. Les CSM sont très sensibles aux différents signaux extra cellulaires de leur environnement et il est fort probable que lors de leur culture en présence de HAP, les CSM perçoivent des signaux analogues à ceux qu'elles reçoivent dans leurs niches osseuses, expliquant l'effet ostéoconducteur de ce matériau.

3.2.2.2. Propriétés mécaniques des supports.

Les niches dans lesquelles les CSM se développent produisent aussi un ensemble de signaux mécaniques, dont l'intégration va réguler le comportement de ces cellules. Afin d'inclure ces signaux mécaniques dans des matériaux tridimensionnels que sont les microporteurs, il est primordial de s'inspirer des résultats ayant été observés sur des supports 2D. Dès 2006, il a été démontré que selon la rigidité du support sur lequel les CSM sont cultivées, ces cellules sont guidées vers des phénotypes totalement différents (Figure 25).

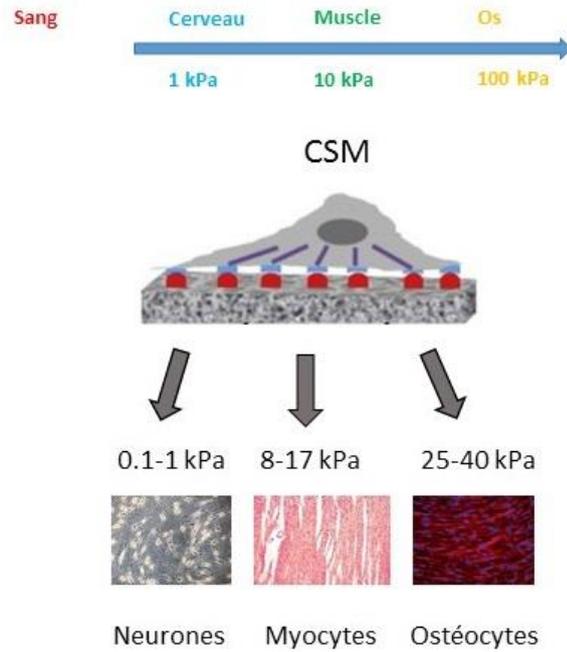


Figure 25 : Impact de la rigidité du substrat d'adhérence sur la différenciation des CSM. Les matrices de rigidités similaires à celles du cerveau ou du muscle vont engendrer respectivement une différenciation neuronale ou myogénique. Modifié d'après Engler et al. [100]

Notamment, la différenciation ostéogénique des CSM médiée par la rigidité du substrat semble être dépendante de l'activation de la voie de signalisation des MAP Kinases (MAPK) [101]. En effet, il a été montré que l'activation des protéines kinases ERK et JNK engendre la translocation nucléaire de la protéine TAZ (via un mécanisme qui reste à déterminer), connue comme étant un activateur de la différenciation ostéogénique des CSM et un répresseur de la différenciation adipogénique (Figure 26).

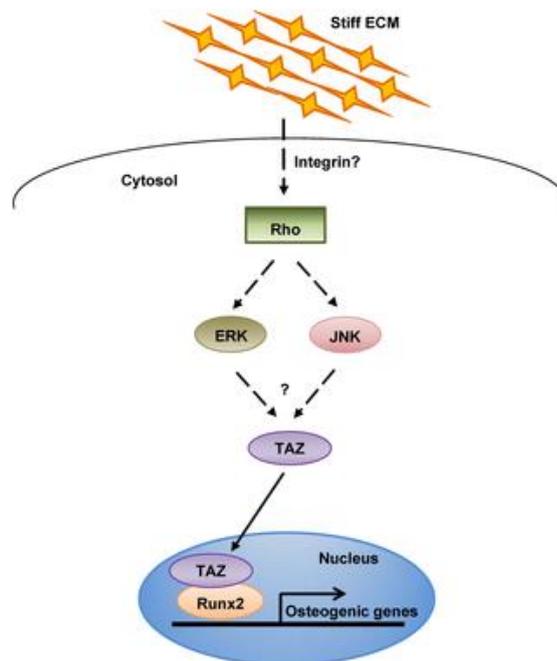


Figure 26 : Influence de la voie des MAPK dans le contrôle de la différenciation ostéogénique des CSM via la rigidité du substrat. D'après Hwang et al. [101].

Associée à YAP, la protéine TAZ serait également impliquée dans un effet mémoire permettant aux cellules de "conserver" les stimulations mécaniques perçues lors de leur culture sur substrat rigide [102]. Le complexe YAP/TAZ joue un rôle de senseur qui, via son accumulation nucléaire, permet de guider les cellules vers un phénotype ostéogénique en réponse à un substrat de forte rigidité (modules de Young supérieur 10 kPa). Suivant la concentration de complexe intranucléaire, ce signal peut être conservé lors d'une baisse de rigidité. Au contraire, Schellenberg *et al.* ont décrit un effet activateur transitoire qui est perdu suite au transfert des cellules en boîte de culture [103]. Cependant, dans cette seconde étude, le transfert nécessite une étape de décollement et de réensemencement des cellules. L'utilisation de substrats dont la rigidité pouvait être modifiée sans décrocher les cellules dans l'étude de Yang *et al.* [102] peut expliquer ces différences de résultats.

Parmi les acteurs impliqués dans cette mécano-transduction, les intégrines jouent un rôle central. En effet, un réarrangement important de l'expression des intégrines selon la rigidité du substrat a été observé. De plus, les CSM dont l'expression de l'intégrine $\beta 1$ a été inactivée ont démontré une perte de leur capacité de différenciation substrat-dépendante [104].

In vivo, l'effet de CSM associées à des hydrogels de différentes rigidité a notamment été étudié dans des modèles de traumatismes crâniens [105]. Ainsi, la capacité de régénération osseuse des CSM est significativement influencée par la rigidité du substrat (Figure 27). Une reconstruction "optimale" est obtenue dans le cas d'un hydrogel présentant une rigidité de 60 kPa, confirmant les résultats obtenus *in vitro*, puisque la différenciation ostéogénique des CSM est largement favorisée sur des substrats avoisinants une rigidité de 60 kPa.

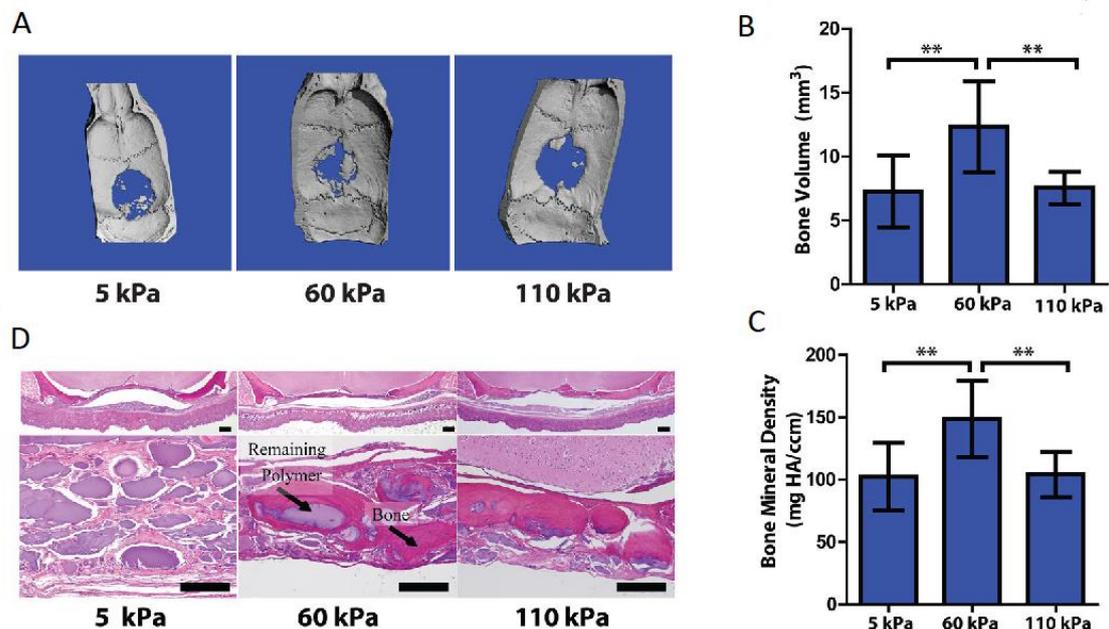


Figure 27 : Impact de la rigidité d'hydrogels sur leur capacité de reconstruction osseuse à 12 semaines *in vivo*. Microtomographie aux rayons X de la régénération osseuse selon la rigidité de l'hydrogel testé (A) ; Analyse quantitative du volume total (B) et de la densité minérale moyenne (C) de l'os régénéré selon la rigidité de l'hydrogel testé ; Analyse histologique de la formation osseuse ainsi que de l'hydrogel restant par coloration hématoxyline et éosine (D). Modifié d'après Huebsch *et al.* [105].

Récemment, un pas de plus a été fait en étudiant la mécano-transduction dans un environnement 3D. L'effet de structures 3D macroporeuses de différentes rigidités sur le phénotype des CSM a été étudié [106]. Ces recherches ont démontré qu'au-delà de la rigidité du substrat, d'autres stimuli mécaniques, comme ceux apportés par la porosité du support, pouvaient affecter la capacité de différenciation des CSM.

Enfin, la capacité de différenciation n'est pas le seul aspect fonctionnel des CSM modifié par l'environnement mécanique dans lequel ces cellules se trouvent. Une étude transcriptomique a démontré que la rigidité du support pouvait affecter la capacité d'immunomodulation des CSM [107]. Sur un hydrogel de 30 kPa, la stimulation inflammatoire des CSM par de l'INF- γ ou du TNF- α engendre une augmentation importante de l'expression des ARN codants pour IDO-1, COX-2 et SDF-1, trois immunomodulateurs, phénomène non observé sur un hydrogel de 3 kPa.

L'ensemble de ces études démontrent que la sensibilité des CSM à leur environnement mécanique est quelque chose d'extrêmement complexe. Certains des acteurs moléculaires impliqués dans la sensibilité des CSM à la rigidité de leur support ont pu être découverts. Cependant, afin de mettre à profit ces données pour la culture des CSM sur microporteurs, d'autres études devront être réalisées pour caractériser encore plus finement les différents stimuli mécaniques rencontrés par les cellules dans ce type d'environnement.

3.2.2.3. Tissus décellularisés.

Les travaux décrits ci-dessus ont principalement pour vocation de mimer l'environnement naturel des CSM. D'autres recherches ont eu pour objectif d'isoler directement la MEC à partir de différents tissus mammifères, notamment humain. Afin de minimiser tout effet indésirable dû aux composants allogéniques ou xénogéniques de ces tissus, ceux-ci sont, suite à leur isolement, traités afin d'éliminer l'ensemble de leurs composants cellulaires. Comme décrit par Gilbert *et al.*, ce procédé démarre généralement par une étape de lyse des membranes cellulaires. Puis les composants membranaires, cytoplasmiques et nucléaires ainsi que les débris cellulaires sont retirés de la matrice par une combinaison de traitements physiques, enzymatiques ou chimiques (Tableau 5).

Traitement	Mode d'action
Physiques	
Congélation rapide	Désorganisation des membranes cellulaires par les cristaux d'H ₂ O solides
Pression mécanique	Eclatement des cellules sous la pression
Agitation ou sonication	Peut causer la lyse cellulaire. Plutôt utilisées en association avec un traitement chimique
Chimiques	
Traitement acide ou basique	Solubilisation des composants cytoplasmiques et désorganisation des acides nucléiques
Détergent non ionique	
Triton X-100	Destruction des interactions lipides-lipides et lipides-protéines, maintien des liaisons protéines-protéines
Détergents ioniques	
Sodium dodecyl sulfate (SDS) Sodium déoxycholate Triton X-200	Solubilisation des membranes cytoplasmiques et nucléaires, potentielle dénaturation des protéines
Détergents zwitterioniques	
CHAPS Sulfobetaines 10 et 16	Possèdent à la fois les propriétés des détergents ioniques et non-ioniques
Autres	
Tri(n-butyl) phosphate	Destruction des liaisons protéines-protéines
Solutions hypotoniques et hypertoniques	Lyse des cellules par choc osmotiques
EDTA et EGTA	Chélation des ions bivalents nécessaires à l'interaction cellules-ECM
Enzymatiques	
Trypsine	Clivage des liaisons peptidiques
Endonucléases et Exonucléases	Hydrolyse des acides nucléiques

Tableau 5 : Liste de différents traitements physiques, chimiques et enzymatiques pouvant être combinés pour la décellularisation des tissus. Modifié d'après Gilbert *et al.* [108].

Les procédés de décellularisation peuvent affecter la composition et les propriétés mécaniques des matrices traitées. Pour chaque tissu, des protocoles adaptés ont été développés afin

de limiter le plus possible ces dommages. Ainsi, de nombreux types de tissus différents ont été décellularisés dans le cadre d'applications biomédicales, tels que les tissus cardiovasculaires, hépatiques, rénaux ou encore de vessie [108].

Le comportement de CSM a été testé sur des tissus adipeux décellularisés (DAT) issus de trois méthodes différentes [109]. La composition en collagène, en laminine, en facteurs de croissance VEGF et FGF β ou encore en GAG a par exemple été significativement affectée selon les protocoles réalisés. Même si les CSM cultivées sur ces différentes matrices ont toutes gardé leurs propriétés de différenciation adipogénique, ces variations de structures et de compositions pourraient potentiellement avoir un impact sur d'autres aspects fonctionnels de ces cellules.

Les DAT ont déjà été utilisés en tant que plateformes d'amplification sous forme de microporteurs. Les résultats obtenus montrent une meilleure prolifération des CSM cultivées sur des DAT en comparaison avec des microporteurs de gélatine. De plus, ces microporteurs DAT sont adipoinducteurs *i.e.* ils sont capables d'induire une différenciation adipogénique sans la présence de facteurs exogènes [110]. Enfin, ces microporteurs peuvent aussi être utilisés en tant que biomatériaux injectables, pour la délivrance de CSM *in situ*. L'utilisation de ces tissus décellularisés dans des processus de reconstruction tissulaire est prometteuse. Cependant, pour préserver leur structure mécanique et renforcer les protéines présentes, il est souvent nécessaire de passer par une étape de réticulation réalisée par des méthodes chimiques, enzymatiques ou physiques. Ces méthodes ont toutes des qualités et des défauts liés à leur efficacité, leur toxicité ou encore leur coût [108]. Récemment, une technique d'électrospray a été proposée pour la formulation de microporteurs de DAT [111]. Suite à une digestion des DAT par de l' α -amylase, les fibrilles de collagène obtenues sont introduites dans une solution d'azote liquide afin d'être pulvérisées, avec une grande reproductibilité, sous forme de sphères d'environ 430 μm de diamètre (Figure 28). Par la suite, des CSM ont été cultivées en "spinner flasks" sur ces microsphères en comparaison aux microporteurs industriels Cultispher-S. La capacité de prolifération des CSM est significativement supérieure sur les microporteurs DAT. De plus, les cellules récupérées en fin de culture ont conservé leurs capacités de différenciation adipogénique, ostéogénique et chondrogénique, démontrant la pertinence de l'utilisation de DAT sous forme de microporteurs, pour l'amplification de CSM à grande échelle.

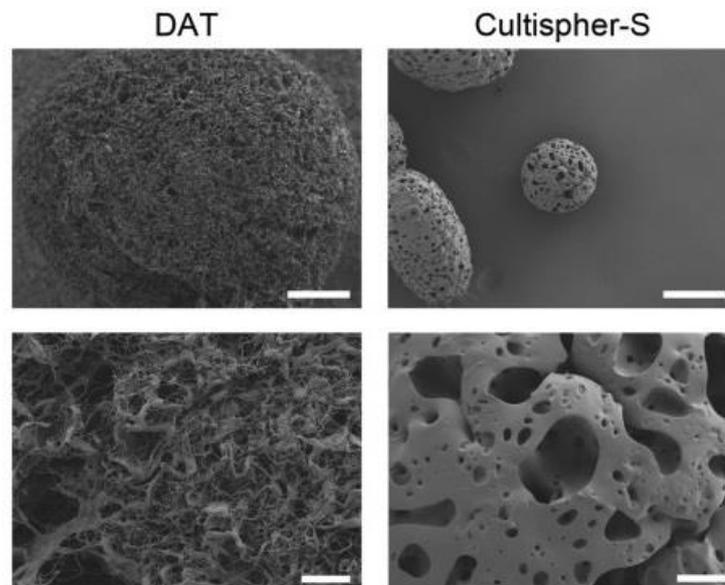


Figure 28 : Structure poreuse des microporteurs DAT et Cultispher-S observée par microscopie électronique. Barre d'échelle = Haut : 100 μm ; Bas : 10 μm . D'après Yu et al. [111].

Jusqu'à présent, nous nous sommes intéressés aux paramètres externes aux bioréacteurs. Lors de leur amplification à grande échelle, les CSM vont également être sensibles aux propriétés

intrinsèques des bioréacteurs. Certaines études ont donc essayé de caractériser l'effet de ces propriétés sur le comportement des CSM.

3.2.3. Adaptation des paramètres du bioréacteur.

Parmi les paramètres des procédés de culture à grande échelle devant être adaptés aux CSM, les réglages à ajuster au niveau des bioréacteurs sont essentiels. Ces dernières années, l'agitation ou la tension en oxygène dans le cadre d'une culture de CSM en bioréacteur ont fait l'objet de nombreuses recherches.

3.2.3.1. Adaptation de l'agitation et stress mécanique.

L'agitation du milieu de culture, généralement par une hélice, induit dans le bioréacteur la formation de zones de turbulences. Des études de modélisation ont permis de déterminer précisément ces zones de turbulences. En pratique, ces zones se retrouvent sous la forme de tourbillons de tailles différentes selon le type et la force d'agitation. Dans le cas d'une culture cellulaire sur microporteurs, plus la taille des microporteurs est importante, plus la vitesse d'agitation devra être élevée afin de maintenir ces microporteurs en suspension. Or, la taille des tourbillons générés par l'agitation est inversement proportionnelle à la vitesse d'agitation. La théorie de l'échelle de Kolmogorov démontre que dans un environnement dynamique *i.e.* sous agitation, si la taille des tourbillons est égale ou inférieure à la taille des particules en suspension dans le bioréacteur, un stress mécanique considérable est appliqué à cette particule. Ainsi, des cellules sur microporteurs vont subir un stress mécanique important, puisqu'elles seront sur des supports de taille supérieure à celle des tourbillons. Ce stress sera d'autant plus significatif que les microporteurs utilisés seront de grande taille [112]. En 2014, la localisation des zones de stress mécanique dans l'agitateur, ainsi que de l'échelle de Kolmogorov, donc la taille des tourbillons, a été modélisée (Figure 29).

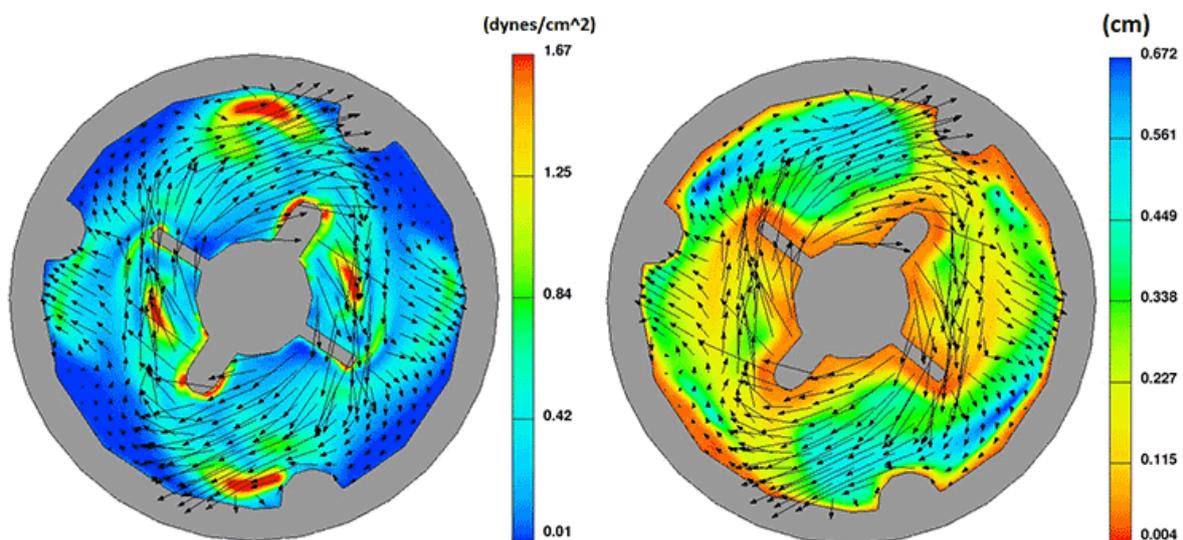


Figure 29 : Représentation des zones de stress mécanique (gauche) et de l'échelle de Kolmogorov (droite) dans le cadre d'une culture en bioréacteur à hélice (coupe transversale) à une vitesse d'agitation de 60 rpm. Les zones les plus turbulentes sont disposées aux abords de l'hélice et sur les rebords du bioréacteur, et cela est associé à une diminution de la taille des tourbillons. D'après Ponnuru et al. [113].

La capacité de différenciation des CSM peut être affectée par ce stress mécanique. En effet, selon la fréquence à laquelle les CSM sont soumises à ce type de stress, celles-ci s'orientent vers une différenciation ostéogénique ou chondrogénique [114]. Par exemple, une augmentation progressive du stress mécanique de 0 à 10 dyn/cm² engendre une différenciation ostéogénique alors qu'un passage direct à 10 dyn/cm² active une différenciation chondrogénique des CSM. Cette différence est due à différents réarrangements physiologiques ou cellulaires comme une modulation de la structure

du cytosquelette d'actine, ou l'activation de différents types de canaux calciques, engendrant une accumulation plus ou moins importante d'ions Ca^{2+} dans la cellule.

L'agitation peut aussi engendrer une modification du microenvironnement cellulaire. Les turbulences ont pour effet de perturber l'accumulation de molécules ou de facteurs sécrétés par les CSM dans leur microenvironnement [115]. Et puisque l'importance du microenvironnement sur le phénotype des CSM a depuis longtemps été caractérisée, il est probable que l'agitation modifie le comportement des CSM. Une régulation et un contrôle fin du paramètre d'agitation sont donc essentiels à l'obtention d'une culture homogène et n'affectant pas la qualité des cellules.

3.2.3.2. Régulation de l'oxygénation.

Le second paramètre pouvant être modifié lors d'une culture en bioréacteur est la tension en oxygène. Physiologiquement, et contrairement aux idées reçues, les conditions d'oxygénation dans les niches de différents types de cellules souches sont plutôt hypoxiques et non normoxiques [116]. Ainsi, une tension en oxygène de 1 à 8 % est généralement observée dans les niches des CS hématopoïétiques, neurales ou mésenchymateuses.

Les effets activateurs de l'hypoxie sur la croissance cellulaire et sur la capacité de différenciation ostéogénique de CSM de rat ont été observés dès 2001, aussi bien *in vitro* qu'*in vivo* [117]. Cependant, une inhibition de différenciation est observée dans le cas d'une culture prolongée en présence d'une tension trop faible en oxygène [118]. De manière générale, l'hypoxie a un effet activateur de la différenciation chondrogénique, notamment lorsque les CSM sont associées à des biomatériaux tels que des éponges de collagène [119]. De plus, l'incubation de CSM pendant 72 h à 2,5% d'oxygène induit une surexpression du gène codant pour la protéine GFAP, impliquée dans la motricité et l'activité des astrocytes [120]. Un conditionnement hypoxique pourrait donc aussi être impliqué dans la différenciation neuronale des CSM. Par contre, l'hypoxie semble inhiber la différenciation adipogénique des cellules [121].

Outre leur capacité de différenciation, d'autres propriétés des CSM vont être influencées par l'hypoxie. Par exemple, les cellules ont une prolifération et un métabolisme plus importants en comparaison avec les cellules cultivées en normoxie [122]. Sous hypoxie, les CSM entrent aussi en division plus rapidement. Un pré-conditionnement à l'hypoxie des CSM augmente significativement leurs capacités immunomodulatrices, via une augmentation de la sécrétion d'interleukine 10 (IL-10) et de ligand Fas. Chez des CSM issues de la pulpe dentaire, une surexpression de HIF-1 α , une protéine induite par l'hypoxie, augmente leurs activités immunomodulatrices, immunosuppressives, pro-angiogéniques et trophiques [123]. Enfin, des CSM ayant été cultivées en environnement hypoxique et dans un milieu riche en ion Ca^{2+} ont des capacités immunomodulatrices amplifiées *in vivo* dans un modèle de GvHD [124].

Ces études démontrent que la tension en oxygène, de même que l'agitation, est un paramètre qui joue de manière extrêmement importante sur le comportement des CSM. Retrouvées naturellement dans un environnement hypoxique, une faible tension en oxygène semble être bénéfique pour ces cellules. Une modification des procédés de culture, passant par un contrôle fin de l'oxygénation, pourrait donc être avantageux pour la qualité des CSM amplifiées.

3.2.4. La récupération des cellules.

Après leur amplification, et selon l'application thérapeutique recherchée, les cellules sont parfois injectées directement avec le matériau sur lequel elles ont été amplifiées. Dans le cas contraire, une étape de décollement des cellules est requise. Lors d'une culture sur microporteurs, cette étape nécessite l'utilisation d'enzymes de dissociation et est associée à une agitation plus ou moins intense. Au-delà des faibles rendements généralement obtenus en comparaison avec une culture 2D, ces procédés peuvent altérer la qualité des cellules et cette étape doit encore être améliorée.

3.2.4.1. Utilisation d'enzymes de dissociation.

Les enzymes utilisées pour décoller les cellules sont généralement protéolytiques, c'est à dire capables de cliver les protéines en peptides (Tableau 6). À l'origine, ces enzymes servent notamment à aider à la digestion de nos aliments, comme la trypsine qui est sécrétée par le pancréas. Celle-ci reste sans doute l'enzyme la plus utilisée en culture cellulaire. Il s'agit d'une protéase à sérine, c'est à dire qu'elle catalyse l'hydrolyse des liaisons peptidiques grâce à cet acide aminé. Cette hydrolyse intervient spécifiquement au niveau C-terminal des acides aminés lysine et arginine.

Enzyme de dissociation	Origine
Collagénase	Clostridium histolyticum
Hyaluronidase	Streptomyces hyalurolyticus / Testicule Bovin
DNase	Pancréas Bovin
Elastase	Pancréas Porcin
Papaine	Carica papaya
Trypsine	Pancréas Bovin
Protease Type XIV	Streptomyces griseus
Accutase	Marine
TrypLE	Protéine Fongique recombinante

Tableau 6 : Différentes enzymes utilisées pour le décollement cellulaire. Leur source d'origine est précisée.

Sur microporteurs, ces enzymes de dissociation sont généralement associées à une agitation, ce qui génère un stress mécanique important pour les cellules. Plusieurs études ont tenté d'optimiser ces procédés. Par exemple, en appliquant une intense agitation de 150 rotations par minute (rpm) pendant un temps court (7 min) lors de l'incubation avec différentes enzymes de dissociation, plus de 95% des cellules ont été récupérées à partir de plusieurs types de microporteurs, milieux de culture et enzymes, que ce soit en "spinner flasks" ou en bioréacteurs [125]. Néanmoins, et malgré une très bonne viabilité cellulaire, l'effet d'une telle agitation sur le phénotype et la fonctionnalité à long terme des CSM nécessiterait d'être étudié pour valider ce protocole. De plus, la puissance d'agitation requise reste difficilement adaptable à grande échelle puisque celle-ci dépend du type de bioréacteur utilisé et de son agitateur.

La récupération des cellules après décollement se fait par filtration, ce qui génère un autre stress mécanique et une perte de rendement. Enfin, cette étape aussi est difficilement transposable pour des cultures à grande échelle [126].

Une dernière contrainte est liée à l'origine bactérienne et animale de la plupart des enzymes protéolytiques utilisées. De plus, l'inactivation de ces enzymes requière généralement l'ajout de sérum, qui là encore représente une limite pour une utilisation chez l'homme. De nouveaux types d'enzymes ont été découverts ou développés, tels que l'accutase, enzyme d'origine marine ou la TrypLE, analogue de la trypsine non animale et n'ayant pas besoin d'être inhibée. Cependant, ces enzymes représentent un surcoût conséquent, surtout à grande échelle.

3.2.4.2. Développement de microporteurs facilitant la récupération des CSM.

Pour éviter l'utilisation d'enzymes de dissociation, de nombreuses recherches ont pour objectif de modifier intrinsèquement les microporteurs. Deux pistes sont actuellement explorées : les microporteurs biodégradables et les microporteurs thermosensibles.

3.2.4.2.1. Microporteurs biodégradables.

Par définition, la biodégradabilité d'un matériau est sa capacité à être dégradé dans le temps. Cette dégradation peut être due à des éléments externes tels que les micro-organismes, ou internes, notamment via la structure physico-chimique du matériau. Dans le cas des microporteurs, deux principaux matériaux ont été étudiés : le PLC et le PLGA.

Le PLC est un polymère semi-cristallin stabilisé par des fonctions esters. La dégradation du PLC intervient en deux temps. Premièrement, un clivage autocatalytique des groupements ester va entraîner la formation de fragments de différentes tailles [127]. La seconde phase constitue la perte de matière du polymère à proprement parler. Elle est due à la production de fragments suffisamment petits pour permettre leur diffusion à l'extérieur de la structure. Cette propriété de biodégradabilité, associée à une biocompatibilité, font du PLC un matériau très intéressant pour la libération de drogue d'intérêt *in vivo* [128]. De plus, en association avec d'autres polymères tels que polylactide (PLA) ou le polyglycolide (PLG), le temps de dégradation du PLC peut être modifié [127], permettant ainsi de moduler la diffusion de la drogue.

Depuis quelques années, plusieurs microporteurs biodégradables à base de PLC ont été synthétisés. Nous nous focaliserons ici sur les travaux de l'équipe de Steve Kah-Weng Oh, qui a largement contribué au développement de tels microporteurs. Ils ont pu obtenir des microsphères de taille très homogène, rendant ainsi ce procédé de fabrication très versatile [129]. Plusieurs types de fonctionnalisations ont été testés, dont notamment la poly-L-lysine (PLL) et la fibronectine (FN). Une fonctionnalisation "sandwich" FN-PLL-FN a démontré les meilleurs résultats, similaires à ceux obtenus avec les microporteurs Cytodex 3. En plus de la taille ou de la porosité, la densité des microsphères peut également être changée suite à une modification du procédé de synthèse, permettant l'adaptation de ces microporteurs à une culture sous agitation [130]. Des microporteurs de densité comprise entre 1,04 et 1,11 g/cm³ selon le type de modification, ont ainsi été développés. Ces microporteurs à faible densité ont été testés en "spinner flasks", et en bioréacteur [131], démontrant de bonnes performances. Les cellules cultivées sur ces supports ont gardé leurs capacités de différenciation et d'immunomodulation. Enfin, ces mêmes microporteurs ont récemment démontré, en association avec des CSM, une bonne capacité de régénération osseuse *in vivo*, démontrant qu'au-delà d'être des supports d'amplification efficaces, ils peuvent aussi être de bons biomatériaux pour l'ingénierie tissulaire [132].

Le PLGA est un polymère ayant les mêmes propriétés que le PLC. Sa biodégradabilité est aussi due à une autocatalyse des fonctions ester [127]. Via leur dégradation, les microporteurs de PLGA ont la faculté de libérer une molécule d'intérêt dans le milieu dans lequel ils baignent. Dans le cas de la culture de CSM, ces propriétés ont par exemple été utilisées pour la libération du TGF- β , favorisant la différenciation chondrogénique des cellules, *in vitro* et *in vivo*. Dans une première étude, un microporteur de PLGA, fonctionnalisé par de la fibronectine et chargé en TGF- β a été synthétisé [133]. De bonnes performances en termes d'adhérence et de différenciation cellulaire ont été observées, même si seuls 25% du TGF- β ne peuvent être libérés après 30 jours de culture. Cette limitation étant en partie due à la stabilité des protéines à long terme, une seconde étape a été de modifier la formulation du microporteur de PLGA afin de protéger le TGF- β de sa dénaturation [134]. L'intégration dans la structure d'un copolymère, le P188, a permis d'augmenter fortement la libération de TGF- β dans le milieu (70%) et la capacité de différenciation chondrogénique des cellules *in vitro*, puis dans un modèle d'arthrose *in vivo* [135]. En dehors du TGF- β , d'autres molécules ont aussi été intégrées dans des microporteurs biodégradables en PLGA, telles que la BMP-2, et ont donné des résultats encourageants quant au potentiel ostéogénique des cellules cultivées. Zhang *et al.* ont notamment développé un système de libération de la BMP-2 associé à une libération d'osteogenic growth peptide (OGP) [136]. Cette double libération de facteurs a eu pour conséquence d'augmenter significativement le potentiel ostéogénique des cellules, en comparaison avec une libération unique de l'un ou l'autre de ces facteurs. Enfin, les microporteurs de PLGA ont été testés en association avec des facteurs de croissance (IGF-1), des matériaux minéraux (HAP) ou des molécules bactéricides (Ponericin-G1) [137,138]. Les données obtenues *in vitro* montrent une bonne capacité des cellules (CSM ou ostéoblastes) à adhérer, à proliférer, et à se différencier sur ces supports. Ces microporteurs sont donc une alternative de choix pour éviter l'usage d'enzymes de dissociation pour la récupération des cellules en fin de culture.

3.2.4.2.2. Microporteurs thermosensibles.

Le développement de microporteurs thermosensibles est une autre alternative crédible. Dans ce cadre-là, le Poly-*N*-isopropylacrylamide (pNIPAAm) apparaît comme un composant de choix. Sa température de transition de l'état hydrophobe à hydrophile est comprise entre 32°C et 35°C, soit aux abords des températures physiologiques. De plus, sa faible toxicité permet d'envisager une utilisation pour l'amplification cellulaire. À une température supérieure à la température de transition, le polymère est allongé en solution aqueuse. À des températures inférieures, il se recroqueville sur lui-même, ce qui permet la libération des cellules dans le milieu de culture [139]. Ce polymère a par exemple été greffé sur un microporteur préexistant, le Cytodex 3 et testé pour l'amplification de CSM [140]. Une capacité d'adhérence et de croissance similaire a été observée pour les microporteurs greffés et non greffés, confirmant la bio compatibilité et la non-toxicité de pNIPAAm pour la culture de CSM. En fin de culture, une capacité de décollement d'environ 80% a été observée, ce qui est inférieur aux rendements obtenus avec de la trypsine. Par contre, l'apoptose et la toxicité sont moindres lors d'un décollement par un changement de température par rapport à un traitement enzymatique, traduisant la douceur de cette méthode. D'autres microporteurs, composés de PHEMA sur lesquels a été incorporé le pNIPAAm ont été testés pour l'amplification de chondrocytes fœtaux, de fibroblastes murins ou de kératinocytes humains, cellules partageant des caractéristiques communes avec les CSM [141,142]. Une moins bonne adhérence et croissance cellulaire a été obtenue avec ces microporteurs thermosensibles par rapport aux microporteurs commerciaux Cytodex 1 et Biosilon. Cependant, des résultats similaires en termes de décollement ont été observés, démontrant l'efficacité de ce microporteur innovant. Plus récemment, Song *et al.* ont développé un microporteur de verre comportant une double fonctionnalisation pNIPAAm/hydroxypropylmethacrylate (HPM) [143]. Ces microporteurs ont été testés sur des CSM et ont démontré de bonnes performances en termes d'adhérence, de croissance et de détachement cellulaire.

Dans le cadre de l'amplification de CS à visée thérapeutique, les microporteurs thermosensibles pourraient donc être une bonne alternative aux systèmes utilisés actuellement. Au-delà d'être fiables pour l'amplification et la récupération des cellules, l'étape de décollement, à l'instar des microporteurs biodégradables, est également peu stressante pour les cellules tout en évitant le recours à des composants xénogéniques.

4. Vers une thérapie acellulaire : l'utilisation des vésicules extracellulaires.

Ces dernières années, un nouveau type de thérapie a été développé : la thérapie acellulaire. Il s'agit d'utiliser non plus les cellules elles-mêmes, mais leur sécrétome et notamment leurs vésicules extracellulaires (EV). Bien que de nombreux aspects biologiques de ces vésicules soient encore peu connus aujourd'hui, plusieurs avantages sont à associer à leur utilisation thérapeutique. En particulier, l'utilisation de ces EV permet d'éliminer les risques liés à l'utilisation de cellules souches. Une description des principaux types d'EV, des connaissances actuelles concernant leur biologie ainsi que des techniques utilisées pour leur isolement et leur caractérisation sera présentée. Plus spécifiquement, les EV secrétées par les CSM et quelques exemples de leur potentiel thérapeutique seront décrits.

4.1. Introduction.

4.1.1. Description des différents types d'EV et de leur biogénèse.

Hormis leur capacité de croissance, de migration ou de division, les cellules sont capables de sécréter des facteurs biologiques dans leur environnement. Ces facteurs peuvent être libérés sous forme de vésicules extracellulaires (EV). Observées pour la première fois en 1983 chez des réticulocytes de rat et de mouton, les EV sont aujourd'hui connues pour être produites par l'ensemble des cellules eucaryotes et procaryotes et ont été retrouvées dans de nombreux fluides biologiques comme le sang, la salive, l'urine, le lait maternel ou le liquide amniotique [144]. Elles sont classées en deux catégories principales : les exosomes et les microvésicules (Figure 30).

	Exosomes	Microvesicles
Origin	Endosome	Plasma membrane
Size	50–150 nm	50–500 nm (up to 1 µm)
Other names (according to their origin, size and morphology)	<ul style="list-style-type: none"> • Protasomes • Tolerosomes • Dexosomes • Nanovesicles • Exosome-like vesicles and others 	<ul style="list-style-type: none"> • Microparticles • Blebbing vesicles • Shedding vesicles • Oncosomes • ARRM • Migrasomes • Neurospheres • Apoptotic bodies

Figure 30 : Description des principaux types d'EV. Ces vésicules peuvent être classées selon leur origine, mais aussi leur taille. D'après Van Niel et al. [145].

Bien que la nomenclature des EV ait constamment évolué ces dernières années, l'argument utilisé aujourd'hui pour différencier une microvésicule d'un exosome semble être la manière dont ils sont produits [146]. Les microvésicules sont formées directement suite à un bourgeonnement de la membrane cellulaire et ce processus fait intervenir plusieurs modifications au niveau des protéines et des lipides membranaires. Notamment, l'augmentation de la concentration en ions Ca^{2+} engendre l'activation de plusieurs enzymes calcium-dépendantes telles que les aminophospholipide translocases et les scramblases. Ces enzymes vont par la suite induire une restructuration de la bicouche lipidique, ainsi que du cytosquelette d'actine, permettant la formation de vésicules. Leur libération se fait via une contraction de la membrane due à l'actomyosine, par une réaction ATP-dépendante. Les effecteurs impliqués dans cette libération sont encore peu connus et vont varier selon le type de microvésicules et de cellules sécrétrices, ou selon les conditions environnementales [145].

Les exosomes sont formés de manière beaucoup plus indirecte, via la voie endosomale. Ils sont générés à partir d'une invagination de la membrane des endosomes tardifs (Figure 31).

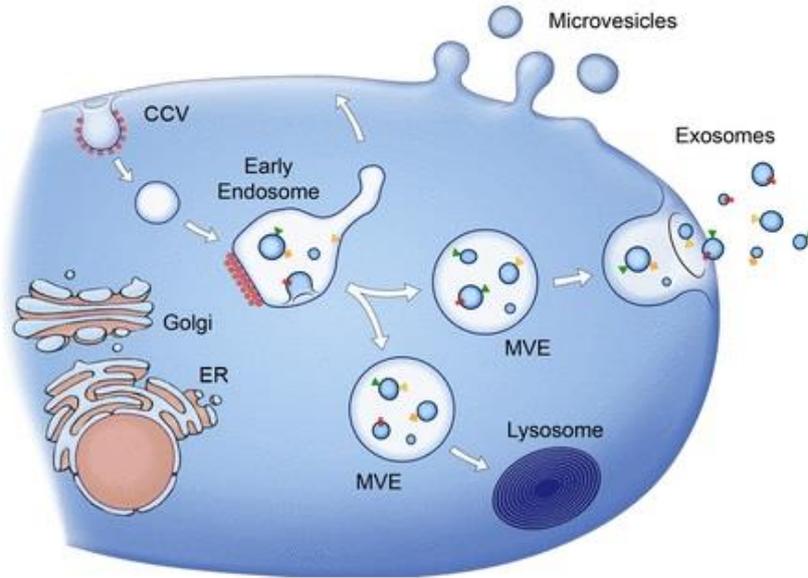


Figure 31 : Biogénèse des exosomes par voie endosomale. Les exosomes sont formés à partir de vésicules intraluminales (ILV) lors de la maturation des corps multivésiculaires (MVE). Tandis que certains MVE suivent la voie endosomale classique sous forme d'endosomes tardifs jusqu'à leur destruction dans les lysosomes, d'autres vont fusionner avec la membrane plasmique et libérer leur contenu dans le milieu extracellulaire. D'après Raposo et Stoorvogel [146].

Deux types de systèmes ont été décrits dans la formation de vésicules intraluminales (ILV) à partir de la membrane des corps multivésiculaires (MVE) : les systèmes ESCRT dépendants et les systèmes ESCRT indépendants. Le complexe ESCRT est composé de plus de 30 protéines retrouvées sous la forme de 4 complexes différents : ESCRT-0, I, II et III, et de leurs protéines associées VPS4, VTA1 et ALIX. Par reconnaissance de protéines mono-ubiquitylées, ESCRT-0 va recruter les protéines qui seront chargées dans les exosomes. Les autres membres ESCRT vont ensuite induire le bourgeonnement et la scission de la membrane.

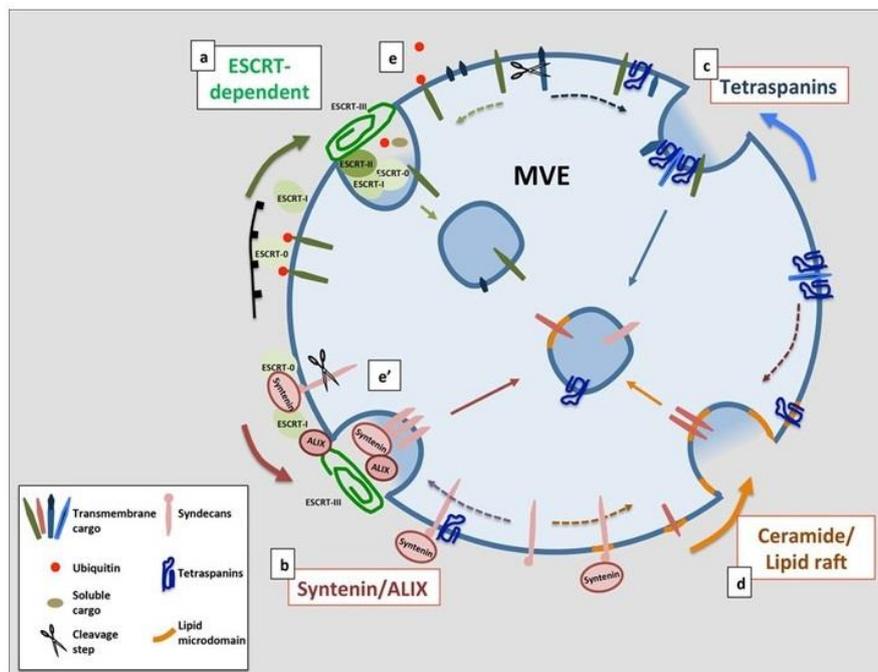


Figure 32 : Description des systèmes de formation des exosomes. On distingue la voie ESCRT dépendante (a) et les voies ESCRT indépendantes : la voie syntenine/ALIX (b), la voie impliquant les tétraspanines (c) et la voie céramide (d). Certaines voies nécessitent une modification post-traductionnelle des protéines qui seront transportées. Il peut s'agir d'une ubiquitylation (e) ou d'un clivage (e'). D'après Palmuli et Van Niel [147].

Des systèmes de formation ESCRT-indépendants ont aussi été décrits : leur activation va dépendre de la cellule sécrétrice et de la cargaison sélectionnée (Figure 32). Les céramides, des sphingolipides, vont permettre la création de microdomaines lipidiques induisant une courbure de la membrane et la formation d'ILV. Les tétraspanines sont des protéines membranaires dont le regroupement dans la membrane des MVE va induire leur bourgeonnement et la formation d'ILV. Enfin, la protéine ALIX, qui interagit avec le complexe synténine-syndecan, peut aussi être impliquée dans la formation d'ILV [144]. Ces effecteurs sont impliqués dans le recrutement de la cargaison des exosomes. Le caractère spécifique de ce recrutement requiert parfois une modification préalable des protéines sélectionnées (Figure 32 e').

Le transport intracellulaire des MVE fait appel au cytosquelette et à leurs molécules associées comme les dynéines, les kinésines et les myosines, mais aussi aux Rab GTPases, qui vont réguler l'ensemble de ces processus (Figure 33).

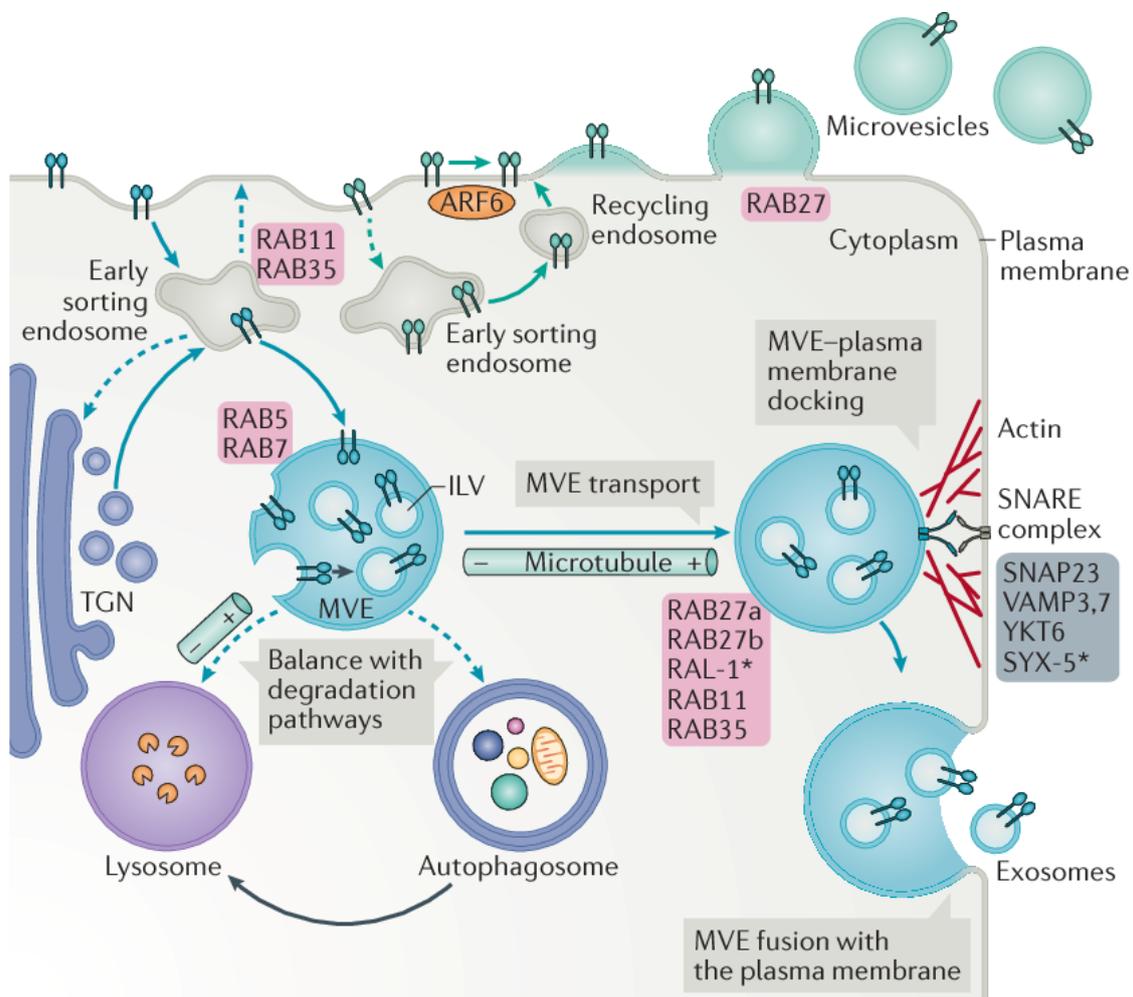


Figure 33 : Effecteurs impliqués dans le transport intracellulaire des MVE et dans la libération des exosomes. Selon leur type, les Rab GTPases vont être impliquées dans différentes étapes du trafic exosomal. Par exemple les Rab5 et 7 vont trier les endosomes tardifs alors que les isoformes Rab27a/b vont contrôler la sécrétion des exosomes. La fusion des MVE à la membrane plasmique est médiée par les protéines SNARE. La protéine v-SNARE, présente à la surface des vésicules, interagit avec la protéine t-SNARE présente sur la membrane cellulaire. D'après Van Niel et al. [145].

4.1.2. Les EV dans la communication cellulaire.

Initialement décrites comme moyen d'élimination de différents composants inutiles à la cellule, les EV sont aussi impliquées dans la communication intercellulaire, qui va se faire via le transport de protéines, de lipides, et d'acides nucléiques. Cela implique une intégration finement contrôlée de composants d'intérêt à l'intérieur des EV, ainsi que l'adressage des EV et leur intégration à la cellule cible. Par exemple, l'intégration de protéines d'intérêt dans les exosomes se fait via des modifications post-traductionnelles (Figure 32). Pour les miRNA en revanche, leur incorporation dans les exosomes serait plutôt médiée par la présence de séquences spécifiques reconnues par la protéine hnRNPA2B1 [145].

Les mécanismes contrôlant l'ensemble de ces étapes restent méconnus, mais il semble qu'ils vont dépendre de l'origine des EV sécrétées, du type de cellule cible, et du type de message délivré (Figure 34). Puisqu'il est à ce jour difficile de discriminer les effets dus aux exosomes de ceux dus aux microvésicules, le terme EV sera utilisé par la suite.

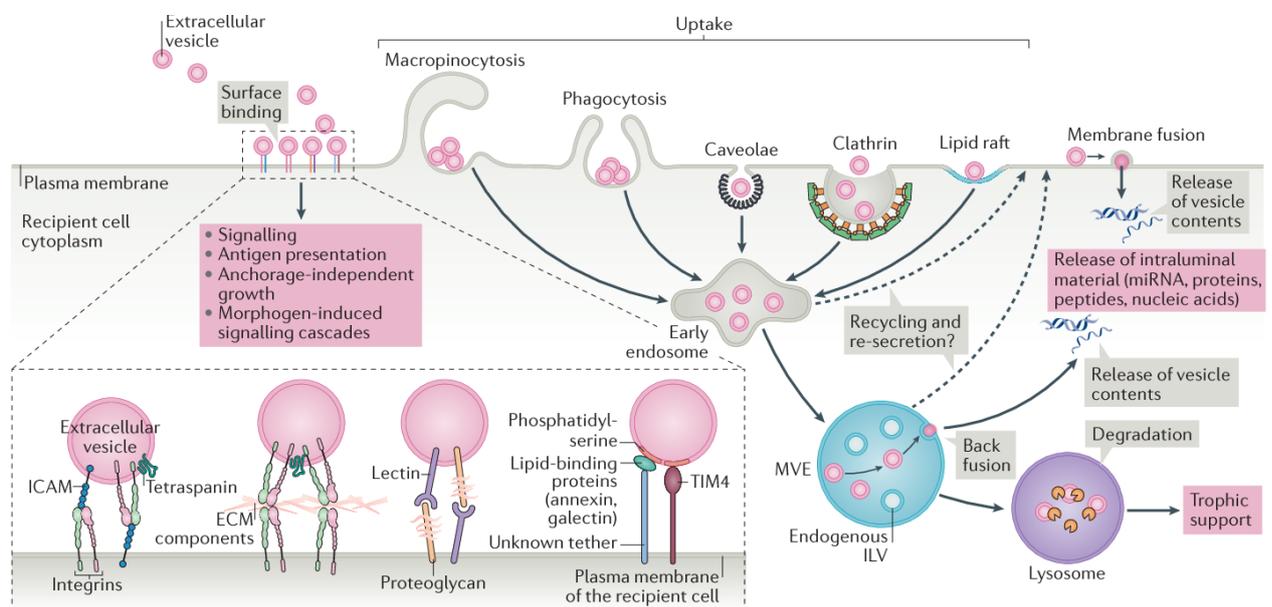


Figure 34 : Interaction des EV avec leurs cellules cibles. La spécificité de ciblage va faire appel à des mécanismes de reconnaissance type ligand/récepteur entre l'EV et sa cellule cible. Parmi les plus connus, on retrouve : les intégrines, les lectines, les lipides, les composants de la MEC, les tétraspanines ou les protéoglycanes. Par exemple, les intégrines présentes à la surface des EV vont interagir avec différents récepteurs tels que les ICAM présentes à la surface des cellules cibles. Dans certaines conditions, une simple interaction des EV avec leurs cellules cibles est suffisante pour délivrer le message. C'est le cas lors de la présentation de peptides du CMH aux cellules T spécifiques ou lors de l'invasion du trophoblaste pendant l'implantation embryonnaire. Dans d'autres cas, l'intégration des EV à l'intérieur des cellules cibles va être nécessaire. Plusieurs types d'endocytose ont été décrits, comme l'endocytose clathrines ou cavéoles-dépendantes, l'endocytose médiée par les radeaux lipidiques, la phagocytose ou la macropinocytose. L'endocytose des EV conduit à la formation d'un endosome puis de MVE. Si dans la plupart des cas, la voie endosomale engendre la lyse des MVE, permettant la libération cytoplasmique de molécules trophiques comme les acides aminés, les EV intégrées peuvent aussi échapper à cette voie lytique et libérer leur contenu non lysé dans le cytoplasme. D'après Van Niel et al. [145].

4.1.3. Isolement et caractérisation des EV.

Des méthodes de centrifugations ont été adaptées à l'isolement de vésicules de grande et petite tailles à partir de tout surnageant de culture ou fluide biologique [148]. Une série de centrifugations permettent en premier temps d'isoler les EV de grande taille telles que les microvésicules, alors que les EV de petite taille, c'est à dire les exosomes, sont isolées par ultracentrifugation à 100 000 x g pendant 90 min. Bien que cette méthode soit aujourd'hui majoritairement utilisée, d'autres techniques ont été développées ou adaptées à l'isolement d'EV : la

centrifugation sur gradient de densité, la filtration, ou la chromatographie d'exclusion [149]. Ces dernières années, des kits commerciaux sont apparus en tant qu'alternative à l'ultracentrifugation. Généralement basées sur des méthodes de précipitation, via des polymères ou des anticorps, ces méthodes de purification doivent cependant être standardisées et les types d'EV isolées doivent aussi être caractérisées [144].

Concernant la caractérisation des EV, trois paramètres sont analysés : leur taille et morphologie, leur densité et leur composition. La microscopie électronique reste aujourd'hui le meilleur moyen d'évaluer l'isolement d'EV. Grâce à sa résolution, la microscopie électronique permet d'observer les plus petites vésicules. La microscopie électronique à transmission (TEM) tend à être remplacée par la cryo-microscopie qui réduit l'altération de l'échantillon observé (Figure 35).

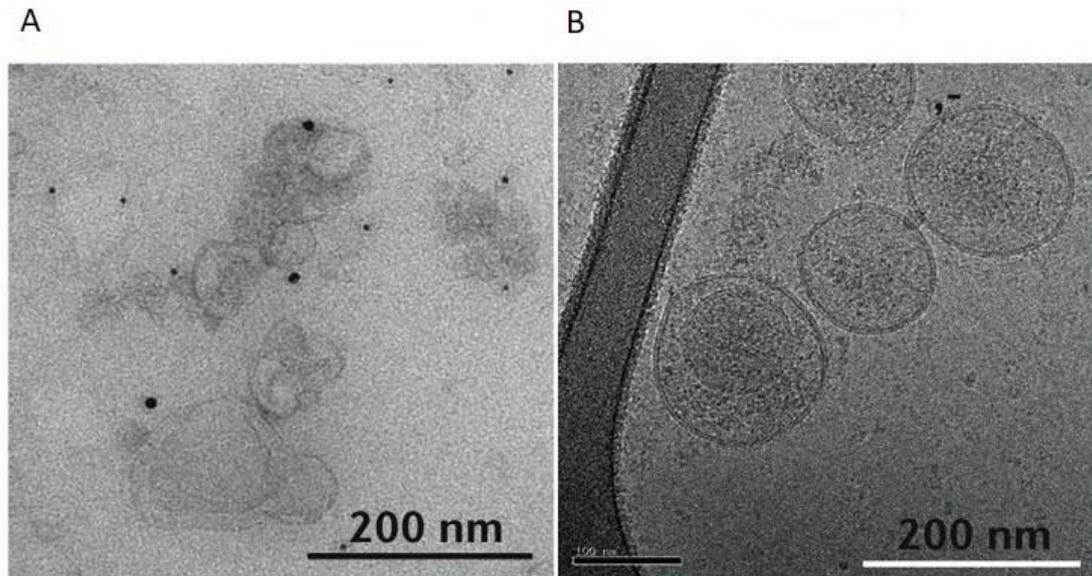


Figure 35 : Imagerie d'EV par TEM (A) et Cryo-EM (B). D'après Van Niel et al. [145].

En comparaison, la microscopie à fluorescence est suffisante pour observer individuellement les vésicules de plus grande taille, c'est à dire les microvésicules [144,145]. La taille des EV peut aussi être évaluée de manière quantitative. Pour cela, la méthode majoritairement utilisée est la Nanoparticle Tracking Analysis (NTA). Brièvement, cette technique consiste en l'illumination par un rayon laser de particules en suspension. Une fois déviée par les EV individuelles présentes dans la solution, la lumière va être captée par la caméra du système. L'analyse est basée sur le mouvement Brownien des particules. En 2013, une standardisation des protocoles de NTA a été proposée par Gardiner *et al.* [150].

Concernant leurs propriétés physiques, les EV vont principalement être identifiées via un gradient de sucrose. Selon leur origine, ces EV vont s'équilibrer à différentes densités [151]. Tandis que les exosomes ont une densité comprise entre 1,13 et 1,19 g/ml, les microvésicules ont elles une densité comprise entre 1,04 et 1,07 g/ml.

L'étude des EV étant un domaine en pleine expansion, l'ensemble de ces méthodes, leur développement et leur standardisation sont en constante évolution. Concernant la composition de ces vésicules, des bases de données telles que "Vesiclepedia" ou "EVpedia" ont été développées pour suivre l'évolution des connaissances scientifiques [144]. Plus généralement, une veille scientifique est assurée par la société internationale des vésicules extracellulaires, et publiée via son "Journal of Extracellular Vesicles" [152].

4.1.4. Utilisation clinique des EV.

L'implication des EV dans de nombreux processus physiologiques et pathologiques a été démontrée [153]. Par exemple, une réduction des lésions d'athérosclérose a été observée dans un modèle murin suite à l'injection d'EV secrétées par des cellules endothéliales et surexprimant les miRNA 143 et 145 [154]. Plus récemment, l'effet cardioprotecteur d'exosomes exprimant le récepteur CXCR4 a été démontré *in vitro* et *in vivo* [155]. Enfin, des exosomes isolés à partir de sang de cordon ont démontré de bonnes capacités de stimulation de la cicatrisation cutanée *in vivo* [156]. Mais les EV peuvent aussi avoir un rôle néfaste. Elles semblent notamment être impliquées dans la tumorigénèse, la formation de métastases ou dans la résistance aux chimiothérapies [157–159]. Enfin, leurs rôles dans la progression de maladies hépatiques, cardiovasculaires et auto-immunes ont aussi été soulignés [153].

Malgré le manque de connaissances actuelles dans le domaine des EV, ces vésicules ont d'ores et déjà été étudiées au niveau clinique, en tant qu'outils thérapeutique et diagnostique. Au niveau thérapeutique, les EV peuvent servir de vecteurs de molécules ou de drogues d'intérêt. Dans le cas où la molécule est intraluminale, l'électroporation, la lipofection, la sonication ou la coculture sont utilisées pour son intégration [160]. En cancérologie, des molécules de chimiothérapie comme la doxorubicine [161] et le paclitaxel [162] ont été intégrées dans des EV et testées sur des modèles cellulaires ou animaux. Des exosomes issus de plantes ont aussi été utilisés en tant que vecteurs dans la libération de curcumine, molécule naturelle anti-inflammatoire, pour le traitement de cancer colorectal (Identifiant ClinicalTrials.gov : NCT01294072). Au niveau diagnostique, les EV peuvent être utilisées en tant que biomarqueurs. En effet, les EV sont retrouvées dans le sang, leur prélèvement sous forme de biopsies liquides représenterait un outil rapide et non invasif. Des marqueurs protéiques, présents à la surface des vésicules, ou des acides nucléiques présents à l'intérieur de ces EV et spécifiques d'une pathologie donnée peuvent être recherchés et quantifiés. Cependant, certaines limites à une utilisation en routine apparaissent, telles que le manque de standardisation dans l'isolement des EV et les faibles rendements d'isolement rendant difficiles les études protéomiques et transcriptomiques.

Pour conclure, l'étude des EV est en pleine expansion. Ces vésicules ont des propriétés très prometteuses aussi bien au niveau diagnostique que thérapeutique et la thérapie acellulaire représente une alternative crédible pour le traitement de nombreuses pathologies. Cependant, des progrès doivent être réalisés dans la connaissance de leur biologie et dans la standardisation des protocoles d'isolement et de caractérisation. Par la suite, nous allons nous intéresser plus spécifiquement aux EV secrétées par les CSM et leur potentiel intérêt en thérapie acellulaire.

4.2. Les EV issues de CSM : effets thérapeutiques et intérêts cliniques.

Contrairement aux CSM qui les sécrètent, les EV sont plus stables, ne représentent aucun risque d'aneuploïdie et réduisent considérablement le risque de rejet immunitaire lors de transplantations allogéniques. De plus, ces vésicules vont pouvoir atteindre des zones de l'organisme inatteignables pour les CSM, comme les capillaires pulmonaires [163]. Ces avantages logistiques, sanitaires et thérapeutiques font de ces vésicules une réelle alternative à l'utilisation de CS en thérapie cellulaire et en ingénierie tissulaire.

4.2.1. Le sécrétome des CSM.

Les effets thérapeutiques des CSM semblaient initialement dus à la capacité de différenciation des cellules suite à leur infiltration dans le tissu lésé. Aujourd'hui, il est connu que leur activité paracrine est aussi largement impliquée et que suite à leur injection chez le patient, les CSM sont plutôt stimulatrices des cellules souches présentes *in situ*. Ces effets paracrines ont été démontrés au début des années 2000 par l'étude de milieux conditionnés dérivés de cultures de CSM [151,164].

Les EV issues de CSM expriment des marqueurs communs à l'ensemble des EV comme CD9 et CD81, mais aussi des marqueurs caractéristiques des CSM tels que CD29, CD44 et CD73 [163]. Les EV produites par les CSM sont aussi composées de lipides, de protéines et d'acides nucléiques. Ces vésicules sont en partie responsables de l'effet thérapeutique paracrine des CSM. Par exemple, il a été montré que l'effet anti-inflammatoire obtenu via l'injection d'EV dans un modèle de rat de pathologie rénale aigüe était totalement aboli lors d'un pré-traitement de ces EV à la RNase, démontrant l'implication des ARN dans le pouvoir thérapeutique des EV [165].

Le potentiel thérapeutique d'EV issues de CSM a été souligné dans de nombreux travaux portant sur différents modèles pathologiques (Figure 36).

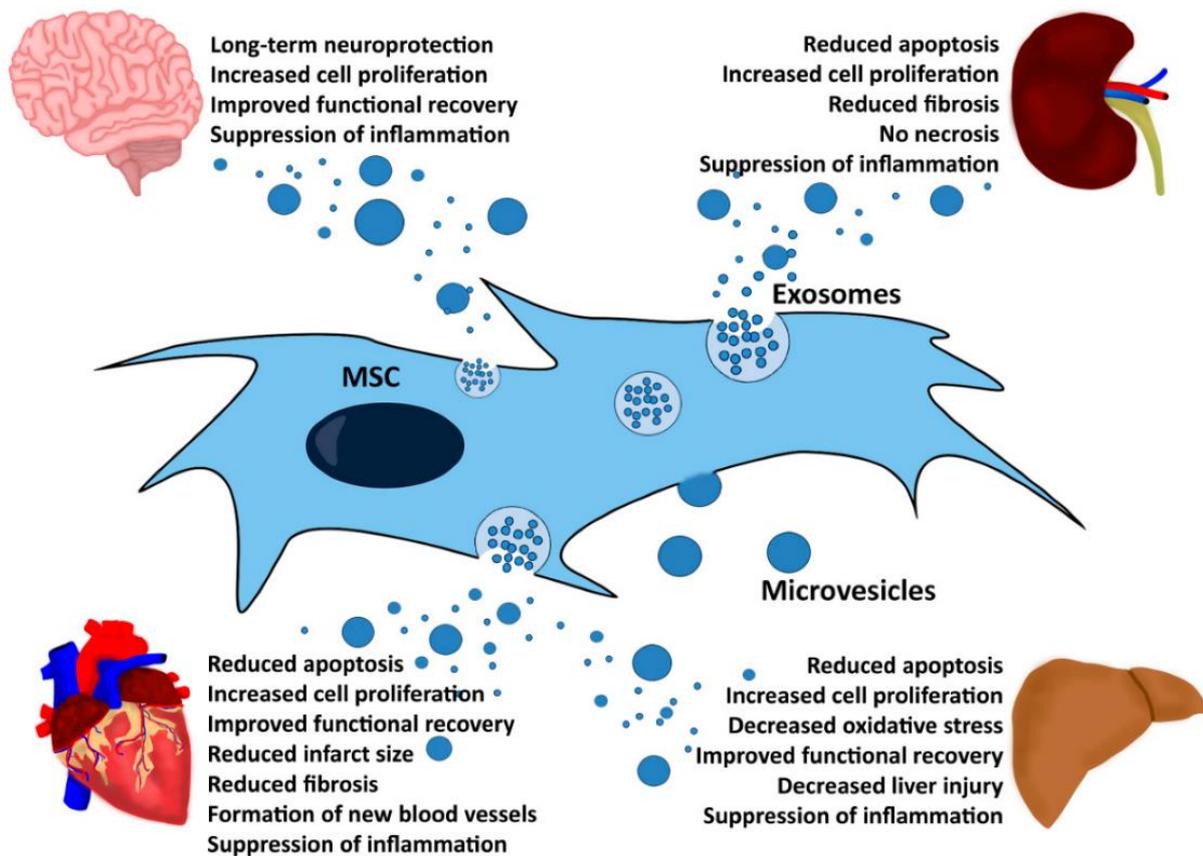


Figure 36 : Aperçu des différents effets thérapeutiques observés suite à l'injection d'EV issues de CSM dans des modèles animaux de pathologies neuronales, rénales, cardiaques et hépatiques. Les effets observés sont similaires à ceux généralement observés en présence de CSM. Ces études ont donc permis d'une part de confirmer l'implication des EV dans l'effet paracrine des CSM, mais aussi de démontrer qu'à elles seules, ces vésicules représentent une réelle alternative thérapeutique. D'après Börger et al. [164].

Certaines de ces études ont également permis d'identifier quelques effecteurs biologiques mis en jeu. Par exemple, concernant la régénération neuronale, Xin *et al.* ont souligné l'importance de la présence du miRNA-133b dans les EV pour observer un effet bénéfique [166]. Concernant la régénération hépatique, la présence de glutathion peroxydase 1 (GPX1) semble être nécessaire à l'activité antioxydante et anti-apoptotique des EV [167]. Enfin, concernant les pathologies auto-immunes, le miRNA-29a semble être impliqué dans l'activité thérapeutique d'EV chez des modèles murins de sclérodémie systémique [168].

Même si la majorité des études citées ont démontré des effets bénéfiques suite à l'injection des EV, certains cas ont au contraire souligné des effets négatifs non négligeables. Par exemple, dans un modèle de diabète de type 1, Rahman *et al.* ont démontré l'effet immunostimulateur d'EV secrétées par des CSM issus d'îlots pancréatiques β [169]. Dans ce cas, les EV seraient de potentiels vecteurs

d'autoantigènes impliqués dans le déclenchement et la progression de la pathologie. Les principaux effets nocifs liés à l'utilisation d'EV issues de CSM en thérapie ont cependant été observés en cancérologie. Ainsi, bien que l'injection intra tumorale d'EV issues de CSM conduise à une réduction de croissance de glioblastomes [170], d'autres études ont quant à elles démontré un effet pro-tumoral. C'est le cas dans le cancer gastrique ou le myélome multiple [171,172].

Même si les résultats précliniques sont très prometteurs, ces études se caractérisent par une variabilité dans les méthodes d'isolement des EV, dans les contrôles utilisés, dans les doses et dans les méthodes d'administration des vésicules, mais aussi par un manque d'effet dose-réponse. Cela soulève à nouveau la question du développement de méthodes de production d'EV adéquates et standardisées [163].

Pour ces raisons, les EV issues de CSM n'ont actuellement que très peu été étudiées en clinique. En 2019, seuls 4 essais sur les 93 portant sur l'utilisation d'EV concernaient les vésicules issues de CSM [173].

4.2.2. Amélioration de la production d'EV par les CSM.

L'utilisation clinique d'EV dérivées de CSM va être dépendante de notre capacité future à produire une quantité suffisante de ces vésicules. Dans cette optique, l'utilisation de matériaux 3D pourrait être une option. En effet, des CSM cultivées sur des éponges de collagène Avitene™ UltraFoam™ ont produit une quantité de protéines exosomales deux fois supérieure à celle produite par des cellules cultivées en conditions 2D classiques, tout en conservant leur activité thérapeutique [174]. Il est donc séduisant de mettre à profit la culture en bioréacteurs, en adaptant les procédés de culture et le type de microporteurs utilisable (voir chapitre 3) [175].

De plus, le conditionnement biochimique ou génétique des CSM peut aussi améliorer leur productivité en EV. Datta *et al.* ont réalisé un criblage à grande échelle afin d'identifier des molécules chimiques déjà commercialisées pouvant stimuler la production d'EV *in vitro* [176]. Sur plus de 4000 molécules testées, la sitafloxacine, la forskoline, le fénotérol, le nitrefazole ou le pentetrazol ont été identifiées comme stimulateurs. Par ailleurs, une surexpression du gène codant pour la phospholipase D2 a aussi conduit à une augmentation de la production d'EV [177]. Enfin, Phan *et al.* ont souligné l'intérêt potentiel d'une manipulation de la machinerie de biogénèse des EV [175] telles que les Rabs GTPases ou les protéines SNARE afin d'augmenter la productivité des CSM.

Au-delà de leurs rendements, c'est surtout l'aspect qualitatif des EV qui a été étudié ces dernières années. Souvent, les CSM productrices sont modifiées afin d'améliorer les capacités thérapeutiques des vésicules sécrétées [178] (Figure 37).

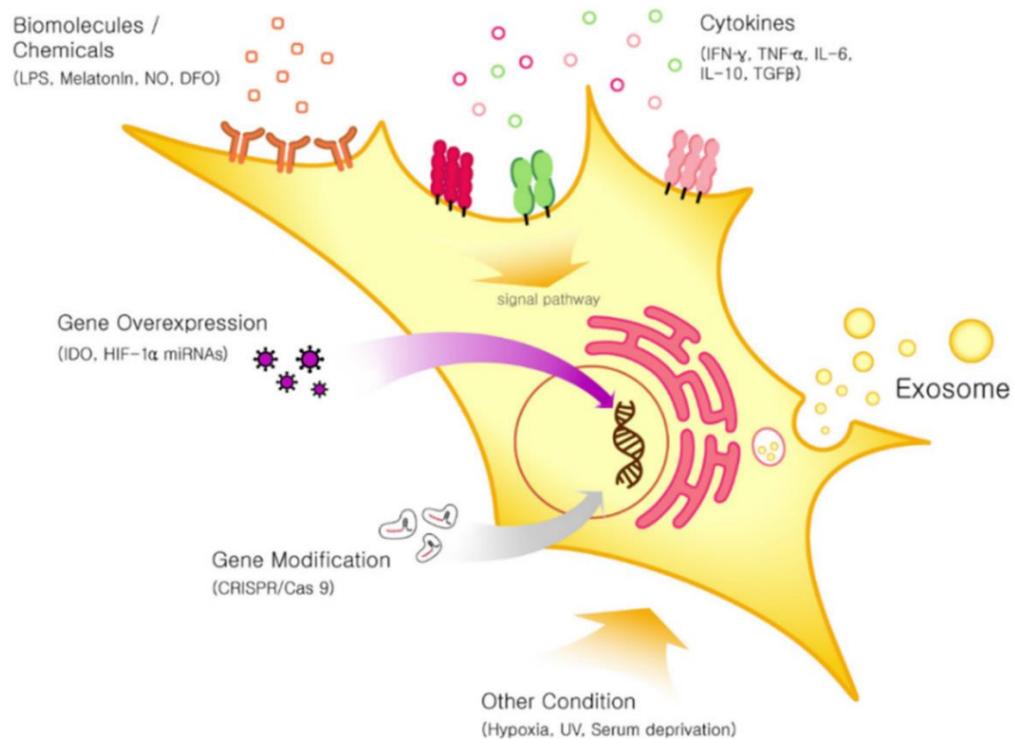


Figure 37 : Différentes stratégies étudiées pour améliorer l'efficacité thérapeutique des EV sécrétées par les CSM. D'après Joo et al. [178].

Ces approches peuvent être classées en quatre catégories :

-Utilisation de cytokines pro inflammatoires, telles que l'IFN- γ , le TNF- α , l'IL-1 β et le TGF- β . En présence de ces différentes cytokines, les CSM produisent des vésicules anti-inflammatoires et anti-apoptotiques [179–181] intéressantes dans le traitement de pathologies inflammatoires et fibrotiques, mais aussi en ingénierie tissulaire osseuse et cartilagineuse.

-Utilisation de molécules comme le lipopolysaccharide (LPS) [182], la mélatonine [183], la déféroxamine [184], le monoxyde d'azote (NO) [185] ou le peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) [186]. En tant que composant de la membrane externe des bactéries à Gram négatif, le LPS conduit principalement à la production d'EV immunomodulatrices. En présence de déféroxamine, un chélateur du fer, ou de NO, les CSM produisent des EV caractérisées par leurs propriétés angiogéniques *in vitro* [184,185].

-Conditionnement par hypoxie : cela conduit la plupart du temps à la production d'EV angiogéniques [187,188]. *In vivo*, l'effet immunomodulateur d'EV produites par des CSM cultivées en condition hypoxique a aussi été observé [189].

-Modifications génétiques : il s'agit de faire surexprimer aux CSM des protéines ou des acides nucléiques d'intérêt. Par exemple, la surexpression d'Akt, ou de GATA-4 par les CSM permet la sécrétion d'EV ayant des effets angiogéniques et cardioprotecteurs [190,191]. Des CSM surexprimant TRAIL sont actuellement étudiées dans le cadre de l'essai clinique TACTICAL démarré en 2017 (Identifiant ClinicalTrials.gov : NCT03298763). *In vitro*, des EV sécrétées par ces cellules ont induit l'apoptose chez 11 lignées cellulaires tumorales différentes, incluant des cancers du poumon, des mésothéliomes pleuraux malins, une lignée de cancer du sein et une lignée de neuroblastome, et ce de manière dose dépendante [192]. De plus, ces EV n'ont présenté aucune cytotoxicité chez les cellules saines d'épithélium bronchial. Concernant la surexpression d'acides nucléiques, c'est surtout les miRNAs qui ont été étudiés. Ces petits ARN non codants sont connus pour être impliqués dans de

nombreux processus physiologiques et pathologiques. Une liste non exhaustive des études réalisées récemment est présentée dans le Tableau 7 ci-dessous :

Pathologies étudiée	miRNA surexprimé	Effet observé
Infarctus du myocarde	93-5-p	↑ Effet protecteur ↓ Autophagie et inflammation
	146-a	↓ Apoptose, inflammation et fibrose <i>in vivo</i> Suppression expression EGR1 chez les cellules cibles
	126	↑ Migration et angiogenèse <i>in vitro</i> ↓ Inflammation et fibrose ↓ Zone de l'infarctus <i>in vivo</i>
AVC	133b	↑ Récupération fonctionnelle ↑ Plasticité et remodelage neuronal
	30d-5p	↑ Polarisation M2 des macrophages ↓ Autophagie ↓ Zone affectée <i>in vivo</i>
Hémorragie cérébrale	133b	↓ Apoptose et neurodégénération
Ischémie moelle épinière	25	↑ Effets neuroprotecteurs
Arthrose	140-5-p	↑ Migration et prolifération chondrocytes <i>in vitro</i> ↓ Progression de la pathologie
	92a-3p	↑ Prolifération du cartilage ↓ Dégradation
Défaut osseux	375	↑ Régénération osseuse
Fibrose hépatique	181-5p	↓ Pathologie ↓ Expression collagène I, vimentine, fibronectine et α -SMA dans le tissu ciblé
Hépatite auto-immune	223	↓ Progression de la pathologie ↓ De l'inflammation caractérisée par ↓ NLRP3 et Caspase-1 <i>in vitro</i> et <i>in vivo</i>
Pathologie pulmonaire aigue	30b-3p	↓ Apoptose cellules pulmonaires <i>in vitro</i> ↑ Protection des alvéoles et des vaisseaux interstitiels
Oncologie		
Carcinome hépatocellulaire	122	↑ Sensibilité au Sorafenib
Gliome	199a	↓ Progression tumorale ↑ Sensibilité au Temozolomide ↓ Expression ArfGAP et AGAP2 des cellules cibles <i>in vitro</i>
	124a	↑ Survie à long terme ↑ Accumulation lipidique intra tumorale via silencing (FOX)A2
Cancer colorectal	16-5-p	↓ Progression tumorale ↑ Apoptose via ↓ expression Intégrine α 2
Cancer de la prostate	143	↓ Progression tumorale ↓ Expression TFF3 chez cellules cibles ↑ Apoptose
Cancer oral	101-3-p	↓ Progression tumorale ↓ Expression COL10A1 des cellules cibles

Tableau 7 : Utilisation préclinique d'EV issues de CSM et enrichies en miRNA. ↑ : augmentation ; ↓ : diminution. Tableau de synthèse à partir de Joo et al. [178].

En conclusion, les EV issues de CSM sont des outils très prometteurs dans le traitement de nombreuses pathologies, notamment celles d'origine inflammatoire. Le caractère acellulaire de ces vésicules favorise leur utilisation thérapeutique et leur utilisation clinique devrait croître dans les années à venir. Plusieurs défis restent cependant à surmonter. Ils concernent notamment la standardisation et le contrôle qualité des protocoles d'isolement et de caractérisation des EV, en fonction de l'application diagnostique ou thérapeutique.

5. Les biomatériaux en thérapie cellulaire.

5.1. Introduction.

Selon la définition établie lors de la conférence de Chester de 1986, les biomatériaux sont des "matériaux non vivants utilisés dans un dispositif médical destiné à interagir avec les systèmes biologiques". Les premiers biomatériaux utilisés en clinique sont les alliages métalliques, composés principalement de cobalt ou de titane. Grâce à leur grande stabilité à long terme *in vivo*, ces métaux ont été largement utilisés dans le remplacement de structures squelettiques [193] et représentent toujours les matériaux de choix dans le traitement de défauts osseux.

De nombreux autres types de biomatériaux existent aujourd'hui. Ils peuvent être d'origine naturelle ou synthétique [194]. Les biomatériaux naturels sont constitués d'éléments retrouvés dans l'environnement des cellules comme le collagène, l'acide hyaluronique, la fibronectine ou la laminine. Ils peuvent également être composés d'autres éléments tels que la soie, l'alginate, le HAP ou le chitosane. Ces matériaux présentent une bonne biocompatibilité et réduisent les réponses immunitaires après greffe. De plus, en tant que composants de la MEC, la plupart de ces matériaux démontrent des propriétés mécaniques et d'adhérence similaires à celles rencontrées par les cellules dans leur environnement. Cependant, ces matériaux demeurent complexes à modifier et à purifier. Leur faible résistance mécanique et l'importante variabilité inter-lots représentent aussi des limites non négligeables à leur utilisation.

De leur côté, les biomatériaux synthétiques forment trois groupes distincts : les polymères, les céramiques et les métaux. Les métaux sont largement utilisés en reconstruction osseuse, notamment orthopédique et dentaire. Des précautions restent cependant à prendre lors de leur utilisation à long terme pour éviter la libération potentielle d'ions métalliques toxiques pour l'organisme. À l'image des métaux, les céramiques sont principalement utilisées dans le traitement de défauts osseux. Leurs propriétés mécaniques et chimiques, proches de celles de l'os, ainsi que leur porosité, confèrent à ces matériaux de fortes propriétés ostéoconductrices. Enfin, les polymères dont les composants principaux sont le PLC, le PLGA ou encore le poly-éthylène-glycol (PEG) sont, contrairement aux métaux et céramiques, biodégradables. Cette propriété permet aux polymères d'être utilisés dans de nombreux domaines allant de l'ingénierie tissulaire à la synthèse de microporteurs biodégradables (voir paragraphe 3.2.4.2.1.). Contrairement aux biomatériaux naturels, leurs homologues synthétiques sont facilement modifiables, ce qui permet le contrôle de leur porosité, leur rigidité ou encore leur fonctionnalisation. Cependant, ces matériaux ont une biocompatibilité intrinsèque faible en comparaison avec les matériaux naturels. Les biomatériaux naturels et synthétiques sont donc complémentaires et aujourd'hui encore largement étudiés.

Initialement utilisés en tant que soutiens mécaniques inertes, les biomatériaux sont aujourd'hui des composés très complexes dont les fonctions intrinsèques dépassent celles de simples supports. Ils arborent de nouvelles fonctionnalités, comme la protection ou le guidage des cellules [195] leur conférant non plus une fonction passive, mais active dans le procédé biologique dans lequel ils sont impliqués. Leurs applications s'étendent à des domaines allant de la vectorisation de molécules, à la thérapie cellulaire, l'ingénierie tissulaire, ou encore l'amplification de cellules adhérentes à grande échelle. Dans ce cas, les biomatériaux sont retrouvés sous forme de microporteurs [195] (voir paragraphe 3.2.2.).

Concernant la vectorisation de molécules, les nanoparticules, de diamètre compris entre 10 et 100 nanomètres, ont représenté un réel intérêt ces dernières années [196]. Retrouvées sous plusieurs formes telles que les nanosphères ou les liposomes, ces biomatériaux sont principalement étudiés en cancérologie, où leur fonctionnalisation de surface permet d'améliorer le ciblage tumoral. Une fois vectorisées, des molécules thérapeutiques d'intérêt sont dirigées vers leur cible de manière

spécifique, permettant un meilleur effet thérapeutique et une réduction des effets secondaires [197,198].

Les biomatériaux sont aussi utilisés en thérapie cellulaire et en ingénierie tissulaire. Ils peuvent être utilisés sans cellules, mais associés à des facteurs trophiques stimulants les cellules *in situ*. On peut citer des facteurs de croissance, tels que le FGF, l'EGF ou le PDGF, des facteurs stimulant l'angiogenèse comme le VEGF, mais aussi des facteurs stimulant la différenciation des cellules *in situ*, comme le TGF- β [195]. Les biomatériaux permettent l'encapsulation ou l'inclusion de ces molécules thérapeutiques et ont été étudiés dans le traitement de pathologies neuronales, cutanées, osseuses et cartilagineuses [194,195].

Les biomatériaux peuvent aussi être utilisés en association avec des cellules. Dans ce cas, ils vont représenter pour celles-ci des supports d'adhérence, de croissance et de différenciation. Les biomatériaux naturels ont intrinsèquement toutes les propriétés nécessaires à l'adhérence et à la croissance des cellules, et notamment des CS [195]. Quant à eux, les biomatériaux synthétiques ne possèdent pas naturellement ces propriétés. Cependant, des modifications peuvent leur être apportées, comme l'intégration de peptides d'adhérence RGD, YIGSR ou IKVAV favorisant, via l'action des intégrines, l'adhérence et la croissance des cellules (Tableau 8).

Peptides	Provenance	Intégrines
RGD (linéaire ou cyclique)	Fibronectine, Vitronectine, Fibrinogène...	$\alpha 3\beta 1$, $\alpha 5\beta 1$, $\alpha v\beta 1$, $\alpha v\beta 3$, $\alpha v\beta 5$, $\alpha v\beta 6$, $\alpha IIb\beta 3$
REDV	Fibronectine	$\alpha 4\beta 1$
LDV		$\alpha 4\beta 1$, $\alpha 4\beta 7$, $\alpha 9\beta 1$
GFOGER	Collagène	$\alpha 1\beta 1$, $\alpha 2\beta 1$
DGEA		$\alpha 2\beta 1$
IKLLI	Laminine	$\alpha 3\beta 1$
EF1zz		$\alpha 2\beta 1$

Tableau 8 : Peptides ayant été intégrés dans des biomatériaux. Les protéines de la MEC dont ils sont issus et les intégrines avec lesquels ils interagissent sont notées. Modifié d'après Heath et Cooper [199].

Il a été démontré que la capacité de différenciation de CS peut être modulée par les propriétés mécaniques (rigidité, topographie) du support sur lequel elles se développent [100,200]. Cet aspect est d'avantage développé dans le paragraphe 3.2.2.2. et est mentionné dans le cas spécifique de biomatériaux de titane dans le paragraphe 5.2.4.

Une fois injectées, les cellules vont devoir faire face au système immunitaire du patient, notamment en thérapie allogénique, ou dans le cas de pathologies très inflammatoires (voir paragraphe 1.2.). Les biomatériaux peuvent aussi servir à l'encapsulation des cellules thérapeutiques afin de les protéger [201] (Figure 38).

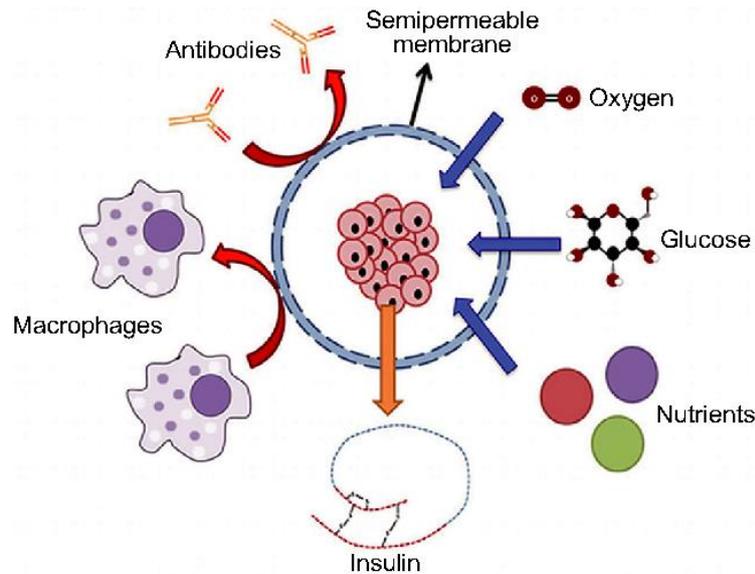


Figure 38 : Principe de l'encapsulation de cellules à visé thérapeutique. La semi-perméabilité des capsules permet aux cellules d'avoir accès aux nutriments nécessaires à leur survie et à leur développement, tout en étant protégées du système immunitaire de l'hôte. Dans le cas bien spécifique du traitement du diabète de type 1, ces capsules sont développées de manière à permettre la libération d'insuline dans le milieu. Modifié d'après Qi *et al.* [195].

Won *et al.* ont démontré qu'un recouvrement de CSM par un film de PEG conjugué au récepteur CXCR4 augmentait la capacité de migration de ces cellules vers un gradient de SDF-1, une chimiokine surexprimée dans le myocarde ischémié [202]. Au-delà de son rôle de protection, l'encapsulation peut donc être utilisée afin d'augmenter la capacité de "homing" des cellules.

Plusieurs biomatériaux sont actuellement étudiés au niveau clinique ou déjà commercialisés. Les pathologies cutanées, osseuses ou le diabète de type 1 comptent parmi les plus traitées. Concernant la régénération de la peau, Epicel[®], Dermagraft[®] et Apligraf[®] sont trois produits thérapeutiques dont l'utilisation a été approuvée par la FDA [203]. Epicel[®] consiste en une association de kératinocytes autologues à un substrat de pétrolatum pour le traitement de brûlures, tandis que Dermagraft[®] est une association de fibroblastes dermiques avec un substrat en polyglactine. Il est indiqué dans le traitement d'ulcères liés au diabète. Concernant la régénération de l'os et le diabète de type 1, plusieurs essais cliniques sont en cours afin d'étudier ces biomatériaux. Dans une étude de phase I/II gérée par l'entreprise Novocell, l'effet d'îlots encapsulés dans du PEG a par exemple été étudié sur 12 patients diabétiques (Identifiant ClinicalTrials.gov : NCT00260234). Concernant la régénération osseuse, un gel de plasma plaquettaire est également étudié dans une étude Egyptienne (Identifiant ClinicalTrials.gov : NCT04109417). Les résultats n'ont pour l'instant pas été communiqués.

Une des limites actuelles à l'utilisation clinique des biomatériaux est le manque de corrélation entre les résultats obtenus *in vitro* et *in vivo* lors d'essais précliniques. En effet, les protéines présentes dans l'environnement du biomatériau lors de son implantation peuvent être, en adhérant à celui-ci, responsables d'une modification de leur biocompatibilité et de leur fonctionnalité. Par exemple, elles peuvent entraîner des phénomènes de coagulation sanguine, de fibrose ou encore la formation de biofilms, responsables *in fine* d'une perte de fonctionnalité du biomatériau [204]. Une étude plus spécifique des interactions biomatériaux-protéines pourrait permettre de développer des structures plus adaptées à une utilisation *in vivo*. Dans le cas d'associations biomatériaux-cellules, ces dernières ont une faible survie suite à leur transplantation. C'est notamment le cas des îlots β pancréatiques qui se retrouvent dans un environnement peu vascularisé et hypoxique. Pour pallier cette limite, Kaufman-Francis *et al.* ont intégré dans une matrice de PLLA-PLGA des îlots, mais aussi des fibroblastes et des cellules endothéliales HUVEC [205]. Au-delà d'augmenter la survie des îlots β , cette tri-culture a permis d'augmenter drastiquement leur production d'insuline.

Les biomatériaux sont donc des structures extrêmement complexes dont l'optimisation reste un champ de recherche en plein essor. En particulier, le développement de l'impression 3D et notamment la bio impression de composés hybrides matériaux-cellules sera à l'avenir un des outils indispensables à leur confection [194].

Dans les paragraphes suivants, j'ai choisi de me concentrer plus particulièrement sur deux applications des biomatériaux auxquelles je me suis intéressé durant ma thèse. Il s'agit des biomatériaux ostéoconducteurs et des biomatériaux ayant des fonctions antiseptiques et antibactériennes.

5.2. Les biomatériaux ostéoconducteurs.

5.2.1. Introduction.

L'os est capable de se régénérer afin de préserver son intégrité et sa fonctionnalité tout au long de la vie de l'individu. Cette réparation osseuse est à l'origine du renouvellement de 25% de l'os spongieux et d'environ 3% de l'os cortical chaque année. Selon la taille de l'endommagement osseux, deux types de réparation vont avoir lieu : la réparation primaire qui concerne les petites lésions osseuses et consiste au maintien de l'homéostasie osseuse, et la réparation secondaire. Dans le cas de la régénération secondaire, la taille de la cassure est plus importante, sans pour autant excéder une taille de l'ordre du diamètre de l'os [206]. Plusieurs processus biologiques et physiologiques sont impliqués (Figure 39).

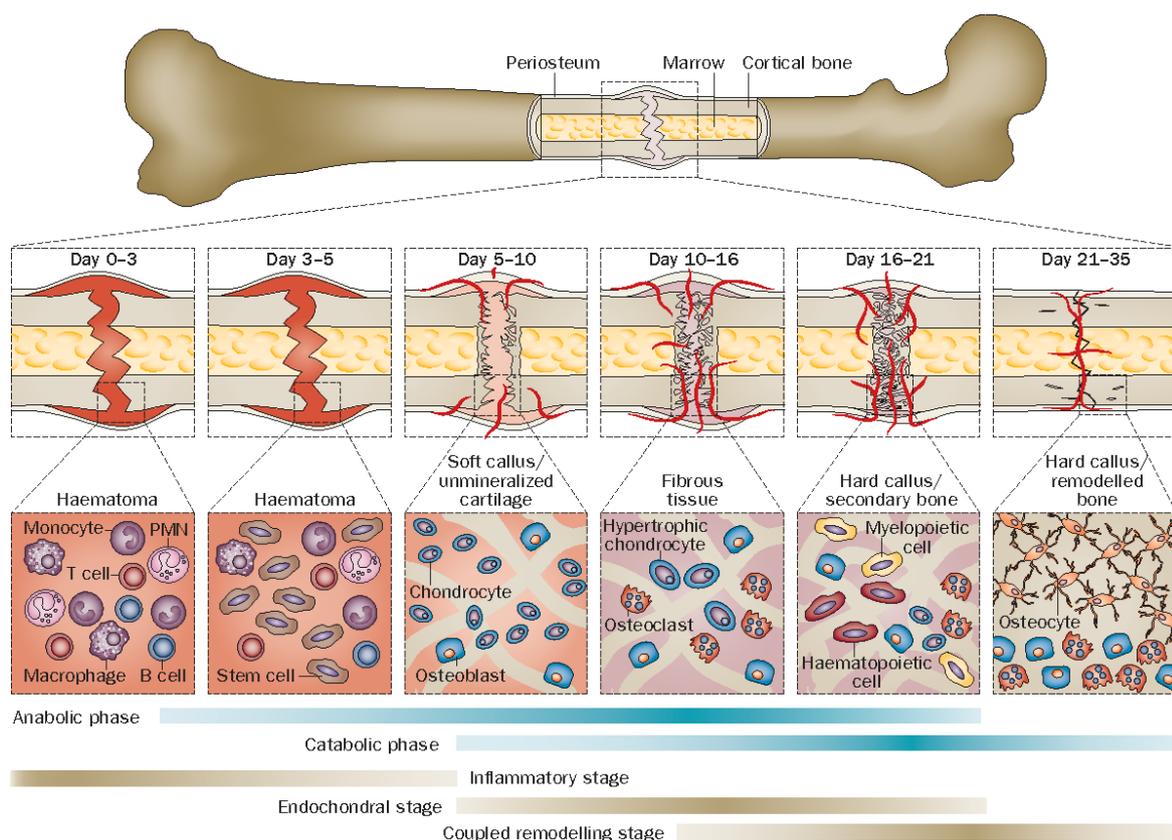


Figure 39 : Etapes impliquées dans la réparation secondaire de l'os suite à une fracture. Ce procédé, qui dure environ un mois, va impliquer de nombreux types cellulaires différents. En premier lieu, une réponse inflammatoire et la formation d'un hématome vont être observées. Par la suite, un cal, puis un tissu fibreux vont être formés, impliquant l'action de cellules cartilagineuses et osseuses telles que les ostéoblastes et les ostéoclastes, mais aussi des cellules appartenant au système hématopoïétique. Le remodelage est la dernière étape de la réparation osseuse secondaire ; il implique notamment les ostéocytes. D'après Wang et Yeung [206].

Dans certains cas, l'endommagement osseux est tel qu'il ne peut être réparé spontanément. Décrite par Spicer *et al.*, la taille critique correspond à la "taille minimum d'un défaut tissulaire qui ne pourra pas être complètement soigné durant la vie entière d'un animal" [207]. Dans le cas de l'os, celle-ci semble être comprise entre 2 et 2,5 fois le diamètre de l'os concerné [206]. De nombreux substituts osseux naturels ou synthétiques ont été développés afin d'aider le processus naturel de reconstruction. Une liste non exhaustive de ces substituts, de leurs propriétés ainsi que leurs limites est décrite dans le Tableau 9.

Type de substitut		<i>Ostéo-conduction</i>	<i>Ostéo-induction</i>	<i>Ostéo-génèse</i>	<i>Ostéo-intégration</i>	<i>Résistance mécanique</i>	<i>Limites</i>
Greffe d'os autologue	Os spongieux	+++	+++	+++	+++	-	Disponibilité limitée Morbidité et infection potentielle au niveau du site donneur
	Os cortical	+	+	+	+	+++	
Greffe d'os allogénique	Os spongieux	+	+	-	++	-	Risque de réaction immunitaire, de rejet, ou de transmission de pathologies
	Os cortical	+	-	-	+	+++	
	Matrice osseuse déminéralisée	+	++	-	++	-	Ostéoconductivité variable selon la source et le procédé de fabrication
Substituts synthétiques	Sulfates de calcium	+	-	-	++	+	Résorption (trop) rapide, seulement ostéoconducteur
	Hydroxy-apatites	+	-	-	-	++	Résorption (trop) lente, seulement ostéoconducteur
	Phosphates de calcium (Céramiques)	+	-	-	+	++	Seulement ostéoconducteurs
	Phosphates de calcium (Ciments)	+	-	-	+	+	
	Verres bioactifs	+	-	-	-	Non cité	Seulement ostéoconducteur Dégradation rapide nocive pour les cellules (pH)
	Poly(méthyl méthacrylate)s (PMMA)	-	-	-	-	+++	Inerte, exothermique et potentiellement toxique

Tableau 9 : Propriétés et limites des substituts osseux (hormis les substituts métalliques) utilisés en reconstruction osseuse. La capacité d'ostéoconduction permet de stimuler la migration et l'activité de réparation des cellules osseuses *in situ*. La capacité d'ostéoinduction permet aux cellules pluripotentes présentes de se différencier en cellules osseuses. La capacité ostéogénique permet la formation d'os en tant que tissu fonctionnel. D'après Wang et Yeung [206].

Idéalement, un substitut osseux doit être ostéoconducteur, ostéoinducteur et ostéogénique. Ces substituts osseux doivent aussi : *i*) avoir une bonne capacité d'intégration dans le tissu osseux tout en limitant la formation de tissu fibrotique, *ii*) avoir de bonnes propriétés mécaniques et structurales, *iii*) ne pas être toxiques, et *iv*) potentiellement être biodégradables, sans pour autant se dégrader trop vite ou trop lentement. Pour l'instant il n'existe pas de biomatériau idéal (Tableau 9). Fonctionnellement, les greffes osseuses autologues restent nettement les plus efficaces. Cependant, leur disponibilité limitée et la morbidité du site donneur sont des limites non négligeables en clinique. Des substituts synthétiques ont donc été développés. Il s'agit notamment des céramiques, des verres bioactifs et des PMMA (poly-méthacrylate de méthyle). Cependant, la plupart de ces substituts sont uniquement ostéoconducteurs, voire inertes dans le cas des PMMA, sont potentiellement toxiques et ont une biodégradabilité difficile à caractériser, bien qu'elle puisse être modulée dans le cas des phosphates de calcium.

De nouveaux matériaux sont en cours de développement et testés pour leur capacité de régénération osseuse. C'est notamment le cas du graphène et de la soie [206]. Cependant, bien que les études réalisées soient pour la plupart prometteuses, notamment lors d'associations à d'autres matériaux synthétiques, le manque de recul au niveau biologique limite pour l'instant leur utilisation clinique.

5.2.2. Association des biomatériaux avec des molécules bioactives.

Afin d'améliorer la fonctionnalité des substituts osseux, ils peuvent être associés à des composés stimulants la formation d'os. Parmi eux ont notamment été étudiés des facteurs de croissance (FGF, PDGF), angiogéniques (VEGF) ou ostéogéniques (BMP-2) [206,208] et ce au niveau préclinique et clinique. Le plasma plaquettaire étant composé de la majorité de ces facteurs [209], il a aussi été étudié, notamment au niveau clinique. Enfin, des drogues ostéogéniques telles que l'alendronate, la simvastatine et le raloxifene ont été associées avec des substituts osseux synthétiques [206].

L'une des limites de l'association biomatériaux-molécules bioactives est la capacité de libération de ces molécules de manière continue et non uniquement durant les premiers jours suivant leur injection. Ce phénomène, appelé "burst release", notamment décrit dans le cas du facteur ostéogénique BMP-2 [210], peut déclencher une réponse inflammatoire importante au niveau du tissu traité, et sa fibrose. Le "burst release" engendre aussi une baisse de la capacité de régénération osseuse. En effet, ces facteurs de croissance et notamment la BMP-2, ont une demi-vie extrêmement courte une fois injectés et sont rapidement éliminés par l'organisme. Leur effet n'est donc que transitoire et ne peut soutenir la réparation osseuse à long terme. Ces protéines peuvent alors être encapsulées, permettant leur libération continue (voir paragraphe 3.2.4.2.1). Enfin, la sécurité des molécules bioactives pose question pour une utilisation clinique [206]. Par exemple, l'utilisation du VEGF pourrait être associée à l'apparition ou à la récurrence de plusieurs pathologies telles que l'hémangiome ou même des tumeurs VEGF dépendantes. L'alendronate a quant à lui été associé à des phénomènes d'hypocalcémies, d'arythmie cardiaque, voir même de nécrose osseuse au niveau de la mâchoire [211].

5.2.3. Association des biomatériaux avec des métaux ostéogéniques.

Pour ces différentes raisons, l'incorporation d'ions inorganiques aux biomatériaux est une alternative intéressante. Ces ions, incluant le magnésium, le strontium, le silicone, le zinc, le cuivre, le lithium ou encore le cobalt sont en effet impliqués dans l'ostéogénèse et l'angiogénèse [206]. Par exemple, le site catalytique de l'ALP (phosphatase alcaline), enzyme essentielle dans la différenciation cellulaire ostéogénique, est constitué d'ions zinc et magnésium [212]. Le lithium, lui, est un inhibiteur de l'enzyme GSK3, qui elle-même est un inhibiteur de la voie de signalisation Wnt, impliquée dans l'ostéogénèse [213]. Enfin, l'effet du cobalt sur l'activation de HIF-1 α et par conséquent, sur la production de VEGF et la vascularisation a été démontré [214]. Contrairement aux facteurs cités ci-dessus, leur toxicité chez l'homme est essentiellement dose-dépendante et donc plus facilement contrôlable. Bien que leur effet thérapeutique ainsi que leur sécurité doivent encore être précisés, leur fonctionnalité, leur bas coût et leur stabilité font de ces ions inorganiques de sérieux candidats à une utilisation clinique, en remplacement ou association avec les facteurs précédemment décrits.

5.2.4. Les biomatériaux de titane en régénération osseuse.

Malgré ses nombreuses qualités, le titane n'a aucune propriété ostéoinductrice, et des associations avec des molécules ostéoinductrices ont donc été étudiées. Ainsi, la BMP-2 a récemment été immobilisée sur des supports de titane [215]. *In vitro*, cette fonctionnalisation a augmenté la différenciation ostéogénique des CSM de manière dose-dépendante. L'effet d'une fonctionnalisation à la BMP-2 sur des implants de titane a aussi été étudié *in vivo*. Haimov *et al.* ont proposé une revue systématique de ces expérimentations [216]. Parmi les 340 implants testés, l'incorporation de BMP-2

a clairement eu un effet positif sur leur ostéointégration et l'ostéoinduction, malgré les limites dues au "burst release" de la BMP-2. Dans certaines études, des réactions inflammatoires liées à l'utilisation de cette protéine ont aussi été observées. Enfin, l'étude de Guillot *et al.* a démontré qu'une libération trop importante de BMP-2 pouvait conduire à une inhibition transitoire localisée de la régénération osseuse [217]. Malgré son efficacité, la quantité de BMP-2 associée aux biomatériaux de titane, ainsi que sa libération, doit être finement régulée afin de prévenir ces effets délétères.

Des ions inorganiques ont aussi été incorporés sur des supports de titane et testés pour leur pouvoir ostéogénique *in vitro* et *in vivo*. C'est le cas du magnésium [218], du strontium [219] ou du zinc [220,221]. Dans l'ensemble de ces études, une augmentation de l'activité ostéogénique a été observée *in vitro* pour les CSM cultivées sur ces différents supports. Même si un effet dose dépendant a été observé dans le cas du magnésium [218], ce phénomène n'a pas été observé dans le cas du zinc ou une quantité trop importante a eu un effet délétère sur la capacité ostéogénique [220]. *In vivo*, l'incorporation de strontium a grandement favorisé la capacité d'ostéointégration des supports de titane, 8 semaines après implantation [219]. Associé à des ions zinc, l'effet ostéogénique du strontium est décuplé *in vitro* et *in vivo*, caractérisant une potentielle synergie entre ces deux ions [222].

Dans leur étude, Guo *et al.* ont incorporé le vanadium aux matériaux de titane [223]. Retrouvé dans l'os et le cartilage, cet ion est connu pour ses propriétés antioxydantes. Analogue au phosphate, il semble également être impliqué dans l'activation des voies de signalisation MAPK, PI3-K et ERK, impliquées dans l'ostéogénèse [224]. Les supports traités par cet ion induisent en effet une différenciation ostéogénique des cellules de façon dose-dépendante. L'effet antioxydant de ces biomatériaux a aussi été observé puisqu'en présence de H₂O₂, une production moins importante d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) a été observée chez les CSM cultivées sur les supports fonctionnalisés en vanadium, encore une fois de manière dose-dépendante. Enfin, les supports les plus riches en vanadium et ayant eu les effets ostéogéniques et antioxydants les plus importants, ont une capacité de libération ionique de 40 jours minimum dans le milieu de culture. Alors que la totalité des ions magnésium est libérée de leur support après seulement 7 jours dans l'étude de Kim *et al.* [225], ces supports pourraient apporter une alternative au "burst release" décrit dans le cas de la BMP-2 et serait donc intéressante à poursuivre dans le cas d'autres études.

Dans plusieurs études, la structure même du titane a été modifiée, lui conférant des propriétés mécaniques et physicochimiques intéressantes pour une éventuelle activité ostéogénique [226,227]. Trois grands types de modifications ont été réalisées : le traitement laser, le sablage et la gravure acide, ces deux dernières pouvant même être associées. Ces modifications engendrent la création de micro et de nanostructures à la surface des matériaux, affectant potentiellement le comportement des cellules cultivées. Des supports de titane traités par sablage et gravure acide (nommé SLA), ont été testés pour leur potentiel ostéogénique [226]. En comparaison avec des supports non traités, les matériaux SLA ont engendré la différenciation ostéogénique des CSM. Le potentiel ostéoinducteur de ces matériaux serait partiellement dû à leur propriété hydrophile. En effet, dans cette même étude, des supports SLA modifiés (mod-SLA), caractérisés par une diminution drastique de l'angle de contact eau-matériau, soulignant leur caractère hydrophile, ont été synthétisés. Sur les supports mod-SLA, les effets ostéogéniques ont été décuplés par rapports aux supports SLA. Cet effet a été retrouvé dans l'étude de Zheng *et al.* (Figure 40).

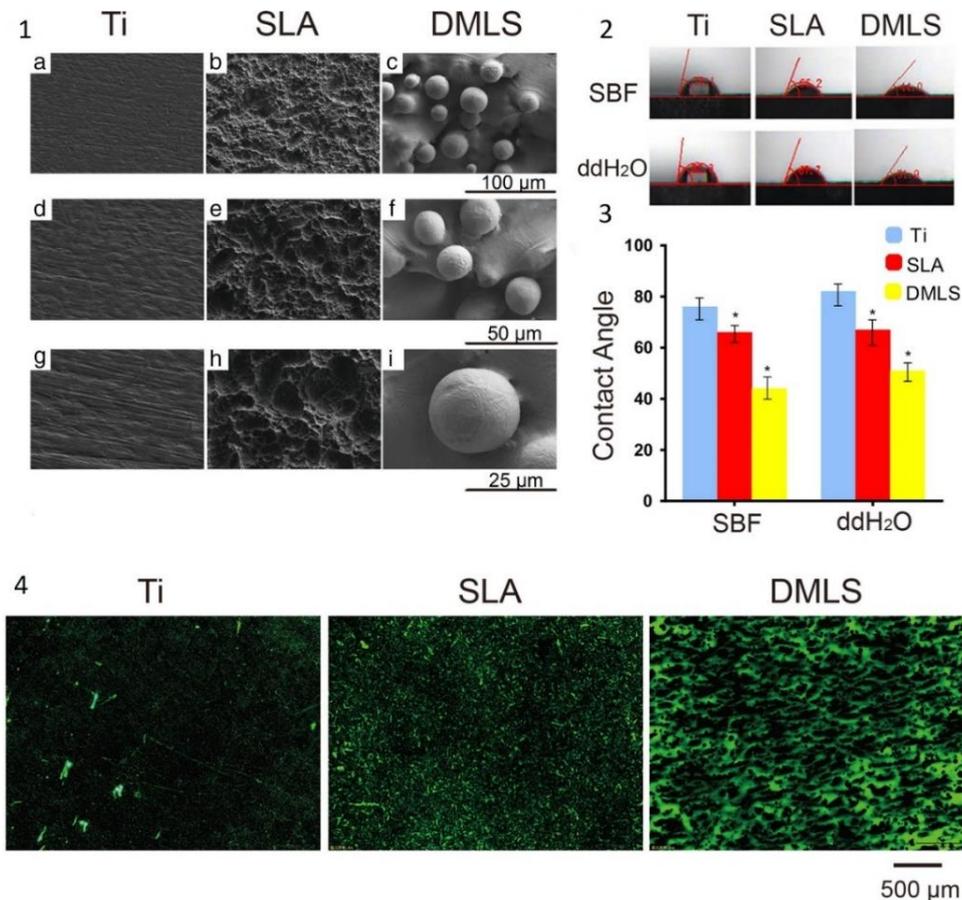


Figure 40 : Caractérisation de supports de titane non traités, traités par SLA et traités par direct metal laser sintering (DMLS). Nano topographie des supports (1) ; Angle de contact dans l'eau et dans un fluide corporel simulé, traduisant le caractère hydrophile (2 et 3) ; Adsorption de BSA (marquée en vert) sur les différents supports (4). Au-delà d'une modification impressionnante de la topographie des supports (1), le traitement DMSL augmente fortement le caractère hydrophile du matériau (2-3). De plus, ce traitement DMSL favorise l'adsorption d'albumine sérique bovine (4). Par la suite, les supports DMLS ont démontré une meilleure capacité ostéogénique *in vitro* et *in vivo*. Modifié d'après Zheng et al. [227].

Il a aussi été observé que l'effet ostéoinducteur des supports SLA et mod-SLA était drastiquement affecté suite à l'inactivation de l'intégrine $\beta 1$ [226]. Cette intégrine jouerait donc un rôle prépondérant dans la sensibilité des CSM aux modifications structurales des supports de titane. Le caractère hydrophile des matériaux de titane favorise l'adsorption de protéines à leur surface (Figure 40-4). Les intégrines étant connues pour leur interaction avec les protéines de l'environnement cellulaire, ces deux phénomènes sont donc sans doute liés.

Enfin, au-delà des aspects physico-chimiques, les nanotubes de titane caractérisent bien l'effet de la nano topographie des matériaux sur la capacité de régénération osseuse (Figure 41). Ainsi, des nanotubes de différentes tailles ont été formés par anodisation et testés pour leur capacité d'ostéointégration et d'ostéogénèse *in vivo* [228].

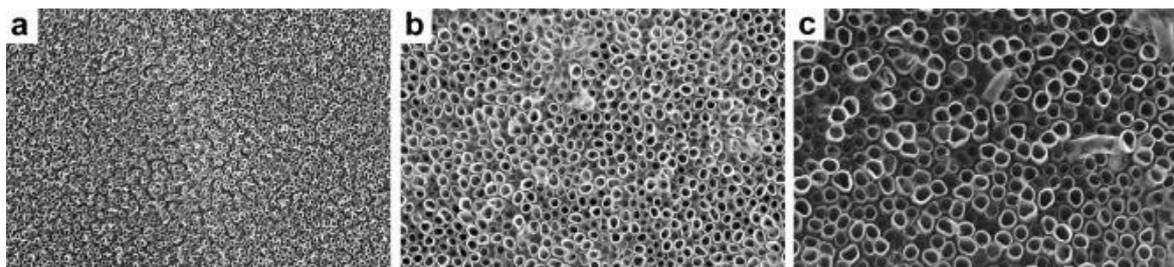


Figure 41 : Nanotubes de différents diamètres créés par anodisation : a : 30 nm ; b : 70 nm ; c : 100 nm. D'après Wang et al. [228].

Les nanotubes de 70 nm ont démontré une meilleure capacité d'ostéointégration et d'ostéogénèse chez le mini porc par rapport aux nanotubes d'autres diamètres. Le collagène de type 1, composant principal de l'os, est organisé sous forme de fibrilles espacées les unes des autres d'environ 68 nm. Les nanotubes de 70 nm mimeraient donc structurellement l'environnement naturel osseux. Ces résultats soulignent l'impact considérable de la taille, mais aussi de la disposition spatiale des nanostructures sur le comportement cellulaire.

5.3. Les biomatériaux antibactériens.

5.3.1. Introduction.

Lors de l'utilisation de biomatériaux en régénération osseuse, plusieurs complications peuvent être à l'origine d'une inefficacité du traitement. L'infection au site de greffe en fait partie. Bien que celle-ci soit peu commune grâce aux protocoles de prophylaxie, la résistance aux antibiotiques, associée à un recourt de plus en plus courant à ce type de greffe, tendent à accentuer ce phénomène. Aux Etats-Unis par exemple, l'incidence des infections suite au traitement de fractures osseuses, ou de pose d'implants dentaires, était comprise entre 5 et 10 % en 2006, représentant plus de 200 000 personnes [229].

Afin de limiter ces risques infectieux, des biomatériaux antibactériens sont développés à base de nano cellulose [230], de verres bioactifs [231], de métaux [232] ou encore d'hydrogels [233]. La nano cellulose est un polymère naturel issu des fibrilles de bois. Sa structure monomérique est composée d'un anneau glucopyranose. Découverts à la fin des années 60 en Floride, les verres bioactifs sont synthétisés de deux manières principales, via la technique de trempe, ou par sol-gel. Cette dernière, plus versatile, permet la synthèse de verres caractérisés par une meilleure bio activité ainsi qu'une meilleure capacité à se résorber. Le sol-gel permet de créer des matériaux mésoporeux [234], connus pour l'amélioration de leur surface, de leur capacité d'ostéointégration et d'ostéoconduction en comparaison avec des bio verres non poreux [231]. Enfin, les hydrogels sont des matériaux composés de polymères d'origine naturelle ou synthétique. Les hydrogels naturels sont principalement composés d'alginate, de gélatine, ou de chitosane. Leurs homologues synthétiques font appels à de très nombreux polymères tels que le PEG, le polyacrylamide (PAAm), l'acide polyacrylique (PAA) ou l'alcool polyvinylique (PVA) [233].

Les matériaux cités ci-dessus ne sont pas antibactériens et sont généralement associés à plusieurs types de composés tels que des antibiotiques, des métaux, ou d'autres molécules naturellement bactéricides. Par exemple, l'anneau glucopyranose, structure de base de la nano cellulose, présente trois fonctions hydroxyles à sa surface, sur les carbones 2, 3 et 6. Ces fonctions sont facilement modifiables chimiquement et permettent l'introduction de fonctions chimiques bactéricides telles que la fonction aldéhyde ou la fonction ammonium quaternaire [230].

5.3.2. Association des biomatériaux avec des antibiotiques.

De nombreux types d'antibiotiques ont été associés aux biomatériaux, tels que l'ampicilline, la tétracycline, la gentamicine, la chloramphénicol, la ciprofloxacine ou la vancomycine [230,233]. Concernant les supports de titane, la bacitracine [235] et une double intégration métronidazole-simvastatine [236] ont notamment été testées. Au-delà de l'effet antibactérien de la bacitracine, observé contre les souches *S. aureus* et *P. gingivalis*, une augmentation importante de la différenciation ostéogénique des cellules a été observée *in vitro* [235]. Cette capacité peut être due à une augmentation du caractère hydrophile du matériau suite à l'intégration de la bacitracine. Lors d'une coculture CSM-macrophages sur ces biomatériaux, une baisse importante de la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires, ainsi qu'une morphologie arrondie des macrophages, traduisant leur statut inactivé, ont été observées [235].

De nos jours, le risque lié à l'utilisation abusive d'antibiotiques est bien connu. De par l'apparition de souches bactériennes résistantes, et même multi-résistantes, l'utilisation future des antibiotiques est compromise et la réduction des doses utilisées est inévitable. Les biomatériaux apportent une solution puisqu'ils permettent une délivrance locale et contrôlée des molécules auxquelles ils sont associés, réduisant ainsi leur concentration [233]. Cependant, cette solution n'apparaît pas viable à long terme et d'autres composés antibiotiques ont été étudiés.

5.3.3. Association des biomatériaux avec des métaux antibactériens.

Les métaux représentent la principale alternative. En effet, de la poudre d'argent était déjà utilisée par Hippocrate afin de traiter les ulcères, il y a plus de 2000 ans. Aujourd'hui, les microorganismes sont connus et d'autres métaux ont été découverts pour leurs effets antibactériens. C'est le cas du cuivre, du zinc, du titane, du gallium ou encore du magnésium. Utilisés principalement sous forme d'ions ou d'oxydes, ces métaux sont aujourd'hui associés aux biomatériaux mentionnés ci-dessus. Quelques exemples de leurs mécanismes d'action sont décrits dans la Figure 42.

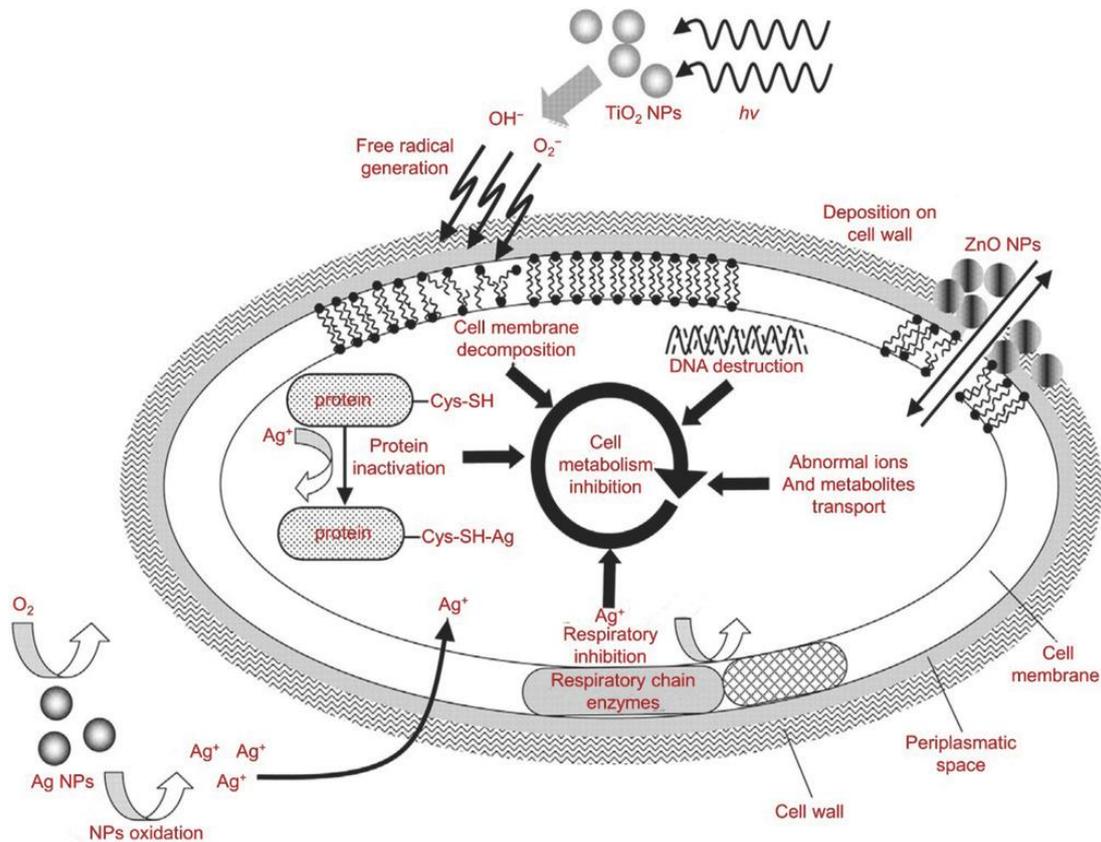


Figure 42 : Activité bactéricide de certains métaux. Différents mécanismes d'action des métaux sur l'intégrité bactérienne sont représentés. Les métaux peuvent être utilisés sous forme d'ions ou d'oxydes. Un des mécanismes le plus connu est la génération par ces métaux d'espèces réactives de l'oxygène (ROS). C'est notamment le cas des oxydes de titane qui, suite à leur irradiation, vont libérer des anions superoxyde O₂⁻. Une fois générés, ces ROS vont détruire la membrane des bactéries, conduisant à leur mort. Sous forme d'ions, les métaux peuvent également pénétrer dans le cytoplasme bactérien et perturber leur métabolisme. D'après Li et al. [233].

Selon Su *et al.*, lors de leur adhérence à la paroi bactérienne, les nanoparticules d'argent perturbent la fonction des protéines de la bicouche lipidique, conduisant à un dérèglement du gradient de protons H⁺ dans le périplasma, puis à une accumulation d'électrons dans le complexe I de la chaîne respiratoire. Cette accumulation d'électrons engendre par la suite la formation de ROS conduisant à la destruction membranaire [237].

Au-delà de son effet antibactérien, le cuivre est connu pour ses propriétés angiogéniques [206]. Ces propriétés, bien que très utiles dans la reconstruction osseuse, ont permis au cuivre d'être

utilisé dans une autre application, la cicatrisation. Par exemple, Wang *et al.* ont testé une association cuivre-bio verre *in vitro*. Au-delà d'inhiber la prolifération des bactéries *E. coli.*, ces biomatériaux ont augmenté significativement l'angiogenèse de cellules endothéliales HUVEC en culture 3D [238].

Associés aux hydrogels, les métaux bactéricides se retrouvent principalement sous la forme de nanoparticules d'argent pour une application en cicatrisation cutanée [239,240]. L'association nanoparticules-hydrogel d'alginate a démontré un effet positif sur la cicatrisation cutanée, ainsi qu'une réduction significative de l'infiltration de neutrophiles *in vivo*, en comparaison avec des hydrogels seuls ou des souris non traitées, démontrant un effet curatif et antibactériens de ces hydrogels chargés [239].

L'association de biomatériaux de titane à différentes quantités d'ions zinc a démontré un effet antibactérien dose-dépendant [220]. Néanmoins, seulement 20 à 30 % d'inhibition de croissance ont été obtenus pour les bactéries *S. aureus* et *E. Coli*. Afin d'améliorer la capacité bactéricide, une association du zinc et de l'argent a été testée [221]. Cela a permis d'augmenter significativement les propriétés antibactériennes de ces matériaux *in vitro* et *in vivo*. Les ions argent perturbent le gradient de protons H^+ , conduisant à une réaction en chaîne dans le mécanisme respiratoire des bactéries. La faible cytotoxicité est expliquée par la différence de taille entre les bactéries et les cellules eucaryotes. Même si leur gradient de protons est également affecté, la zone touchée n'est pas assez grande pour perturber significativement la chaîne respiratoire. Dans ce même esprit, Guo *et al.* ont démontré l'effet antibactérien de supports de titane fonctionnalisés au vanadium, *in vitro* et *in vivo*, contre des souches de *S. aureus* résistantes à la méticilline (MRSA) [223]. La contamination bactérienne engendre une déplétion en fer chez l'hôte, mécanisme universel de défense de celui-ci, qui stimule l'accumulation intra-bactérienne en vanadium. Or, une concentration intracellulaire excessive en vanadium affecte l'homéostasie redox des cellules, ainsi que leur capacité de croissance, expliquant l'effet bactéricide observé. Plus récemment, l'effet antibactérien de supports de titane associés au molybdène a été testé (Figure 43).

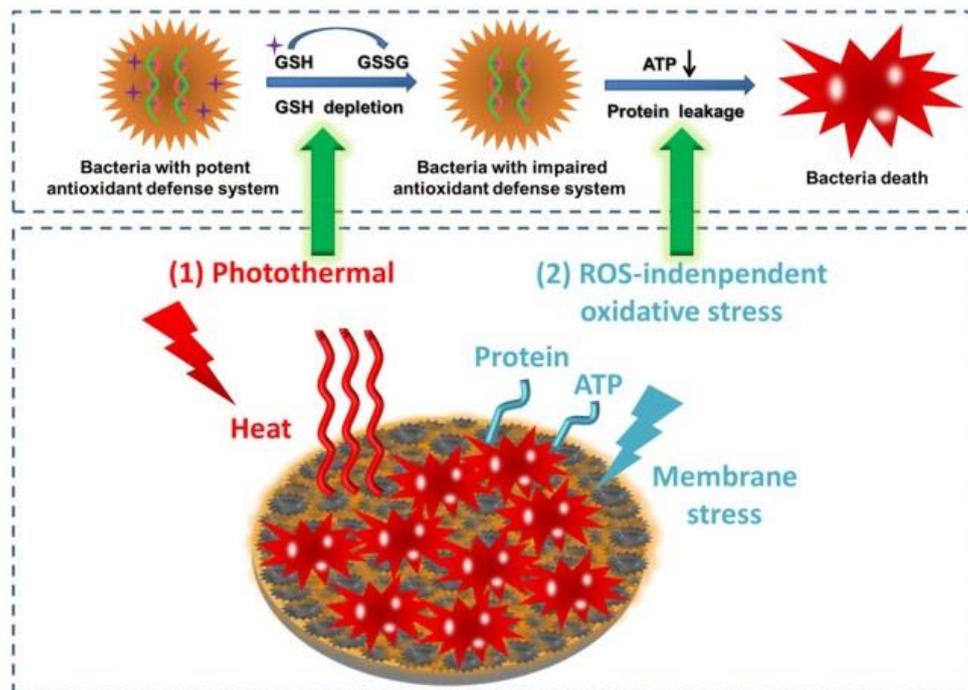


Figure 43 : Effet bactéricide de supports de titane fonctionnalisés au molybdène. Suite à l'irradiation NIR (near-infra-red) du support, l'effet photo thermique conduit à une déplétion en GSH, un antioxydant. Dépourvues de système antioxydant, les bactéries vont voir leur intégrité membranaire détruite. L'ensemble de ces phénomènes conduisent à une baisse de production en ATP ainsi qu'à une fuite de leurs composants protéiques, conduisant à la mort des bactéries. D'après Yuan *et al.* [241].

Liu *et al.* ont fixé des nanoparticules de TiO₂ sur leurs nanotubes de titane 70 nm dans le but d'augmenter leurs performances antibactériennes [242]. Lors de leur irradiation UV, les nanoparticules permettent un transfert important de charges photo-induites et une augmentation de la quantité de ROS produites, deux paramètres importants dans la différenciation cellulaire et dans l'effet bactéricide. En plus d'augmenter significativement la capacité ostéoconductrice de ces nanotubes, une légère baisse de croissance des souches bactériennes *S. mutans* et *P. gingivalis* a été observée *in vitro*. Une baisse de l'expression des protéines gtf B, C, D, reconnues comme facteurs de virulence dans le cas des caries dentaires, ayant aussi été observée chez ces bactéries, ces biomatériaux semblent particulièrement intéressants pour une utilisation en orthodontie.

5.3.4. Association des biomatériaux à une combinaison antibiotiques-métaux.

À l'instar des antibiotiques, les métaux possèdent un certain nombre de limites. Leur toxicité sur les tissus humains nécessite d'être étudiée de manière plus approfondie. Comme les antibiotiques, leur utilisation prolongée et à forte dose représente un risque environnemental, notamment sous forme de nanoparticules, et sanitaire [230]. L'association métaux-antibiotiques-biomatériaux fait partie des alternatives étudiées puisqu'elle permet de réduire les doses utilisées. Les verres bioactifs mésoporeux permettent cette association et sont donc intéressants dans cette optique [231]. Par exemple, Lee *et al.* ont développé des bio verres mésoporeux fonctionnalisés avec des ions argent et de la tétracycline [243]. Au-delà d'inhiber de manière synergique la croissance des bactéries *E. fecalis* et *S. mutans*, cette double fonctionnalisation engendre la différenciation des cellules souches dentaires *in vitro* et *in vivo*. Dans cette association, la destruction de la membrane bactérienne par les ions argent est complétée par une inhibition de la synthèse protéique par la tétracycline, expliquant la synergie antibactérienne de ces deux composés.

5.3.5. Association des biomatériaux avec des molécules naturelles.

Certaines molécules naturelles sont également connues pour leurs propriétés antibactériennes et ont donc logiquement été associées aux biomatériaux. C'est le cas du lysozyme, capable d'hydrolyser le peptidoglycane bactérien. Associé à des matériaux de nano cellulose, une inhibition de croissance de plusieurs souches bactériennes a été observée *in vitro* [244]. La curcumine, ou safran des Indes, est un pigment naturel antibactérien retrouvé dans les racines de Curcuma. Son utilisation biologique a longtemps été restreinte à cause de sa faible solubilité aqueuse. Encapsulée dans des hydrogels, cette molécule a démontré des effets antibactériens encourageants [245]. À l'image de la curcumine, d'autres molécules naturelles bactéricides insolubles dans l'eau ont pu être associées à ces hydrogels, telles que les huiles essentielles, le miel ou encore la propolis [230,233].

5.3.6. Biomatériaux intrinsèquement antibactériens.

Enfin, une alternative possible est la création de biomatériaux intrinsèquement antibactériens. Halpenny *et al.* ont inclus dans des hydrogels de PHEMA [246] et de PDMS-Pluronic F127 [247] une molécule libérant de l'oxyde nitrique (NO) lors de son illumination : le [Mn(PaPy(3))(NO)]ClO(4). Suite à sa libération, le NO a réduit de manière significative la croissance des bactéries *A. baumannii*, *P. aeruginosa* et *E. coli*, démontrant un effet antibactérien inductible. Cependant, le NO est rapidement oxydé en dioxyde d'azote ou converti en nitrate, perdant toute propriété bactéricide. Associées à une libération spatiale assez aléatoire du NO, cela limite l'utilisation de ces biomatériaux *in vivo*. Plus récemment, Bai *et al.* ont développé des hydrogels composés d'une protéine synthétique amphiphile : A₉K₂ [248]. Celle-ci a une forte capacité antibactérienne *in vitro* contre plusieurs souches bactériennes. Après 48 h de culture sur ces supports, une bonne cytocompatibilité a été observée. Enfin, lors d'une coculture de bactéries *B. subtilis* et de cellules NIH3T3, la fixation préférentielle des cellules eucaryotes a été démontrée. Cependant, la gélification du peptide A₉K₂ par la lysyl oxydase a pour catalyseur le SVF ou la plasma amine oxydase (PAO), deux protéines bovines. L'utilisation en clinique de cet hydrogel antibactérien pourrait être remise en cause.

Les alternatives les plus crédibles ont été développées avec des biomatériaux de titane. Un des concepts principaux consiste en la création de nanostructures à la surface des matériaux. Via leur taille et leur disposition, ces nanostructures miment le plus souvent des surfaces naturellement bactéricides [249–251].

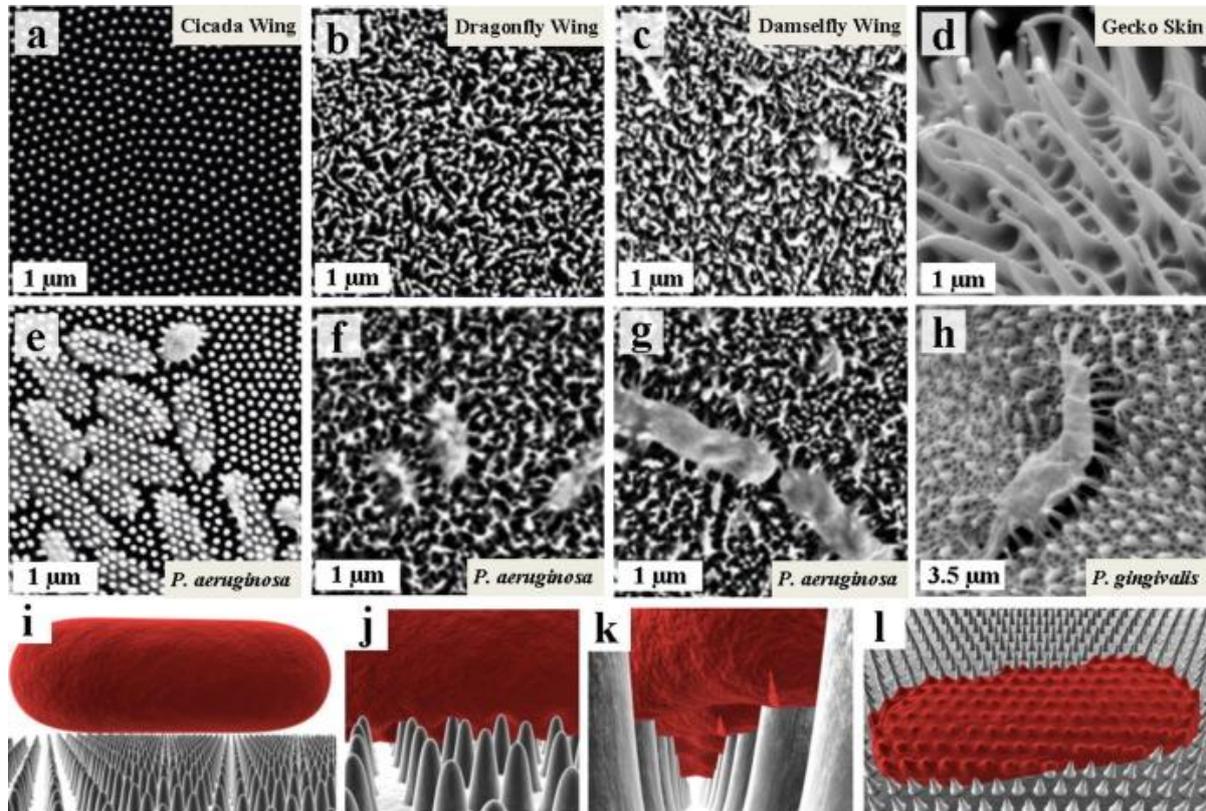


Figure 44 : Effet antibactérien de surfaces bio inspirées. Ligne du haut (a,b,c et d) : Images de microscopie électronique représentant les nanostructures à la surface des ailes de *Psaltoda claripennis* (a), *Diplacodes bipunctata* (b), *Calopteryx haemorrhoidalis* (c) et de la peau de *Lucasium steindachneri* (d). Ligne du milieu : Images de microscopie électronique des bactéries *P.aeruginosa* (e,f et g) et *P. gingivalis* (h) à la surface de ces différentes nanotopographies. Ligne du bas : Représentation schématique de l'effet bactéricide des ailes de *Psaltoda claripennis*. La bactérie approche de la surface (i) puis interagit avec celle-ci, ce qui engendre une tension de sa membrane (j). Cette tension entraîne une rupture de la membrane au niveau des régions "suspendues" entre les nanostructures (k), ce qui induit la destruction mécanique de la membrane de la bactérie, et sa mort (l). D'après Elbourne et al. [252].

Linklater *et al.* ont notamment développé des biomatériaux de titane nanostructurés par gravure plasma [250]. Ces biomatériaux, caractérisés par une topographie similaire à celle retrouvée chez *Diplacodes bipunctata*, ont démontré une activité bactéricide intéressante *in vitro*. Cet effet a été observé pour les bactéries à Gram négatif *P. aeruginosa* (87%) et à Gram positif *S. aureus* (72%), pourtant caractérisés par des propriétés membranaires très différentes.

Afin d'améliorer les propriétés antibactériennes de leurs matériaux de titane, cette même équipe a créé de nouvelles nanostructures, cette fois non biomimétiques, à la surface des biomatériaux de titane. Ces nanostructures ont montré une capacité bactéricide de 99% et 90% pour les souches *P. aeruginosa* et *S. aureus* respectivement [253]. Sur ces biomatériaux pré-infectés par ces mêmes bactéries, les ostéoblastes MG-63 ont réussi à adhérer et à proliférer, tout en conservant l'expression de leurs facteurs spécifiques [254]. Ces résultats démontrent l'intérêt de ces biomatériaux dans la "course pour la surface". Celle-ci caractérise les mécanismes par lesquels les cellules de l'hôte vont être en compétition avec les bactéries présentes à la surface d'un implant. Si les cellules de l'hôte

gagnent, elles colonisent la surface de l'implant et le protègent des agents pathogènes. Par contre, si les bactéries gagnent, elles vont infecter l'implant et former un biofilm à sa surface.

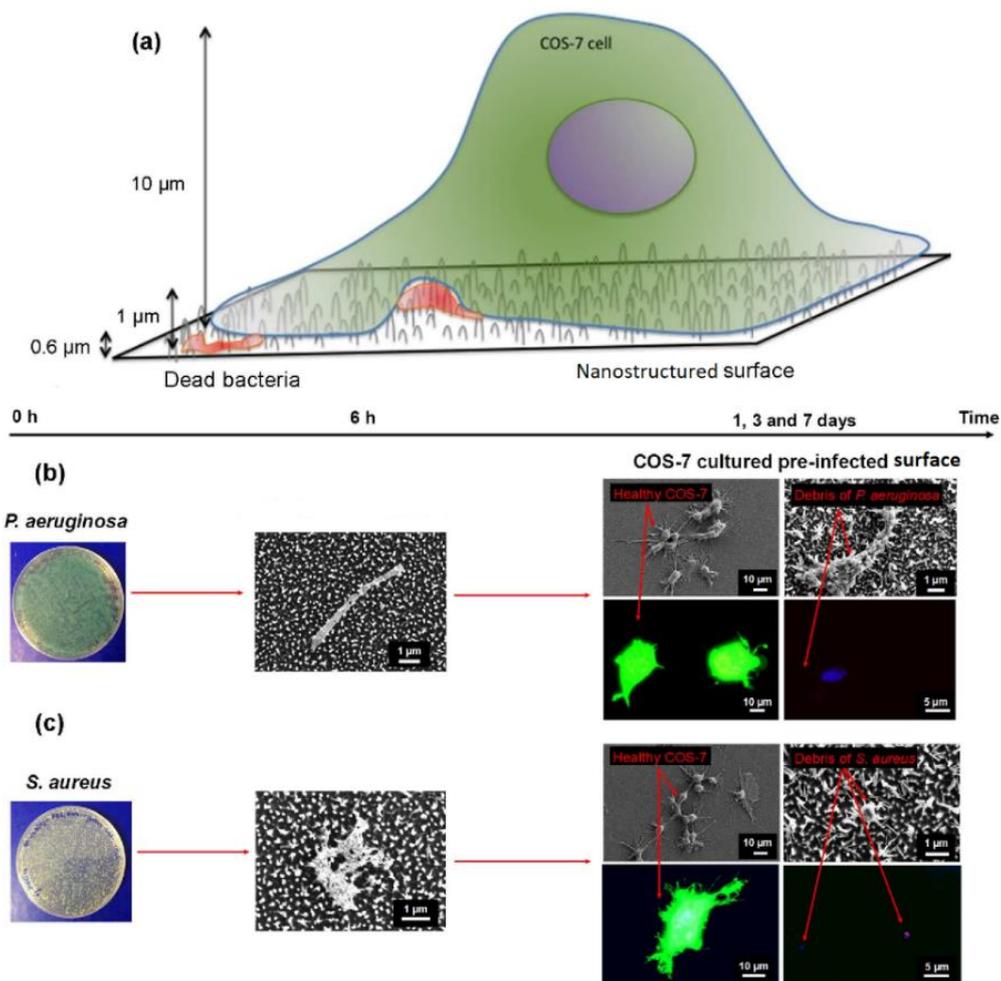


Figure 45 : Intérêt des biomatériaux nanostructurés dans la "course pour la surface" entre les cellules COS-7 et les bactéries *P. aeruginosa* et *S. aureus*. La taille importante des cellules COS-7 leur permet d'adhérer aux biomatériaux nanostructurés alors que les bactéries sont tuées par les nanostructures (a). Sur des supports pré-infectés par les bactéries *P. aeruginosa* (b) et *S. aureus* (c), les cellules COS-7 ont réussi à adhérer et à se développer à la surface des matériaux pendant au moins 7 jours. Elles ont pris l'avantage sur les bactéries dans la course à la surface. Modifié d'après Pham et al. [255].

Ces biomatériaux de titane nanostructurés représentent donc des alternatives intéressantes aux biomatériaux antibactériens utilisant des ions métalliques ou des antibiotiques. Idéalement, ces nouveaux biomatériaux devront être capables, outre leurs propriétés intrinsèques bactéricides envers de multiples souches bactériennes Gram positives et négatives, d'avoir une bio activité intéressante pour une utilisation clinique, notamment dans la régénération osseuse.

Objectifs du travail de thèse

Mon travail de thèse avait pour objectifs de :

- Tester des microporteurs de forme innovante pour l'amplification d'ASC. En premier lieu, plusieurs fonctionnalisations sol-gel ont été testées dans différents milieux de culture. Une fois la meilleure fonctionnalisation déterminée, des microporteurs ont été synthétisés et le comportement d'ASC sur ces microporteurs a été étudié en culture statique, puis en spinner flasks. Ce premier axe d'étude a été réalisé grâce à une collaboration avec Carroucell, une entreprise spécialisée dans la production de biomatériaux innovants dans le cadre de ma bourse CIFRE.
- Caractériser le comportement d'ASC sur différents types de biomatériaux de titane. Trois supports différents ont été étudiés : des supports polis de topographie lisse et deux types de supports nanostructurés dont l'effet antibactérien avait été prouvé dans des études précédentes. La capacité d'adhérence, de croissance et de différenciation des cellules a notamment été observée. Ce travail a été réalisé en collaboration avec l'équipe du Pr Elena Ivanova, chercheur à l'Institut Royal de Technologie de Melbourne.
- Déterminer l'impact d'une culture en spinner flasks sur la production d'EV par les ASC. La production d'EV a été évaluée à partir d'une culture en spinner flasks et comparée aux résultats obtenus en boîtes de culture classiques. Les microporteurs commerciaux Enhanced attachment ont été utilisés. L'impact du type de culture a été évalué qualitativement et quantitativement. Suite aux conditions exceptionnelles liées à la pandémie de coronavirus, les résultats présentés ici sont préliminaires et n'ont pu être conduits jusqu'au bout.

Partie I : Développement de microporteurs innovants pour l'amplification à grande échelle d'ASC.

Cette première partie de mon travail, réalisée en collaboration avec l'entreprise Carroucell, avait pour but de synthétiser et d'étudier le comportement d'ASC sur des microporteurs de silice de forme innovante. La difficulté d'un tel projet était d'arriver à développer des supports adaptés à l'adhérence et à la croissance des ASC tout en respectant les contraintes liées à une utilisation en bioréacteurs : les microporteurs doivent être mécaniquement solides et de faible densité.

Plusieurs types de fonctionnalisations de la surface des supports et différents milieux sans sérum ont été étudiés *in vitro*, en plaques 96 puits, afin d'identifier les meilleures combinaisons fonctionnalisation-milieu. Dans un second temps, des microporteurs à base de silice et fonctionnalisés ont été synthétisés sur la base d'un procédé breveté par la société Carroucell. Le comportement d'ASC a ensuite été étudié en conditions de culture statiques puis dynamiques en spinner flasks. Ces travaux ont conduit à la rédaction d'une publication, présentée sous la forme envoyée à l'éditeur.

1. Sélection du milieu de culture et de la fonctionnalisation des microporteurs.

1.1. Matériel et méthodes.

Les matrices de silice fonctionnalisées par du collagène de type I, de l'acide hyaluronique, de la fibronectine ou de la poly-L-lysine ont été synthétisées par voie sol-gel directement dans des plaques de culture de type 96 puits non-prétraitées pour la culture de cellules. Les procédures de synthèse de la silice et de formulation ne peuvent être détaillées ici car elles demeurent le savoir-faire protégé de la société Carroucell et l'objet d'un brevet en cours de dépôt.

Les ASC (CTI Biotech, Meyzieu, France) ont étéensemencées (5000 cellules/ puits) et incubées à 37°C, 5% CO₂ pendant 24, 48, 72 et 96 h. Quatre milieux de culture différents ont été utilisés :

- le DMEM supplémenté par 10% de sérum de veau fœtal (SVF)
- le milieu PowerStem MSC1 (PAN Biotech, Allemagne) sans SFV
- le milieu CTSTM StemProTM MSC SFM (ThermoFisher Scientific, France) sans SFV
- le milieu Mesenchymal Stem Cell Growth Medium DXF (Promocell, Allemagne) sans SFV

À chaque temps, les plaques de culture sont centrifugées à 1500 rpm pendant 5 min puis vidées. Dans chaque puits, 100 µL de milieu de culture contenant 0,5 g/ml de réactif MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl) -2,5-diphenyl tetrazolium bromide) (Sigma-Aldrich, France) ont été ajoutés pour permettre la quantification des cellules vivantes. Les cellules ont par la suite été incubées pendant 3 h à 37°C, 5% CO₂ et à l'abri de la lumière. Après centrifugation et élimination du surnageant, les cristaux de Formazan formés ont été dissous par ajout de 100 µL de diméthylsulfoxyde (DMSO) (Sigma-Aldrich, France) dans chaque puits. Enfin, le nombre de cellules vivantes a été quantifié par une lecture d'absorbance à 570 nm (référence 650 nm).

1.2. Résultats.

Les cinétiques de croissance des ASC cultivées dans les différents milieux de cultures et sur les différentes matrices sol-gel sont représentées dans la Figure 46 ci-dessous.

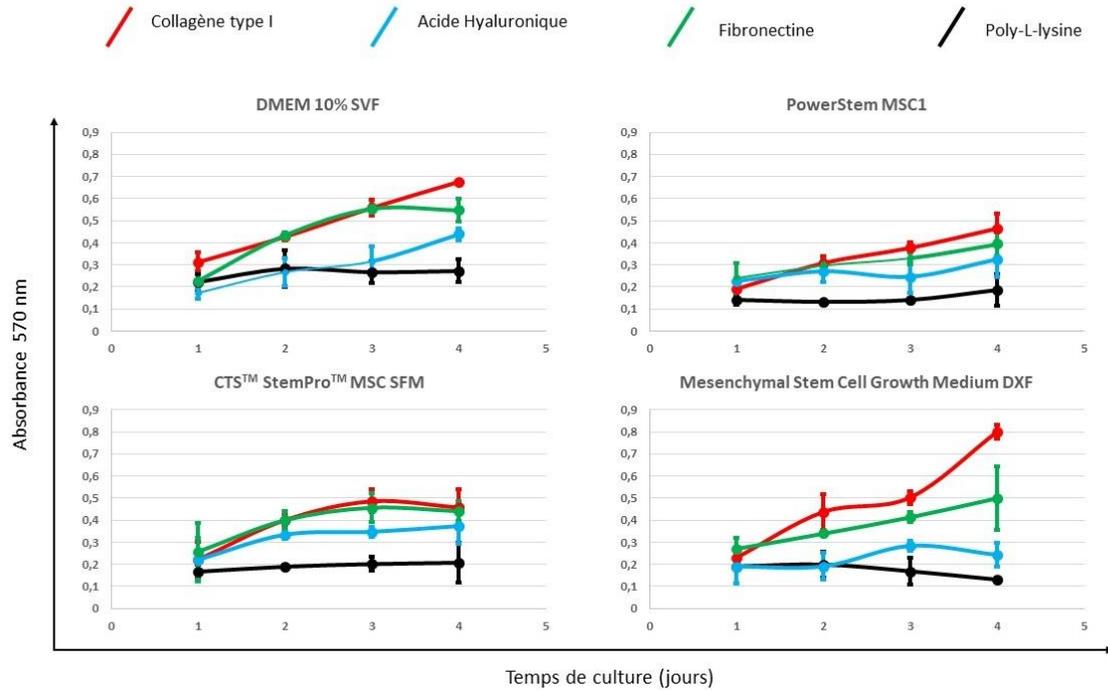


Figure 46 : Influence du milieu de culture et de la fonctionnalisation sur la croissance des ASC. La prolifération des cellules a été suivie au cours du temps à l'aide d'un test MTT. Quatre matrices de silice et quatre milieux de culture différents ont été testés (n=3).

La fonctionnalisation au collagène ou à la fibronectine sont les plus adaptées à l'amplification d'ASC, quel que soit le milieu de culture testé. En accord avec Shekaran *et al.* [129], les résultats les moins bons ont été observés avec la poly-L-lysine, puisqu'une absence de croissance cellulaire (absorbance d'environ 0,2 pour tous les temps et tous les milieux) a été observée dans toutes les conditions testées. Enfin, milieux et fonctionnalisations confondus, la condition optimale semble être l'association d'une matrice de silice fonctionnalisée au collagène de type I avec le milieu Promocell Mesenchymal Stem Cell Growth Medium DXF. En effet, dans ces conditions, un facteur d'amplification de 3,5 a été observé après 72 h de culture. En comparaison, un facteur d'amplification de 2,2 a été observé pour le milieu DMEM + SVF, deuxième milieu le plus efficace.

Nous avons donc choisi le collagène de type 1 comme fonctionnalisation de référence pour la synthèse de microporteurs de silice. De plus, nous avons décidé de continuer à travailler avec les milieux de culture développés par la société Promocell. Pour des raisons économiques, nous avons cependant choisi le milieu Mesenchymal Stem Cell Growth Medium 2, contenant 2% de sérum mais ayant une composition équivalente à la formulation "xeno-free" ou DXF testée.

2. Développement et caractérisation de microporteurs innovants pour l'amplification d'ASC en culture tridimensionnelle dynamique.

2.1. Article 1.

Innovative Disc-shaped Xeno-free Microcarriers for Adipose-Derived Mesenchymal Stem Cells Amplification and Increased Harvesting Ability.

Tristan Le Clainche, Tarek Fathallah, Anaïck Moisan, Jean-Luc Coll, and Véronique Martel-Frchet**

T. Le Clainche, Dr J.L. Coll, Dr V. Martel-Frchet
Cancer Target and Experimental Therapeutics
Institute for Advanced Biosciences, INSERM U1209, UMR CNRS 5306
Grenoble Alpes University
Site Santé, Allée des Alpes, 38700 La Tronche, France
E-mail: veronique.frchet@ephe.psl.eu

T. Le Clainche, Dr T. Fathallah
Carroucell
73800 Saint Helene du Lac, France

Dr A. Moisan
Cell Therapy and Engineering Unit
EFS Auvergne Rhône Alpes
38330 Saint Ismier, France

Dr V. Frchet
EPHE
PSL Research University
4-14 rue Ferrus, 75014 Paris, France

* corresponding authors

Abstract:

Human adipose-derived mesenchymal stem cells (ASC) are promising tools for regenerative medicine, but their *in vitro* amplification before administration is still an issue. Microcarriers emerge as a novel approach for ASC expansion in bioreactors. In this work, innovative silica microcarriers obtained with a Green Sol-Gel chemistry are presented. These microcarriers have a novel disc shape which, as compared to the commonly used spherical microcarriers, increases their specific surface while presenting a flat surface, close to monolayer culture conditions. They present a uniform diameter of 500 μm and a width of 3 μm , giving rise to a surface of \approx

2500 cm² g⁻¹, significantly more important than the ones available with spherical microcarriers. These microcarriers are functionalized with collagen versus epoxide or NH₃ groups in order to provide functional surfaces without xenogenic products. In stirred spinner flasks, positively charged NH₃ microdiscs allow to obtain similar amounts of ASC than spherical microcarriers, while maintaining an excellent cell viability of approximately 95%. Harvesting is highly facilitated compared to other microcarriers with a yield of virtually 100% and ASC keep their specific markers expression and tri-lineage differentiation ability. These new xeno-free positive charged NH₃ microcarriers thus represent an important step toward a GMP compliant large-scale ASC production for biomedical applications.

1. Introduction

Human mesenchymal stem cells (MSC) are self-renewal multipotent cells that can differentiate into a variety of tissues.^[1] MSC can be isolated from different tissues sources such as bone marrow (BMSC), adipose tissue (ASC), dental tissues, dermal tissues or umbilical cord.^[2-4] Thanks to their facilitated sampling process, adipose tissue derived mesenchymal stem cells (ASC) appear as a really promising source for cell therapy and have already been used in numerous clinical studies.^[5] Furthermore, their proliferation capacity is not dependent of the age of the patient.^[6] When compared to bone marrow-derived stem cells, ASC have a similar immunomodulatory potential but are genetically and morphologically more stable, and present a higher proliferation capacity and lower senescence during in vitro expansion.^[7] Since 2010, the number of clinical trials using ASC had steadily increased with some clinical trials in phase III.^[8] ASC are tested for the treatment of different pathologies such as type 1 diabetes, osteoarthritis, Crohn's disease or heart diseases.^[9-12] In particular, some clinical studies suggested that ASC possess immunosuppressive properties, indicating that they could be used for allogeneic graft.^[13] This could be a great advantage, since it would allow to prepare stocks of ASC from a single donor that could be ready for use when needed. Indeed, according to the treated pathology, as well as the patient, the needed cell dose may be quite consequent, up to tens of millions per kg body weight of patient.^[14] Even in the case of adipose tissue, a good source of ASC with a yield of 10^6 cells per 200 mL of fat, ASC still need to be amplified up to 10^2 times to obtain a reliable amount of therapeutic cells.^[15] Actually, 2D amplification in culture flasks is not adapted, since this would require a culture surface greater than 0.3 m^2 for supplying enough cells for one treatment. Besides being cumbersome and cost-effective, those technics may induce heterogeneity in the final product since cells proliferate in different flasks and are subsequently pooled. Moreover, the important handling steps increase contamination risks. Furthermore, several studies have shown that the phenotype of MSC was dependent of

cell expansion process and that continuous passaging could lead to cell transformation.^[16–18] To overcome these issues, large scale amplification process involving bioreactors have been developed.^[19–21] In the case of anchorage dependent cells such as MSC, microcarriers (MC) are needed.^[22] Numerous types of MC are commercially available and present different physical properties. They can be solid or porous, made of different materials (dextran, gelatin, polystyrene, cellulose) and they can have different surface coatings (extracellular matrix proteins, growth factors, positive charges).^[14] Many “homemade” and suppliers MC, typically spherical particles with a diameter of 100-300 µm, are currently developed and adapted according to the targeted therapeutic application and cell origin. Mechanical properties of the scaffolds on which MSC are amplified have also been widely studied and it was showed that substrate topography and stiffness impact cell fate and alters expression of MSC biomarkers.^[23–28] Finally, as MSC will be directly injected to patients, they must be produced in xeno-free conditions with clinical grade medium. All these aspects must be considered to develop new microcarriers allowing reproducible *ex-vivo* expansion of MSC while preserving their characteristics.

Sol Gel chemistry is a powerful tool based on the hydrolysis and condensation of metal alkoxides. It permits the production of a large range of functional solid objects such as porous materials, thin films or nanoparticles while allowing a great control of particle size and morphology.^[29] Finally, the flexibility of the sol gel technology allows the synthesis of hybrids materials containing organic and mineral compounds in a cost-effective manner. It is thus possible to functionalize them with different types of molecules that support cell attachment and proliferation but also allows an efficient detachment of the cells at the end of the process. This later process still remains a major challenge in MC-based cell culture. As well, the influence of microcarriers shape on MSC phenotype has not been studied for bioreactor culture purposes.

We have developed sol-gel based technologies that allows the production of silica objects with very complex microstructures of high precision, impossible to obtain by conventional methods of implementation of glasses and ceramics. Furthermore, the obtained objects present a suitable purity and homogeneity (Patent FR2000158 deposited on the 9th of January 2020). In this study, we use our technology to synthesize new shaped disc microcarriers composed of silica and hydroxyapatite (HAP), a biomaterial able to support MSC adhesion.^[30] Indeed, it has been shown that the curvature of MC decreased MSC proliferation because cells are exposed directly to surrounding flows and exposed to high shear stress in stirred bioreactors.^[31] To our knowledge, these are the first disc shape microcarriers adapted to stirred culture conditions. This allows a significant increase of the specific surface area of the microcarriers compare to spherical MC and so the amount of cells per unit volume of culture medium. It is possible to increase the surface area without increasing the volume by adjusting the thickness of the disks.^[32] Moreover, the versatility of our synthesis process allows to test different functionalizations of our MC. In addition, our chemical process was established to avoid the use of toxic solvents or catalysts. Herein, we studied HAP-silica MC functionalized with type I Collagen or with either epoxide or NH₃ groups in order to avoid the use of xenogenic components. The ability of those MC to support ASC amplification in static and in dynamic conditions using spinner flasks was compared to the growth of ASC in 2D monolayer conditions. We also compared our MC with two commercially available MC that are commonly used for MSC amplification (Enhanced attachment and Cytodex 1). We analyzed cell proliferation, cell viability and ASC phenotype (expression of ASC specific markers, multilineage differentiative potential) after cell expansion with our MC. Finally, we determined the yield of cell harvesting compared to other commercial MC.

2. Results

2.1. Characteristics of disc-shape Microcarriers

We synthesized new disc MC (HAP MC) by combining silica and hydroxyapatite (HAP). Our process allowed the production of MC with a diameter of about 500 μm (**Table 1**). Importantly, they presented a higher homogeneity of size ($519.5 \mu\text{m} \pm 9.3\%$) in comparison with the commercial Corning[®] Enhanced Attachment Microcarriers ($168.5 \mu\text{m} \pm 25.8\%$) and Cytodex 1 ($197.5 \mu\text{m} \pm 25.6\%$). This will ensure that confluence of cells will be reached at the same time, an important condition to have a homogenous pool of ASC.

To increase cell adhesion, MC were also functionalized with collagen from marine origin, an extracellular cell matrix protein known to promote cell adhesion (HAP-Collagen MC). However, a safe expansion protocol for human ASC for clinical application requires the total absence of xenogeneic materials. Therefore, we developed MC functionalized with an epoxide group which is a hydrophilic function (HAP-Epoxide MC). Since it is known that positively charged surfaces allow cell adhesion and spreading, we also synthesized MC functionalized with a tertiary amino group (HAP-NH₃ MC).

Since the initial solution is homogeneous, the distribution of functional groups within the matrix remains similar during the entire sol-gel process. The surface distribution of each component introduced in the MCs is presented in **Table 2**. SiO₂ is always the most represented component: 89.6, 90.6, 90.6 or 99.5% of the surface of HAP-Collagen, HAP-Epoxide, HAP-NH₃ and HAP MC, respectively. In these MC, HAP represents 0.4% in HAP-Collagen MC and 0.5% in all other HAP MC. Finally, collagen, epoxide function or amine function represent 10%, 9% and 9% of the surface of their respective MC.

2.2. ASC Adhesion and Proliferation on Microcarriers in Static Conditions

The efficiency of cell adhesion at the beginning of culture would influence cell expansion, since a latency would occur if a too low number of cells adhered on MC. ASC attachment on

our MC was compared to that observed on Tissue Culture Polystyrene plates (TCPS), used as control surfaces, and to Cytodex-1 and Enhanced attachment MC, previously shown to allow MSC amplification. [33,34] After 30 min on static conditions, about 80% of cells adhered on all MC, except for HAP-MC that required more than 150 min to reach the same level of adhesion (**Figure 1a**). So, this type of MC was removed from this study since it failed to promote an efficient ASC adhesion. However, for shorter times, we could observe that HAP-Epoxyde, HAP-NH₃ as well as Cytodex-1 MC promoted a dramatic increase of ASC adhesion. More than 75% of cells were attached to these MC after only 5 min. This was much faster than adhesion on Enhanced-attachment or HAP-Collagen MC and on TCPS plates.

An important feature of MC is their ability to promote a uniform cell distribution to ensure homogeneous culture conditions for all the cells. Cell distribution on MC was observed after 72 h of incubation. ASC are heterogeneously distributed on Enhanced-attachment MC, with some MC without cells and others with a high cell density (Figure 1b). This lead to cell aggregates that may not be desirable, since high cell–cell contact may negatively affect the proliferation and differentiation potential of ASC^[35]. Conversely, ASC appeared more homogeneous distributed on Cytodex-1 and disc MC and all MC seemed to be colonized. Concerning cell's morphology, ASC were notably more spread with a fibroblastic shape on our MC than on Enhanced-attachment or Cytodex-1 MC (Figure 1c), indicating that they retained their phenotype during expansion on our MC.

As shown on **Figure 2a**, ASC proliferated on all MC, but with slight differences. After one day, HAP-NH₃ and HAP-Epoxyde MC showed the best ability to promote cell growth. However, after 5 days, we could obtain more or less the same number of cells with all MC. It should be noted that for all tested MC, the total number of ASC remained approximately 1.5 times less than that obtained on TCPS plates after 7 days. Finally, at the end of the culture, the proliferation seemed to decline except with HAP-Collagen MC. This could reflect cell death

or a lack of free surface on MC. Indeed, after 7 days on MC, the cell death on Enhanced-attachment and Cytodex-1 MC was significantly increased by 1.5 and 1.2 times respectively compared to that observed on TCPS plates (Figure 2b). On the contrary, cell death was reduced by a factor of 1.1, 1.25 and 1.7 with HAP-collagen, HAP-Epoxyde and HAP-NH₃ MC respectively. The elevated cell death observed with Enhanced-attachment MC could reflect the high number of aggregates observed with this class of MC (Figure 1b).

So, in static conditions, our MC appeared particularly adapted for the amplification of ASC, since they promote ASC adhesion and proliferation with the same rate as other available MC currently used, while allowing a better cell survival, which is a crucial criterion for the amplification of therapeutic cells.

2.3 Improved harvesting from microcarriers

The ease of detachment of cells from MC is a major challenge in MC-based cell culture. Based on an analysis of the literature, we decided to test TrypLE, a xenofree recombinant trypsin. ^[36] In the same conditions of enzyme concentration and time of incubation, we could observe that virtually 100% of the cells have been recovered with our three different HAP-MC (**Figure 3**). On the contrary, half of the cells remained attached to Enhanced-attachment or Cytodex-1 MC. In conclusion, HAP-Collagen, HAP-Epoxyde and HAP-NH₃ MC allowed an excellent harvesting yield that offered a valuable benefit compared to other commercially MC.

2.4 ASC expansion under stirring conditions in spinner flasks

To further characterize our MC, we studied their performance in spinner flasks. For each assay, 1.5×10^6 ASC were inoculated in low serum medium containing a total MC surface of 200

cm². After 5 days, we observed that each MC type could promote ASC proliferation in stirred conditions (**Table 3**). However, HAP-Epoxy MC seemed to be the less suitable for ASC amplification in these conditions. On the contrary, Enhanced-attachment and HAP-Collagen MC were able to generate the highest cell expansion ability (8-fold expansion) of ASC compared with the others MC. Finally, Cytodex-1 and HAP-NH₃ MC allowed to obtain about 1×10^7 cells, which corresponded to a 6.3-fold amplification after 5 days in spinner flask. We observed an important difference in cell viability among the more efficient MC. For example, cells harvested from HAP-NH₃ MC presented a cell viability of $95.3 \pm 1.15\%$ compared to $90 \pm 2\%$ with Enhanced-attachment MC. This difference was previously observed in static conditions (**Figure 2**). It is of particular importance since it is necessary to develop process minimizing adverse effects on the cells to obtain efficient ASC for a clinical use. Finally, senescence was quantified, since it indicates a progressive loss of proliferative potential that is associated with a reduction of ASC therapeutic properties.^[37] Regarding senescence rate, it appeared less important with Enhanced-attachment, HAP-Collagen and HAP-NH₃ MC. Senescent cells represent 14 to 16% of total cells, which is of the same order as what we could observe with ASC growing on TCPS plates (data not shown). On the contrary, about one fifth of the cells appeared senescent with Cytodex-1 and HAP-Epoxy MC. The results obtained in spinner flask demonstrated that our new disc-shape HAP-Collagen and HAP-NH₃ MC presented better performance than commercially MC for the amplification of healthy ASC. More importantly, the ability of HAP-Collagen microcarriers to promote ASC growth in agitated conditions was equivalent for cells sampled from three different donors, which suggested that the performance is independent from the donor (**Table S1, Supporting Information**). This is particularly significant for a process that would be used for clinical applications with cells derived from different patients.

2.5 ASC identity and functionality validation after amplification on microcarriers

The final step to validate our MC was to determine whether the ASC harvested after amplification retained their phenotype and differentiation capacity. Cells were detached from MC after 5 days of growth in spinner flasks and analyzed by flow cytometry for three positive markers (CD73, CD90 and CD105) and five negative markers (CD11b, CD19, CD34, CD45, HLA-DR). For all tested MC, the cell expression was >95% for the positive markers (**Figure 4a**) and <2% for the negative markers (**Table S3, Supporting Information**). The ability of harvested cells to differentiate into adipocytes, osteoblasts and chondrocytes was also analyzed by Oil Red, Alizarin red and Alcian Blue staining respectively (Figure 4b). This demonstrated that the amplification of ASC on our HAP MC preserved their tri-lineage differentiation potential, as it was also observed with Enhanced-attachment and Cytodex-1 MC (data not shown). All these results confirmed that after expansion on our MC in stirred conditions followed by their harvesting, ASC kept their mesenchymal stem cells phenotype according to the ISCT (International Society for Cell and Gene Therapy).^[38]

3. Discussion

The effective transfer of human MSC into clinical practice will depend on the development of scalable and cost-effective processes for their amplification. MC offer a convenient method for growing adherent cells because of their high surface/volume ratio and the use of a stirred bioreactor allowing to monitor and to control environmental parameters (temperature, pH, pO₂). In this work, we presented new disc-shaped MC and compared them to available MC. Their performance was determined regarding different characteristics: the adhesion ability, the cell expansion, the ease of detachment of the cells and the phenotype of the cells at the end of the amplification process in stirred spinner flasks. Our technological breakthrough is based on the development of a new sol-gel process that allows the production of glass and ceramics at

room temperature. It enables the development of forms and compositions that are not feasible with traditional processes. Our new process takes into account industrialization requirements and cost control. Furthermore, in accordance with Green chemistry principles, our process avoid the use and the generation of hazardous substances. ^[39] This not only reduces the environmental impact, but also avoid the risk of toxic molecules release in the medium during cell amplification on MC. Finally, thanks to our flexible manufacturing process, we could adjust shape and composition of MC to customize them exactly to cells requirements. Furthermore, a key feature of our MC is that they presented a great homogeneity in size, that is not offered by several available MC.^[40] This is of particular importance for expansion of ASC, since it is necessary to achieve confluence on all MC at the same time to ensure a high quality cell preparation. We produced solid MC with a diameter of 500 μm , giving a specific surface of $2500 \text{ cm}^2\text{g}^{-1}$. It has been shown that MSC presented higher growth on large MC than on small MC.^[36] For spherical MC, this implies to increase diameter of the beads and then the volume of the beads, which induces a decrease in surface area compared to the volume of the bead. Furthermore, this leads to a substantial increase of the MC weight that requires an increase in the stirring speed necessary to keep MC in suspension. Macroporous MC are advantageous since they provide a higher surface area for cells to grow, while offering some degree of protection from the hydrodynamic shear stress in stirred cultures. ^[41] Nevertheless, the reduced nutrient and oxygen accessibility for cells into the inner part of these MC and the difficulty to harvest the cells raise the question of the homogeneity and quality of the expanded cells.^[42] Here, disc shape allows to increase the surface without increasing the volume or porosity by adjusting the thickness, and then improves the surface/volume ratio. Thanks to their specific surface, 1 g of our solid disc shaped MC provided a surface area equal to thirty 75 cm^2 culture flasks. This will permit to have a high cell yield per unit of culture medium volume.

Our results showed that HAP-Collagen MC provided a better alternative than other available MC for the amplification of ASC. Indeed, the ASC yield was similar to that obtained with Enhanced-attachment MC, but cells presented a higher cell viability and a lower senescence (**Table 3**). Regarding Cytodex-1 MC, a high cell viability was sustained at the end of the culture, but ASC amplification was lower, and cells presented a high rate of senescence, indicating a slowdown of the proliferation ability. Furthermore, cell detachment is highly increased with HAP-Collagen MC since we could harvest 1.5 and 2 times more cells compared to Enhanced-attachment and Cytodex-1 MC respectively (**Figure 3**). However, a major limitation of our HAP-Collagen MC is the use of marine collagen, a xenogeneic component.

Production of clinical-grade ASC should comply with GMP (Good Manufacturing Practice) and avoid the use of animal-derived substances.^[43] For example, Enhanced-attachment MC present a negatively charged and hydrophilic surface due to a coating with CellBIND®, an oxygen-containing component. Therefore, we decided to develop MC containing an Epoxide function that contains an oxygen atom attached to two adjacent carbon atoms. Several other commercial MC, such as Cytodex 1, present an amino-group functionalization since it has been previously shown that positively charged surfaces promote cell adhesion due to the adsorption of proteins.^[44-46] Indeed, both HAP-Epoxide and HAP-NH₃ MC promote ASC adhesion and proliferation on static conditions with the same efficiency than Enhanced-attachment, Cytodex-1 or HAP-Collagen MC (**Figure 1**). However, HAP-Epoxide MC did not seem suitable for use on stirred bioreactors since the cell yield obtained in spinner flask is about 1.8 times less important than that obtained with Enhanced-attachment or HAP-collagen MC (**Table 3**). In contrast, HAP-NH₃ MC were colonized by ASC and promote cell proliferation in static and stirred conditions. Compared to HAP-Collagen MC, ASC yield obtained with HAP-NH₃ MC was slightly lower, but these MC had the advantage of being xeno-free. Compared to other available xeno-free MC such as Enhanced-attachment and Cytodex-1 MC, our HAP-NH₃ MC

present a real alternative since they allowed ASC amplification in the same range, with a great cell viability and a high improvement of harvesting ability. Furthermore, ASC amplified in HAP-NH3 MC kept their phenotype indicating that their cellular functions were preserved.

In this study, ASC culture was performed under low fetal bovine-containing medium (2% of FBS). Until now, very few studies have been performed on the amplification of ASC with MC in xeno-free conditions. A major limitation was to promote efficient adhesion of ASC on MC in serum-free medium.^[33,47] Indeed, serum serve to deliver Extra-Cellular Matrix proteins that are required for the interaction of the cells with the MC. Cunha et al. proposed a xeno-free process for ASC amplification using Synthemax MC.^[48] They successfully expanded ASC in a 2 L bioreactor, but during harvesting, they lost 25% of the cells. Furthermore, less than 95% of ASC expressed CD105 marker, indicating the impact of their amplification process on cell phenotype. Our HAP-NH3 MC allowed a great increase in cell harvesting that represent a real advantage. So, it appeared necessary to test their performance in xeno-free media. For this purpose, we plan to use a medium that could provide molecules and growth factors supporting the expansion of ASC. Human platelet lysate represent a real alternative to fetal bovine serum.^[49] In order to develop a GMP compliant process, future studies would be performed by combining our xeno-free HAP-NH3 MC with serum-free medium containing platelet lysate. We would then determine if our MC could be a new alternative for ASC amplification sufficient for a clinical use.

4. Experimental Section ((delete section if not applicable))

Cell culture: Adipose tissue derived mesenchymal stem cells (ASC) were provided by the Etablissement Français du Sang (Saint-Ismier, France). Cells were isolated from healthy donors of fat tissue and prepared as previously described (*Bura A, Planat-Benard V, Bourin P,*

et al. Phase I trial: The use of autologous cultured adipose-derived stroma/stem cells to treat patients with non-revascularizable critical limb ischemia. Cytotherapy. 2014;16:245–257).

Briefly, human ASC were isolated after enzymatic digestion of adipose tissue obtained from subcutaneous abdominal fat of healthy donors during liposuction procedure. Cell expansion of the stromal vascular fraction was performed using the procedures implemented for clinical applications (EFS, France). Cells were cultured in Promocell Mesenchymal stem cell growth medium 2 (Heidelberg, Germany) containing 2% fetal bovine serum (FBS) at 37 °C and 5% CO₂. For monolayer culture conditions and static experimentations, cells were seeded on a coating of 10 µg/mL of Human Plasma Fibronectin (FN) from EMD Millipore (Darmstadt, Germany). When cells reached confluence, they were harvested with TrypLE (ThermoFisher, Courtaboeuf, France) and replated into new flasks.

Microcarriers: Cytodex 1 microcarriers were purchased from GE Healthcare (Buc, France) and Enhanced attachment microcarriers from Corning (Avon, France). Our MC were synthesized according to our patent FR2000158. Collagen was hydrolyzed marine collagen obtained from fish skin. Ca₅(OH)(PO₄)₃ (HAP) was purchased from Sigma Aldrich (Lyon, France). For Sol-gel synthesis, Tetraethoxysilane (TEOS) 99%+, Tetramethoxysilane (TMOS) 98%, (3-Glycidoxypropyl)trimethoxysilane (GPTMS) 97% and 2-propanol 99,5%, were purchased from Thermo Fisher Scientific

Cell adhesion assay: 96 well plates were covered by different microcarriers or with 10 µg/mL FN. ASC were plated at 3 x 10⁴ cells per well for 5, 30, 60, 120 and 180 min. At the end of the kinetic, medium containing unbound cells was slightly removed and replaced by fresh medium containing 1X PrestoBlue reagent (ThermoFisher). Cells were incubated for 2 h at 37°C, 5% CO₂ and the medium was further transferred into 96 well plates for 590 nm fluorescence

measurement. Relative adhered cell amount was determined by comparison between obtained fluorescence values to the one obtained after 180 min adhesion time, since no cells were observed in the removed medium at this time.

For cell visualisation on our different microcarriers, ASC were prestained with PKH26 red membrane stainer (Sigma-Aldrich) according to the manufacturer instructions. Then, 2×10^4 cells were plated in non-treated 24 well plates, covered by 2 cm^2 of different microcarriers and cultured for 72 hours in $400 \mu\text{L}$ of culture medium. Image acquisition was performed using live microscopy (AxioObserver Z1, Carl Zeiss, Oberkochen, Germany).

Static culture studies: Static cultures of ASC were performed by plating 2×10^4 cells in $400 \mu\text{L}$ of medium in non-treated 24 well plates, covered by 2 cm^2 of different microcarriers.

For growth kinetics, cells were maintained up to 7 days. Every 3 days, $100 \mu\text{L}$ of fresh medium was added. At 24, 72, 120 and 168 h, culture medium was removed and $400 \mu\text{L}$ of fresh medium containing 1X PrestoBlue reagent was added. Fluorescence was then analyzed and compared to growth curves in order to determine cell amount.

For cell death visualization and quantification, ASC cells were cultured for 7 days. On day 6, growth medium was removed, and fresh medium containing 1/1000 IncuCyte Cytotox Green reagent (Essen Biosciences, Welwyn Garden City, United Kingdom) was added. On day 7, cells were observed by live imaging for dead cells visualization and death related fluorescence was quantified.

Cell harvesting evaluation: ASC were cultured for 96 hours. Medium was then removed and cells were rinsed once with Dulbecco's Phosphate Buffer Saline without $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ (ThermoFisher). Cells were then incubated with $300 \mu\text{L}$ of TrypLE dissociation reagent (ThermoFisher). During the cell detachment step, microcarriers settled much faster than

detached cells. So, after 10 min, 300 μ L of medium was added and microcarrier-free cells were recovered and centrifugated at 1200 rpm for 5 min. The pellet was resuspended in 400 μ L of 1X PrestoBlue reagent and the obtained fluorescence amount was compared to the one obtained before cell detachment to determine harvesting yield.

Dynamic cell culture in spinner Flasks: For dynamic cell culture, Techne 4 places Stirrer and Techne 125 mL Spinner Flasks (Techne, Stone, Staffordshire, United Kingdom) were used. A culture volume of 50 mL and a microcarrier surface of 200 cm^2 were selected and 1.5 million cells were seeded. During the first 2 hours, stirring was inactivated to permit cell attachment. Cells were then cultured for 5 days and the medium was refreshed at day 3. At the end of the culture, cells were detached using TryPLE dissociation reagent and separated from the microcarriers using a 100 μ m cell strainers (Corning, Wiesbaden, Germany).

Flow cytometry: Harvested ASCs were assessed for surface marker expression via flow cytometry. Labeling was done with the BD Stemflow Human MSC Analysis Kit (BD Biosciences, Le Pont de Claix, France) according to the manufacturer instructions. For each sample, 1×10^4 cells were acquired on an Accuri C6 cytometer (BD Biosciences) and data were analyzed with the FCS Express 6 software (De Novo Software, Glendale, USA).

Tri-Lineage differentiation of ASC: For adipogenic and osteogenic differentiation, 5×10^4 cells were seeded on 2 wells LAB-TEK II chambers (ThermoFisher). Once 80-90% confluence was observed, growth media was replaced by AdipoMAX differentiation medium (Sigma-Aldrich) or by Stempro Osteogenesis Differentiation medium (ThermoFisher). For adipogenic differentiation, cells were cultured for 14 days and the medium was replaced every 4 days. At the end of the culture, cells were washed by PBS and fixed with 4% paraformaldehyde (PFA)

for 30 minutes at room temperature. Cells were rinsed twice with PBS and then stained by Oil Red O (Sigma-Aldrich), during 50 minutes at room temperature. Slides were washed three times with PBS and mounted for microscope observation. For osteogenic differentiation experiments, cells were cultured for 21 days in differentiation medium that was replaced every 4 days. At the end of the culture, cells were washed twice by PBS and fixed for 20 minutes with 4% PFA. Cells were washed with distilled water and stained with 2% Alizarin Red, pH 4.2 for 20 min at room temperature. Unspecific staining was removed with distilled water and slide was mounted for microscope observation. To determine the chondrogenesis potential of ASC, 1×10^5 cells were seeded on 96-well Spheroid Microplates (Corning). After 1 or 2 days, when the spheroids formed, growth medium was replaced by Stempro Chondrogenesis Differentiation medium (ThermoFisher). Cells were cultured for 21 days and the medium was changed every 4 days. At the end of the culture, spheroids were pooled, washed once with PBS and fixed with 4% PFA overnight at 4°C. They were washed twice with PBS and embedded in Tissue-Tek O.C.T compound (Gentaur, Paris, France) for cryosection. 10 μm sections were then cut and transferred on Superfrost slides. Cryosections were then stained with 1% Alcian Blue (Sigma-Aldrich) for 30 minutes, protected from light. Unspecific staining was removed by three washes with HCL 0.1N and slides were mounted for microscope observation.

Cell Senescence study: ASC were plated on 2 wells LAB-TEK II chambers (1×10^4 cells per well). After 3 to 4 days, cells were stained with the Senescence β -Galactosidase Staining Kit (Cell Signaling, Leiden, The Netherlands), according to the manufacturer instructions. Slides were mounted for microscope observation and 10 pictures were randomly taken for each condition. β -Galactosidase positive cells were then counted and normalized to the total number of cells in each field.

Statistical analysis: Data were expressed as the mean value \pm the standard deviation (mean \pm SD) and analyzed by a two-tailed unpaired t-test. The degree of statistical significance was set at $P < 0.05$.

Acknowledgements

The authors thanks Norbert Masciave and Alexandre Babin for their technical assistance. The authors would like to acknowledge the Association Nationale Recherche Technologie (ANRT, France) for its financial support.

Keyword

So-gel chemistry, microcarriers, human mesenchymal stem cells, harvesting, bioreactors

References

- [1] X. Wei, X. Yang, Z. Han, F. Qu, L. Shao, Y. Shi, *Acta Pharmacologica Sinica* **2013**, *34*, 747.
- [2] G. Bartsch, J. J. Yoo, P. De Coppi, M. M. Siddiqui, G. Schuch, H. G. Pohl, J. Fuhr, L. Perin, S. Soker, A. Atala, *Stem Cells and Development* **2005**, *14*, 337.
- [3] G. T.-J. Huang, S. Gronthos, S. Shi, *Journal of Dental Research* **2009**, *88*, 792.
- [4] S. Kern, H. Eichler, J. Stoeve, H. Klüter, K. Bieback, *Stem Cells* **2006**, *24*, 1294.
- [5] A. S. Şovrea, A. B. Boşca, A. M. Constantin, E. Dronca, A. Ilea, *Rom J Morphol Embryol* **2019**, *60*, 7.
- [6] O. S. Beane, V. C. Fonseca, L. L. Cooper, G. Koren, E. M. Darling, *PLoS ONE* **2014**, *9*, e115963.
- [7] L. Frese, P. E. Dijkman, S. P. Hoerstrup, *Transfus Med Hemother* **2016**, *43*, 268.
- [8] P. Van Pham, *Biomed Res Ther* **2014**, *1*, 11.
- [9] Y. B. Cho, K. J. Park, S. N. Yoon, K. H. Song, D. S. Kim, S. H. Jung, M. Kim, H. Y. Jeong, C. S. Yu, *STEM CELLS Translational Medicine* **2015**, *4*, 532.
- [10] H.-P. Lin, T.-M. Chan, R.-H. Fu, C.-P. Chuu, S.-C. Chiu, Y.-H. Tseng, S.-P. Liu, K.-C. Lai, M.-C. Shih, Z.-S. Lin, et al., *Cell Transplantation* **2015**, *24*, 521.
- [11] E. C. Perin, R. Sanz-Ruiz, P. L. Sánchez, J. Lasso, R. Pérez-Cano, J. C. Alonso-Farto, E. Pérez-David, M. E. Fernández-Santos, P. W. Serruys, H. J. Duckers, et al., *American Heart Journal* **2014**, *168*, 88.
- [12] Y.-M. Pers, C. Jorgensen, *Hormone Molecular Biology and Clinical Investigation* **2016**, *28*, DOI 10.1515/hmbci-2016-0010.
- [13] B. Puissant, C. Barreau, P. Bourin, C. Clavel, J. Corre, C. Bousquet, C. Taureau, B. Cousin, M. Abbal, P. Laharrague, et al., *Br J Haematol* **2005**, *129*, 118.
- [14] H. Tavassoli, S. N. Alhosseini, A. Tay, P. P. Y. Chan, S. K. Weng Oh, M. E. Warkiani, *Biomaterials* **2018**, *181*, 333.
- [15] M. Witkowska-Zimny, K. Walenko, *Cellular and Molecular Biology Letters* **2011**, *16*, DOI 10.2478/s11658-011-0005-0.
- [16] J. Cai, X. Miao, Y. Li, C. Smith, K. Tsang, L. Cheng, Q. Wang, *Stem Cell Reports* **2014**, *3*, 227.
- [17] S. Neri, P. Bourin, J.-A. Peyrafitte, L. Cattini, A. Facchini, E. Mariani, *PLoS ONE* **2013**, *8*, e77895.
- [18] M. Patrikoski, M. Juntunen, S. Boucher, A. Campbell, M. C. Vemuri, B. Mannerström, S. Miettinen, *Stem Cell Res Ther* **2013**, *4*, 27.

- [19] A. Lakowitz, R. Krull, R. Biedendieck, *Microbial Cell Factories* **2017**, *16*, 14.
- [20] J. R. Price, W. K. Shieh, C. M. Sales, *Journal of Visualized Experiments* **2015**, 53443.
- [21] F. Tapia, D. Vázquez-Ramírez, Y. Genzel, U. Reichl, *Applied Microbiology and Biotechnology* **2016**, *100*, 2121.
- [22] A. L. van Wezel, *Nature* **1967**, *216*, 64.
- [23] B. M. Baker, B. Trappmann, W. Y. Wang, M. S. Sakar, I. L. Kim, V. B. Shenoy, J. A. Burdick, C. S. Chen, *Nature Materials* **2015**, *14*, 1262.
- [24] N. Huebsch, E. Lippens, K. Lee, M. Mehta, S. T. Koshy, M. C. Darnell, R. M. Desai, C. M. Madl, M. Xu, X. Zhao, et al., *Nature Materials* **2015**, *14*, 1269.
- [25] J. S. Park, J. S. Chu, A. D. Tsou, R. Diop, Z. Tang, A. Wang, S. Li, *Biomaterials* **2011**, *32*, 3921.
- [26] J. Xie, M. Bao, S. M. C. Bruekers, W. T. S. Huck, *ACS Applied Materials & Interfaces* **2017**, *9*, 19630.
- [27] C. Yang, M. W. Tibbitt, L. Basta, K. S. Anseth, *Nature Materials* **2014**, *13*, 645.
- [28] B. Zhang, N. Kasoju, Q. Li, J. Ma, A. Yang, Z. Cui, H. Wang, H. Ye, *IJSC* **2019**, *12*, 84.
- [29] D. P. Debecker, *The Chemical Record* **2018**, *18*, 662.
- [30] J. Hu, Y. Zhou, L. Huang, J. Liu, H. Lu, *BMC Musculoskelet Disord* **2014**, *15*, 114.
- [31] J. J. Schmidt, J. Jeong, H. Kong, *Tissue Engineering Part A* **2011**, *17*, 2687.
- [32] P. A. Webb, C. Orr, *Analytical Methods in Fine Particle Technology*, Micromeritics, Norcross, **1997**.
- [33] J. G. Carmelo, A. Fernandes-Platzgummer, M. M. Diogo, C. L. da Silva, J. M. S. Cabral, *Biotechnology Journal* **2015**, *10*, 1235.
- [34] D. Schop, R. van Dijkhuizen-Radersma, E. Borgart, F. W. Janssen, H. Rozemuller, H.-J. Prins, J. D. de Bruijn, *Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine* **2010**, *4*, 131.
- [35] I. Sekiya, B. L. Larson, J. R. Smith, R. Pochampally, J.-G. Cui, D. J. Prockop, *STEM CELLS* **2002**, *20*, 530.
- [36] S. Derakhti, S. H. Safiabadi-Tali, G. Amoabediny, M. Sheikhpour, *Materials Science and Engineering: C* **2019**, *103*, 109782.
- [37] Y. Li, Q. Wu, Y. Wang, L. Li, H. Bu, J. Bao, *International Journal of Molecular Medicine* **2017**, *39*, 775.

- [38] M. Dominici, K. Le Blanc, I. Mueller, I. Slaper-Cortenbach, F. C. Marini, D. S. Krause, R. J. Deans, A. Keating, D. J. Prockop, E. M. Horwitz, *Cytotherapy* **2006**, *8*, 315.
- [39] B. A. de Marco, B. S. Rechelo, E. G. Tótolí, A. C. Kogawa, H. R. N. Salgado, *Saudi Pharm J* **2019**, *27*, 1.
- [40] O.-W. Merten, *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* **2014**, *370*, 20140040.
- [41] A. K.-L. Chen, S. Reuveny, S. K. W. Oh, *Biotechnology Advances* **2013**, *31*, 1032.
- [42] A. M. de Soure, A. Fernandes-Platzgummer, C. L. da Silva, J. M. S. Cabral, *Journal of Biotechnology* **2016**, *236*, 88.
- [43] M. Viganò, S. Budelli, C. Lavazza, T. Montemurro, E. Montelatici, S. de Cesare, L. Lazzari, A. R. Orlandi, G. Lunghi, R. Giordano, *Stem Cells International* **2018**, *2018*, 1.
- [44] S. Guo, X. Zhu, M. Li, L. Shi, O. J. L. T, J. D, N. K. G, *Effect on Protein Adsorption and Cell Adhesion ACS Appl. Mater. Interfaces* **2016**, *8*, 30552.
- [45] L. Bacakova, E. Filova, M. Parizek, T. Ruml, V. Svorcik, *Biotechnology Advances* **2011**, *29*, 739.
- [46] K. Webb, V. Hlady, P. A. Tresco, *J Biomed Mater Res* **1998**, *41*, 422.
- [47] F. dos Santos, P. Z. Andrade, M. M. Abecasis, J. M. Gimble, L. G. Chase, A. M. Campbell, S. Boucher, M. C. Vemuri, C. L. da Silva, J. M. S. Cabral, *Tissue Eng Part C Methods* **2011**, *17*, 1201.
- [48] B. Cunha, T. Aguiar, S. B. Carvalho, M. M. Silva, R. A. Gomes, M. J. T. Carrondo, P. Gomes-Alves, C. Peixoto, M. Serra, P. M. Alves, *Journal of Biotechnology* **2017**, *248*, 87.
- [49] G. Astori, E. Amati, F. Bambi, M. Bernardi, K. Chierigato, R. Schäfer, S. Sella, F. Rodeghiero, *Stem Cell Res Ther* **2016**, *7*, DOI 10.1186/s13287-016-0352-x.

Table 1. Characteristics of microcarriers used in this study.

Microcarrier name	Enhanced attachment	Cytodex 1	Disc microcarriers			
Manufacturer	Corning ^a	GE Healthcare ^a	Carroucell			
Material	Polystyrene	Dextran	Silica and 5% Hydroxyapatite (HAP)			
Fonctionnalisation	CellBIND	DEAE	Collagen	Epoxide	NH3	Φ ^b
Porous	No	Microporous	No			
Shape	Spherical beads	Spherical beads	Discs			
Diameter (µm)	168.5 ± 43.5	197.5 ± 50.5	519.5 ± 48.5			
Specific surface	360 cm ² g ⁻¹	3400 cm ² g ⁻¹ of dry particles	2500 cm ² g ⁻¹			
Animal components	None	None	2% Collagen (marine origin)		None	

^aFeatures are given based on manufacturer data.

^bΦ: MC without surface modification.

Table 2. Surface composition of the disc microcarriers.

	Microcarrier name	HAP-Collagen	HAP-Epoxyde	HAP-NH3	HAP
MC composition (% of each component)^a	SiO ₂	89.6	90.6	90.6	99.5
	HAP	0.4	0.5	0.5	0.5
	Collagen	10	N.R.	N.R.	N.R.
	Epoxyde function	N.R.	9	N.R.	N.R.
	NH ₃ function	N.R.	N.R.	0.5	N.R.

^aThe values were calculated based on the known density, mass fraction and volume fraction of each component. These percentages represent the average surface covered by each component.

N.R. : Non relevant.

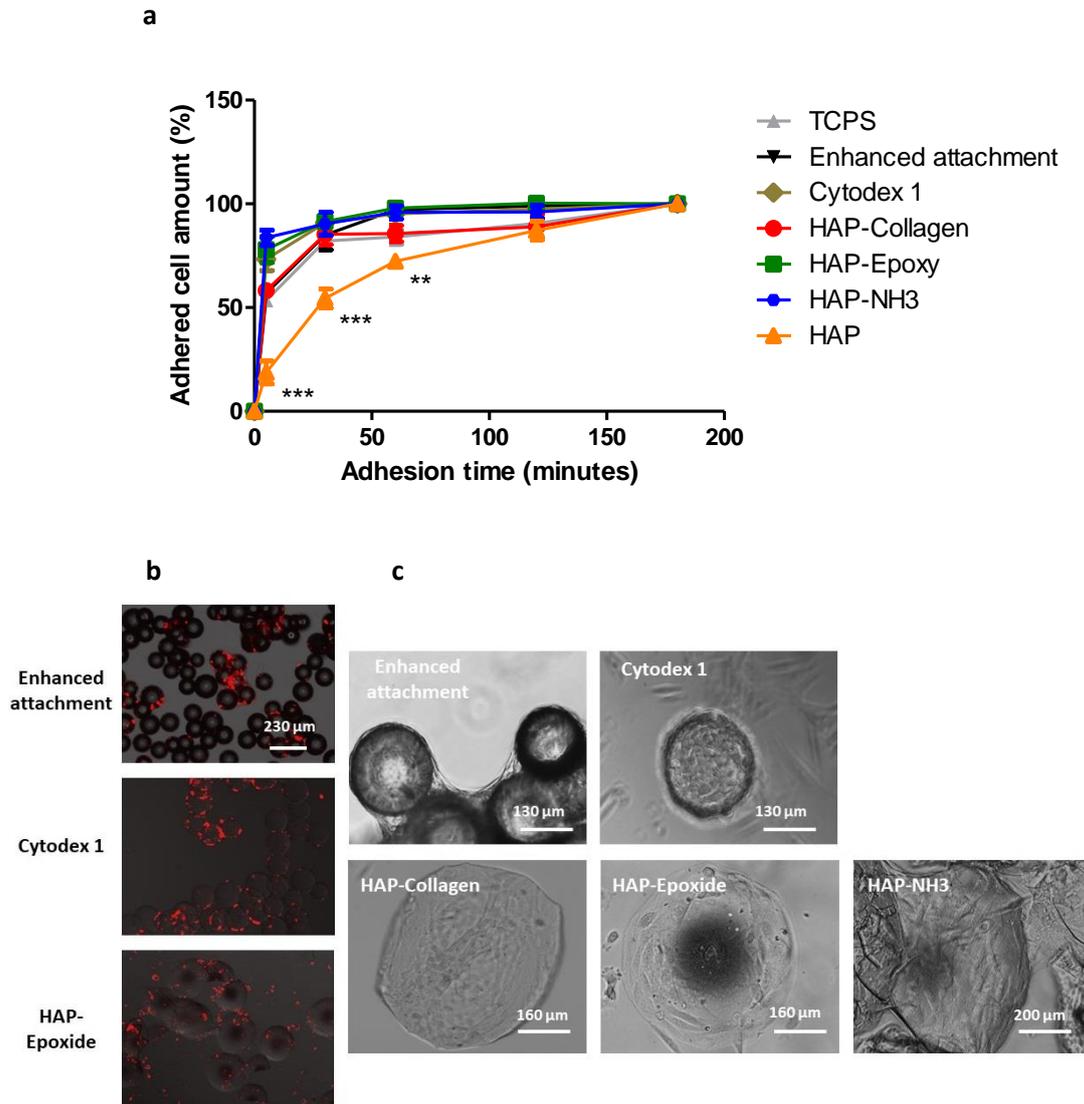
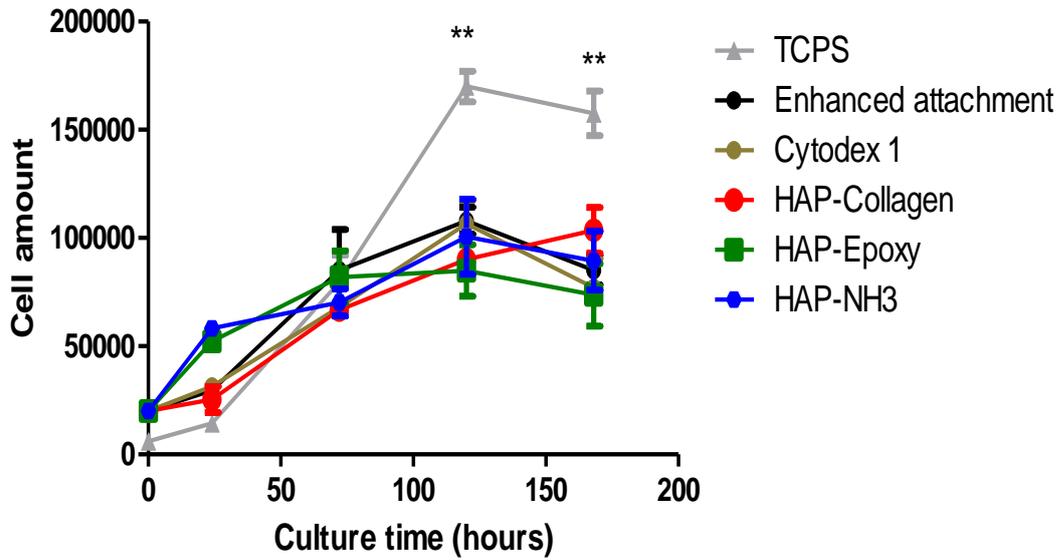


Figure 1. a) ASC adhesion in static conditions according to the MC. At each time, adhesion efficiency was expressed as a fraction of adhered cells compared to maximum number of adhered cells at the end of the kinetic (** indicates $p \leq 0.0049$ and *** indicates $p \leq 0.0007$; $n = 3$). b) Distribution of ASC on MC. ASC were PKH-26 labeled (red), incubated with MC on static conditions and representative images were taken after 72 hours. Images from HAP-Collagen and HAP-NH3 MC could not be acquired because of high autofluorescence giving background signal. c) Phase contrast images of ASC attached to the different microcarriers in static conditions after 72 hours of expansion.

a



b

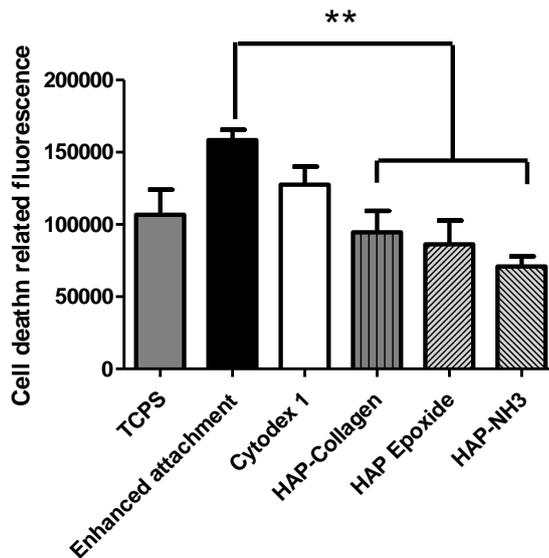


Figure 2: ASC expansion on different types of MC in static conditions. a) Cell growth was monitored over 7 days by using Prestoblue labeling (** indicates $p \leq 0.0032$; $n = 3$). b) Dead cells were evaluated on day 7 of culture by using Cytotox Green reagent. Cell death was relative to the green fluorescence (** indicates $p \leq 0.0045$; $n = 3$).

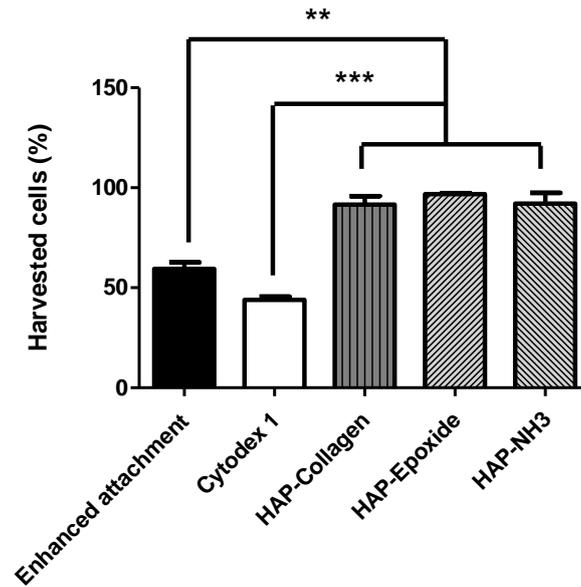


Figure 3: ASC harvesting from the different MC studied. The fraction of detached cells is represented according to the total number of cells in each condition (** indicates $p \leq 0.0064$ and *** indicates $p \leq 0.001$; $n = 3$).

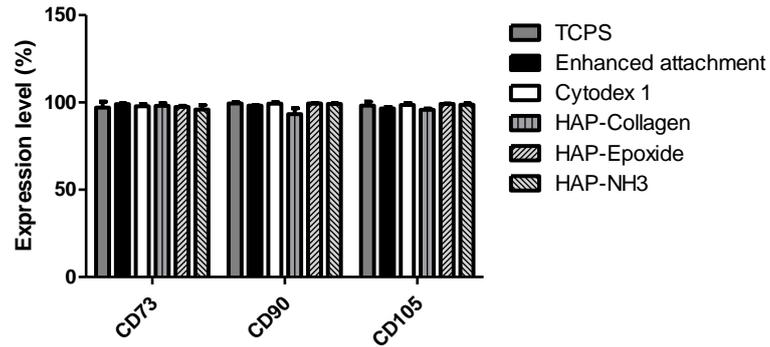
Table 3. Cell yield, viability and senescence after amplification in spinner flask according to the type of MC (n = 3).

Microcarrier	Number of viable cells harvested (x 10 ⁷)	Cell viability after harvesting (% ^a)	Cell senescence (% ^b)
Enhanced-attachment MC	1.25 ± 0.18	90 ± 2	13.9 ± 3.46
Cytodex 1 MC	1.12 ± 0.11	96 ± 1.4	18.05 ± 5.2
HAP-Collagen MC	1.27 ± 0.25	92.7 ± 1.2	13.94 ± 1.5
HAP-Epoxyde MC	0.70 ± 0	94.3 ± 0.57	18.7 ± 3.5
HAP-NH3 MC	1.03 ± 0.25	95.3 ± 1.15	16.2 ± 4.2

^aPercentage of viable cells was related to the total number of harvested cells.

^bAfter amplification in spinner flask, ASC were plated on plates and β -galactosidase activity was analyzed after 3 to 4 days. The percentage of senescent cells was expressed compared to the total number of cells.

a



b

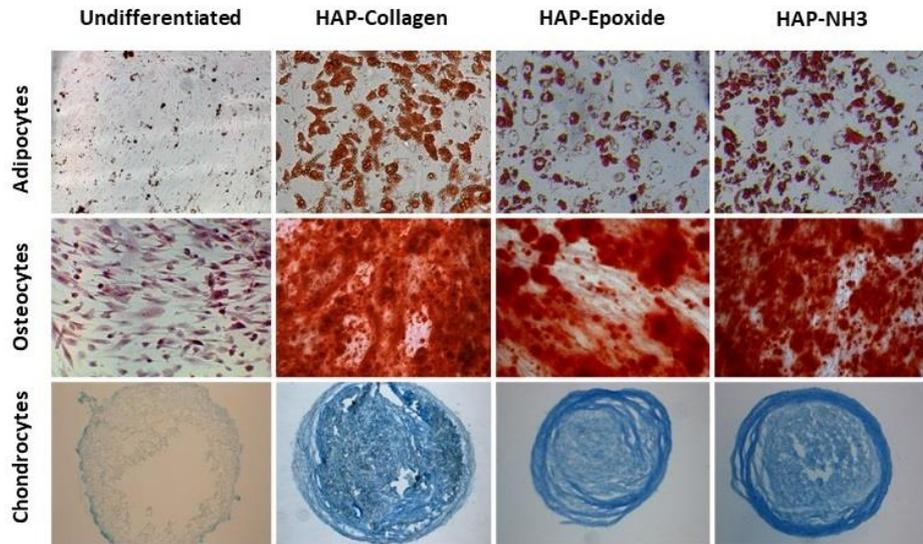


Figure 4: Characterization of ASC harvested from the different MC after spinner flask amplification. a) Flow cytometry analysis of expression of positive cell surface markers (CD73, CD90, and CD105) (n = 3). b) *In vitro* differentiation of ASC into adipocytes (Oil red staining, top panel), osteoblasts (Alizarin red staining, middle panel) or chondrocytes (Alcian blue staining, bottom panel). Negative controls showed staining of ASC in basal medium, without differentiation factors.

Supplementary Material

1. Supplemental Experimental Section

Dynamic cell culture in spinner flasks

Cell senescence quantification

Flow cytometry

2. Supplemental results

Table S1

Table S2

Table S3

1. Supplemental Experimental Section

Dynamic cell culture in spinner Flasks: For dynamic cell culture, Techne 4 places Stirrer and Techne 125 mL Spinner Flasks (Techne, Stone, Staffordshire, United Kingdom) were used. A culture volume of 50 mL and a microcarrier surface of 200 cm² were selected. 1.5 million cells from three different donors were seeded. During the first 2 hours, stirring was inactivated to permit cell attachment. Cell were then cultured for 5 days and the medium was refreshed at day 3. At the end of the culture, cells were detached using TryPLE dissociation reagent and separated from the microcarriers using a 100 µm cell strainers (Corning, Wiesbaden, Germany).

Cell senescence quantification: ASC were plated on two-wells LAB-TEK II chambers (1 x 10⁴ cells per well). After 3 to 4 days, cells were stained with the Senescence β-Galactosidase Staining Kit (Cell Signaling, Leiden, The Netherlands), according to the manufacturer instructions. Slides were mounted for microscope observation and 10 pictures were randomly taken for each condition. β-Galactosidase positive cells were then counted and normalized to the total number of cells in each field.

Flow cytometry: Harvested ASCs were assessed for surface marker expression via flow cytometry. Labeling was done with the BD Stemflow Human MSC Analysis Kit (BD Biosciences, Le Pont de Claix, France) according to the manufacturer instructions. For each sample, 1 x 10⁴ cells were acquired on an Accuri C6 cytometer (BD Biosciences) and data were analyzed with the FCS Express 6 software (De Novo Software, Glendale, USA).

2. Table S1

Table S1. Cell yield, viability and senescence after amplification in spinner flask according to the type of MC and the ASC donor (n = 3).

Donor	Enhanced attachment			Cytodex 1			HAP-Collagen		
	1	2	3	1	2	3	1	2	3
Number of viable cells harvested (x 10⁷)	1.1 +/- 0	1.25 +/- 0.18	1.21 +/- 0.16	0.79 +/- 0.26	1.12 +/- 0.11	1.08 +/- 0.35	1.08 +/- 0.39	1.27 +/- 0.25	1.18 +/- 0.39
Cell viability after harvesting (%^a)	91.5 +/- 0.7	90 +/- 2	93 +/- 1.4	97 +/- 1.4	96 +/- 1.4	96.5 +/- 0.71	93.7 +/- 2.1	92.7 +/- 1.2	96.7 +/- 1.52
Cell senescence (%^b)	19.6 +/- 8.28	13.9 +/- 3.46	15.8 +/- 4.8	23.45 +/- 7.67	18.05 +/- 5.2	31.4 +/- 5.7	15.6 +/- 3.99	13.94 +/- 1.5	17.3 +/- 4.1

^aPercentage of viable cells was related to the total number of harvested cells.

^bAfter amplification in spinner flask, ASC were plated on plates and β -galactosidase activity was analyzed after 3 to 4 days. The percentage of senescent cells was expressed compared to the total number of cells.

Table S2. Flow cytometry analysis of expression of positive cell surface markers (CD73, CD90, and CD105) of ASC cultured in spinner Flasks, according to the MC and the ASC donor (n = 2).

		Enhanced attachment			Cytodex 1			HAP-Collagen		
Donor		1	2	3	1	2	3	1	2	3
Percentage of positive cells	CD73	99.89 +/- 0.15	98.82 +/- 0.76	98.4 +/- 0.73	98.88 +/- 0.03	98.28 +/- 0.53	96.41 +/- 0.73	96.61 +/- 3.62	95.73 +/- 1.3	99.1 +/- 0.37
	CD90	99.15 +/- 1.36	97 +/- 1.63	98.8 +/- 0.94	99.58 +/- 0.27	98.33 +/- 1.1	99.83 +/- 0.13	96.15 +/- 0	94.12 +/- 4.7	94.28 +/- 3.93
	CD105	96.45 +/- 0.9	97.73 +/- 1.02	97.15 +/- 1.21	99.28 +/- 0.68	97.97 +/- 1.77	98.48 +/- 0.5	95.75 +/- 0.63	97.35 +/- 2.67	96.53 +/- 1.88

Table S3. Flow cytometry analysis of expression of negative cell surface markers (CD34, CD11b, CD19, CD45 and HLA-DR) of ASC cultured in spinner Flasks, according to the MC (n = 2).

	Enhanced attachment	Cytodex 1	HAP-Collagen	HAP-Epoxyde	HAP-NH3
Percentage of positive cells for expression of negative markers	0.6 +/- 0.37	0.007 +/- 0.003	0.84 +/- 0.6	0.41 +/- 0.58	0.91 +/- 1.27

3. Discussion et perspectives.

La première partie de ma thèse concernait l'étude de microporteurs développés par l'entreprise Carroucell pour l'amplification d'ASC en culture statique puis en spinner flasks. Les résultats obtenus montrent que ces microporteurs sont très prometteurs pour une utilisation en bioréacteur. Tout d'abord, leur forme limite la mortalité cellulaire liée à l'agrégation et favorise l'étape de décollement et de séparation. De plus, leur grande surface spécifique permet d'avoir une culture plus homogène et donc de potentiellement réduire la densité d'ensemencement. Enfin, la technologie sol-gel utilisée pour synthétiser les microporteurs est très versatile et permet d'optimiser leur fonctionnalisation, leurs propriétés mécaniques ou encore leur biodégradabilité.

Pour leur future utilisation en bioréacteurs, le développement de systèmes adaptés à leurs caractéristiques devra être envisagé. Le système d'agitation, la densité d'ensemencement, l'oxygénation ou encore la stratégie de remplacement du milieu de culture devront être adaptés afin de limiter les stress hydrodynamiques, mécaniques ou métaboliques appliqués aux cellules. L'amélioration de leurs propriétés mécaniques et de leur dégradabilité, de leur surface spécifique ou encore de leur homogénéité de taille permettra d'améliorer les rendements obtenus, notamment en culture libre de tout composants xénogéniques.

3.1. Intérêt des microporteurs disques pour l'amplification et la récupération des ASC.

Bien que de nombreuses formes de microporteurs aient été développées [57], les billes restent à ce jour majoritairement utilisées dans les procédés d'amplification de cellules adhérentes en bioréacteur. Développés à la fin des années 80, les microporteurs Fibra-Cel[®] sont à ce jour les seuls microporteurs de forme discoïdale commercialisés. Ces microporteurs sont composés de fibres de polyester et d'un maillage de polypropylène, ce qui permet une grande porosité du matériau mais ne limite pas la diffusion de milieu de culture à l'intérieur de celui-ci [256]. Aujourd'hui développés sous format BPF, ces microporteurs demeurent néanmoins dédiés à une culture en bioréacteur à lit fixe [257,258]. En effet, ils ont un diamètre de 6000 μm pour une épaisseur de 500 μm . En comparaison, nos microporteurs ont un diamètre beaucoup plus proche des tailles standards des microporteurs sphériques, ce qui augmente leur versatilité. Théoriquement, les microporteurs Carroucell sont utilisables dans les bioréacteurs à lit fixe, mais aussi en suspension, dans des bioréacteurs à hélice ou à vague.

Nous avons étudié les microporteurs disques en comparaison avec les microporteurs Enhanced attachment de Corning[®] et Cytodex[®] 1 de GE Healthcare. Dans le cas de microporteurs sphériques, un diamètre compris entre 100 et 230 μm est recommandé pour la culture de cellules animales [259]. C'est un compromis entre la maximisation de la surface disponible pour les cellules (ce paramètre est augmenté en diminuant le diamètre des sphères), et le maintien d'une surface adéquate à l'adhérence et à la croissance de centaines de cellules. Les CSM, qui sont des cellules de taille importante, nécessitent des microporteurs d'un diamètre d'au moins 150 μm pour se développer [57]. L'intérêt de la forme disque est qu'elle permet d'augmenter la surface spécifique disponible pour les cellules sans affecter leur adhérence, étalement ou croissance. En effet, nous pouvons accroître le diamètre tout en diminuant l'épaisseur du disque. La seule limite à cette augmentation concerne la densité : celle-ci doit permettre la mise en suspension des microporteurs en environnement dynamique. Il faut aussi s'assurer de la résistance mécanique du matériau : celui-ci ne doit pas casser en culture agitée car cela pourrait affecter la qualité des cellules amplifiées. Ainsi, une surface spécifique de 2500 cm^2/g a été obtenue tout en maintenant une densité d'environ 1,1, supérieure à celle des microporteurs Enhanced attachment et Cytodex[®] 1 mais similaire à celle de microporteurs sphériques Hillex[®] de SoloHill[®] ou cylindriques DE-53 de Whatman[™]. La surface spécifique des microporteurs Fibra-Cel[®] est de 120 cm^2/g . À cause des limites imposées par leur forme, la surface spécifique des microporteurs sphériques est comprise entre 350 et 500 cm^2/g [57]. Une modification des paramètres de synthèse permettrait d'augmenter drastiquement la surface

spécifique des microporteurs. À l'avenir, nous espérons obtenir une surface spécifique d'au moins 6000 cm²/g.

La taille des disques est aussi plus uniforme, ce qui est connu pour influencer sur l'homogénéité des cellules sur les microporteurs, mais aussi sur l'homogénéité globale de la culture, et par conséquent sur le comportement des cellules [260]. Concernant cet aspect, la densité d'ensemencement est aussi un paramètre prépondérant [261] : plus la quantité de cellules ensemencées par microporteur est importante, plus la probabilité d'observer un microporteur non colonisé est faible. Une densité d'ensemencement de 10 000 cellules par cm² a été utilisée, ce qui représente entre 9 et 10 cellules par microporteur Enhanced attachment et Cytodex® 1, et plus de 40 cellules par microporteur disque. Après 72 h de culture, les ASC sont réparties de façon homogène sur la totalité des microporteurs disques, ce qui n'est pas le cas pour les microporteurs sphériques, notamment les Enhanced attachment. En effet, certains microporteurs ne sont pas colonisés tandis que d'autres sont fortement chargés en cellules. Nos résultats démontrent que les microporteurs disques améliorent l'homogénéité de distribution cellulaire, et ce pour une même densité d'ensemencement. À l'avenir, ces microporteurs pourraient permettre de réduire cette densité d'ensemencement, ce qui représente un avantage conséquent dans le cas de l'amplification de cellules rares telles que les CSM.

Des agrégats ont été observés en culture statique et dynamique pour l'ensemble des microporteurs testés. L'impact de la formation d'agrégats sur le comportement des CSM est déjà connu. Les agrégats limitent le transfert de masse et induisent une hétérogénéité de la culture, engendrant une baisse de la capacité de croissance et de la viabilité cellulaire ainsi qu'une potentielle altération du phénotype des CSM [262]. En culture statique, cette agrégation a montré des effets néfastes sur la prolifération et la viabilité des ASC. En effet, la croissance cellulaire semble ralentir dès le troisième jour de culture sur microporteurs, parallèlement à l'apparition d'agrégats, alors qu'une réduction de prolifération n'est observée qu'entre le cinquième et le sixième jour en boîtes de culture (TCPS). De plus, la quantité maximale de cellules obtenue sur microporteurs est presque deux fois moins importante qu'en 2D alors qu'une surface totale identique (2 cm²) était disponible pour les cellules. Ces résultats démontrent que l'agrégation limite la capacité des ASC à coloniser la totalité de la surface disponible.

Après 7 jours de culture statique, une baisse de viabilité cellulaire est aussi observée au sein de ces agrégats. Cependant, cette mortalité est similaire entre les microporteurs disques et la condition TCPS, alors qu'elle est significativement augmentée dans le cas des microporteurs Enhanced attachment. Bien que non significative, la mortalité cellulaire semble aussi être supérieure lors de la culture sur microporteurs Cytodex® 1. Ces résultats démontrent une réduction de la mortalité liée à l'agrégation sur microporteurs disques. Notre hypothèse est que sur microporteurs disque, le transfert de masse *i.e.* les échanges d'oxygène et de nutriments entre cellules et milieu de culture, est favorisé malgré la formation d'agrégats.

En thérapie cellulaire, le décollement des cellules et leur séparation des microporteurs sont des étapes très importantes pour l'obtention d'un produit thérapeutique de bonne qualité [126]. Dans nos expériences, l'enzyme TryPLE a été utilisée pendant 10 min sans qu'aucune agitation ne soit appliquée. En fin de culture dynamique, les cellules ont été séparées des microporteurs par filtration à 100 µm. Nos résultats démontrent que la forme des microporteurs joue un rôle prépondérant dans la capacité de récupération des ASC suite à leur culture. On peut supposer qu'en tant que supports plans, les microporteurs disques permettent une adhérence cellulaire similaire à celle retrouvée en culture 2D et donc un décollement facilité. De plus, la quantité d'ASC restantes dans le filtre est réduite dans le cas de microporteurs disques (Figure 51 en annexe). Notre seconde hypothèse est que les microporteurs disques favorisent l'étape de séparation des cellules des microporteurs. Les méthodes de filtration sont basées sur la différence de taille entre les microporteurs et les cellules qui, une fois décollées, ont un diamètre d'environ 15 à 20 µm [126]. À petite échelle, des filtres ou des tamis à

usage unique tels que les Cell Strainers de Corning® ou de BD Biosciences sont utilisés. D'autres dispositifs de filtrations tels que le Steriflip, l'Opticap® ou l'Harvestainer™ BioProcess Container ont été développés et sont adaptables à des volumes de culture plus importants allant de 3 à 200 litres [126,263]. Néanmoins, la formation d'agglomérats de microporteurs, engendrant un colmatage des filtres, limite l'efficacité de ces dispositifs [264]. Les microporteurs disques ont limité le colmatage des Cell Strainers lors de nos expériences. Leur utilisation pourrait donc représenter un avantage conséquent dans des procédés de séparation à moyenne échelle. Enfin, à l'échelle industrielle, les dispositifs de rétention cellulaire classiquement utilisés pour les procédés de perfusion comme les ATF ("Alternating Tangential Flow") ou les TFF ("Tangential Flow Filtration") peuvent être adaptés à la séparation des cellules des microporteurs. Ces dispositifs permettent de réduire les phénomènes de colmatage observés chez des filtrations plus classiques. L'association de ces dispositifs aux microporteurs disques pourrait donc être prometteuse pour une utilisation à grande échelle.

3.2. Propriétés mécaniques des microporteurs disques développés.

La synthèse des microporteurs développés par la société Carroucell fait appel à une réaction sol-gel intéressante en particulier pour sa versatilité. En effet, en modifiant le catalyseur, les précurseurs alkoxydes ou différents paramètres de synthèse comme le temps ou les conditions de gélification, nous pouvons contrôler la taille la morphologie, la porosité ou encore la rigidité du matériau [234].

Dans le cadre de ma thèse, il était nécessaire que ces microporteurs aient une grande résistance mécanique afin de limiter le nombre de particules produites suite à la destruction des microporteurs [126]. Suite à la culture des ASC en spinner flasks, une très faible casse des microporteurs a été observée. De même, lors de l'étape de séparation, aucun morceau de microporteur, ou particule, n'a été observé dans les différents lots de cellules. Cependant, de futurs travaux devraient nous permettre d'améliorer encore leur résistance mécanique, tout en conservant une grande surface spécifique. Par exemple, l'ajout de molécules comme MgO, TiO₂ ou CaF₂, dans la solution colloïdale est connue pour améliorer la résistance mécanique de matériaux de silice. En effet, la substitution du Mg²⁺ par le Ca²⁺ renforce les interactions du réseau et donc la résistance du matériau [234].

Il a aussi été démontré que les CSM sont sensibles aux caractéristiques mécaniques des supports sur lesquels elles se développent [100]. Selon leur rigidité, ces supports vont en effet mimer les propriétés de différents tissus de notre organisme, engendrant la différenciation des CSM en cellules neuronales, musculaires ou encore osseuses. Or, la rigidité du matériau peut être modifiée en synthèse sol-gel. L'un des solvants pouvant être utilisé en sol-gel est l'eau, dont Murtagh *et al.* ont démontré l'effet sur la rigidité de matériaux de silice non poreux issus d'alkoxydes TEOS [265]. Pour une même quantité d'eau, le type de précurseur utilisé peut également influencer sur la rigidité du matériau synthétisé [234]. La synthèse sol-gel permet l'obtention de matériaux hybrides. Lee *et al.* ont synthétisé différents hybrides silice-chitosane et ont étudié l'impact de la quantité de chitosane sur leur propriétés mécaniques [266]. Pour une quantité de chitosane de 0, 15 et 50%, des rigidités de 10, 55 et 70 MPa ont été observées. En jouant sur certains paramètres de synthèse sol-gel, les propriétés mécaniques des matériaux peuvent donc être drastiquement modifiées.

À l'avenir, une caractérisation et une modification de la rigidité des microporteurs pourrait permettre de moduler le comportement des ASC lors de leur amplification et par exemple permettre de les orienter vers une différenciation ostéogénique. Ces cellules pourraient alors être utilisées dans le traitement de défauts osseux et leur efficacité pourraient être comparée à celle de cellules ayant été amplifiées sur d'autres types de microporteurs. Notamment, l'un de nos objectifs concerne l'incorporation de chitosane dans les microporteurs disques. Associés aux propriétés mécaniques soulignées dans l'étude de Lee *et al.* [266], le chitosane est aussi connu pour sa biocompatibilité et son potentiel ostéogénique [267]. Ce matériau a été incorporé dans des microporteurs pour

l'amplification de CSM à plusieurs reprises [268,269]. En modulant la quantité de chitosane, un effet ostéogénique synergique pourrait donc être obtenu.

Les propriétés mécaniques et la biodégradabilité dépendent aussi de la porosité du matériau. En synthèse sol-gel, cette propriété peut aussi être modulée [234]. En effet, des xerogels et des aérogels peuvent être obtenus et sont caractérisés par une porosité plus importante que les matériaux denses. Plus spécifiquement, les propriétés des pores *i.e.* leur taille ou leur disposition, peuvent être contrôlées en modifiant certains paramètres de synthèse. L'ajout de tensioactif lors de la synthèse est notamment connu pour son effet sur la porosité des matériaux [270]. Selon leur taille, les pores vont être classés en micropores (0,5-2 nm), mésopores (2-50 nm) ou macropores (>50 nm) [234]. L'incorporation de micropores dans les microporteurs disques pourrait donc permettre de contrôler plus finement leurs propriétés mécaniques et leur dégradabilité.

3.3. Apports de la fonctionnalisation des microporteurs.

Plusieurs fonctionnalisations des microporteurs ont été évaluées. Cependant, un composant commun a été incorporé dans la totalité des matrices de silice : l'hydroxyapatite (HAP). De composition $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$, le HAP est un phosphate de calcium correspondant au composant minéral du tissu osseux. Sa biocompatibilité, sa cytocompatibilité et sa biodégradabilité font du HAP un matériau régulièrement utilisé en régénération osseuse [271]. Dans leur étude, Fricain *et al.* ont développé des biomatériaux de polysaccharides fonctionnalisés au HAP. Ces biomatériaux ont démontré leur potentiel ostéogénique *in vivo* dans plusieurs modèles animaux ectopiques et orthotopiques [272]. Pouvant être obtenu naturellement, notamment à partir de corail, ou synthétiquement, l'interaction du HAP avec les CSM a été étudiée à de nombreuses reprises [99]. Cependant la faible résistance mécanique du HAP limite son utilisation seul en tant que biomatériau. Dans leur étude, Feng *et al.* ont synthétisé des microporteurs composés uniquement d'hydroxyapatite et ont étudié leur capacité pour l'amplification de CSM *in vitro* [273]. Suite à leur adhérence et après 7 jours de culture, une meilleure croissance des cellules a été observée en comparaison avec des microporteurs Cytodex[®] 3. En présence de facteurs de différenciation ostéogénique, l'effet ostéoconducteur de ces microporteurs d'HAP a aussi été observé. Ces résultats sont contradictoires avec les nôtres. En effet, en comparaison avec les autres microporteurs disques, Enhanced attachment et Cytodex[®] 1, une moins bonne adhérence cellulaire a été observée lors des premières heures de culture sur microporteurs HAP. De plus, sur des temps plus longs, une très faible capacité d'étalement, ainsi qu'une croissance nulle des cellules ont été observées (Figure 52 en annexe). Dans leur étude, Feng *et al.* ont utilisé du milieu DMEM supplémenté par 10% de SVF. Nos résultats montrent donc qu'en présence d'une faible quantité de sérum, 5% de HAP n'est pas suffisant pour induire la croissance d'ASC. À l'avenir, une augmentation de la quantité de HAP incluse dans la matrice de silice pourra être testée, et son effet sur l'adhérence et la croissance des MSC pourra être évalué. Toutefois, malgré la présence de silice, une attention particulière à la résistance mécanique des microporteurs synthétisés devra être portée, notamment pour une culture sous agitation.

Pour nos expérimentations, des microporteurs de silice fonctionnalisés au HAP (5%) et au collagène de type 1 (2%) ont été synthétisés. Les résultats obtenus démontrent que ces microporteurs permettent d'amplifier de manière efficace des ASC *in vitro* tout en conservant leur phénotype et leur caractère multipotent. De surcroît, des rendements et des taux de senescence similaires ont été observés pour des cellules provenant de 3 donneurs différents, ce qui n'est pas le cas pour les microporteurs industriels Cytodex[®] 1. Enfin, ces microporteurs permettent l'amplification en statique de CSM issues de moelle osseuse et ce aussi efficacement que des ASC (Figure 53 en annexe). Cela prouve la reproductibilité des procédés de culture avec les microporteurs HAP-Collagène et souligne leur potentiel pour l'amplification de CSM à visée thérapeutique.

Au-delà d'une utilisation pour l'amplification de CSM non différenciées, les microporteurs de silice HAP-Collagène pourraient aussi être utilisés dans l'amplification de cellules dédiées à l'ingénierie tissulaire, notamment osseuse. En effet, la totalité des composants de ces microporteurs ont déjà été montrés comme ostéogéniques. Lors de sa libération dans le milieu, la silice soluble engendre la formation d'hydroxyapatite carbonée, précurseur du HAP, connue pour sa biocompatibilité et sa forte ostéoconductivité [234]. Les bio verres de silice restent un des matériaux les plus utilisés en régénération osseuse [274]. Le HAP et le collagène de type 1 sont des composants essentiels de l'os et leur potentiel dans la régénération de ce tissu a largement été souligné [272,275].

Perez *et al.* ont développé des microporteurs de HAP et de collagène pour l'amplification de cellules ostéoblastiques Saos-2 [276]. En comparaison avec des microporteurs de HAP ne contenant pas de collagène, une meilleure croissance cellulaire a été observée sur 14 jours. Une quantité de 0,8% de collagène a été utilisée, confirmant qu'à faible quantité, le collagène promeut la croissance cellulaire lors de son association au HAP. Dans cette étude, l'association HAP-collagène stimule aussi la différenciation ostéogénique des cellules, traduite par une augmentation de l'activité ALP à 7 et 14 jours en comparaison avec des microporteurs de verre ou sans collagène. Les cultures statiques et dynamiques ont été réalisées pendant 5 et 7 jours respectivement. À l'issue des cultures dynamiques, les cellules ont conservé leur multipotence. Dans de prochaines expériences, l'activité ALP des ASC cultivées sur microporteurs HAP-Collagène devra être analysée lors de cultures prolongées. Ces cultures pourront être réalisées en milieu de culture classique ou en milieu de différenciation, afin d'évaluer le potentiel ostéoconducteur et ostéoinducteur de ces supports.

3.4. Vers un procédé de culture libre de tout composant d'origine animale.

Un des objectifs de mon projet était de synthétiser des microporteurs permettant une future production sous format BPF, format appliqué à tout produit thérapeutique. Ce format BPF tient compte du milieu de culture et de l'enzyme de décollement des cellules, d'où notre volonté de travailler avec un milieu pauvre en SVF ainsi qu'avec la TrypLE, enzyme d'origine recombinante. Il s'applique aussi aux supports de culture utilisés ainsi qu'à leur composition. Ici, nous avons travaillé en présence de 2% de collagène de type 1. Associé à sa faible quantité, ce collagène est aussi d'origine marine, connue pour une réduction des risques de contaminations à l'homme [277]. Afin de faire un pas supplémentaire vers ces recommandations BPF, d'autres fonctionnalisations ont été testées.

L'époxyde est une fonction hydrophile caractérisée par la présence d'un oxygène ponté par deux liaisons carbonées. Les matériaux hydrophiles sont connus pour favoriser l'adsorption de protéines à leur surface ainsi que l'adhérence cellulaire [278]. Les époxydes ont notamment déjà été utilisées pour l'adsorption de protéines comme la lipase [279]. Pour ces raisons, cette fonction a été incorporée à la surface des microporteurs de silice fonctionnalisés au HAP afin d'induire l'adsorption des protéines du sérum et de favoriser l'adhérence et la croissance des cellules. À notre connaissance, c'est la première fois que des fonctions époxydes ont été incorporées à des microporteurs pour la culture de CS. La fonctionnalisation CellBIND®, présente sur de nombreux dispositifs de culture cellulaire Corning® et notamment sur les microporteurs Enhanced attachment, est caractérisée par la présence de groupements oxygène hydrophiles favorisant l'adhérence et la croissance cellulaire. La fonctionnalisation des microporteurs HAP-Epoxyde est donc comparable à celle des microporteurs Enhanced attachment.

Les cellules sont chargées négativement à leur surface. De nombreuses fonctions chimiques chargées positivement tels que les groupements amines favorisent l'adhérence et la croissance cellulaire [278]. Ces groupements sont donc présents dans de nombreux microporteurs commerciaux tels que les Cytodex® 1 et 2, les Hillex II-170 de Thermo Scientific ou encore DE-52 et DE-53 de Whatman™ [57]. Les fonctions amines semblent promouvoir la croissance, l'étalement mais aussi la

différenciation ostéogénique des CSM [280]. Pour ces différentes raisons, des microporteurs fonctionnalisés avec une fonction amine tertiaire ont aussi été développés.

Les ASC cultivées sur microporteurs HAP-Epoxyde et HAP-NH₃ ont démontré d'excellentes capacités d'adhérence cellulaire et de croissance lors de cultures statiques. Les fonctions époxydes, hydrophiles et amines, chargées positivement, favorisent probablement l'adsorption des protéines du milieu de culture à la surface des microporteurs et donc l'adhérence des ASC. Pour confirmer cette théorie, de la BSA marquée par fluorescence pourrait être incubée pendant un temps court en présence des microporteurs Carroucell HAP, HAP-Collagène, HAP-Epoxyde et HAP-NH₃. La fluorescence serait ensuite visualisée et quantifiée. Bien que la croissance des ASC sur les microporteurs HAP-NH₃ en culture dynamique soit comparable à celle obtenue avec les microporteurs HAP-Collagène, Enhanced attachment et Cytodex® 1, elle est affectée de manière significative sur les microporteurs HAP-Epoxyde. Ces résultats peuvent s'expliquer en partie par l'augmentation de la sénescence cellulaire avec ces microporteurs [52]. La capacité de différenciation ostéogénique, chondrogénique et adipogénique des ASC, ainsi que l'expression de leurs marqueurs CD73, CD90 et CD105 sont conservées pour l'ensemble des microporteurs testés. Néanmoins, ces différents marqueurs phénotypiques ne sont pas systématiquement affectés par la sénescence des CSM [281]. L'expression de RUNX2 (CBFA1), facteur de transcription impliqué dans la différenciation ostéogénique et chondrogénique et dont l'expression est affectée chez les cellules sénescents [282] pourra être évaluée suite à la culture des ASC sur microporteurs disques. L'expression de CD146 et CD106, deux marqueurs sous-exprimés chez les CSM sénescents, pourrait aussi être évaluée afin de confirmer les résultats obtenus par révélation de l'activité β -galactosidase [283,284].

La sénescence des CSM est un phénomène encore peu connu et une compréhension plus approfondie des effecteurs moléculaires liés à ce phénomène est nécessaire [285]. Jusqu'à présent, aucun lien n'a été fait entre la fonctionnalisation des microporteurs et le taux de sénescence des CSM cultivées. Cependant, afin de limiter ce phénomène avec les microporteurs "xeno-free" et notamment les microporteurs HAP-Epoxyde, plusieurs alternatives sont possibles. L'effet positif de molécules antioxydantes comme la mélatonine, le GSH ou la vitamine C sur la sénescence des CSM a déjà été montré [286,287]. Notamment, la vitamine C peut être produite de manière recombinante chez la levure *S. cerevisiae* [288]. Son incorporation dans les microporteurs "xeno-free" HAP-Epoxyde et HAP-NH₃ pourrait permettre de réduire la sénescence des ASC associée à leur amplification sur ces microporteurs et donc d'augmenter leurs rendements.

Au-delà des solutions liées à la fonctionnalisation des microporteurs, des méthodes de détection de sénescence cellulaire devront être développées et appliquées aux procédés d'amplification de CSM à grande échelle. Bertolo *et al.* ont récemment démontré que l'auto-fluorescence des CSM est un marqueur fiable de leur sénescence [289]. CyBC9 est une sonde à fluorescence et son efficacité dans la détection de la sénescence des CSM a été validée lors de cultures 2D et sur microporteurs [290]. La détection est rapide (2h) et non toxique. L'auto-fluorescence des CSM pourrait donc, à l'image de leur métabolisme, devenir un critère de suivi principal lors de procédés d'amplification à grande échelle.

À moyen terme, d'autres fonctionnalisations libres de tout composants xénogéniques pourraient être testées, comme par exemple certains ligands cellulaires, qui correspondent à de petites séquences peptidiques retrouvées au sein des protéines de la MEC. La séquence Arg-Gly-Asp (RGD), retrouvée dans la fibronectine et le collagène, les séquences Tyr-Ile-Gly-Ser-Arg (YIGSR) et Ile-Lys-Val-Ala-Val (IKVAV), retrouvées pour leur part dans la laminine, ou encore la séquence Gly-Phe-Hyp-Gly-Glu-Arg (GFOGER) du collagène ont déjà été étudiées dans la fonctionnalisation de biomatériaux. Ces peptides ont notamment été testés pour la culture d'ostéoblastes [291], l'ingénierie tissulaire de muscles squelettiques [292] ou la régénération nerveuse [293]. Concernant la culture des

CSM, ces peptides ont été étudiés pour leur capacité à induire la différenciation de ces cellules. Ces peptides conservent donc les propriétés de leurs protéines d'origine, mais ne sont pas limités par leur origine animale. Ils représentent donc des alternatives de choix dans le futur développement de microporteurs "xeno-free"

Nos expériences ont été réalisées dans le milieu Promocell Mesenchymal stem cell growth medium 2. Ce milieu possède une quantité très faible en sérum (2%) mais n'est pas totalement "xeno-free". Les résultats observés sur microporteurs HAP-NH3 sont très encourageants dans l'optique d'une amplification de CSM sous format BPF, mais ces cultures ne sont pas encore libres de tout composants xénogéniques. En milieu Promocell Mesenchymal stem cell growth medium DXF, les ASC n'ont pas réussi à adhérer aux microporteurs HAP-Epoxyde et HAP-NH3 (données non montrées). En effet, de nombreux composés comme l'albumine ou le cholestérol sont présents dans le SVF. Certains éléments traces comme le fer, le zinc, le cuivre ou le sélénium sont liés à la transferrine et à l'albumine du SVF et tendent à manquer dans les milieux "xeno-free" [126]. Ces différents composants jouent un rôle essentiel dans le comportement des cellules souches et notamment des CSM. Par exemple, le cholestérol est impliqué dans le renouvellement des ES [294] ainsi que dans la différenciation ostéogénique des CSM [295]. Les facteurs de croissance FGF- β et TGF- β 1 sont fondamentaux à la croissance de ces cellules [296]. Bien que ces différents composants puissent être remplacés par leur équivalents synthétiques ou recombinants [126], ces ajouts ont un coût non négligeable, surtout à grande échelle. Dans cette optique, les suppléments humains comme le lysat plaquettaire (LP) sont particulièrement intéressants, puisque leur effet sur la croissance et la physiologie des CSM a largement été décrit [86,91]. De plus, le LP peut facilement être obtenu à partir d'unités plaquettaires (Figure 21). Nous avons déjà évalué la croissance des ASC en boîtes de culture, en présence des milieux DMEM et α -MEM supplémentés par 5 ou 10% de LP (Figure 54 en annexe). Même si toutes les conditions ont conduit à une croissance des CSM, le milieu de culture α -MEM semble donner les meilleurs résultats, quel que soit la quantité de LP. Un des objectifs à court terme sera de cultiver en spinner flasks les ASC sur microporteurs "xeno-free" HAP-Epoxyde et HAP-NH3 dans le milieu de culture α -MEM + 5% LP. Néanmoins, le LP peut affecter les capacités immunomodulatrices des CSM [90]. Celles-ci devront donc être vérifiées chez les ASC à la suite de leur amplification dans ce milieu.

3.5. Limites actuelles.

Bien que les performances des microporteurs disques dans l'amplification d'ASC soient très encourageantes, des limites restent tout de même à mentionner. Lors de leur fonctionnalisation par différentes molécules, celles-ci sont introduites directement dans la solution initiale avant sa gélification. Ainsi, même si la quantité de molécule initiale est connue et que la solution est homogène, le manque actuel de caractérisation ne nous permet pas de connaître exactement la quantité de molécules et leur distribution à la surface des microporteurs une fois la synthèse terminée. Cela peut engendrer des variations inter-lots. Dans le cas de molécules onéreuses comme les ligands peptidiques, cette méthode de fonctionnalisation est aussi problématique car elle limite la quantité de molécules présentes à la surface des microporteurs. De plus, la densité ou la disposition spatiale des ligands peptidiques peut influencer sur les CSM [297,298]. Une méthode de revêtement (ou coating) plus adaptée devra être mise au point.

À cause de leur taille et de leur forme, les microporteurs disques sont difficiles à prélever en cours de culture. Pourtant, cette capacité peut être utile afin de vérifier la bonne adhésion et la croissance des cellules, au moins initialement. Néanmoins le suivi de culture est aujourd'hui principalement réalisé par la quantification de métabolites comme le glucose et le lactate. Le développement des méthodes de spectroscopie permet de faciliter ce suivi ; elles sont donc aujourd'hui utilisées dans des procédés de culture en bioréacteur [64].

En cours de culture, les microporteurs disques chargés en cellules ont tendance à sédimenter au fond des spinner flasks, même si cela n'a pas affecté la croissance et le phénotype des ASC. Ces phénomènes ont déjà été observés par Kaiser *et al.* [299]. En effet, dans le cas de vitesses d'agitations trop faibles, une sédimentation importante des microporteurs a été observée sous l'agitateur, zone connue pour sa faible agitation. À l'avenir, une optimisation des conditions d'agitation devra donc être réalisée (voir paragraphe 1.6. ci-dessous).

Enfin, suite à leur culture sur microporteurs disques, les ASC ont été caractérisées par l'évaluation de leur capacité de différenciation adipogénique, ostéogénique et chondrogénique, ainsi que par l'expression de leurs marqueurs membranaires positifs et négatifs. Bien que ces résultats démontrent le maintien de leurs propriétés de cellules souches, une évaluation plus poussée de la fonctionnalité thérapeutique des ASC amplifiées devra être réalisée. En premier temps, une évaluation de leurs capacités immunomodulatrices *in vitro* pourra être réalisée. À plus long terme, une observation de leur potentiel thérapeutique *in vivo* devra être effectuée. Les ASC sont étudiées au niveau clinique dans le traitement de pathologies diverses telles que le diabète de type 1, les défauts en tissu mou ou les défauts osseux [300]. Plusieurs modèles animaux de défauts osseux ont déjà été développés au laboratoire [208,217] et feront l'objet de futures expérimentations.

3.6. Perspectives.

L'une des principales perspectives de ce projet sera de tester les microporteurs disques en bioréacteur, et notamment en bioréacteur à hélice. Les paramètres d'agitation, ainsi que le diamètre de l'hélice et l'angle des pales par rapport à l'axe de l'hélice devront être adaptés spécifiquement à la forme des microporteurs. Ces modifications permettent d'améliorer la puissance et l'efficacité de l'agitation, mais aussi de limiter son impact mécanique et hydrodynamique sur les cellules. Dans leur étude, Collignon *et al.* ont étudié 5 hélices de géométries différentes et ont modélisé par mécanique des fluides leur effet sur l'agitation et le stress engendré pour les cellules [301]. Hormis l'impact hydrodynamique de ces différents agitateurs, cette étude a démontré une disposition spatiale et temporelle différente des zones de stress mécanique selon le modèle étudié. À l'avenir, ce type d'étude pourrait permettre d'optimiser les bioréacteurs à hélice à notre nouvelle forme de microporteurs. Cela permettra d'améliorer la prolifération des cellules tout en préservant leur viabilité et leur fonctionnalité.

Les microporteurs disques pourraient aussi être testés en bioréacteurs à vague [302] et en bioréacteur à lit fixe [256]. Dans les bioréacteurs à vague, un mouvement de basculement mono ou bidirectionnel selon le modèle, est créé et forme une vague à l'intérieur du sac, permettant l'agitation du milieu de culture et le transfert de masse. Plusieurs paramètres, modifiables, vont influencer sur l'intensité d'agitation : l'angle du basculement, son rythme, et la quantité de milieu dans le sac de culture. De plus, ces bioréacteurs réduisent significativement le stress hydrodynamique appliqué aux cellules. Tsai *et al.* ont démontré l'effet des paramètres d'agitation en bioréacteur à vague sur la formation d'agrégats par les CSM [303]. Selon l'angle de basculement appliqué, des agrégats de tailles contrôlées ont pu être formés. Ces agrégats ont augmenté les capacités de migration et d'angiogenèse des CSM, démontrant leur potentiel thérapeutique.

Dans les bioréacteurs à lit fixe, les microporteurs ne sont pas mis en suspension, le transfert de masse s'effectuant par la circulation du milieu de culture. Pour ces raisons, les microporteurs utilisés peuvent avoir des tailles et des densités très importantes. Mizukami *et al.* ont comparé l'efficacité de bioréacteurs à hélice, à fibres creuses et à lit fixe sur l'amplification de CSM issues de cordon ombilical [304]. Après 7 jours de culture, des facteurs d'amplification de 9,8, 8,8 et 6,9 ont été obtenus dans des bioréacteurs à fibres creuses, à hélice et à lit fixe respectivement. Cependant, seulement 18% des cellules ont été récupérées suite à leur culture en bioréacteurs à lit fixe, contre 61% pour les bioréacteurs à hélice et 100% pour les bioréacteurs à fibres creuses. Dans la plupart des

études utilisant des bioréacteurs à lit fixe, les microporteurs Fibra-Cel® sont sélectionnés. Néanmoins, malgré leur porosité, leur surface spécifique est limitée. De plus, la récupération des cellules en fin de culture semble très limitée. À ma connaissance, aucune étude n'a pour l'instant tenté d'utiliser des microporteurs sphériques dans ce type de bioréacteur. Grâce à leur forme, semblable à celle des Fibra-Cel®, leur grande surface spécifique ainsi que leurs excellents rendements de décollements cellulaires, les microporteurs disques seront intéressants à tester dans de tels bioréacteurs.

Un des avantages de la culture en bioréacteurs est qu'ils permettent de contrôler les paramètres physico-chimiques et notamment l'oxygénation du milieu de culture. Les niches des cellules souches étant naturellement hypoxiques [116], une faible tension en oxygène conduit le plus souvent à une augmentation de la croissance cellulaire. Timmins *et al.* ont cultivé des CSM issues de placenta sur microporteurs Cultispher-S dans un bioréacteur à vague de 2 litres. Après 7 jours de culture en condition hypoxique (5% O₂), un facteur d'amplification de 16,3 a été obtenu [305]. De futures expériences en conditions hypoxiques pourraient permettre d'améliorer les rendements obtenus suite à la culture sur microporteurs disques. L'hypoxie pouvant aussi influencer sur la capacité de différenciation des CSM, une attention particulière devra être portée à cet aspect.

Enfin, ces microporteurs pourraient aussi être testés dans d'autres types d'applications comme la production de vaccins ou d'anticorps. En effet, les cellules cultivées sur microporteurs disques sont peu sensibles à l'agrégation. Ces microporteurs pourraient donc être utilisés dans la production de produits thérapeutiques sécrétés comme le sont les vaccins ou les anticorps.

Partie II : Etude du comportement d'ASC sur des biomatériaux de titane nanostructurés.

Malgré les nombreux progrès fait dans la synthèse de biomatériaux, le titane fait encore partie des biomatériaux les plus utilisés en ingénierie tissulaire, et notamment pour la régénération osseuse. Cependant, l'utilisation de biomatériaux est souvent associée à l'apparition d'infections pouvant compromettre l'efficacité du traitement. Afin de limiter ces infections, de nombreux travaux ont eu pour objectif de développer des biomatériaux de titane antibactériens. L'équipe d'Elena Ivanova de l'Institut Royal de Technologie de Melbourne (RMIT) a créé des nanostructures à la surface de matériaux de titane en s'inspirant des topographies retrouvées naturellement à la surface des ailes d'insectes (voir paragraphe 5.3.6. de la synthèse bibliographique). Ces biomatériaux nanostructurés ont des capacités bactéricides *in vitro* contre plusieurs souches bactériennes, Gram positives et négatives [250,253].

En collaboration avec cette équipe, le second volet de ma thèse concernait l'étude du comportement d'ASC sur ces biomatériaux nanostructurés en vue de leur potentielle utilisation thérapeutique. En comparaison avec des matériaux de titane polis, les capacités d'adhérence et de croissance des cellules sur ces supports ont été étudiées et une attention particulière a été portée sur leur phénotype. Enfin, le potentiel ostéoinducteur de ces biomatériaux a été évalué *in vitro*. Ces travaux ont conduit à la rédaction d'un article soumis pour publication.

1. Article 2.

Mechano-bactericidal titanium surfaces for bone tissue engineering

Tristan Le Clainche^{a,1}, Denver Linklater^{b,1}, Sherman Wong^b, Phuc Le^b, Saulius Juodkazis^d, Xavier Le Guével^a, Jean-Luc Coll^a, Elena Ivanova^{b,*}, Véronique Martel-Frchet^{a,c*}

^a *Institute for Advanced Biosciences, Université Grenoble-Alpes, INSERM U1209, CNRS UMRAllée des Alpes, 38700 La Tronche, France*

^b *School of Science, RMIT University, Melbourne, VIC 3000, Australia*

^c *EPHE, PSL Research University, 75014 Paris, France*

^d *Optical Sciences Centre and ARC Training Centre in Surface Engineering for Advanced Materials (SEAM), School of Science, Swinburne University of Technology, Hawthorn, VIC 3122, Australia*

¹ *These authors contributed equally to this work.*

** corresponding authors*

E-mail addresses: elena.ivanova@rmit.edu.au (E. Ivanova), veronique.frchet@ephe.psl.eu (V. Frchet).

Abstract

Despite advances in the development of bone substitutes and strict aseptic procedures, the majority of failures in bone grafting surgery are related to nosocomial infections. Development of biomaterials combining both osteogenic and antibiotic activity is, therefore, a crucial public health issue. Herein, we developed two types of intrinsically bactericidal titanium supports fabricated by using commercially scalable techniques: plasma etching or hydrothermal treatment, which display two separate mechanisms of mechano-bactericidal action. Hydrothermal etching produces a randomly nanostructured surface with sharp nanosheet protrusions killing bacteria *via* cutting of the cell membrane, whereas plasma etching of titanium produces a microscale two-tier hierarchical topography that both reduce bacterial attachment and rupture those bacteria that encounter the surface. The adhesion, growth and proliferation of human Adipose-derived Stem Cells (hASCs) on the two mechano-bactericidal topographies were assessed. Both types of supports allowed the growth and proliferation of the hASCs in the same manner and cells kept their stemness and osteogenic potential. Furthermore, these supports induced osteogenic differentiation of hASCs without the need of differentiation factors, showing their osteoinductive properties. This study proves that our innovative mechano-bactericidal titanium surfaces with both regenerative and bactericidal properties are a promising solution to improve the success rate of reconstructive surgery.

Keywords

Mechano-bactericidal surfaces, Adipose-derived Mesenchymal Stem Cells, osteogenic differentiation, titanium, nanostructured surfaces

Introduction

Bone grafting is one of the main therapeutic tools in orthopedic, maxillofacial or dental surgery to compensate for bone loss that has a traumatic, degenerative or tumoral origin. Despite

progress made in the development of biomaterials as bone graft substitutes for bone reconstruction, approximately 10% of these surgeries are compromised by bacterial infection [1]. Indeed, bacterial infection is a major factor leading to implantation failure and may lead to serious illness and even death [2]. Infection may arise from bacteria that are present in the operating room environment or from the patient themselves, e.g., from the skin or endogenous microflora. Bacteria can quickly attach to the implant and grow as colonies embedded in an extracellular matrix of carbohydrates or exopolysaccharide, creating a biofilm [3]. The biofilm shields the bacteria from the immune system of the patient and antibiotics: bacteria organized in a biofilm could be 10-1000 times more resistant to antimicrobial agents [4,5]. In the majority of cases, the only therapeutic solution is the removal of the infected implant followed by its replacement. This has not only important consequences for patients' quality of life and in terms of financial costs, but infectious bacteria could also possibly remain in the host after the removal of the failed implant. So, rather than trying to treat the consequence of bacterial colonization, total inhibition of bacterial adhesion on the implant appears to be the best strategy to prevent implant-associated-infection. Therefore, ideal novel implant devices for bone reconstruction should combine both antibiotic activity and osteogenic promoting properties.

An attractive approach for the development of antibacterial, osteogenic implantable devices is to engineer antibacterial characteristics directly on biomaterials currently used in the clinic. Due to its excellent biocompatibility, chemical stability and mechanical properties [6,7], titanium (Ti) is one of the most widely used materials for implant manufacturing since the 1960's. Various surface modifications of Ti-based implants are currently under investigation for implementation of antibacterial surface properties. One approach is to prepare antibiotic-impregnated Ti implants. Different antibiotic coatings have been tested in order to allow the release of antibiotics from the implant in the body of the patient. However, antibiotic resistance occurs frequently and the release is limited over the time [8–10]. New strategies were developed to induce the release of the antibiotic only in presence of bacteria and in a dose-dependent manner. For example, it is known that the microenvironment at bacterial infection sites is particularly abundant in extracellular lipases. Therefore, antibiotics could be grafted to a PEG-based surface and then released only upon the activation of lipases at the infection site [11]. Although proof-of-concept studies have been successfully demonstrated, practical applications of these new antibacterial biomaterials are faced with many challenges. One challenge is to avoid passive release efficiently so that the antimicrobial agents can be retained in the biomaterial systems since diffusion is too fast and the effect persists only until the drug is exhausted. After long-term implantation in the body, a major adverse event from using antibiotics is the risk of inducing antibiotic resistance [12]. Other studies have shown the antibacterial effect of copper, magnesium/zinc or silver oxide nanoparticles coated implants [13–15]. However, this effect is achieved by the release of metallic ions, and the effects on human health remain unknown [16–18]. Therefore, the ideal biomaterial would be multifunctional: intrinsically antibacterial without the need of additional components or treatments while supporting the growth and proliferation of attaching cells.

Bacterial adhesion is influenced by a combination of material surface properties, such as surface charge, hydrophobicity and surface roughness [19]. Many plants and animal species have developed natural defense strategies against bacterial colonization. By studying insect wings, especially those of cicadas and dragonflies, we previously showed that their surface is covered with a multitude of nano-protrusions that could rupture the bacteria trying to adhere, and thus, demonstrate bactericidal activity [20–22]. Recent advances in nanoengineering techniques have allowed the development of surfaces with nanostructures mimicking those found on the surface of insect wings that could prevent bacterial adhesion. Indeed, different materials (silicon, gold-coated polystyrene) with surface topography bioinspired by insect

wings shows that these materials then acquire mechano-bactericidal properties towards both Gram-positive and Gram-negative bacteria as well as endospores [23–26]. This innovative strategy enables the synthesis of materials with inherent bactericidal activity that is sustainable and does not rely on the diffusion of antibiotic molecules.

Recently, we reported the fabrication of mechanically bactericidal (mechano-bactericidal) Ti surfaces using commercially scalable, single-step, wet and dry etching techniques that were extremely active against clinically relevant pathogenic bacteria such as *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa* (Table S1) [27–30]. Ti surfaces engineered by hydrothermal etching selectively eliminated only bacterial cells while promoting the growth and proliferation of eukaryotic cells such as COS-7 fibroblasts or osteoblast-like cells [23,28]. Furthermore, these surfaces were shown to stimulate neuronal differentiation [29]. Ti *nanopillar* surfaces, engineered by maskless plasma etching, were recently reported to promote both the osteogenic and cardiomyogenic lineage differentiation of Mesenchymal Stem Cells [31,32].

In this context, it seemed attractive to analyze the potential osteoconductive properties of mechano-bactericidal Ti surface patterns established in our previous works. Here we aimed to investigate the adhesion, growth and differentiation ability of human Adipose-derived Mesenchymal Stem Cells (hASCs) in response to two types of mechano-bactericidal Ti topographies. These supports exhibit either a 3D hierarchical topography of micropillar clusters (3.5 μm height) or a dense array of sharp nanosheets (Fig. 1). hASC fate on these supports was evaluated using a combination of scanning electron microscopy, immunofluorescence microscopy and biochemical assays. The initial response of hASCs to the engineered topographies was closely monitored *via* quantification of cell number, cell shape (aspect ratio), and production of focal adhesion contacts. Finally, the ability of surface features to induce osteogenesis without the need of adding growth factors was assessed by quantification of calcium deposits and alkaline phosphatase activity.

Materials and Methods

Cell culture and reagents. Human Adipose-tissue derived stem cells (hASC) were kindly provided by the Etablissement Français du Sang (EFS) of Saint-Ismier (France). Cells in between passage 2-5 were used for the experiments. For control culture conditions, as well as for cell maintenance, tissue culture polystyrene plates (TCPS) were used. Since cell culture medium with only 2% serum was used (Mesenchymal stem cells growth medium 2, Promocell, Heidelberg, Germany), it was necessary to realize a pre-coating of flasks with 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ of human fibronectin before cell seeding. For cell harvesting, TrypLE (Thermofisher, Courtaboeuf, France) was used.

Fabrication of Ti supports. Commercially pure (CP) ASTM grade 2 Ti rods (1 cm diameter) were obtained from Goodfellow (Huntingdon, England). Potassium hydroxide pellets were obtained from Merck & Co (Kenilworth, New Jersey, USA). All solvents used for substrate cleaning were of analytical grade and were used without further purification. Absolute ethanol (99%) was purchased from Labtek Pty Ltd (Brendale, Australia) and acetone (laboratory reagent 99.5%) was obtained from Merck & Co. A Secotom-50 (Struers, Cleveland, USA) instrument was used to mill the Ti rods into discs with 2 mm thickness. The Ti discs were polished using silicon carbide grinding papers of grit size P1200. Polished Ti discs were

ultrasonically cleaned in sequential solutions of 100% acetone, 100% ethanol and MilliQ water for 5 min, respectively.

Hydrothermal treatment (HTE Ti discs). The polished and cleaned Ti discs were subjected to hydrothermal for 6 h. During the hydrothermal etching process, the discs were fully submerged in 100 mL of 1 M KOH in a Teflon lined autoclave and heated to 150°C for each reaction period. After hydrothermal etching, the Ti discs were collected and retained in MilliQ water for 24 h. Following this step, the Ti discs were collected and dried at 37°C for 24 h. Then, the hydrothermally treated (HTE) Ti discs were annealed at a temperature of 450°C for 4 h in a high-temperature oven. The rate of temperature increase was 20°C/min. Thermal annealing was used to initiate the formation of sharp nanosheets, and to increase the chemical and mechanical stability of the surface structures. After annealing, the chamber was left to cool to room temperature, and the HTE discs were then collected. Afterwards, the HTE-Ti discs were cleaned ultrasonically for 20 min with 50% ethanol to remove any trace impurities and loose debris.

Plasma etching (two-tier Ti discs). To achieve a mirror finish polish of the discs an initial manual polishing step was performed as described above. After initial polishing, the Ti discs were then sonicated for 10 min in ethanol to remove any surface contamination arising from the manual grinding process. A subsequent chemical mechanical polishing step, using a 3 µm diamond solution, DiaPro (Struers, United States) was used in conjunction with a polishing cloth for 10 min. Finally, a 0.5 µm silica bead/hydrogen peroxide solution was used with a soft cloth for a further 10–20 min. Samples were then sonicated sequentially in acetone, isopropanol and deionised water prior to processing. Modification of the polished Ti substrata to impart a surface microstructure was achieved using a chlorine-based, maskless plasma etching technique as previously described [30]. The Ti was placed on a quartz carrier wafer and subjected to reactive ion etching (RIE) (Plasma Lab System 100, Oxford Instruments, United Kingdom), using Cl₂ gas maintained at a flow rate of 50 sccm, 1000 W ICP and 100 W RF power, and 3 mTorr pressure for 40 min.

Characterization of Ti surfaces. High-resolution scanning electron micrographs of the Ti discs were recorded using a SEM/electron beam lithography (EBL) Direct Write Two instrument (Raith Nanofabrication GmbH, Dortmund, Germany) operated at 10 kV. Top-view SEM images were analyzed using the ImageJ (Version 1.8.0) software package, including DiameterJ and OrientationJ plugins, to determine edge length and density of HTE supports and spacing, pillar diameter and density of plasma etched Ti supports.

The surface chemical composition of the Ti substrate was studied using X-ray photoelectron spectroscopy (XPS; Axis Ultra Spectrometer, Kratos analytical Ltd., Manchester, UK), equipped with monochromatic X-ray source (Al Ka, $h\nu = 1486.6$ eV) operating at 150 W. The spectrometer energy scale was calibrated using the Au 4f_{7/2} photoelectron peaks at a binding energy of 83.98 eV. The hydrocarbon component of the C 1s peak (binding energy 285.0 eV) was used as a reference for charge correction. Photoelectrons emitted at 90° to the surface from an area of 700 µm × 300 µm were analyzed at 160 eV for survey spectra and then at 20 eV for region spectra. Survey spectra were recorded at 1 eV/step, while the region spectra were taken at 0.1 eV/step. The relative atomic concentration of elements detected by XPS was quantified based on the peak area in the survey spectra with the sensitivity factors for the Kratos instrument being used. Peaks in the high-resolution regions of spectra were fitted with synthetic Gaussian- Lorentzian components after the removal of a linear background (using the Kratos vision II software).

X-ray diffraction patterns (D8 Advance, Bruker, Preston, Australia), showing the crystallinity of the nanostructures, were obtained under ambient conditions where the samples were scanned over 2h for the range of 30–85° at a scanning rate of 1 degree per minute using Cu-K α radiation, ($\lambda = 0.15406$ nm).

Water contact angles on the Ti surfaces were measured using the sessile drop method. The measurements were conducted at room temperature, under ambient conditions, using an FTA1000 (First Ten Angstroms, Inc., Portsmouth, UK) instrument. At least three separate measurements were taken for each sample, and three technical replicates were studied. For each contact angle measurement, images were taken in 2 s using a Pelco model PCHM 575-4 camera. The images were analyzed using FTA Windows Mode 4 software.

Nanoindentation of two-tier Ti supports was performed using Hysitron Picoindenter equipped with a flat-ended tip (see supplementary information).

Adhesion kinetics. Titanium supports were transferred into 96 well plates and 3×10^4 cells were seeded and allowed to adhere for 5, 15, 30 and 60 min respectively. Cell culture medium was then removed and replaced by 200 μ L of medium containing 20 μ L of Presto Blue reagent (ThermoFisher, Courtaboeuf, France). Adhered cells were then incubated at 37°C, 5% CO $_2$ for 2 h. The fluorescence at 590 nm (excitation 560 nm) was quantified with a spectrofluorometer (FluoStar Omega, BMG Labtech, Ortenberg, Germany). As the cells were attached after 60 minutes of incubation, relative cell adhesion was determined by comparison between the fluorescence values obtained for each respective time point and 60 min of adhesion.

Fluorescence imaging. Cells (1×10^4 per well) were seeded in 24-well plates containing polished, two-tier and HTE titanium surfaces, respectively. Positive control surfaces were wells coated with fibronectin (TCPS condition). Polished, non-structured Ti surfaces were used as negative controls.

After 15 min, 1 h or 24 h of adhesion, cells were fixed using 4% Paraformaldehyde (PFA) and permeabilized for 30 min at room temperature with 0.2% Triton in PBS. After blocking for 1 h with phosphate buffer saline (PBS, pH 7.4) containing 0.2% Tween and 2.5% bovine serum albumin (BSA), cells were incubated overnight at 4 °C with mouse Vinculin antibody (Sigma-Aldrich, Lyon, France; 1:200) for focal adhesions analysis. Cells were then stained with anti-mouse Alexa 488 antibody for 1 h at room temperature. For actin and nucleus imaging, cells were labeled with TRITC coupled phalloidin (Sigma) and Hoechst (Thermofisher) for 45 and 5 min, respectively. Imaging was performed using confocal laser scanning microscopy (CLSM) (LSM710 NLO, Carl Zeiss, Oberkochen, Germany). Using Image J software (Version 1.5) and focal adhesion analysis server (FAAS), cell aspect ratio, area and focal adhesion properties were further determined [33]. For morphologic studies, data were obtained from two independent experiments and quantification was realized on 15 different cells per experiment.

Scanning electron microscopy (SEM). Ti supports with adhered cells were fixed in 4 % PFA for 10 min and then dehydrated using a graded series of ethanol at concentrations of 30, 50, 70, 90, 95, 100 ($\times 2$) % for 10 min each. Ti supports were then sputter coated with gold (Neocoater, JEOL) for SEM imaging. SEM imaging was performed using the SEM capabilities

of an electron beam lithography Direct Write Two instrument (Raith Nanofabrication, GmbH) operated at 3 kV.

Cell growth. hASC were plated at 1×10^4 per cm^2 in 24-well plates containing different Ti surfaces and incubated for up to 96 hours. Each day supports were transferred to empty wells and 500 μL of medium containing 50 μL of PrestoBlue reagent was added. Cells were then incubated for 2 h and the fluorescence was measured at 590 nm, as mentioned above. Fluorescence values were normalized to the total surface of the different supports (2 and 0.8 cm^2 for TCPS and Ti supports, respectively) to determine the total number of cells per cm^2 .

At the endpoint (96 h), cells were harvested using TrypLE reagent and counted using a hemocytometer. Cell viability was evaluated using Trypan blue reagent.

For live and dead cells staining, Incucyte cytotox green reagent (Essen Biosciences, Welwyn Garden City, UK) was used. The reagent was added in the medium (diluted at 1/4000) after 72 h of culture. Cells were then observed using live microscopy (AxioObserver Z1, Carl Zeiss, Oberkochen, Germany) after 96 hours of culture. To compare dead cell amount to overall cell amount, actin and nucleus staining was also realized, as stated above.

Tri-Lineage differentiation of hASC. To verify that the growth on different Ti supports did not modify cell differentiation ability, we harvested cells grown for 96 hours on those supports and subsequently performed a tri-lineage differentiation assay.

For adipogenic and osteogenic differentiation, cells were seeded at 5×10^4 per well in LAB-TEK II chambers (ThermoFisher). Once 80-90% of confluence was observed, growth media was replaced by AdipoMAX differentiation medium (Sigma-Aldrich, Lyon, France) or by Stempro Osteogenesis Differentiation medium (ThermoFisher). For adipogenic and osteogenic differentiation, cells were cultured for 14 or 21 days respectively and the medium was replaced every 4 days. At the end of the culture, cells were washed by PBS, fixed with 4% paraformaldehyde (PFA) for 30 minutes at room temperature and then rinsed twice with PBS. For adipogenic differentiation, cells were stained by Oil Red O (Sigma-Aldrich) for 50 minutes at room temperature. For osteogenic differentiation, cells were stained with 2% Alizarin Red, pH 4.2 for 20 minutes at room temperature. Unspecific staining was removed with distilled water. After three washes with PBS, slides were mounted for microscope observation.

To determine the chondrogenesis potential of ASC, 1×10^5 cells were seeded on 96-well Spheroid Microplates (Corning). When the spheroids were formed (after 1 or 2 days), growth medium was replaced by Stempro Chondrogenesis Differentiation medium (ThermoFisher). Cells were cultured for 21 days and the medium was changed every 4 days. At the end of the culture, spheroids were pooled, washed once with PBS and fixed with 4% PFA overnight at 4°C. Then, they were washed twice with PBS and embedded in Tissue-Tek O.C.T compound (Sakura, Japan) for cryo-section. The obtained sections of 10 μm were transferred on Superfrost slides and then stained with 1% Alcian Blue (Sigma-Aldrich, France) for 30 minutes, protected from light. Unspecific staining was removed by three washes with HCL 0.1N and slides were mounted for microscope observation.

Cell Senescence. After growing on Ti supports, cells were harvested and plated on LAB-TEK II chambers (1×10^4 cells per well). After 2 to 3 days, cells were stained with the Senescence

β -Galactosidase Staining Kit (Cell Signaling, Leiden, The Netherlands), according to the manufacturer instructions. Slides were mounted for microscope observation and 10 pictures were randomly taken for each condition. β -Galactosidase positive cells were then counted and normalized to the total number of cells in each field.

Osteoconductive properties of Ti surfaces

Calcium deposits quantification. Cells were plated at 2×10^4 hASC per well in 24-well plates containing the different Ti surfaces and were incubated for 21 days in growth medium. The medium was refreshed every 4 days without adding any differentiation factors. After the incubation, Alizarin red staining was performed as described above. To quantify the amount of calcium deposit, Alizarin red staining was dissolved by adding 500 μ L of 20% Methanol and 10% acetic acid solution. Finally, 450 nm absorbance was read by spectrophotometry.

Alkaline phosphatase (ALP) activity. Cells (2×10^4 per well) were plated in 24 well plates containing our different titanium surfaces and were incubated for 21 days in growth medium without adding any differentiation factors. After 7, 14 and 21 days of culture, cells were lysed with 50 μ L of 1% Triton X-100 (Sigma-Aldrich) in PBS during 90 minutes at 4°C. Cell debris were then pelleted by centrifugation at 2000 g for 15 minutes at 4°C. ALP activity was revealed by adding 200 μ L of Alkaline Phosphatase Yellow ELISA solution (Sigma-Aldrich) to 20 μ L of protein supernatant. After 1 h of incubation at 37 °C, reaction was stopped by adding 50 μ L of 3 M sodium hydroxide (Sigma-Aldrich). Absorbance at 405 nm was read and normalized to the total protein amount.

Statistical analysis

Data were expressed as the mean value \pm the standard error of the mean and analyzed by a two-tailed unpaired T-test. The degree of statistical significance were set at $P < 0.05$.

Results

Fabrication and characterization of nanostructured Ti surfaces

Two types of physically bactericidal Ti surfaces were fabricated using commercially scalable, single-step, wet and dry etching techniques as described elsewhere [30,34]. These nano-fabrication techniques represent novel approach of controlling bacterial attachment that could be used to upscale the nanopatterns readily for commercialisation.

Ti surfaces were characterised using a combination of surface analysis techniques. Analysis of top-view SEM micrographs determined the specific surface topological parameters of the nano-microstructured Ti surfaces (Table 1). After 40 min of maskless chlorine plasma etching, the surfaces began to form a hierarchical topography with tall, clustered pillars forming pyramidal structures on the micron scale (3.5 μ m length) with interspersed shorter pillars (1 μ m length) (Figure 1, Table 1). Plasma etching of bulk Ti results from a combination of physical ion bombardment and chemical etching. Chemical etching is predominantly responsible for etching of the Ti metal, whereas ion bombardment works to remove the oxide layer [35]. Recently, we reported that this two-tier surface topography can reduce the extent of attachment of bacterial cells by minimising the suitable surface area for attachment, as well

as directionally trapping those cells that do encounter the surface inside the clustered micropillars where the second tier of nanopillars act to rupture and kill the cells (Figure S2) [30].

In contrast, hydrothermal etching forms a random network of Ti-based nanosheets *via* dissolution of Ti^{4+} from the precursor surface (TiO_2 layer) followed by subsequent recrystallisation of potassium titanate ($K_2Ti_3O_7$) during the hydrothermal etching process [36]. After 6 h, the height of the nanosheets formed sharp nano-edges of approximately 10 nm in thickness which have demonstrated considerable ability to kill both Gram-negative *Pseudomonas aeruginosa* and Gram-positive *Staphylococcus aureus*, including methicillin resistant strains (MRSA) [34,37] (Table S1, Figure S2). The nanotopology formed on the Ti surfaces after 6 h of hydrothermal treatment is reminiscent of the nanopattern of vertically oriented graphene sheets. The ultra-sharp edges of graphene nanosheets have been reported to cause the formation of pores by physical insertion into the bacterial membrane [38].

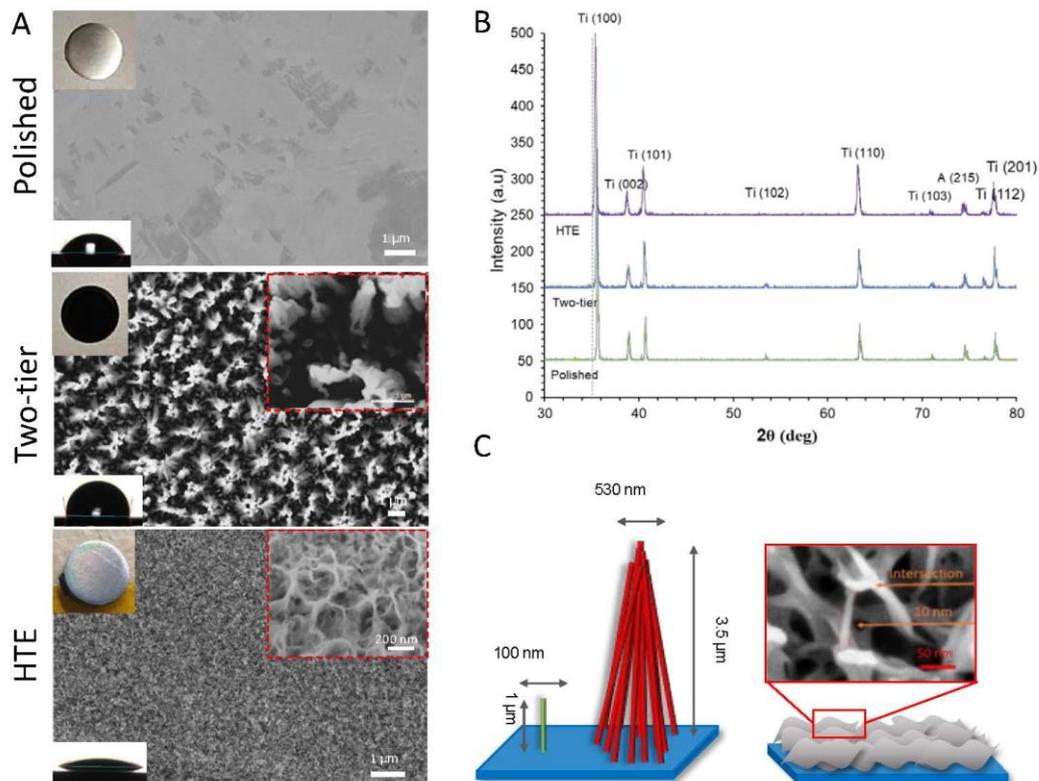


Fig. 1. Surface characterisation of polished and nanostructured surfaces. (A) Top-view SEM micrographs of two-tier and HTE nano-structured surfaces, fabricated by plasma and hydrothermal etching, respectively. Insets show high-magnification SEM images of resultant surfaces. (B) XRD patterns for titanium processed with ICP-RIE and HTE. All diffraction peaks could be indexed to the TiO_2 anatase phase (A) (JCPDS file #21-1272) and to the Ti metal phase (Ti) (JCPDS 44-1294). (C) Schematic representation of the structures formed on Ti following plasma etching for 40 min and hydrothermal etching for 6 h, respectively.

Table 1. Characterization of surface physico-chemical characteristics

Surface Geometric Parameters			
	Polished	Two-Tier	HTE
Etch	0	40 min	6 h
Pitch (nm)	-	1729 ± 621	-
Cap/edge width (nm)	-	158 ± 40	10
Pillar/Edge Density	-	6.69 ± 1.4 (pillar/μm ²)	20 ± 13 (edge/μm ²)
Pillar Height/Edge Length	-	3.5 ± 0.5 μm	8.0 ± 1.8 (μm/μm ²)
Wettability			
Water contact angle (°)	60.1 ± 8.0	98.4 ± 5.8	22.00 ± 2.2
Elemental Composition (At%)			
O	34.275 ± 1.33	29.945 ± 0.33	56.65 ± 1.24
C	19.25 ± 0.31	26.605 ± 0.33	13.5 ± 0.25
Ti	32.98 ± 7.7	29.27 ± 2.52	22.65 ± 3.5
Cl	-	1.075 ± 0.05	-
K	-	-	7.25 ± 0.11

hASC adhesion and proliferation on the different Ti supports

Mesenchymal Stem Cells (MSCs) can be isolated from different sources such as bone marrow, adipose tissue (ASC), dental tissues, dermal tissues or the umbilical cord [39]. Human adipose tissue-derived stem cells (hASCs) are particularly promising for cell therapy and have already been used in numerous clinical studies, therefore they were of significant interest for this work [40]. Several studies have shown that the surface topography of materials strongly influences cell response such as adhesion, migration or differentiation [41–46]. First, the dynamic of hASC attachment during the first hour of interaction with HTE and two-tier Ti supports was compared to that on polished non-structured Ti and TCPS used as control surfaces (Figure 2). After 15 min of incubation, approximately 75% of the hASCs attached onto HTE and polished Ti and 50% of hASCs attached on two-tier Ti surface. However, despite the differences in Ti surface topographies, 90–97% of the hASCs attached to all studied surfaces after 30 min interaction.

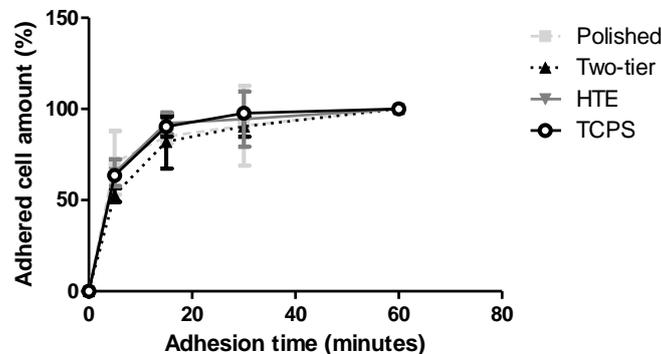


Fig. 2. Dynamic of hASC attachment on different types of Ti surfaces. hASC were seeded on polished, Two-tier or HTE Ti surfaces and tissue culture wells coated with fibronectin (TCPS), which was used as a positive control. After 60 min interaction, all the cells (~100%) were found to have attached onto all studied surfaces.

The assessment of hASC morphology on the three types of Ti supports over 24 hours was performed by using SEM and fluorescence microscopy after 15 min, 60 min and 24 h of incubation (Figures 3A and 3B). Cell area analysis and elongation (aspect ratio – length/width) were determined by actin labelling and visualized by immunofluorescence microscopy (Figures 3C and 3D). Examination of SEM and fluorescence micrographs revealed that at short incubation times, hASCs spreading was inhibited on the micro-nano-structured Ti surfaces; however, after 24 h, an enhanced cell spreading and elongation was detected on these surfaces. Indeed, after 15 min of attachment, the average hASC area was 109 ± 8 and $158 \pm 16 \mu\text{m}^2$ for HTE and two-tier supports, respectively, compared to 248 ± 51 and $335 \pm 43 \mu\text{m}^2$ for polished Ti and TCPS surfaces, respectively. After 60 min, the cells attached to HTE and Two-tier supports exhibited respective areas of $195 \pm 21 \mu\text{m}^2$ and $245 \pm 21 \mu\text{m}^2$, compared to cell areas of $454 \pm 45 \mu\text{m}^2$ on TCPS and $624 \pm 56 \mu\text{m}^2$ on polished Ti. Especially during the first hour hASCs displayed significantly higher aspect ratio on polished Ti surfaces, 2.5 ± 0.25 at 60 min compared to 1.7 ± 0.2 for two-tier, 1.9 ± 0.1 for HTE and 1.5 ± 0.07 for TCPS (Fig. 3D). This finding was in agreement with the estimated cell area showing that cells started to elongate earlier on polished Ti compared to other surfaces. Nevertheless, after 24 h of adhesion, hASCs displayed greater spreading on HTE surfaces compared to polished Ti. At this point, cell aspect ratios were similar for polished, HTE and TCPS surfaces (approximately 3.5 to 4.5); however, on two-tier surfaces, the resulting aspect ratio was 6.2 ± 0.62 which is significantly higher ($p < 0.025$), indicating an extremely elongated cell shape on two-tier surfaces. Notably, the cell area was more heterogeneous on HTE ($1507 \pm 181 \mu\text{m}^2$) than that on polished surface ($1086 \pm 92.6 \mu\text{m}^2$). The heterogeneous values of the cell areas could be due to the random network of edge on HTE Ti. Thus, our results confirm that surface nanotopography can impose some constraints that directly affected cell surface area and morphology of hASCs.

Cell attachment onto the substratum is mediated by focal adhesions that are involved in signal transduction and cytoskeletal organization [47–49]. Focal adhesions are mechanosensors and mechanotransducers that sense and transduce mechanical signals into biochemical signals [50,51]. Vinculin labelling was used to visualize the focal adhesion in cells adhered to the Ti supports and to assess if the change in nanotopography could alter focal adhesion formation (Figure 3E). After 24 h of incubation, there was no significant difference in the size of focal adhesion area between the different substrata (Figure 3F). Focal adhesion size depends on both the stiffness of the substratum and the density of ligands available to form adhesion points [52]. Our results suggest that hASCs were not able to sense stiffness difference between the TCPS, polystyrene (stiffness about 3 GPa, [53]) and the metallic, Ti surfaces. The stiffness of Ti microstructures on Two-tier supports was assessed using nano-indentation (Figure S4). An approximate value for elastic modulus of ~ 100 GPa was calculated, which is similar to bulk Ti [54]. This could explain why hASC were not able to sense the difference between TCPS and Ti stiffness because these values did not conform to the physiological mechanical environment. Although the range of ECM stiffness in the body is enormous, it remains in much lower values (from tenths of a kPa in the brain tissue to hard bone with of hundreds of MPa) [55]. Nevertheless, the number of focal adhesions was greatly impacted by the surface topographies. Approximately 32.73 ± 3.34 to 44.67 ± 5.3 well-defined focal adhesions were observed at the cell periphery on TCPS and polished Ti, respectively. In contrast approximately only 14.47 ± 1.23 focal adhesion/cell and 5 ± 1.23 focal adhesion/cell were observed on two-tier and HTE, respectively (Fig. 3G). This was a dramatic decrease in

the number of focal adhesions on nanostructured Ti surfaces and they appeared less well-defined and did not reach the cell periphery (Figure 3E).

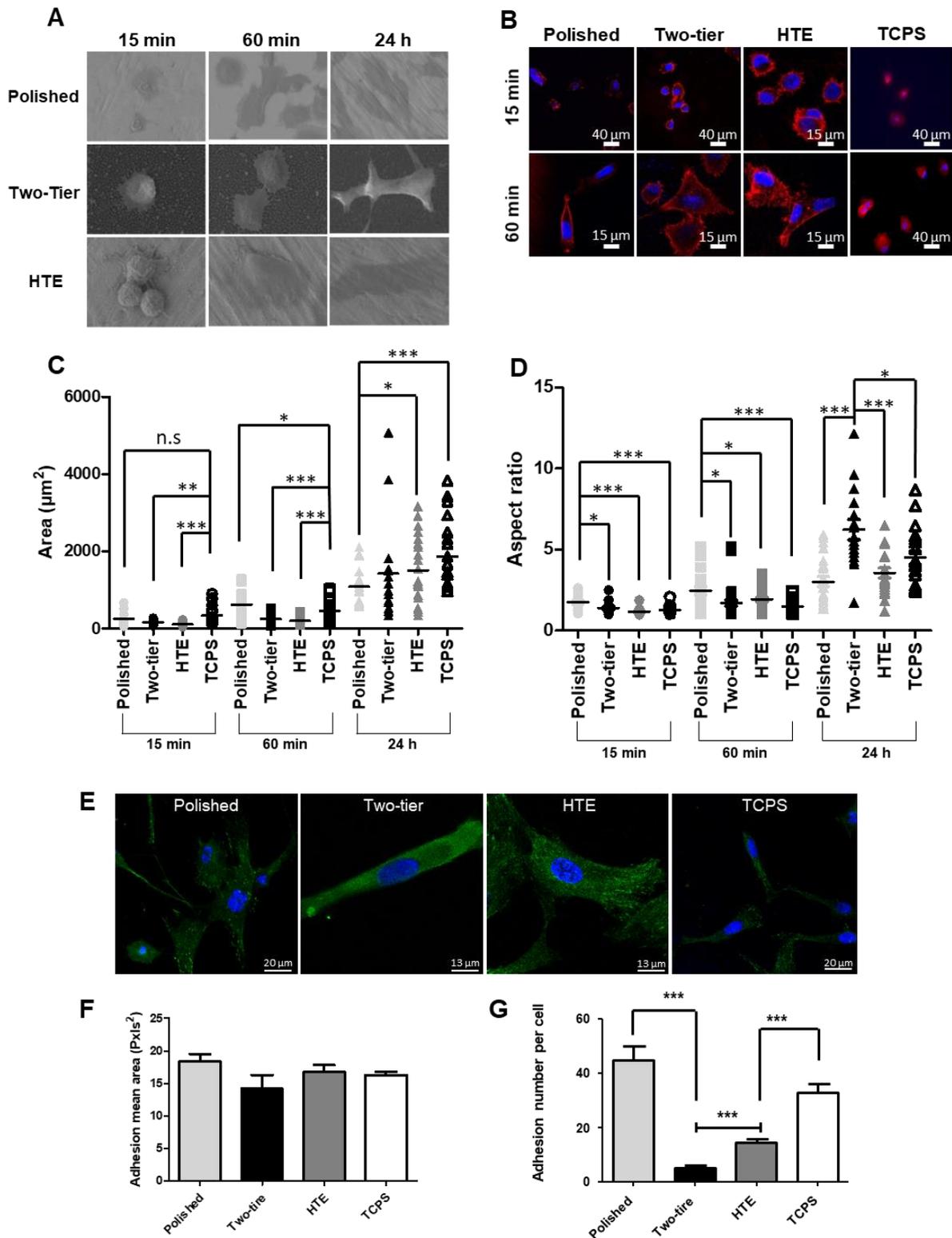


Fig. 3. hASC morphology on Ti surfaces over 24 hours. (A) SEM micrographs of hASC on the different Ti supports. (B) Representative images of actin organization in hASC seeded on Ti surfaces

(actin, red). The nuclei were stained with Hoechst (nucleus, blue). (C, D) Morphological parameters of hASC on different supports. The graphs show the estimation of the cell area (C) and the aspect ratio (D). Results are expressed as mean \pm SEM. (E) Representative merged CLSM images of hASC showing focal adhesions (vinculin, green) and nuclei (Hoechst, blue). F, Surface coverage by attached cells on the different Ti surfaces. (G) Estimation of the number of focal adhesions on individual hASC at the time of attachment on the different Ti supports. Values are shown as mean \pm SEM. Statistical analysis were conducted for each nanostructured sample with respect to non-structured counterpart and between nanostructured samples (* indicates $p \leq 0.05$, ** indicates $p \leq 0.005$, *** indicates $p \leq 0.0005$).

Several experimental studies have shown that surface topography (both random and ordered) affected mesenchymal stem cell proliferation [43,44]. Therefore, the ability of the Ti surfaces used in this study to promote hASC growth was also investigated. Surprisingly, hASC behavior was not affected by extended contact with the Ti surfaces. Cell proliferation on the Ti supports was similar to the control TCPS, which is considered to be an optimal *in vitro* culture substratum for MSC amplification in low serum medium [56,57] (Fig. 4A). After 96 h of incubation, a decrease in the growth rate and even a plateau was observed for both TCPS and HTE Ti substrata, suggesting that confluence was reached. The final cell yield was 75000-95000 cells per cm² for polished, two-tier and HTE supports, which corresponded to an amplification of approximately 7.5 to 9.5 times of the cell seeding density (Fig. 4B). Finally, an average cell viability of 91, 93 and 94% for polished, two-tier and HTE surfaces was observed, respectively, which indicated that the Ti supports are neither harmful nor stressful for this cell type. Live and dead staining after 96 h of culture (Fig. 4C) confirmed these results.

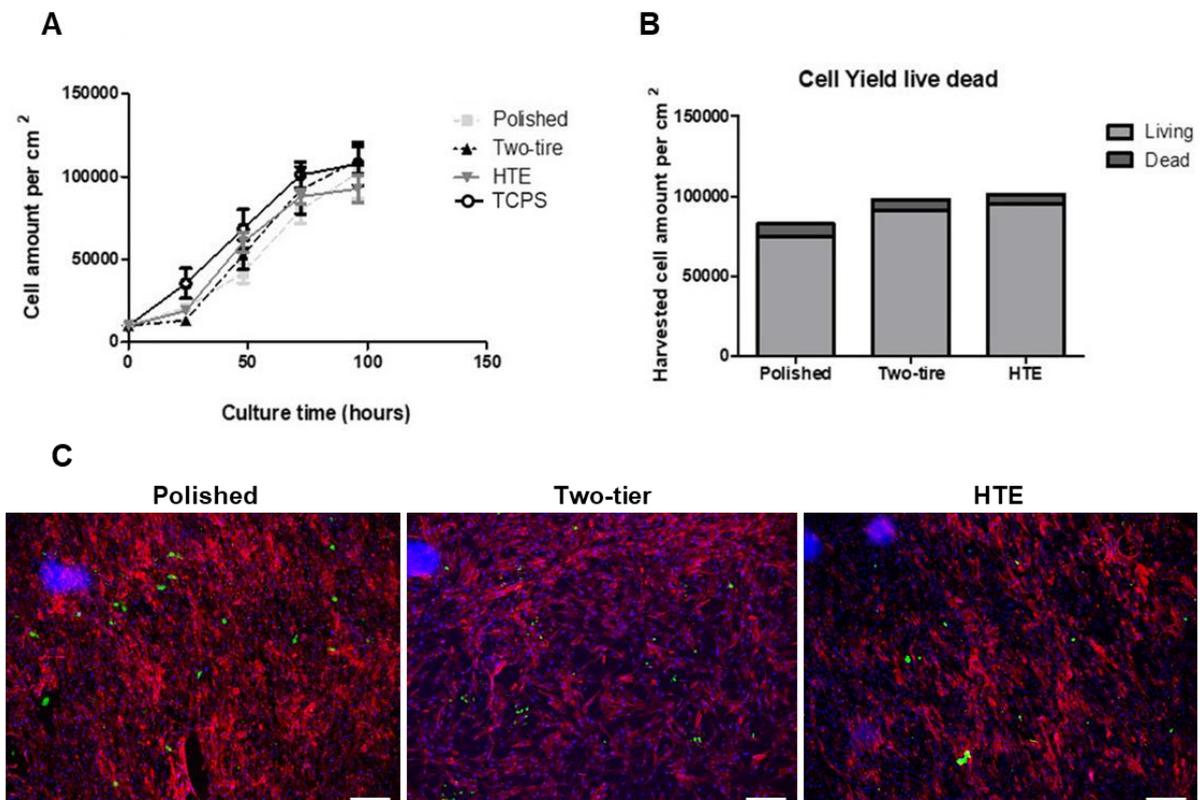


Fig. 4. hASC growth on nanostructured titanium surfaces for 96 h. (A) The proliferation of hASC was not affected by the nanostructurations on the Ti supports. (B) Similar yields and viabilities were

obtained on the different Ti supports after 96 h of growth. Results are expressed as mean \pm SEM. (C) Representative images of live/dead staining of hASC after 96 h on Ti supports (live cells, red; dead cells, green; nuclei, blue). Scale bars = 185 μ m.

hASC grown on Ti supports kept their hallmarks

MSCs have a limited replicative capacity during *in vitro* amplification [58], therefore, it was important to test whether the Ti supports induced their senescence. Senescent cells have an increased lysosomal content that could be detected as high β -galactosidase activity [59]. After 72 h of growth on the different Ti surfaces, we analyzed β -galactosidase activity in hASCs. As shown in Fig. 5A, there was no significant difference in the senescence rate between hASC cells seeded on TCPS (control) and HTE or polished Ti surfaces. However, senescence was significantly increased after culturing on the two-tier Ti surfaces compared to TCPS ($19.5 \pm 2\%$ and $15 \pm 0.97\%$ for two-tier surface and TCPS respectively).

Therefore, it appeared necessary to check whether our Ti supports affected the functionality of hASC cells. MSCs are defined by their ability to differentiate into adipocytes, chondrocytes and osteoblasts in culture [60]. hASC grown on TCPS or Ti supports for 96 h were then incubated with different factors known to induce adipogenesis, chondrogenesis or osteogenesis. Herein, tri-lineage differentiation of hASC cultivated on all the Ti surfaces was preserved (Fig. 5B). Ultimately, hASC differentiation ability was not affected by the increase of senescence on Two-tier Ti surfaces. This is of particular importance for applications of regenerative medicine, where healthy hASCs that are able to proliferate and differentiate are required.

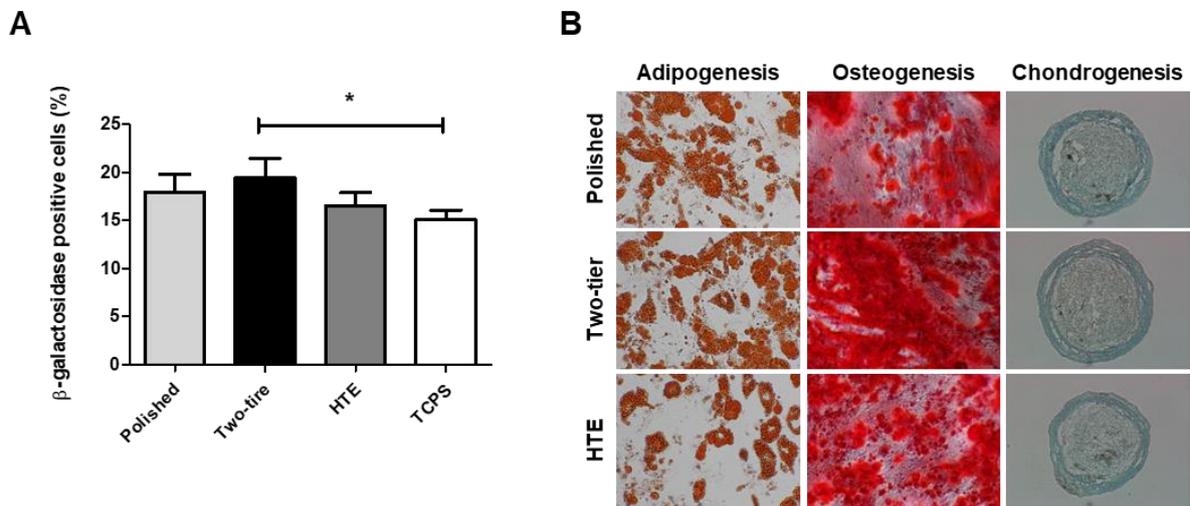


Fig. 5. Maintenance of the functional properties of hASC after amplification on Ti supports. (A) Senescence-associated β -galactosidase staining in hASC seeded onto TCPS or Ti surfaces after 72 h. Results are expressed as mean \pm SEM (* $p = 0.0356$). (B) hASC kept their ability to differentiate into adipocytes (Oil Red O staining, brown), osteoblasts (Alizarin Red staining, red) and chondrocytes (Alcian Blue, blue) after amplification on Ti surfaces.

Mechanobactericidal Ti surfaces induced osteogenic differentiation

The combination of supports with mesenchymal stem cells (MSCs) has become the technology of choice for repairing critical-sized bone defects [61–65]. This implies that the MSCs keep their ability to differentiate and secrete factors that would help tissue repair. This could be obtained by combining supports and MSCs with differentiation factors such as Bone Morphogenetic Proteins (BMPs) [66,67]. However, the amount of BMP should be tightly controlled since supra-physiological amount of BMP is required for successful bone healing, but high doses can result in complications such ectopic bone formation [68–70]. Therefore, it would be better to directly control MSCs fate only by specific characteristics of the biomaterial used for MSCs seeding [71]. Here, we assessed the potential of the different Ti supports to promote hASC osteogenic without the addition of differentiation factors. After 21 days, the osteogenic differentiation was revealed by staining of calcium deposits with Alizarin red (Fig. 6A). Both the nanostructured Ti supports were able to induce osteogenesis differentiation as determined by a significant higher staining intensity compared to cells cultured on the TCPS control and polished Ti. Therefore, our data suggested that, besides the material itself, surface topography had a major impact on cell osteogenic differentiation. These results were confirmed by monitoring Alkaline phosphatase (ALP) activity. For a better comparison between the supports, the results were normalized to the total protein concentration (Fig. 6B). A significantly higher ALP activity was observed for hASCs grown on all the Ti supports compared to cells grown on the TCPS control. It should be noted that for the negative control on TCPS, experiment should be stopped after 10 days, since hASC could not differentiate as they were maintained in normal growth medium and ultimately died. For cells grown on Ti surfaces, we observed that differentiation began after 7 days and then increased in a time-dependent manner. After 14 days of incubation, a significantly higher ALP activity was observed in cells grown on two-tier supports, in comparison to HTE Ti. After 21 days of culture, ALP activity was significantly higher for both two-tier and HTE supports (ALP activity of 0.029 ± 0.0004 and 0.03 ± 0.0008 U/ μ g of protein respectively), compared to the polished Ti (ALP activity of 0.023 ± 0.0010 U/ μ g of protein).

Thus, our results showed that the nanostructured Ti surfaces exhibited osteoinductive abilities that is directly linked to the effects of the surface micro-nanostructures on hASC adhesion. Indeed, it has already been reported that mesenchymal stem cells adhesion properties could be linked to their differentiation ability [72,73].

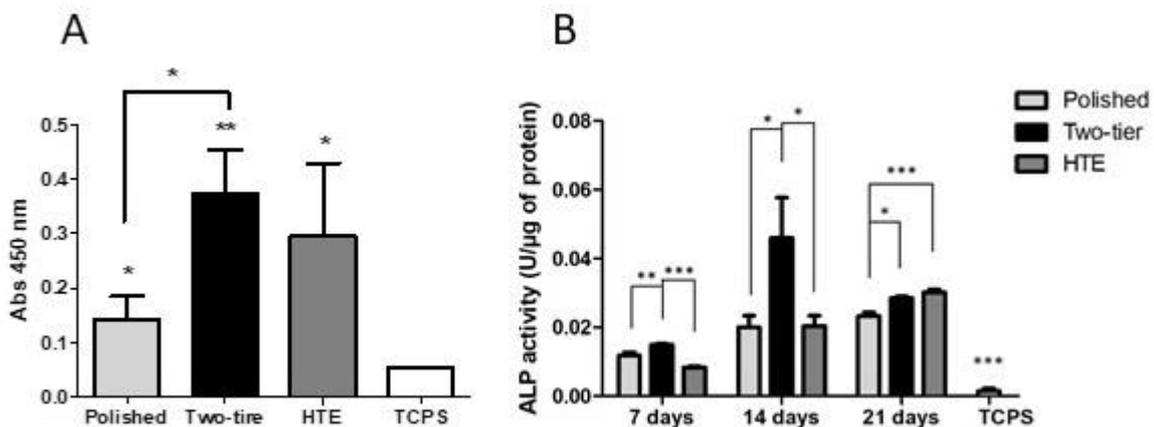


Fig. 6. Ti supports induced osteogenic differentiation of hASC. (A) Cells mineralization associated Alizarin Red absorbance after 21 days of incubation in growth medium. Results are expressed as mean \pm SEM (* $p < 0.05$; ** $p = 0.0016$). (B) Cells ALP activity after 7, 14 and 21 days of incubation in growth medium. Results are expressed as mean \pm SEM (* $p < 0.05$; ** $p = 0.0091$; *** $p < 0.0005$).

Discussion

Bone tissue can heal and regenerate itself; however, for large defects, reconstruction using a synthetic substitute is necessary [74]. The efficiency of bone regeneration for the fixation of fractures and bone defects could be increased by seeding MSCs directly onto the implants through their ability to secrete bioactive molecules such as growth factors or chemokines that stimulate bone growth [75]. Many studies have shown that adhesion, migration and differentiation of stem cells are strongly influenced by the architecture of adhesion surfaces [41,76]. Indeed, modification of the surface to display nanostructures has reportedly induced mechanical stimuli that affect MSC differentiation [77–79]. Therefore, modulating the topography of biomaterials could be a powerful tool to control and guide the behavior of the cells.

In this work, we developed Ti supports, that exhibit two scales of surface structuring by either hydrothermal treatment or plasma etching and display potent mechano-bactericidal properties [23–25,27]. The two mechano-bactericidal Ti topographies mainly differed in the size and shape of their surface structures, while surface chemistry and crystallinity were constant. Indeed, the difference in the surface structures also influence their action of mechano-bactericidal activity. Chlorine reactive ion (plasma) etching of bulk Ti induces the formation of high aspect ratio pillars, similar to black silicon [25]. High aspect ratio structures have been shown to initiate bacterial cell death by excessive stretching of the bacterial cell membrane as it adsorbs to the surface structures, leading to cell rupture [20]. In contrast, hydrothermal treatment of Ti metal induces the formation of nanowires and nanosheets (dependent on etch time and electrolyte concentration). Sharp nano-edges (less than 10 nm) have been reported to induce the formation of pores in the bacterial cell membrane, leading to the leakage of cytoplasmic material and cell death.

To determine whether we can couple a bactericidal surface modification of biomaterials while retaining their ability to support the growth of MSCs, we tested the behavior of hASC on Ti surfaces with different micro-nanostructured topographies. Here, we showed that the Ti supports allowed the adhesion and amplification of hASCs. Cells could adhere to the nanostructured and smooth Ti topographies with similar efficiency as to the TCPS control, while maintaining cell viability and tri-lineage differentiation ability. This was in accordance with our previous studies with osteoblast-like and pheochromocytoma cells [28,29]. However, other works have demonstrated a reduction of the adhesion of MSCs on Ti surfaces obtained by hydrothermal treatment [80]. Analyses of cell morphology on micro-nanostructured and non-structured surfaces highlighted that hASC behave differently in response to adhesion to modified surfaces compared to polished supports. hASCs presented the smallest cell area on polished Ti surface, whilst possessing the greatest number of focal adhesions. Contrastingly, hASCs exhibited greater cell-surface area on HTE and two-tier Ti surfaces while possessing a small number of focal adhesions. This suggested that because of their flexibility, hASCs can follow the topography of nanostructured surfaces such as HTE and two-tier Ti to spread out, but they are less able to form anchoring sites through the formation of focal adhesions. For the cells seeded on the two-tier Ti surfaces, they should spread over the surface nanofeatures and, therefore, they could establish focal adhesions only at the top of these nanopillars. As it is known that cell spreading and focal adhesion organization is correlated to the spacing and

distribution of adhesion ligands, this could explain why the number of focal adhesions was reduced on nanostructured Ti surfaces compared to HTE and polished Ti where the entire body of the cell was in contact with the Ti surface [81,82]. Analysis of SEM micrographs confirmed that hASC could adhere only at the tip of the protrusions. The large spacing (1.7 μm) between the nanofeatures would induce cell stretching and generate an increase in cytoskeleton tension [83]. Similar to polished Ti supports, hASCs grown on HTE Ti displayed a larger cell surface area in contact with the substratum because of the nanoscale feature size. Typical surface roughness values for HTE Ti are more comparable ($\sim 20\times$ increase in roughness) to polished Ti than to Two-tier Ti ($\sim 200\times$ increase in roughness compared to polished Ti) (Fig. S4). Furthermore, our results showed that there was a significant decrease in the number of focal adhesions on two-tier compared to HTE Ti surfaces, that was consistent with the greater distance between nanoprotusions on Two-tier surfaces.

Nevertheless, it should be noted that two-tier Ti surface induced cell senescence, which could reflect stress or damage to the cell. Senescence of hASC could affect their clinical therapeutic potential, by affecting their paracrine effects, immunomodulatory activity or differentiation potential [84]; however, this did not impact on their differentiation potential. HTE Ti surfaces did not increase the number of senescent cells compared to hASC grown on polished Ti and TCPS. Therefore, HTE Ti surfaces could be a viable alternative for the design of new hASC amplification platforms. Indeed, they showed similar performances in terms of cell growth, senescence and tri-lineage differentiation ability to TCPS. Furthermore, the HTE supports have bactericidal properties that would allow safe amplification of hASC without the addition of antibiotics, which is a substantial advantage for cell amplification processes for therapeutic applications.

Finally, we showed that all our Ti surfaces displayed osteoinductive properties without requiring the addition of growth factors, with a higher osteogenesis induction observed for cells grown on micro-nanostructured Ti compared to polished Ti. It has previously been proposed that the nanotopography could directly affect stem cell differentiation [79,85,86]. Indeed, adhesion of cells on substrates stimulate mechano-transductive signals that play a key role in stem cells fate [72,87]. Our results showed that hASC displayed different spreading area and different number of focal adhesions related to the respective size of the surface structuration of the Ti supports. Osteogenesis is reportedly correlated with cell elongation and the formation of large focal adhesions [45,88]. For two-tier Ti, the most osteogenic, there was a drastic decrease in the number of focal adhesions and cell morphology presented with higher aspect ratio compared to cells grown on HTE and polished Ti. Higher aspect ratio is related to an increase in the cytoskeletal tension that leads to higher level of RhoA, ROCK, and myosin light chain phosphorylation that induces an osteogenesis switch [89]. The difference between the Ti supports in their ability to promote osteogenesis may be related to the tensions imposed on the cell by the surface nanostructures during adhesion and cell spreading. Further studies are necessary to examine more precisely the role of the cytoskeleton tension in the differentiation of hASC on Ti nanostructured surfaces. In particular, the role of phosphorylation of myosin II light chain, involved in cell contractility. Indeed, HTE Ti was able to promote osteogenesis of hASCs even if the cells presented an aspect ratio similar to those on polished Ti or TCPS (which did not induce osteogenesis). Although HTE Ti induced osteogenesis with a lower efficiency than the two-tier Ti support, it might be the more promising support as it did not increase cell senescence.

Conclusion

In summary, we developed mechano-bactericidal Ti supports with two different size scales of structured topography. The efficient antibacterial activity of these surfaces has already been highlighted in our previous works. Here, we showed that hASCs could adhere, spread and proliferate on these substrata. Furthermore, hASCs retained their differentiation ability. Significantly, the two separate topographies promoted osteogenesis of ASCs without requiring the addition of growth factor. To our knowledge, this is the first biomaterial presented possessing these two biological functions without the need of adding a supplemental coating or functionalization. The influence of surface architecture on initial cell adhesion and morphology and the correlative impact on osteogenesis of hASCs was systematically studied. The number of focal adhesions formed in response to attachment to the substratum was not found to be especially important in inducing osteogenesis of stem cells, as previously reported.

The two-tier and HTE Ti surface presented in this study appear as innovative supports that would allow the development of improved implant for bone regenerative medicine. Overall, mechano-bactericidal Ti supports are promising as a new alternative to develop bone implant that may itself be biocompatible, bactericidal and osteoinductive.

Acknowledgments

We are grateful to A. Moisan (Cell Therapy and Engineering Unit, EFS Auvergne-Rhône-Alpes, Saint Ismier, France.) for providing us with hASC. D.L acknowledges the support of SAAFE Research Internship Program, scholarship awarded by AINSE ANSTO and the French Embassy. E.P.I gratefully acknowledges funding from the Australian Research Council (ARC) Industrial Transformation Research Hubs Scheme (Project Number IH130100017) and ARC Industrial Transformation Training Centre (ITTC) scheme (Project number IC180100005).

Declaration of competing interest

There are no conflicts to declare.

References

- [1] C.T. Johnson, A.J. García, Scaffold-based anti-infection strategies in bone repair, *Ann. Biomed. Eng.* 43 (2015) 515–528. <https://doi.org/10.1007/s10439-014-1205-3>.
- [2] F.-H. Lee, P.-C. Shen, I.-M. Jou, C.-Y. Li, J.-L. Hsieh, A Population-Based 16-Year Study on the Risk Factors of Surgical Site Infection in Patients after Bone Grafting, *Medicine (Baltimore)*. 94 (2015). <https://doi.org/10.1097/MD.0000000000002034>.
- [3] L. Hall-Stoodley, J.W. Costerton, P. Stoodley, Bacterial biofilms: from the natural environment to infectious diseases, *Nat. Rev. Microbiol.* 2 (2004) 95–108. <https://doi.org/10.1038/nrmicro821>.
- [4] R.M. Donlan, J.W. Costerton, Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms, *Clin. Microbiol. Rev.* 15 (2002) 167–193.
- [5] M.E. Olson, H. Ceri, D.W. Morck, A.G. Buret, R.R. Read, Biofilm bacteria: formation and comparative susceptibility to antibiotics, *Can. J. Vet. Res. Rev. Can. Rech. Veterinaire*. 66 (2002) 86–92.
- [6] A.T. Sidambe, Biocompatibility of Advanced Manufactured Titanium Implants—A Review, *Materials*. 7 (2014) 8168–8188. <https://doi.org/10.3390/ma7128168>.
- [7] M. Kaur, K. Singh, Review on titanium and titanium based alloys as biomaterials for orthopaedic applications, *Mater. Sci. Eng. C*. 102 (2019) 844–862. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2019.04.064>.
- [8] K.C. Popat, M. Eltgroth, T.J. Latempa, C.A. Grimes, T.A. Desai, Decreased Staphylococcus epidermidis adhesion and increased osteoblast functionality on antibiotic-loaded titania nanotubes, *Biomaterials*. 28 (2007) 4880–4888. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2007.07.037>.
- [9] M. Stigter, J. Bezemer, K. de Groot, P. Layrolle, Incorporation of different antibiotics into carbonated hydroxyapatite coatings on titanium implants, release and antibiotic efficacy, *J. Control. Release Off. J. Control. Release Soc.* 99 (2004) 127–137. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2004.06.011>.
- [10] W. Ahmed, Z. Zhai, C. Gao, Adaptive antibacterial biomaterial surfaces and their applications, *Mater. Today Bio*. 2 (2019) 100017. <https://doi.org/10.1016/j.mtbio.2019.100017>.
- [11] V.V. Komnatnyy, W.-C. Chiang, T. Tolker-Nielsen, M. Givskov, T.E. Nielsen, Bacteria-Triggered Release of Antimicrobial Agents, *Angew. Chem. Int. Ed.* 53 (2014) 439–441. <https://doi.org/10.1002/anie.201307975>.
- [12] D. Campoccia, L. Montanaro, P. Speziale, C.R. Arciola, Antibiotic-loaded biomaterials and the risks for the spread of antibiotic resistance following their prophylactic and therapeutic clinical use, *Biomaterials*. 31 (2010) 6363–6377. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2010.05.005>.
- [13] C. Prinz, M. Elhensheri, J. Rychly, H.-G. Neumann, Antimicrobial and bone-forming activity of a copper coated implant in a rabbit model, *J. Biomater. Appl.* 32 (2017) 139–149. <https://doi.org/10.1177/0885328217713356>.
- [14] A. Gao, R. Hang, X. Huang, L. Zhao, X. Zhang, L. Wang, B. Tang, S. Ma, P.K. Chu, The effects of titania nanotubes with embedded silver oxide nanoparticles on bacteria

- and osteoblasts, *Biomaterials*. 35 (2014) 4223–4235. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2014.01.058>.
- [15] X. Shen, Y. Zhang, P. Ma, L. Sutrisno, Z. Luo, Y. Hu, Y. Yu, B. Tao, C. Li, K. Cai, Fabrication of magnesium/zinc-metal organic framework on titanium implants to inhibit bacterial infection and promote bone regeneration, *Biomaterials*. 212 (2019) 1–16. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2019.05.008>.
- [16] A.N. Besold, E.M. Culbertson, V.C. Culotta, The Yin and Yang of copper during infection, *J. Biol. Inorg. Chem. JBIC Publ. Soc. Biol. Inorg. Chem.* 21 (2016) 137–144. <https://doi.org/10.1007/s00775-016-1335-1>.
- [17] M. Bost, S. Houdart, M. Oberli, E. Kalonji, J.-F. Huneau, I. Margaritis, Dietary copper and human health: Current evidence and unresolved issues, *J. Trace Elem. Med. Biol. Organ Soc. Miner. Trace Elem. GMS.* 35 (2016) 107–115. <https://doi.org/10.1016/j.jtemb.2016.02.006>.
- [18] A.B.G. Lansdown, A Pharmacological and Toxicological Profile of Silver as an Antimicrobial Agent in Medical Devices, *Adv. Pharmacol. Sci.* 2010 (2010). <https://doi.org/10.1155/2010/910686>.
- [19] M. Ribeiro, F.J. Monteiro, M.P. Ferraz, Infection of orthopedic implants with emphasis on bacterial adhesion process and techniques used in studying bacterial-material interactions, *Biomater.* 2 (2012) 176–194. <https://doi.org/10.4161/biom.22905>.
- [20] S. Pogodin, J. Hasan, V.A. Baulin, H.K. Webb, V.K. Truong, T.H. Phong Nguyen, V. Boshkovikj, C.J. Fluke, G.S. Watson, J.A. Watson, R.J. Crawford, E.P. Ivanova, Biophysical model of bacterial cell interactions with nanopatterned cicada wing surfaces, *Biophys. J.* 104 (2013) 835–840. <https://doi.org/10.1016/j.bpj.2012.12.046>.
- [21] E.P. Ivanova, J. Hasan, H.K. Webb, V.K. Truong, G.S. Watson, J.A. Watson, V.A. Baulin, S. Pogodin, J.Y. Wang, M.J. Tobin, C. Løbbe, R.J. Crawford, Natural Bactericidal Surfaces: Mechanical Rupture of *Pseudomonas aeruginosa* Cells by Cicada Wings, *Small*. 8 (2012) 2489–2494. <https://doi.org/10.1002/smll.201200528>.
- [22] R.J. Crawford, H.K. Webb, V.K. Truong, J. Hasan, E.P. Ivanova, Surface topographical factors influencing bacterial attachment, *Adv. Colloid Interface Sci.* 179–182 (2012) 142–149. <https://doi.org/10.1016/j.cis.2012.06.015>.
- [23] V.T.H. Pham, V.K. Truong, A. Orlowska, S. Ghanaati, M. Barbeck, P. Booms, A.J. Fulcher, C.M. Bhadra, R. Buividas, V. Baulin, C.J. Kirkpatrick, P. Doran, D.E. Mainwaring, S. Juodkazis, R.J. Crawford, E.P. Ivanova, “Race for the Surface”: Eukaryotic Cells Can Win, *ACS Appl. Mater. Interfaces*. 8 (2016) 22025–22031. <https://doi.org/10.1021/acsami.6b06415>.
- [24] A. Elbourne, R.J. Crawford, E.P. Ivanova, Nano-structured antimicrobial surfaces: From nature to synthetic analogues, *J. Colloid Interface Sci.* 508 (2017) 603–616. <https://doi.org/10.1016/j.jcis.2017.07.021>.
- [25] D.P. Linklater, S. Juodkazis, E.P. Ivanova, Nanofabrication of mechano-bactericidal surfaces, *Nanoscale*. 9 (2017) 16564–16585. <https://doi.org/10.1039/c7nr05881k>.
- [26] C.M. Bhadra, M. Werner, V.A. Baulin, V.K. Truong, M.A. Kobaisi, S.H. Nguyen, A. Balcytis, S. Juodkazis, J.Y. Wang, D.E. Mainwaring, R.J. Crawford, E.P. Ivanova, Subtle Variations in Surface Properties of Black Silicon Surfaces Influence the Degree

- of Bactericidal Efficiency, *Nano-Micro Lett.* 10 (2018). <https://doi.org/10.1007/s40820-017-0186-9>.
- [27] C.M. Bhadra, V.K. Truong, V.T.H. Pham, M. Al Kobaisi, G. Seniutinas, J.Y. Wang, S. Juodkazis, R.J. Crawford, E.P. Ivanova, Antibacterial titanium nano-patterned arrays inspired by dragonfly wings, *Sci. Rep.* 5 (2015) 16817. <https://doi.org/10.1038/srep16817>.
- [28] J.V. Wandiyanto, V.K. Truong, M. Al Kobaisi, S. Juodkazis, H. Thissen, O. Bazaka, K. Bazaka, R.J. Crawford, E.P. Ivanova, The Fate of Osteoblast-Like MG-63 Cells on Pre-Infected Bactericidal Nanostructured Titanium Surfaces, *Mater. Basel Switz.* 12 (2019). <https://doi.org/10.3390/ma12101575>.
- [29] J.V. Wandiyanto, D. Linklater, P.G. Tharushi Perera, A. Orlowska, V.K. Truong, H. Thissen, S. Ghanaati, V. Baulin, R.J. Crawford, S. Juodkazis, E.P. Ivanova, Pheochromocytoma (PC12) Cell Response on Mechanobactericidal Titanium Surfaces, *Mater. Basel Switz.* 11 (2018). <https://doi.org/10.3390/ma11040605>.
- [30] D.P. Linklater, S. Juodkazis, R.J. Crawford, E.P. Ivanova, Mechanical inactivation of *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa* by titanium substrata with hierarchical surface structures, *Materialia.* 5 (2019) 100197. <https://doi.org/10.1016/j.mtla.2018.100197>.
- [31] L. Das Ghosh, J. Hasan, A. Jain, N.R. Sundaresan, K. Chatterjee, A nanopillar array on black titanium prepared by reactive ion etching augments cardiomyogenic commitment of stem cells, *Nanoscale.* 11 (2019) 20766–20776. <https://doi.org/10.1039/c9nr03424b>.
- [32] J. Hasan, S. Jain, K. Chatterjee, Nanoscale Topography on Black Titanium Imparts Multi-biofunctional Properties for Orthopedic Applications, *Sci. Rep.* 7 (2017) 41118. <https://doi.org/10.1038/srep41118>.
- [33] M.E. Berginski, S.M. Gomez, The Focal Adhesion Analysis Server: a web tool for analyzing focal adhesion dynamics, *F1000Research.* 2 (2013) 68. <https://doi.org/10.12688/f1000research.2-68.v1>.
- [34] J.V. Wandiyanto, T. Tamanna, D.P. Linklater, V.K. Truong, M. Al Kobaisi, V.A. Baulin, S. Joudkazis, H. Thissen, R.J. Crawford, E.P. Ivanova, Tunable morphological changes of asymmetric titanium nanosheets with bactericidal properties, *J. Colloid Interface Sci.* 560 (2020) 572–580. <https://doi.org/10.1016/j.jcis.2019.10.067>.
- [35] E.R. Parker, B.J. Thibeault, M.F. Aimi, M.P. Rao, N.C. MacDonald, Inductively coupled plasma etching of bulk titanium for MEMS applications, *J. Electrochem. Soc.* 152 (2005) 675–683.
- [36] J. Huang, Y. Cao, Z. Deng, H. Tong, Formation of titanate nanostructures under different NaOH concentration and their application in wastewater treatment, *J. Solid State Chem.* 184 (2011) 712–719. <https://doi.org/10.1016/j.jssc.2011.01.023>.
- [37] J.V. Wandiyanto, S. Cheeseman, V.K. Truong, M.A. Kobaisi, C. Bizet, S. Juodkazis, H. Thissen, R.J. Crawford, E.P. Ivanova, Outsmarting superbugs: bactericidal activity of nanostructured titanium surfaces against methicillin- and gentamicin-resistant *Staphylococcus aureus* ATCC 33592, *J. Mater. Chem. B.* 7 (2019) 4424–4431. <https://doi.org/10.1039/C9TB00102F>.

- [38] V.T.H. Pham, V.K. Truong, M.D.J. Quinn, S.M. Notley, Y. Guo, V.A. Baulin, M. Al Kobaisi, R.J. Crawford, E.P. Ivanova, Graphene Induces Formation of Pores That Kill Spherical and Rod-Shaped Bacteria, *ACS Nano*. 9 (2015) 8458–8467.
- [39] S. Kern, H. Eichler, J. Stoeve, H. Klüter, K. Bieback, Comparative analysis of mesenchymal stem cells from bone marrow, umbilical cord blood, or adipose tissue, *Stem Cells Dayt. Ohio*. 24 (2006) 1294–1301. <https://doi.org/10.1634/stemcells.2005-0342>.
- [40] A. Simona, A.B. Bo, A.-M. Constantin, E. Dronca, A. Ilea, State of the art in human adipose stem cells and their role in therapy, (n.d.) 25.
- [41] S.A. Skoog, G. Kumar, R.J. Narayan, P.L. Goering, Biological responses to immobilized microscale and nanoscale surface topographies, *Pharmacol. Ther.* 182 (2018) 33–55. <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2017.07.009>.
- [42] Z. Pan, C. Yan, R. Peng, Y. Zhao, Y. He, J. Ding, Control of cell nucleus shapes via micropillar patterns, *Biomaterials*. 33 (2012) 1730,.
- [43] K. Kulangara, J. Yang, M. Chellappan, Y. Yang, K.W. Leong, Nanotopography Alters Nuclear Protein Expression, Proliferation and Differentiation of Human Mesenchymal Stem/Stromal Cells, *PLOS ONE*. 9 (2014) e114698. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0114698>.
- [44] J.Z. Gasiorowski, C.J. Murphy, P.F. Nealey, Biophysical Cues and Cell Behavior: The Big Impact of Little Things, *Annu. Rev. Biomed. Eng.* 15 (2013) 155–176. <https://doi.org/10.1146/annurev-bioeng-071811-150021>.
- [45] K.A. Kilian, B. Bugarija, B.T. Lahn, M. Mrksich, Geometric cues for directing the differentiation of mesenchymal stem cells, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 107 (2010) 4872–4877. <https://doi.org/10.1073/pnas.0903269107>.
- [46] S. Dobbenga, L.E. Fratila-Apachitei, A.A. Zadpoor, Nanopattern-induced osteogenic differentiation of stem cells – A systematic review, *Acta Biomater.* 46 (2016) 3–14. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2016.09.031>.
- [47] B.D. Gomperts, Ij.M. Kramer, P.E.R. Tatham, Chapter 13 - Signal Transduction to and from Adhesion Molecules, in: B.D. Gomperts, Ij.M. Kramer, P.E.R. Tatham (Eds.), *Signal Transduct. Second Ed.*, Academic Press, San Diego, 2009: pp. 375–416. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-369441-6.00013-1>.
- [48] B. Wehrle-Haller, Structure and function of focal adhesions, *Curr Opin Cell Biol.* 24 (2012) 116–124. <https://doi.org/10.1016/j.ceb.2011.11.001>.
- [49] R.O. Hynes, Integrins: bidirectional, allosteric signaling machines, *Cell*. 110 (2002) 673–687. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(02\)00971-6](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(02)00971-6).
- [50] K. Burridge, C. Guillyuy, Focal adhesions, stress fibers and mechanical tension, *Exp. Cell Res.* 343 (2016) 14–20. <https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2015.10.029>.
- [51] P. Ringer, G. Colo, R. Fässler, C. Grashoff, Sensing the mechano-chemical properties of the extracellular matrix, *Matrix Biol.* 64 (2017) 6–16. <https://doi.org/10.1016/j.matbio.2017.03.004>.

- [52] X. Cao, E. Ban, B.M. Baker, Y. Lin, J.A. Burdick, C.S. Chen, V.B. Shenoy, Multiscale model predicts increasing focal adhesion size with decreasing stiffness in fibrous matrices, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 114 (2017) E4549–E4555. <https://doi.org/10.1073/pnas.1620486114>.
- [53] C. Yang, M.W. Tibbitt, L. Basta, K.S. Anseth, Mechanical memory and dosing influence stem cell fate, *Nat. Mater.* 13 (2014) 645–652. <https://doi.org/10.1038/nmat3889>.
- [54] M. Niinomi, Recent research and development in titanium alloys for biomedical applications and healthcare goods, *Sci. Technol. Adv. Mater.* 4 (2003) 445–454.
- [55] R.G. Wells, The role of matrix stiffness in regulating cell behavior, *Hepatology.* 47 (2008) 1394–1400. <https://doi.org/10.1002/hep.22193>.
- [56] S. Jung, A. Sen, L. Rosenberg, L.A. Behie, Identification of growth and attachment factors for the serum-free isolation and expansion of human mesenchymal stromal cells, *Cytotherapy.* 12 (2010) 637–657. <https://doi.org/10.3109/14653249.2010.495113>.
- [57] M. Cimino, P. Parreira, S.J. Bidarra, R.M. Gonçalves, C.C. Barrias, M.C.L. Martins, Effect of surface chemistry on hMSC growth under xeno-free conditions, *Colloids Surf. B Biointerfaces.* 189 (2020) 110836. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2020.110836>.
- [58] W. Wagner, P. Horn, M. Castoldi, A. Diehlmann, S. Bork, R. Saffrich, V. Benes, J. Blake, S. Pfister, V. Eckstein, A.D. Ho, Replicative Senescence of Mesenchymal Stem Cells: A Continuous and Organized Process, *PLOS ONE.* 3 (2008) e2213. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0002213>.
- [59] B.Y. Lee, J.A. Han, J.S. Im, A. Morrone, K. Johung, E.C. Goodwin, W.J. Kleijer, D. DiMaio, E.S. Hwang, Senescence-associated β -galactosidase is lysosomal β -galactosidase, *Aging Cell.* 5 (2006) 187–195. <https://doi.org/10.1111/j.1474-9726.2006.00199.x>.
- [60] R.M. Samsonraj, M. Raghunath, V. Nurcombe, J.H. Hui, A.J. van Wijnen, S.M. Cool, Concise Review: Multifaceted Characterization of Human Mesenchymal Stem Cells for Use in Regenerative Medicine: Characterization of Human Mesenchymal Stem Cells, *STEM CELLS Transl. Med.* 6 (2017) 2173–2185. <https://doi.org/10.1002/sctm.17-0129>.
- [61] R. Shi, Y. Huang, C. Ma, C. Wu, W. Tian, Current advances for bone regeneration based on tissue engineering strategies, *Front. Med.* 13 (2019) 160–188. <https://doi.org/10.1007/s11684-018-0629-9>.
- [62] E. Gómez-Barrena, P. Rosset, F. Gebhard, P. Hernigou, N. Baldini, H. Rouard, L. Sensebé, R.M. Gonzalo-Daganzo, R. Giordano, N. Padilla-Eguiluz, E. García-Rey, J. Cordero-Ampuero, J.C. Rubio-Suárez, J. Stanovici, C. Ehrnthaller, M. Huber-Lang, C.H. Flouzat-Lachaniette, N. Chevallier, D.M. Donati, G. Ciapetti, S. Fleury, M.-N. Fernandez, J.-R. Cabrera, C. Avendaño-Solá, T. Montemurro, C. Panaitescu, E. Veronesi, M.T. Rojewski, R. Lotfi, M. Dominici, H. Schrezenmeier, P. Layrolle, Feasibility and safety of treating non-unions in tibia, femur and humerus with autologous, expanded, bone marrow-derived mesenchymal stromal cells associated with biphasic calcium phosphate biomaterials in a multicentric, non-comparative trial, *Biomaterials.* 196 (2019) 100–108. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2018.03.033>.
- [63] M. Marcacci, E. Kon, V. Moukhachev, A. Lavroukov, S. Kutepov, R. Quarto, M. Mastrogiacomo, R. Cancedda, Stem cells associated with macroporous bioceramics for

- long bone repair: 6- to 7-year outcome of a pilot clinical study, *Tissue Eng.* 13 (2007) 947–955. <https://doi.org/10.1089/ten.2006.0271>.
- [64] R. Quarto, M. Mastrogiacomo, R. Cancedda, S.M. Kutepov, V. Mukhachev, A. Lavroukov, E. Kon, M. Marcacci, Repair of Large Bone Defects with the Use of Autologous Bone Marrow Stromal Cells, *N. Engl. J. Med.* 344 (2001) 385–386. <https://doi.org/10.1056/NEJM200102013440516>.
- [65] G.K. Sándor, J. Numminen, J. Wolff, T. Thesleff, A. Miettinen, V.J. Tuovinen, B. Mannerström, M. Patrikoski, R. Seppänen, S. Miettinen, M. Rautiainen, J. Öhman, Adipose stem cells used to reconstruct 13 cases with cranio-maxillofacial hard-tissue defects, *Stem Cells Transl. Med.* 3 (2014) 530–540. <https://doi.org/10.5966/sctm.2013-0173>.
- [66] H. Sun, H.-L. Yang, Calcium Phosphate Scaffolds Combined with Bone Morphogenetic Proteins or Mesenchymal Stem Cells in Bone Tissue Engineering, *Chin. Med. J. (Engl.)*. 128 (2015) 1121–1127. <https://doi.org/10.4103/0366-6999.155121>.
- [67] A. Decambron, A. Fournet, M. Bensidhoum, M. Manassero, F. Sailhan, H. Petite, D. Logeart-Avramoglou, V. Viateau, Low-dose BMP-2 and MSC dual delivery onto coral scaffold for critical-size bone defect regeneration in sheep, *J. Orthop. Res.* 35 (2017) 2637–2645. <https://doi.org/10.1002/jor.23577>.
- [68] H. Haimov, N. Yosupov, G. Pinchasov, G. Juodzbaly, Bone Morphogenetic Protein Coating on Titanium Implant Surface: a Systematic Review, *J. Oral Maxillofac. Res.* 8 (2017) e1. <https://doi.org/10.5037/jomr.2017.8201>.
- [69] M. Bouyer, R. Guillot, J. Lavaud, C. Plettinx, C. Olivier, V. Curry, J. Boutonnat, J.-L. Coll, F. Peyrin, V. Josserand, G. Bettega, C. Picart, Surface delivery of tunable doses of BMP-2 from an adaptable polymeric scaffold induces volumetric bone regeneration, *Biomaterials.* 104 (2016) 168–181. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2016.06.001>.
- [70] R. Guillot, I. Pignot-Paintrand, J. Lavaud, A. Decambron, E. Bourgeois, V. Josserand, D. Logeart-Avramoglou, E. Viguier, C. Picart, Assessment of a polyelectrolyte multilayer film coating loaded with BMP-2 on titanium and PEEK implants in the rabbit femoral condyle, *Acta Biomater.* 36 (2016) 310–22.
- [71] J.-K. Yoon, M.-L. Kang, J.H. Park, K.-M. Lee, Y.M. Shin, J.W. Lee, H.O. Kim, H.-J. Sung, Direct Control of Stem Cell Behavior Using Biomaterials and Genetic Factors, *Stem Cells Int.* (2018). <https://doi.org/10.1155/2018/8642989>.
- [72] I. Han, B.-S. Kwon, H.-K. Park, K.S. Kim, Differentiation Potential of Mesenchymal Stem Cells Is Related to Their Intrinsic Mechanical Properties, *Int. Neurorol. J.* 21 (2017) S24-31. <https://doi.org/10.5213/inj.1734856.428>.
- [73] L.A. Hidalgo-Bastida, S.H. Cartmell, Mesenchymal Stem Cells, Osteoblasts and Extracellular Matrix Proteins: Enhancing Cell Adhesion and Differentiation for Bone Tissue Engineering, *Tissue Eng. Part B Rev.* 16 (2010) 405–412. <https://doi.org/10.1089/ten.teb.2009.0714>.
- [74] J.C. Reichert, S. Saifzadeh, M.E. Wullschleger, D.R. Epari, M.A. Schütz, G.N. Duda, H. Schell, M. van Griensven, H. Redl, D.W. Hutmacher, The challenge of establishing preclinical models for segmental bone defect research, *Biomaterials.* 30 (2009) 2149–2163. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2008.12.050>.

- [75] V. Bunpetch, Z.-Y. Zhang, X. Zhang, S. Han, P. Zongyou, H. Wu, O. Hongwei, Strategies for MSC expansion and MSC-based microtissue for bone regeneration, *Biomaterials*. (2017). <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2017.11.023>.
- [76] B. Zhang, N. Kasoju, Q. Li, J. Ma, A. Yang, Z. Cui, H. Wang, H. Ye, Effect of Substrate Topography and Chemistry on Human Mesenchymal Stem Cell Markers: A Transcriptome Study, *Int. J. Stem Cells*. 12 (2019) 84–94. <https://doi.org/10.15283/ijsc18102>.
- [77] L.E. McNamara, R.J. McMurray, M.J.P. Biggs, F. Kantawong, R.O.C. Oreffo, M.J. Dalby, Nanotopographical Control of Stem Cell Differentiation:, *J. Tissue Eng.* (2010). https://doi.org/10.4061_2010/120623.
- [78] P. Tsimbouri, N. Gadegaard, K. Burgess, K. White, P. Reynolds, P. Herzyk, R. Oreffo, M.J. Dalby, Nanotopographical effects on mesenchymal stem cell morphology and phenotype, *J. Cell. Biochem.* 115 (2014) 380–390. <https://doi.org/10.1002/jcb.24673>.
- [79] M.J. Dalby, N. Gadegaard, R. Tare, A. Andar, M.O. Riehle, P. Herzyk, C.D.W. Wilkinson, R.O.C. Oreffo, The control of human mesenchymal cell differentiation using nanoscale symmetry and disorder, *Nat. Mater.* 6 (2007) 997–1003. <https://doi.org/10.1038/nmat2013>.
- [80] R. Fraioli, P.M. Tsimbouri, L.E. Fisher, A.H. Nobbs, B. Su, S. Neubauer, F. Rechenmacher, H. Kessler, M.-P. Ginebra, M.J. Dalby, J.M. Manero, C. Mas-Moruno, Towards the cell-instructive bactericidal substrate: exploring the combination of nanotopographical features and integrin selective synthetic ligands, *Sci. Rep.* 7 (2017) 16363. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-16385-3>.
- [81] E.A. Cavalcanti-Adam, A. Micoulet, J. Blümmel, J. Auernheimer, H. Kessler, J.P. Spatz, Lateral spacing of integrin ligands influences cell spreading and focal adhesion assembly, *Eur. J. Cell Biol.* 85 (2006) 219–224. <https://doi.org/10.1016/j.ejcb.2005.09.011>.
- [82] L. Bacakova, E. Filova, M. Parizek, T. Ruml, V. Svorcik, Modulation of cell adhesion, proliferation and differentiation on materials designed for body implants, *Biotechnol. Adv.* 29 (2011) 739–767. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2011.06.004>.
- [83] F. Wang, C. Li, S. Zhang, H. Liu, Tantalum Coated on Titanium Dioxide Nanotubes by Plasma Spraying Enhances Cytocompatibility for Dental Implants, *Surf. Coat. Technol.* 382 (2020) 125161.
- [84] V. Turinetto, E. Vitale, C. Giachino, Senescence in Human Mesenchymal Stem Cells: Functional Changes and Implications in Stem Cell-Based Therapy, *Int. J. Mol. Sci.* 17 (2016) 1164. <https://doi.org/10.3390/ijms17071164>.
- [85] M.J. Dalby, N. Gadegaard, R.O.C. Oreffo, Harnessing nanotopography and integrin–matrix interactions to influence stem cell fate, *Nat. Mater.* 13 (2014) 558–569. <https://doi.org/10.1038/nmat3980>.
- [86] E.K.F. Yim, S.W. Pang, K.W. Leong, Synthetic nanostructures inducing differentiation of human mesenchymal stem cells into neuronal lineage, *Exp. Cell Res.* 313 (2007) 1820–1829. <https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2007.02.031>.
- [87] A.J. Steward, D.J. Kelly, Mechanical regulation of mesenchymal stem cell differentiation, *J. Anat.* 227 (2015) 717–731. <https://doi.org/10.1111/joa.12243>.

- [88] M.J.P. Biggs, R.G. Richards, N. Gadegaard, C.D.W. Wilkinson, M.J. Dalby, Regulation of implant surface cell adhesion: characterization and quantification of S-phase primary osteoblast adhesions on biomimetic nanoscale substrates, *J. Orthop. Res. Off. Publ. Orthop. Res. Soc.* 25 (2007) 273–282. <https://doi.org/10.1002/jor.20319>.
- [89] R. McBeath, D.M. Pirone, C.M. Nelson, K. Bhadriraju, C.S. Chen, Cell shape, cytoskeletal tension, and RhoA regulate stem cell lineage commitment, *Dev. Cell.* 6 (2004) 483–495. [https://doi.org/10.1016/s1534-5807\(04\)00075-9](https://doi.org/10.1016/s1534-5807(04)00075-9).

Supplementary Material

1. Supplemental Figures

Supplemental Figure S1

Supplemental Table S1

Supplemental Figure S2

Supplemental Figure S3

Supplemental Table S2

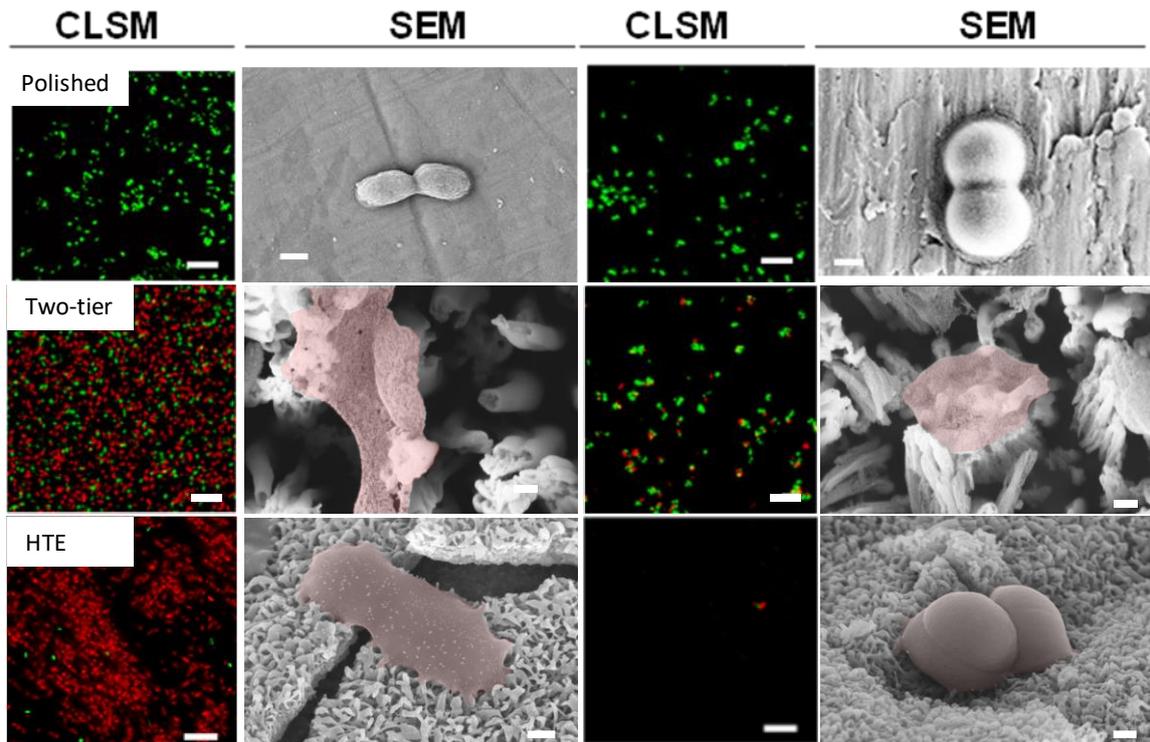
Supplemental Figure S4

2. Supplemental Results

Surface Chemical Characterization

Nanoindentation

Figure S1. Antibacterial activity of Polished, Two-tier and HTE Ti surfaces towards



Pseudomonas aeruginosa and *Staphylococcus aureus*, represented by CLSM and SEM images, respectively. CLSM scale bars are 10 μ m, SEM scale bars are 200 nm.

Table S1. Assessment of bactericidal properties of nanostructured Ti surfaces

Sample name	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>		<i>Staphylococcus aureus</i>	
	Antibacterial activity (% non-viable cells)	Cell Attachment ($\times 10^3$) cells/mm ²	Antibacterial activity (% non-viable cells)	Cell Attachment ($\times 10^3$) cells/mm ²
Polished	4.7 \pm 3.9	63.4 \pm 21.4	8.8 \pm 6.5	19.8 \pm 7.0
Two-tier	87 \pm 2	270.3 \pm 20	72.5 \pm 13	2.1 \pm 0.5
HTE	98.8 \pm 0.7	230.8 \pm 38.3	87.4 \pm 10.2	2.2 \pm 0.8

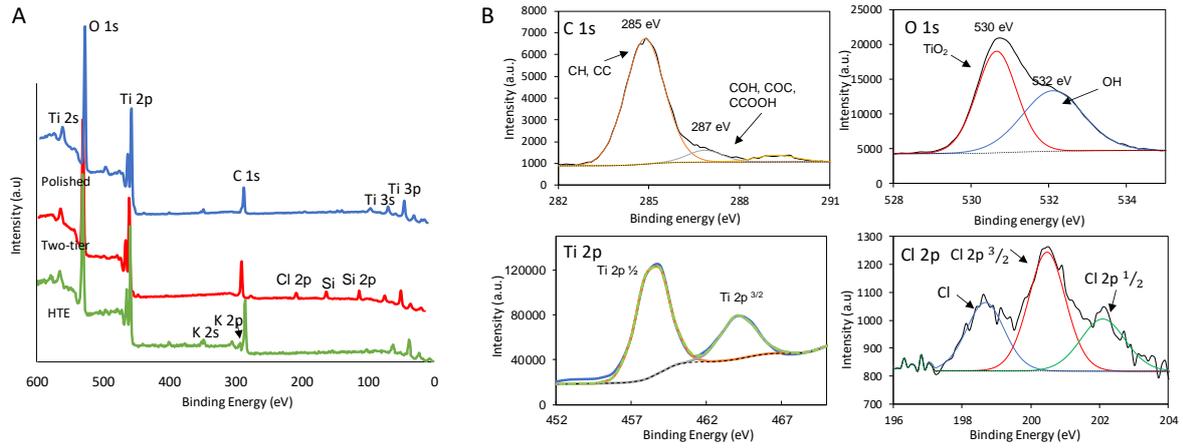


Figure S2. Surface Chemical Characterisation of modified and polished Ti surfaces. (A) Wide survey spectra of polished, Two-tier and HTE Ti. (B) Narrow spectral window scans of C 1s, O 1s, Ti 2p and Cl 2p bands.

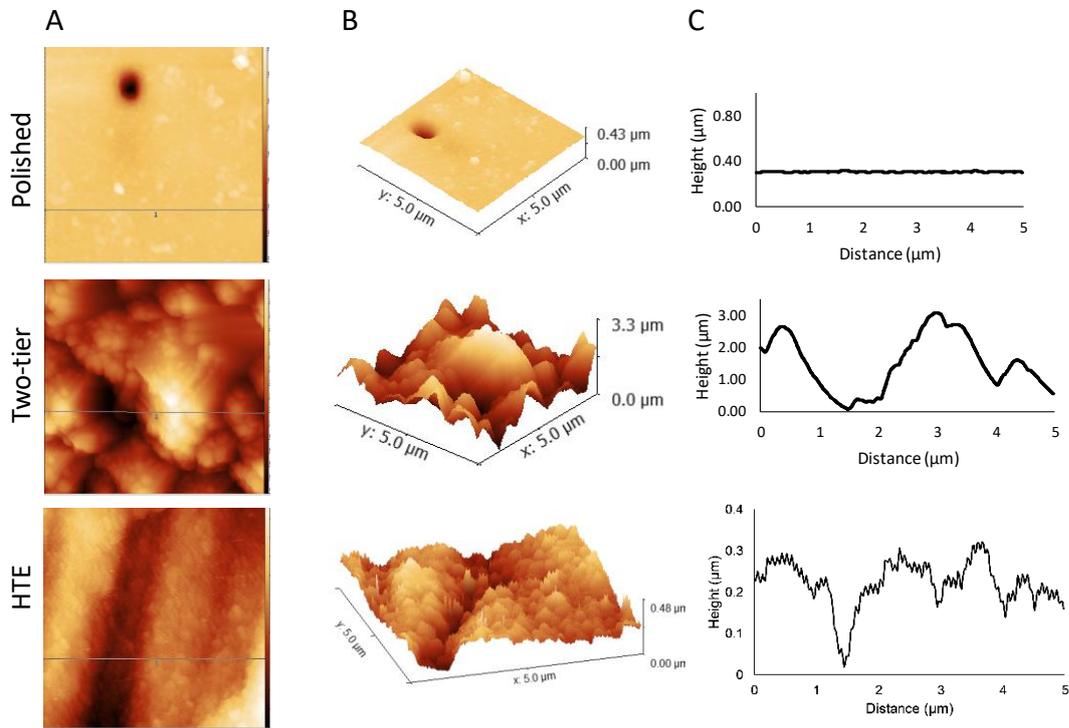


Figure S3. Surface roughness analysis of polished, Two-tier and HTE surfaces. Representative height scans (A) 3D reconstructions of height scans (B) and line scans (C) of respective Ti surfaces over a 5 \times 5 μm scan area.

Table S2. AFM surface roughness analysis of polished, Two-tier and HTE Ti surfaces

Sample name	Surface Roughness		
	Polished	Two-tier	HTE
S_{\max} (nm)	19 ± 3	3956 ± 864	581.3 ± 142.1
Median Height (nm)	17 ± 2	1511 ± 317	385.1 ± 110.9
Mean roughness R_a (S_a)	2.5 ± 0.3	446.3 ± 12	92.1 ± 36.5
Root mean square height R_{ms} (S_q)	3 ± 0.3	567 ± 11	109.9 ± 44.8
Skewness	-0.05 ± 0.1	0.42 ± 0.1	-0.4 ± 0.2
Kurtosis	3.41 ± 0.7	0.305 ± 0.02	-0.5 ± 0.3

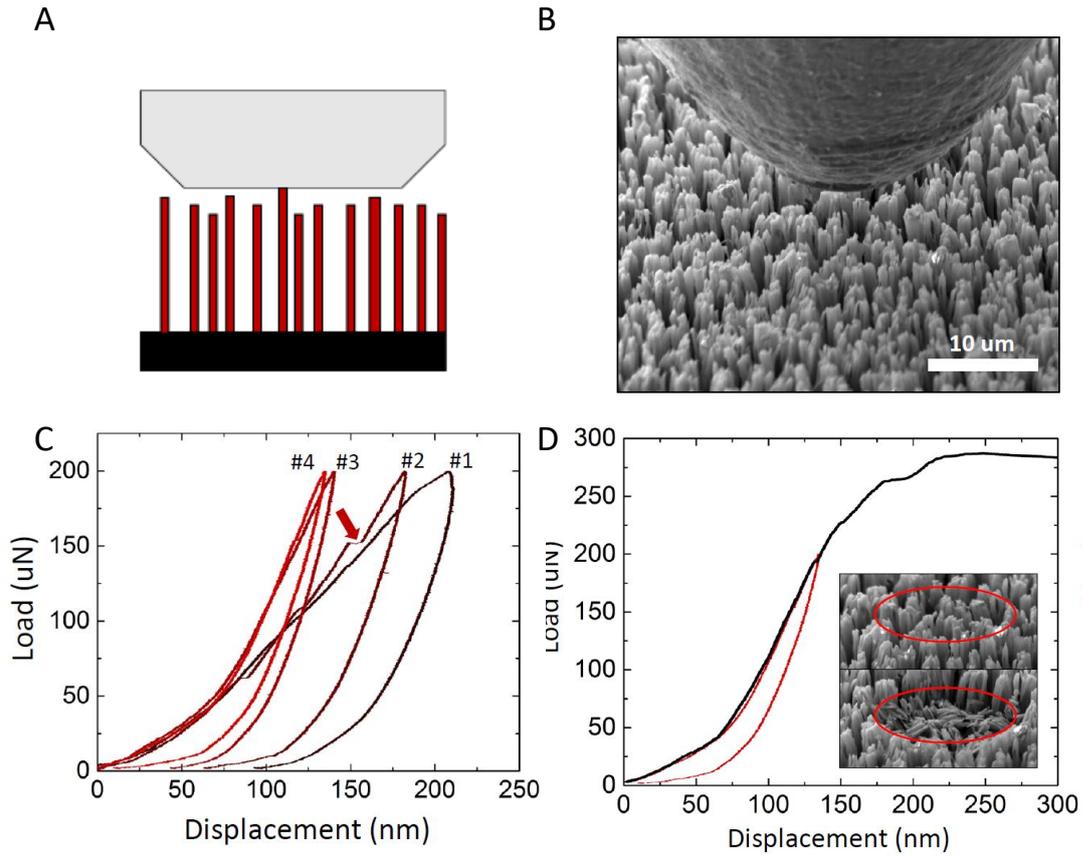


Figure S4. (A) Schematic representation of the tip engaging the non-uniform surface the Ti micropillar array (B) SEM image of the tip over the Ti nanostructures, taken at a tilt of 60°. (C) Multiple 200 μN load indents on the same region. (D) Stress/strain curves (black) obtained from the sample after a consistent tip-to-sample engagement was achieved. The last elastic indent (red) is also included to show that prior to plastic deformation the sample behaviour is identical to previous indents. Inset SEM images shows the sample before and after plastic deformation.

Supplementary Results:

Surface Chemical Characterization: Analysis of the surface chemical composition confirmed the Ti nanostructures to be titanium dioxide (TiO₂), as indicated by the characteristic Ti 2p doublet peaks in the wide scan XPS survey and high concentrations of surface oxygen (Figure S3). There were no changes to the crystalline Ti phase following prolonged periods of either plasma or hydrothermal etching, as confirmed by XRD analysis of the surface crystallinity (Figure 1).

The polished Ti possessed a water contact angle (WCA) of 60°. Nanostructuring of the bulk Ti by hydrothermal etching caused an increase in the wettability of the surfaces (Table 1) with a WCA of just 22°. In contrast, the formation of TiO₂ pillar arrays *via* plasma etching caused an increase in hydrophobicity (WCA 98°) (Table 1). This is most likely a result of the increasing surface roughness with increasing etch time, which results in the ability of the surface to entrap air between the features.

Nanoindentation: As expected from the variable Ti pillar height, the first indent few indents made were not very informative. Mechanical healing, where cyclic indentation to very low loads is performed on the sample, was used to create a more ideal surface for nanoindentation. Low loads will result in elastic deformation (no change) to the majority of the sample. However, defects act as focal points for stress. Therefore, even low loads will allow enough stress for those defects to be removed from the sample, which creates a more ideal surface for subsequent indentation. Here, this technique allows the tip to engage all the Ti pillars at roughly the same time. In Figure S4C, the curves are starting to look a lot more consistent with what we expect. There are “pop-in” events during the loading segment of indent #2, which are indicated by the arrow. This is indicative of a NW that has bent slightly at that point. After this occurs the load/unload curves become quite consistent. In Figure S4D, the curve doesn't begin with a linear region, which is expected from the elastic regime. Instead, it appears similar to pointed tip loading, which increases exponentially as the tip engages more of the sample. Most probably, the tip is engaging more NWs over this range. This suggests there is still a height difference (~60 nm) between the tallest and shortest NWs in the indented region. The slope of the elastic region can be used to measure an elastic modulus:

$$E_r = \frac{\sigma}{\varepsilon} = \frac{F/A}{\Delta L/L_0}$$

Where E_r is elastic modulus, σ is stress, ε is strain, F is load force (y-axis on the plot), A is contact area, ΔL is displacement (x-axis of plot), and L_0 is pillar height. Rearrange for F as a function of ΔL gives:

$$F = \left(E_r \frac{A}{L_0} \right) \Delta L$$

Here, we calculated a value of ~100 GPa (using a very rough estimate for contact area) which is similar to that of bulk Ti. The onset of plasticity (where the curve goes from linear to curved) occurs at ~150 nm, while fracture (where the curve goes flat) occurs at ~225 nm. For a NW of ~4 μm length that is ~4% and ~6%, respectively. These values will vary based on the NW height and material. As we are now engaging all the NWs within the indented region at the same time, a fracture event in the curve results in all the NWs bending at the same time.

2. Discussion et perspectives.

Nos résultats ont démontré que les biomatériaux nanostructurés et bactéricides développés par l'équipe d'Elena Ivanova permettent l'adhérence et la croissance des ASC. Ces cellules conservent leurs capacités de différenciation ostéogénique, adipogénique et chondrogénique en présence des facteurs requis, démontrant le maintien de leurs propriétés de pluripotence. Néanmoins, une légère augmentation de la senescence cellulaire a été observée suite à la culture des ASC sur biomatériaux Two-tier. C'est un résultat important à prendre en compte, car la senescence peut altérer les propriétés thérapeutiques des CSM. Enfin, suite à une culture à plus long terme sur biomatériaux Two-tier et HTE, et en milieu de culture sans facteurs de différenciation, les ASC présentent une minéralisation de la matrice et une activité ALP supérieures à celles observées chez les cellules cultivées sur titane poli ou en condition TCPS. Ces résultats démontrent l'effet ostéoinducteur de la nanotopographie des biomatériaux Two-tier et HTE. À notre connaissance, c'est la première fois que des supports de titane nanostructurés présentent conjointement des propriétés antibactériennes et ostéoinductrices. Ces effets ne dépendent pas de la libération de molécules, ce qui représente un avantage substantiel. Au-delà des difficultés liées aux phénomènes de résistance, il est en effet difficile de contrôler précisément la libération des antibiotiques, ce qui limite encore plus leur efficacité, notamment à long terme. Dans le cas de la régénération osseuse, l'infection de l'implant peut survenir jusqu'à plusieurs mois et même années après la greffe, par des mécanismes totalement indépendants de la greffe initiale. De plus, les traitements antibiotiques ne sont pas toujours pleinement efficaces et certaines bactéries peuvent résister, adhérer au support et dans les cas extrêmes, former des biofilms [306]. Cela souligne l'importance de développer des dispositifs antibactériens empêchant de manière efficace l'adhérence des bactéries aux supports, et dont l'effet puisse perdurer dans le temps. Les biomatériaux de titane nanostructurés sont donc très prometteurs pour une future utilisation en régénération osseuse.

2.1. Potentiel des biomatériaux de titane nanostructurés en tant que supports d'amplification d'ASC.

L'évaluation du comportement des ASC lors de leur culture sur les biomatériaux de titane nanostructurés démontre le potentiel de ces supports, et notamment des HTE, pour une utilisation en tant que plateforme d'amplification des cellules. En effet, ces biomatériaux permettent une croissance cellulaire en milieu pauvre en sérum (2% SVF), tout en permettant aux cellules de conserver leur multipotence, aussi efficacement qu'en condition de culture classique (TCPS). Afin d'éviter une contamination bactérienne, l'ajout de pénicilline et de streptomycine est souvent considéré. Pour favoriser l'adhérence et la croissance des ASC en condition pauvre en sérum, un coating à la fibronectine humaine est également recommandé. Ces additifs sont coûteux lorsqu'utilisés à grande échelle et, dans le cas des antibiotiques, ont des conséquences dramatiques pour l'environnement. Les nanostructures présentes à la surface des supports HTE ont une activité antibactérienne très importante. De plus, ces supports peuvent être réutilisés suite au retrait des déchets cellulaires par sonication. L'équipe d'Elena Ivanova a déjà développé des nanostructures bactéricides en or à la surface de matériaux de polystyrène [307] mais aussi en silicone [255]. Cette versatilité pourrait permettre à l'avenir la production d'outils d'amplification cellulaire naturellement bactéricides, rentables économiquement et respectueux de notre environnement.

2.2. Intérêt des biomatériaux nanostructurés pour la régénération osseuse.

Les propriétés mécaniques des biomatériaux, comme leur rigidité et leur nanotopographie, sont connues pour leurs effets sur la différenciation des CSM [200]. Nos résultats démontrent qu'effectivement, les biomatériaux de titane nanostructurés Two-tier et HTE possèdent des propriétés antibactériennes, mais aussi ostéoinductrices. Pour obtenir ces deux propriétés, il est souvent nécessaire d'associer les biomatériaux à des antibiotiques et/ou des facteurs de différenciation comme la BMP-2 [308]. Les biomatériaux de titane nanostructurés développés par Fraioli *et al.*

possèdent également des propriétés bactéricides et ostéogéniques [249]. Néanmoins, l'activité bactéricide contre *P. aeruginosa* est en moyenne de 20% pour ces supports, contre $87\% \pm 2\%$ et $98,8\% \pm 0,7\%$ pour les matériaux Two-tier et HTE respectivement. De plus, les propriétés ostéoinductrices de ces matériaux nécessitent un coating avec un peptide spécifique de l'intégrine $\alpha_v\beta_3$.

Un effet ostéoinducteur plus ou moins important a été observé selon le type de nanostructures étudié. Plusieurs mécanismes moléculaires différents pourraient donc être impliqués dans la différenciation ostéogénique des ASC lors de leur culture les biomatériaux Two-tier et HTE. Sur les biomatériaux Two-tier, les ASC sont caractérisées par un aspect ratio d'environ 6, traduisant une forme très allongée des cellules. Selon McBeath *et al.*, la tension du cytosquelette associée à cette forme allongée engendre la différenciation ostéogénique des cellules [309]. Ces mécanismes impliquent l'action des protéines RhoA et ROCK ainsi que la phosphorylation de la chaîne légère de la myosine II. Afin de vérifier l'implication de ces mécanismes moléculaires, un marquage de la myosine II phosphorylée pourrait être réalisé. La blebbistatine et Y-27632 sont des molécules inhibitrices de la myosine II et de ROCK respectivement. Leur utilisation permettrait également de vérifier l'implication des mécanismes tension-dépendants. La réorganisation du cytosquelette peut aussi induire une déformation du noyau des cellules et perturber la disposition spatiale des chromosomes. Ce phénomène est appelé mécano transduction directe. Dans leur étude, Tsimbouri *et al.* ont démontré qu'une nanotopographie ostéoinductrice engendrait un réarrangement des zones chromosomiques où les gènes liés à la différenciation ostéogénique sont regroupés [310]. Des approches similaires pourraient permettre d'évaluer ces phénomènes de mécano transduction directe chez les ASC cultivées sur nos biomatériaux Two-tier.

Les ASC cultivées sur les biomatériaux de titane HTE ont un aspect ratio similaire à celui observé sur titane poli ou en condition TCPS. D'autres mécanismes moléculaires pourraient être impliqués dans la différenciation ostéogénique des cellules cultivées sur ces matériaux. Les supports HTE sont caractérisés par un angle de contact de l'eau de 22° , contre 60° et 98° pour les surfaces polies et Two-tier respectivement. Les biomatériaux HTE sont donc très hydrophiles. Plusieurs études ont démontré l'effet ostéoconducteur ou ostéoinducteur de biomatériaux de titane nanostructurés hydrophiles [226,227]. Ces mécanismes impliquent notamment les intégrines β_1 . Des tests d'adhérence avec la lignée cellulaire d'ostéosarcome MG-63 déplétée en intégrine β_1 permettrait de démontrer l'implication de ces intégrines dans la différenciation ostéogénique lors de cultures sur supports HTE.

L'angiogenèse est un autre processus physiologique très important dans la régénération osseuse, car les vaisseaux sanguins permettent d'apporter l'oxygène et les nutriments nécessaires. Les vaisseaux sanguins servent aussi de route aux cellules souches et immunitaires impliquées [311]. La vascularisation de l'os intervient dans les premiers jours de la reconstruction osseuse (Figure 39). Il est connu que les CSM favorisent l'angiogenèse via la sécrétion de facteur VEGF [312]. La sécrétion de VEGF par les ASC lors des premiers jours de culture sur biomatériaux nanostructurés pourra être évaluée et comparée à celle obtenue sur titane poli ou en condition TCPS.

La réaction inflammatoire est également un phénomène prépondérant dans le bon déroulement de la réparation osseuse. Bien qu'une réponse inflammatoire soit nécessaire durant les premiers jours de régénération pour recruter les progéniteurs ostéogéniques et les CSM, une réponse chronique et à plus long terme engendre la fibrose du tissu et un échec d'ostéointégration du biomatériau [313]. La réponse inflammatoire chronique est souvent associée à l'activité des macrophages. Suite à leur adhérence au biomatériau, les macrophages vont, sous leur forme pro-inflammatoire (M1), sécréter des cytokines inflammatoires pro-fibrotiques telles que les interleukines 1β , 2, 6, ou 4, le TNF- α , le MCP-1 ou le MIP-1 α . Sous leur forme anti-inflammatoire (M2), les macrophages vont au contraire sécréter les interleukines 10 et 1 α , le TGF- β ou le VEGF [313]. L'étude du sécrétome de macrophages en réponse à leur culture sur les biomatériaux Two-tier et HTE permettrait d'évaluer le potentiel pro ou anti-inflammatoire de ces matériaux.

Plus globalement, des co-cultures pourraient être réalisées afin de mieux appréhender le comportement des biomatériaux nanostructurés *in situ*. Récemment, Grémare *et al.* ont développé des conditions adéquates à la tri-culture d'ostéoblastes, d'ostéoclastes et de cellules endothéliales, trois types cellulaires impliqués dans l'homéostasie osseuse. Dans ces expériences, la culture dans un mélange de milieu EGM-2MV, déplété en hydrocortisone et en acide ascorbique, et de milieu α -MEM a conduit au maintien du phénotype et des fonctions homéostatiques de ces différentes cellules [314]. L'utilisation d'un tel modèle permettrait également d'évaluer le potentiel ostéogénique et angiogénique des biomatériaux.

Toutes ces expériences permettraient de mieux caractériser le potentiel thérapeutique des biomatériaux nanostructurés. Néanmoins, les observations réalisées *in vitro* ne reflètent que rarement les mécanismes se déroulant chez le patient [204]. Pour ces raisons, des tests *in vivo* devront être réalisés. La plateforme Optimal de l'Institut pour l'Avancée des Biosciences (IAB) de Grenoble permettra l'étude des mécanismes de réparation osseuse chez des modèles animaux [208]. En collaboration avec cette plateforme, le potentiel régénérateur des supports de titane polis, Two-tier et HTE sera évalué chez des modèles de défauts osseux pré-infectés ou non.

Partie III : Impact des conditions de culture d'ASC sur la production de vésicules extracellulaires (EV).

Les ASC sont connues pour leurs effets thérapeutiques paracrines. Et parmi les composants sécrétés par ces cellules, les vésicules extracellulaires ont connu un réel engouement ces dernières années. Afin d'améliorer le potentiel thérapeutique de ces EV, il est nécessaire d'optimiser leur production. Dans un travail préliminaire, nous avons testé si la production d'EV par des ASC cultivées en 3D pouvait être satisfaisante. Cela a été réalisé sur les supports commerciaux Enhanced attachment.

1. Matériel et méthodes.

Production d'EV par les ASC :

2 x 10⁶ ASC ont étéensemencées dans des spinner flasks contenant 200 cm² de microporteurs Enhanced attachment et cultivées à 37°C et 5% de CO₂. Après 2 h en conditions statiques, une agitation de 50 rpm a été appliquée. Pour cette étape d'amplification, le milieu de culture Mesenchymal Stem Cell Growth Medium 2 de Promocell a été utilisé. Après 72 h d'incubation, le milieu a été récupéré, les complexes microporteurs/cellules ont été lavés deux fois au PBS 1X puis remis en culture dans 40 ml de milieu DMEM sans sérum. Les cellules ont à nouveau été incubées pendant 48 h sous agitation. Enfin, le milieu a été récupéré et les EV ont été isolées.

Isolement des EV :

Les EV ont été isolées suivant les méthodes d'ultracentrifugation décrites par Théry *et al.* en 2006 [148]. Les milieux conditionnés sont centrifugés pendant 10 min à 2000 rpm suivi d'une seconde centrifugation du surnageant pendant 10 min à 3300 rpm. Le surnageant est à nouveau récupéré pour être ultracentrifugé 2 fois : une première fois à 12000 rpm pendant 30 min à 4°C et une seconde à 35000 rpm pendant 70 min à 4°C. Les culots contenant les EV de petites tailles sont remis en suspension dans 80 µL de PBS préalablement filtré à 0,22 µm. Pour les ultracentrifugations, la centrifugeuse Optima L 90K ainsi que le rotor fixe 70 TI (Beckman coulter, États-Unis) ont été utilisés. Une accélération maximale et l'absence de freinage ont été sélectionnés.

Conservation des EV :

Suite à leur isolement, les EV ont été conservées dans du PBS à -20°C pour une durée de 6 mois maximum.

Visualisation des EV par high-resolution transmission electron microscopy (HRTEM) :

L'acquisition des images a été réalisée par Laetitia Rapenne et Xavier Le Guevel au Laboratoire des matériaux et du génie physique (LMGP) de Grenoble. Le microscope JEOL 2010 LaB6, fonctionnant à 200 kV et ayant une résolution point par point de 0,19 nm a été utilisé. Les échantillons ont été déposés sur une grille de carbone et de formvar. Les images ont été analysées par le logiciel Image J.

Quantification des EV par nanoparticle tracking analysis (NTA) :

La taille et la quantité d'EV produites par les ASC ont été mesurées à l'aide d'un NanoSight NS300 accessible sur la plateforme de caractérisation biophysique de l'institut de biologie structurale (IBS) de Grenoble avec l'aide de Christine Chatellard. Les solutions d'EV ont été diluées dans du PBS 1X filtré à 0,22 µm. Selon les conditions, une dilution au 1/1000^{ème} ou au 1/3000^{ème} a été appliquée. L'acquisition et l'analyse ont été réalisées via le logiciel NanoSight NTA 3.2. La concentration en particules ainsi que leur taille (moyenne et mode) ont été déterminées. Un schéma explicatif de la technique de NTA est présenté en annexe de ce manuscrit (Figure 50).

Quantification protéique des échantillons d'EV :

Brièvement, une gamme étalon d'albumine bovine sérique (BSA) a été réalisée dans une plaque 96 puits. En parallèle, 5 µL de lysats d'EV ont été déposés en dupliqué sur cette même plaque. Dans la totalité des puits, de l'eau distillée a été ajoutée qsp 150 µL. Par la suite, 150 µL de réactif (QuantiPro™ BCA assay kit, Sigma-Aldrich) ont été ajoutés. La réduction alcaline du Cu²⁺ présent dans le réactif par les protéines des échantillons conduit à la formation de complexes Cu¹⁺ quantifiables par absorbance. Après une incubation d'une heure à 60°C, l'absorbance à 570 nm a été mesurée. La quantité de protéines présentes dans les échantillons d'EV a été déterminée par comparaison des valeurs d'absorbance avec celles obtenues pour la gamme étalon.

Western Blot :

Pour l'analyse des protéines contenues dans les EV, 5 µL de solution d'EV ont été lysées dans 45 µL de tampon de lyse RIPA (Tris-HCl 50 mM pH = 7.5 ; NaCl 150 mM ; NP40 1% ; Sodium deoxycholate 0,5 %) contenant un cocktail d'inhibiteurs de protéases (Sigma-Aldrich, États-Unis) pendant 45 min à 4°C. Les échantillons ont ensuite été centrifugés à 14 000 x g pendant 15 min à 4°C et le surnageant a été récupéré. Pour chaque échantillon, 50 µg de protéines ont été dilués dans du tampon Laemmli (voir annexes) et chauffés à 95°C pendant 3 min. Les protéines ont ensuite été déposées sur un gel de polyacrylamide 10% (composition des réactifs en annexe) et soumises à un champ électrique de 150 V. Après migration, les protéines sont transférées sur membrane de nitrocellulose pendant 1 h à 100 V. Après une étape de blocage d'1 h à température ambiante dans du TBS / 5% lait, les membranes ont été incubées avec un anticorps anti-flotilline-1 (Sigma-Aldrich, France) dilué au 1/1000^{ème} dans du TBS / 5% lait / 0,1% Tween 20 pendant une nuit à 4°C. Après trois lavages dans du TBS / 0,1% Tween 20, les membranes ont été incubées avec un anticorps secondaire couplé à la HRP (Agilent Technologies, France) dilué au 1/10 000^{ème} dans du TBS / 5% lait / 0,1% Tween 20. Après trois lavages, la présence des protéines marquées est révélée par luminescence, suite à l'ajout de réactif ECL (Thermo Scientific, France). La détection a été réalisée à l'aide d'une caméra Vilber Fusion FX Spectra.

2. Résultats.

2.1. Visualisation des EV par microscopie électronique.

Les EV issues d'ASC cultivées sur microporteurs Enhanced attachment ont été visualisées par microscopie électronique (Figure 47).

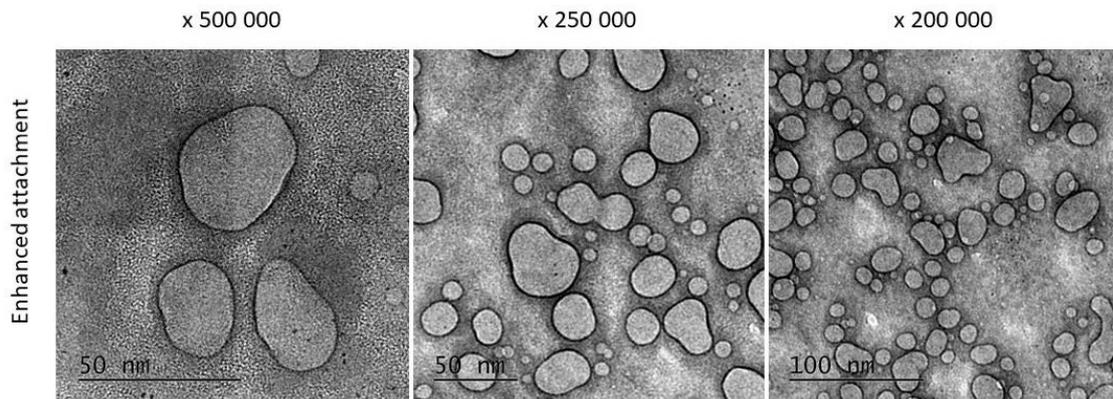


Figure 47 : Morphologie des EV sécrétées par des ASC cultivées 120 heures sur microporteurs Enhanced attachment (préparation 2).

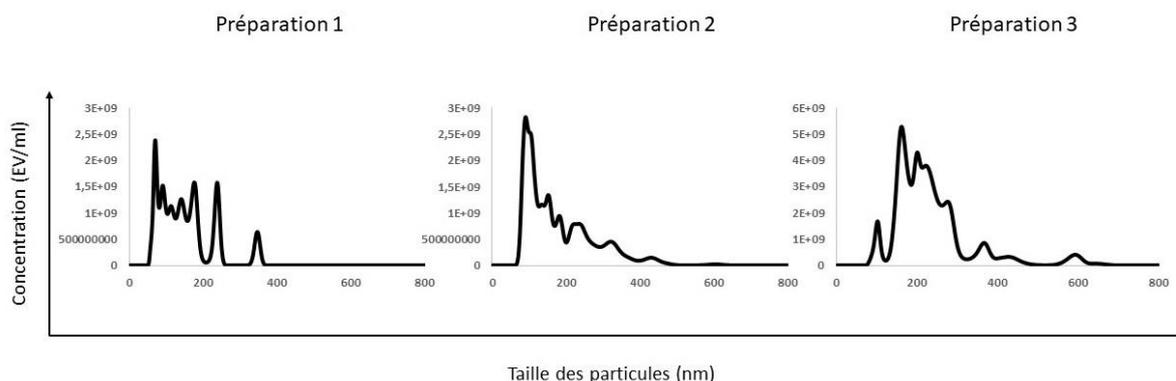
Même si la microscopie cryo-électronique est de plus en plus utilisée, la TEM reste l'une des références pour la caractérisation d'EV. Les images obtenues démontrent que la majorité des vésicules produites ont une taille de $32,7 \pm 12,1$ nm. Les exosomes sont décrits comme ayant une taille inférieure à 150 nm, tandis que les microvésicules ont une taille pouvant aller jusqu'à 500 nm, voire

1 μm [145]. Nos premiers résultats indiquent donc que la majorité des EV présentes dans les fractions d'EV sont des exosomes.

2.2. Caractérisation des EV par NTA.

Le NTA est une technique analytique permettant l'obtention d'informations variées telles que la répartition et la taille moyenne des EV, le mode (taille la plus représentée dans la population), et la concentration des EV. Il est alors possible de déterminer un taux de vésiculation des ASC (Figure 48).

A



B

	Enhanced attachment		
	Préparation 1	Préparation 2	Préparation 3
Moyenne de la taille (nm)	150,2	179,9	231,7
Mode de la taille (nm)	95,5	89,6	159,7
Concentration en EV (particules/ml)	$2,24 \times 10^{11}$	$2,7 \times 10^{11}$	$6,35 \times 10^{11}$
Taux de vésiculation (EV/cellule)	$1,43 \times 10^3$	$1,73 \times 10^3$	$4,06 \times 10^3$

Figure 48 : Analyse des préparations d'EV. (A) Distribution de la population d'EV issues d'ASC cultivées sur microporteurs Enhanced attachment. (B) Caractéristiques des préparations d'EV.

Bien que les mêmes conditions aient été appliquées, nous observons une répartition assez différente de la taille des particules selon la préparation analysée (Figure 48-A). En effet, la préparation 2 est beaucoup plus homogène que les préparations 1 et 3, même si dans l'ensemble la plupart des EV obtenues ont des tailles comprises entre 50 et 300 nm. La préparation 2 apparaît principalement composée d'exosomes (taille inférieure à 150 nm) en accord avec les résultats de microscopie électronique. Les préparations 1 et 3 en revanche, sont composées d'exosomes mais probablement aussi de microvésicules. Nos résultats présentés précédemment (Article 1) ont montré que nos conditions de culture donnaient des quantités et qualités d'ASC très reproductible. Les différences observées sur les EV seraient donc plutôt dues à des variations qui surviennent lors de la préparation par ultracentrifugations itératives. La première ultracentrifugation permet en effet de sédimenter les vésicules de taille importante alors que la seconde, plus rapide, nous garantit normalement de récupérer les EV de plus petite taille [148]. Il semble donc nécessaire d'associer cette méthode à d'autres techniques de purification telles que la centrifugation sur gradient de densité [149]. Cette hétérogénéité est confirmée par la moyenne de taille des EV selon la préparation, puisque celle-ci est comprise entre 150,2 nm pour la préparation 1 et 231,7 nm pour la préparation 3 (Figure 48-B). Cependant, le mode est lui de 95,5, 89,6 et 159,7 nm pour les préparations 1, 2 et 3

respectivement. Pour ces trois préparations, et sur la base de leurs aspects morphologiques, les EV les plus présentes semblent donc être des exosomes [145]. Cela devra être validé ultérieurement par des mesures de leur densité et de leur composition en protéines et en acides nucléiques [144,145].

Au niveau quantitatif, le NTA permet également de déterminer la concentration en EV dans un échantillon donné. Nous avons obtenu $2,24 \times 10^{11}$, $2,7 \times 10^{11}$ et $6,35 \times 10^{11}$ vésicules/ml dans les préparations 1, 2 et 3 (Figure 48-B), soit une quantité totale de $1,79 \times 10^{10}$, $2,16 \times 10^{10}$ et $5,08 \times 10^{10}$ EV. Après cinq jours de culture sur microporteurs Enhanced attachment, nous récupérons en moyenne 12,5 millions d'ASC (Article 1), il y a donc un taux de vésiculation de $1,43 \times 10^3$, $1,73 \times 10^3$ et $4,06 \times 10^3$ respectivement. À titre de comparaison, des taux de vésiculation de $4,5 \times 10^3$ EV par cellule ont été obtenus à partir de CSM de moelle osseuse cultivées en boîtes [315]. Cependant, dans nos expérimentations, les EV ont été récupérées après 48 h de culture en milieu sans sérum, contre 72 h pour l'étude de Zannoni *et al.* [315]. Ces résultats soulignent une potentielle augmentation de la productivité par cellule en spinner flask. Une quantité moyenne de $3,01 \times 10^{10}$ EV a été obtenue dans un seul spinner flask, alors qu'il faut l'équivalent de 10 boîtes de culture pour obtenir $1,25 \times 10^{10}$ EV. Ces résultats démontrent donc l'intérêt d'une culture sur microporteurs, mais restent néanmoins à confirmer, en particulier sur 2 points importants. Premièrement, le taux de cellules décollées avec les microporteurs Enhanced attachment n'est pas de 100%. Il est donc difficile d'évaluer précisément la quantité de cellules productrices et le taux de vésiculation. L'utilisation de dispositifs qui permettent le comptage de cellules poussant sur microporteurs et sans décollement, tels que les NucleoCounter® (ChemoMetec, Danemark) devrait apporter une aide précieuse à ce niveau. La seconde raison est que lors des expériences menées par Johanna Zannoni, des CSM issues de moelle osseuse ont été utilisées et non des ASC. Il serait donc important de comparer avec les mêmes cellules, puis d'étendre les expériences à des cellules prélevées chez plusieurs donneurs différents.

La quantité de protéines sert souvent de standard pour établir la fonctionnalité d'EV *in vivo*. Cela permet aussi d'évaluer la pureté en vésicules dans un échantillon donné. Pour ces raisons, la quantité de protéines dans les échantillons d'EV issues d'ASC cultivées sur microporteurs Enhanced attachment a été déterminée (Tableau 10).

	Enhanced attachment		
	Préparation 1	Préparation 2	Préparation 3
Quantité protéique totale (µg)	179,6	137,6	180,4
Quantité d'EV par µg de protéines	$9,98 \times 10^7$	$1,57 \times 10^8$	$2,82 \times 10^8$

Tableau 10 : Quantité de protéines présentes et pureté des échantillons d'EV isolées suite à la culture d'ASC sur microporteurs Enhanced attachment.

Des quantités de protéines allant de 137,6 à 180,4 µg ont été obtenues (Tableau 10) soit environ 10^8 EV par µg de protéines pour ces trois préparations. D'après Webber et Clayton, un échantillon d'EV est très pur lorsque 3×10^{10} vésicules par µg de protéines sont obtenues [316]. Il semble donc qu'il y ait des protéines contaminantes dans les préparations.

2.3. Evaluation de la présence de Flotilline-1.

Afin de mieux caractériser les EV produites par les ASC, il est possible d'évaluer leur composition en acides nucléiques, mais aussi en certaines protéines d'intérêt. La présence de la Flotilline-1 a ainsi été évaluée par western blot (Figure 49).

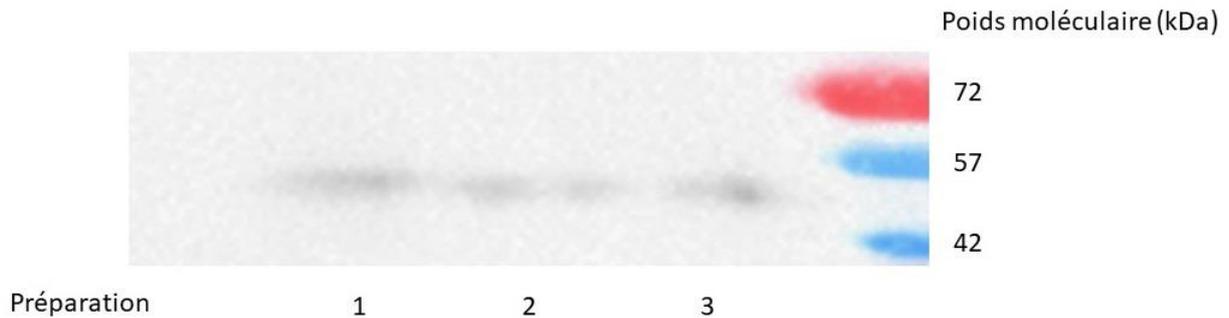


Figure 49 : Présence de flotilline 1 dans les EV issues d'ASC cultivées sur microporteurs Enhanced attachment.

Les flotillines 1 et 2 sont des protéines membranaires impliquées dans la signalisation cellulaire, la communication entre la membrane et le cytosquelette, mais aussi l'endocytose [317]. Suite à leur regroupement dans la membrane, les flotillines vont s'associer aux clathrines, induire le bourgeonnement de la membrane et permettre l'endocytose. L'implication de ces protéines dans l'adressage des MVEs et ILVs vers le lysosome, l'appareil de Golgi ou la membrane cellulaire, permettant la libération d'exosomes, a récemment été soulignée [318]. Les flotillines sont donc présentes dans les exosomes et non dans les microvésicules [145]. La révélation d'une seule bande à un poids moléculaire attendu de 47 kDa suite à une incubation avec un anticorps anti-flotilline confirme donc la présence d'exosomes dans les trois préparations réalisées.

3. Discussion et perspectives.

Au-delà de leur capacité de différenciation, il apparaît que l'effet thérapeutique des CSM est médié par leur activité paracrine. Parmi les composés que ces cellules sécrètent, les vésicules extracellulaires (EV) apparaissent comme l'un des acteurs majeurs dans l'activité thérapeutique de ces cellules. Ces dernières années, le potentiel d'EV issues de CSM dans le traitement de nombreuses pathologies a été décrit, autant *in vitro* qu'*in vivo*. À ce jour, plusieurs stratégies ont été développées afin d'améliorer la productivité des cellules sécrétrices, mais aussi les rendements d'isolement des EV à partir du milieu de culture et de leur purification. Cependant, peu d'entre elles se sont concentrées sur l'intérêt d'une culture à grande échelle des cellules sécrétrices, encore moins dans le cas de CSM. Notre objectif était donc d'évaluer l'impact d'une culture sur microporteurs en spinner flasks sur la productivité en EV des ASC.

J'ai pu caractériser les EV sécrétées par des ASC cultivées sur microporteurs Enhanced attachment. En comparaison avec une culture 2D, la culture dynamique sur microporteurs ne semble pas affecter la productivité des cellules ; au contraire, la quantité d'EV produites par cellule semble même être supérieure. Néanmoins, selon l'expérience, des préparations d'une pureté et d'une homogénéité différentes sont obtenues. Ceci est sans doute dû au protocole d'ultracentrifugation. Enfin, les vésicules ont été caractérisées au niveau morphologique par NTA, TEM et immuno-blot. La taille des vésicules observées, associée à la présence de flotilline-1 dans tous les échantillons, permettent de conclure qu'une grande partie des EV présentes dans les préparations sont des exosomes.

3.1. Impact des conditions de culture sur la productivité des ASC.

Dans notre protocole de production d'EV, les cellules ont d'abord été amplifiées dans le milieu Promocell Mesenchymal stem cell growth medium 2. Or, la composition du milieu utilisé peut influencer la production des EV par les cellules [319]. De manière générale, l'utilisation de milieu sans SVF ou dont le SVF a été déplété en EV est conseillée. En effet, les EV contenues dans le SVF sont biologiquement actives et pourraient modifier les propriétés de l'échantillon lors d'une future application *in vitro* ou *in vivo*. Néanmoins, l'utilisation de tels milieux peut altérer la capacité de croissance des cellules cultivées ainsi que leur productivité en EV [320,321]. Une des alternatives

mentionnées par la Société Internationale des Vésicules Extracellulaires (ISEV) consiste au remplacement du SVF par d'autres suppléments comme des facteurs synthétiques ou du lysat plaquettaire (LP) [152]. Dans de futures expériences, l'impact de l'utilisation de DMEM ou d' α -MEM complémenté en LP sur la productivité des ASC pourra donc être testé.

La quantité de glucose fait aussi partie des paramètres influençant la production d'EV. Tandis qu'une forte quantité de glucose promeut la sécrétion d'EV par les cellules endothéliales [322], son absence favorise au contraire la sécrétion d'EV chez les cardiomyocytes [323]. À notre connaissance, cet effet n'est pas connu chez les CSM et devra donc être étudié.

Enfin, la densité d'ensemencement ainsi que la fréquence de récupération de EV influent sur les rendements obtenus [324]. Une adaptation de ces paramètres de culture devra donc aussi être testée.

3.2. Intérêts et limites de la méthode d'isolement utilisée.

Pour isoler les EV sécrétées, le protocole d'ultracentrifugation décrit par Théry *et al.* en 2006 a été systématiquement utilisé [148]. Bien que les EV obtenues soient majoritairement des exosomes, nos résultats démontrent néanmoins que selon la préparation réalisée, une population d'EV de tailles différentes est obtenue. De plus, une pureté relativement faible a été observée. Une des causes pourrait être un manque de reproductibilité des méthodes d'ultracentrifugation utilisées. Plusieurs alternatives sont possibles afin d'optimiser l'isolement des EV. Notamment, il est possible d'associer l'ultracentrifugation à des gradients de sucrose, afin de séparer les vésicules selon leurs densités. Récemment, Langevin *et al.* ont proposé une étude comparative de différents protocoles d'ultracentrifugations pour l'isolement d'EV à partir de sérum humain [325]. Leurs résultats ont démontré qu'un protocole comprenant deux ultracentrifugations, associées à un coussin de 30% de sucrose, était le plus efficace, tout en limitant la contamination protéique et lipidique de l'échantillon. Cependant, cela pose des limites à son utilisation en clinique. En effet, ces méthodes requièrent une bonne qualification du personnel technique et une manutention considérable qui augmentent le temps et les coûts liés à l'isolement des EV. Enfin, son efficacité va dépendre de propriétés du matériel utilisé comme la centrifugeuse ou le rotor et va donc varier d'un laboratoire à un autre [326]. Pour ces raisons, plusieurs autres méthodes ont été développées afin de faciliter le passage à grande échelle, tout en améliorant les rendements et la pureté des échantillons obtenus. Notamment, l'utilisation de dispositifs de filtration comme le TFF semble prometteuse. En comparaison avec l'ultracentrifugation, ces dispositifs sont facilement adaptables à grande échelle, puisqu'ils facilitent les étapes de lavage et de changement de milieu. Utilisés seuls [327] ou en association avec un dispositif de chromatographie [328], ces méthodes de filtration ont démontré un rendement jusqu'à 7 fois supérieur à celui obtenu avec des méthodes d'ultracentrifugation. Baranyai *et al.* ont quant à eux testé une méthode de chromatographie par exclusion de taille dans l'isolement d'EV à partir de plasma sanguin [329]. En comparaison avec l'ultracentrifugation, la chromatographie améliore de manière significative la pureté des échantillons, caractérisée par une absence d'albumine dans les fractions observées. Néanmoins, une partie importante des EV a été éluée avec cette protéine, engendrant une baisse importante du rendement obtenu. Enfin Zhang *et al.* ont récemment présenté une nouvelle méthode de purification, l'AF4 ("Asymmetric Flow Field-Flow Fractionation") [330]. Basée sur la séparation des vésicules selon leur densité, mais aussi sur leurs propriétés hydrodynamiques, l'AF4 a permis d'obtenir deux sous-types d'exosomes, mais aussi d'un nouveau type de particules nommées "exomères" de taille d'environ 35 nm. Ces différentes populations d'EV ont par la suite démontré des propriétés physiques et biologiques différentes, *in vitro* et *in vivo* [330].

Ces techniques sont toutes basées sur les propriétés physiques des EV. Afin d'améliorer encore plus la pureté des échantillons obtenus tout en conservant un rendement important, des méthodes immunologiques peuvent être utilisées. Généralement, des anticorps spécifiques sont fixés à la surface de billes magnétiques, permettant l'isolement d'une population d'EV d'intérêt [331]. À

partir de milieux conditionnés par les cellules cancéreuses LIM1863 et en comparaison avec l'ultracentrifugation ou la centrifugation sur gradient de densité, ces méthodes ont conduit à l'obtention d'une population d'EV plus homogène et pure en termes de taille et d'expression de protéines spécifiques [332]. Ces approches immunologiques peuvent aussi être associées à des dispositifs microfluidiques et consistent notamment à l'incorporation dans ces systèmes d'anticorps anti-CD63, spécifique des exosomes [333]. Néanmoins, ces techniques sont adaptées pour de petits volumes d'échantillon n'excédant pas 400 µl. Plus récemment et afin d'améliorer la surface de récupération des EV, Zhao *et al.* ont introduit des billes magnétiques marquées dans un système microfluidique [334]. Cette combinaison a notamment permis d'augmenter le volume d'échantillon traité jusqu'à 10 ml. Bien que ces dispositifs microfluidiques soient pour l'instant utilisés comme outils diagnostiques, principalement en oncologie, leur association à d'autres méthodes de purification pourrait être prometteuse dans l'isolement d'EV à grande échelle et à haute pureté.

3.3. Perspectives.

De nombreuses expériences restent à réaliser à court, moyen et long terme. Tout d'abord, la production d'EV suite à la culture des ASC en 2D, mais aussi sur les microporteurs Cytodex® 1 et disques Carroucell sera analysée. Ces expériences seront réalisées dans les mêmes conditions (densité d'ensemencement, même donneur d'ASC, milieux de culture et méthode d'isolement des EV) que celles présentées ici. Les EV obtenues seront caractérisées par TEM, NTA, dosage protéique et immuno-blot. Selon Colao *et al.*, une solution d'exosomes devrait *i)* posséder des protéines transmembranaires telles que les tétraspanines CD63, CD81 ou CD9 *ii)* posséder des protéines cytoplasmiques comme la protéine TSG101, les protéines Rab GTPases ou encore les annexines *iii)* être libre de toute protéine provenant de l'appareil de Golgi, du réticulum endoplasmique, des mitochondries ou encore du noyau et *iv)* être libre de toutes protéines extracellulaires comme les cytokines ou les protéines du sérum [331]. Dans de futures expériences, des protéines provenant de ces différents compartiments devront être testées afin de s'assurer de la qualité des échantillons. Malgré les lavages et le passage en milieu DMEM sans sérum lors de l'étape de production, la présence d'EV et notamment d'exosomes issus du sérum du milieu Promocell dans l'échantillon final n'est pas à exclure. Des protéines spécifiques des CSM telles que CD73 et CD29 devront donc également être recherchées afin de s'assurer que les exosomes observés ont bien été sécrétés par les cellules.

Par la suite, lorsque les supports optimaux auront été déterminés, l'effet d'autres paramètres de culture sera évalué. Parmi ces paramètres, le donneur d'ASC, la densité d'ensemencement, la fréquence de récupération des EV ou encore la composition du milieu de culture (milieu sans sérum ou LP, présence de glucose ou non) seront testés. D'autres protocoles d'isolement seront testés afin d'améliorer l'homogénéité et la pureté des échantillons.

La sténose trachéale est une pathologie des voies respiratoire. Souvent d'origine congénitale, elle est due à une malformation du tissu fibro-cartilagineux pouvant conduire à une obstruction des voies aériennes et à une asphyxie. Une intervention chirurgicale est donc souvent requise. Chez l'adulte, cette pathologie peut être un effet secondaire suite à une intubation prolongée. Celle-ci engendre une fibrose de la muqueuse respiratoire ; dans certains cas, une atteinte cartilagineuse est observée [335]. Les CSM, ainsi que leur EV, sont connus pour leurs propriétés anti inflammatoires, anti ischémiques et anti fibrotiques. Bien que ces cellules aient déjà été étudiées dans le traitement de la sténose trachéale au niveau préclinique [336], démontrant des effets anti inflammatoires et régénérateurs encourageant, aucune étude de leurs EV n'a à notre connaissance été réalisée. Les cellules primaires d'épithélium respiratoire représentent un bon modèle d'étude *in vitro* pour de telles pathologies. Afin d'évaluer la fonctionnalité des EV issues d'ASC, leur impact sur la croissance, la viabilité et la capacité de migration de ces cellules primaires sera évalué.

Discussion générale

Mon travail de thèse avait pour but principal d'étudier les relations entre cellules souches mésenchymateuses (CSM) et biomatériaux, pour des applications de médecine régénératrice. Nous avons choisi le modèle des CSM pour leurs nombreuses qualités thérapeutiques et leur sécurité accrue par rapport à d'autres types de cellules souches (Figure 13, Tableau 2). *In vivo*, ces cellules sont aussi impliquées dans de nombreux processus physiologiques. Par contre, et malgré la facilité avec laquelle ces cellules peuvent être amplifiées *in vitro*, les CSM demeurent très sensibles aux propriétés biologiques, physiques, et chimiques de leur environnement. Leur utilisation en médecine nécessite donc une excellente optimisation des biomatériaux sur lesquels elles seront cultivées.

Nous nous sommes intéressés à deux formes de biomatériaux en particulier : des microporteurs et des supports en titane antibactériens, pour des applications de thérapie cellulaire ou d'ingénierie tissulaire car les défis imposés sont différents dans ces deux cas. Pour la thérapie cellulaire, il est nécessaire de produire une quantité très importante de CSM indifférenciées (Figure 20). Au contraire, dans le cas de l'ingénierie tissulaire, notamment osseuse, il apparaît séduisant de stimuler la différenciation cellulaire *in vitro* ou *in situ*. Enfin, l'objectif final était d'arriver à développer des biomatériaux tout en limitant l'utilisation de produits xénogéniques et dont la synthèse est en accord avec le respect de l'environnement.

Nous avons ainsi pu développer des microporteurs disques HAP-NH₃ qui se sont révélés très performants. De même, les supports de titane antibactériens développés par l'équipe d'Elena Ivanova ne contiennent aucun produit d'origine animale. Dans les deux cas, des résultats très intéressants ont été obtenus. Ces études représentent donc des étapes importantes vers le développement de produits thérapeutiques de format BPF. L'étape suivante consistera à démontrer que ces supports conservent leurs propriétés même en absence de SVF, qui devra être remplacé par du lysat plaquettaire ou un autre apport de facteurs de croissance et d'adhérence.

Les microporteurs disques testés sont composé principalement de silice. C'est un composé naturel pouvant être recyclé, contrairement au polystyrène utilisé dans la manufacture de bon nombre de microporteurs industriels. De plus, les microporteurs disques sont obtenus via une technique sol-gel verte *i.e.* ne faisant intervenir, ou ne produisant aucune substance dangereuse au niveau sanitaire et environnemental [337]. Ils représentent donc une alternative économique et environnementale très intéressante aux boîtes de culture en plastique à usage unique pour la production de grandes quantités de cellules. Les biomatériaux de titane démontrent quant à eux des activités bactéricides intrinsèques très importantes contre plusieurs types de souches bactériennes. Ils pourraient donc être des alternatives à l'utilisation d'antibiotiques pour l'amplification des cellules *in vitro* en plus d'être des biomatériaux adaptés aux applications de régénération osseuse, ou à d'autres applications thérapeutiques.

Les vésicules extracellulaires produites par les cellules souches présentent aussi un grand intérêt pour la médecine régénératrice. La thérapie acellulaire conserve des effets thérapeutiques impressionnants tout en évitant les limites liées aux propriétés des cellules qui les sécrètent [163,164]. Ces dernières années, plusieurs approches ont été développées pour la production de lots d'EV adaptés à la clinique. La technologie sol-gel utilisée pour la synthèse des microporteurs disques semblent donc particulièrement appropriée à la production d'EV car elle permet d'inclure n'importe quel composant d'intérêt dans la matrice et notamment des molécules connues pour favoriser la sécrétion d'EV [176]. Associée aux avantages liés à une culture à grande échelle, l'utilisation des microporteurs que nous avons développés pourrait donc permettre de produire des quantités d'EV suffisantes pour le traitement de plusieurs patients.

Nos travaux apportent donc des perspectives importantes pour la médecine régénératrice, et ouvrent plusieurs champs d'expérimentations innovants pour l'optimisation de ces différents outils thérapeutiques.

Conclusion

La thérapie cellulaire, acellulaire et l'ingénierie tissulaire sont toutes des thérapies d'avenir dans le traitement de pathologies très variées. Durant ma thèse, plusieurs points essentiels à l'amélioration de ces thérapies ont été abordés, qu'il s'agisse de la production de cellules et de vésicules extracellulaires thérapeutiques à grande échelle ou du développement de biomatériaux innovants. L'ensemble de ces travaux s'est déroulé dans un environnement multidisciplinaire, alliant la biologie, la chimie et la physique. Il s'agissait d'apporter à la fois une meilleure compréhension des mécanismes impliqués mais aussi de proposer de potentielles applications pour ces thérapies.

Grâce au contrat CIFRE dont j'ai pu bénéficier, j'ai eu la chance de réaliser un projet nécessitant un savoir-faire académique, mais aussi industriel. Cela m'a permis de mieux comprendre les avantages et les contraintes liés à ces différents environnements. Enfin, le projet d'étude concernant les biomatériaux de titane nanostructurés a été réalisé en collaboration avec l'équipe du Pr Elena Ivanova, basée au RMIT de Melbourne. Cela m'a permis de m'ouvrir au contexte international dans lequel doivent se positionner la recherche académique et industrielle.

Cette thèse a donc été très enrichissante pour moi à de nombreux points de vue et j'espère avoir pu le retranscrire dans ce manuscrit.

Annexes

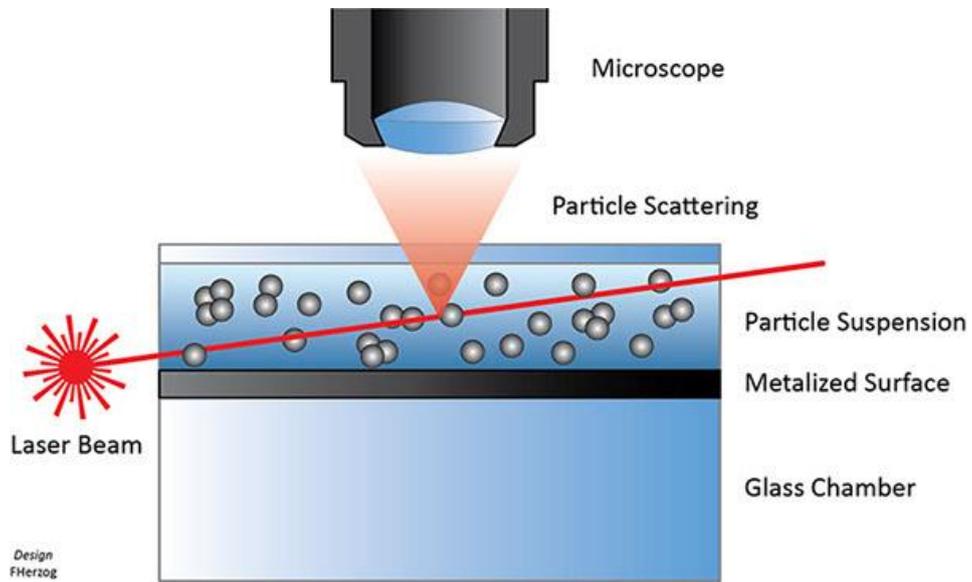


Figure 50 : Schéma explicatif du principe du Nanoparticle tracking analysis (NTA).

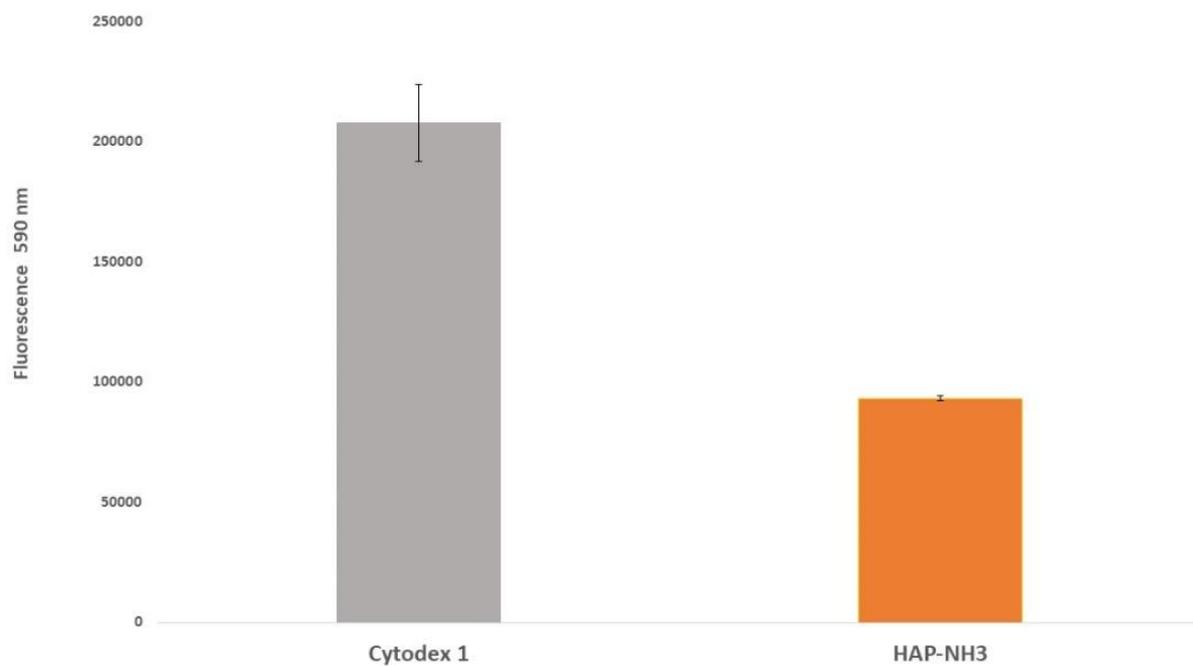


Figure 51 : Quantification de la fluorescence des cellules restantes dans les filtres suite à l'étape de séparation entre les ASC et les microporteurs Cytodex 1 et HAP-NH3. Le réactif Presto Blue a été utilisé.

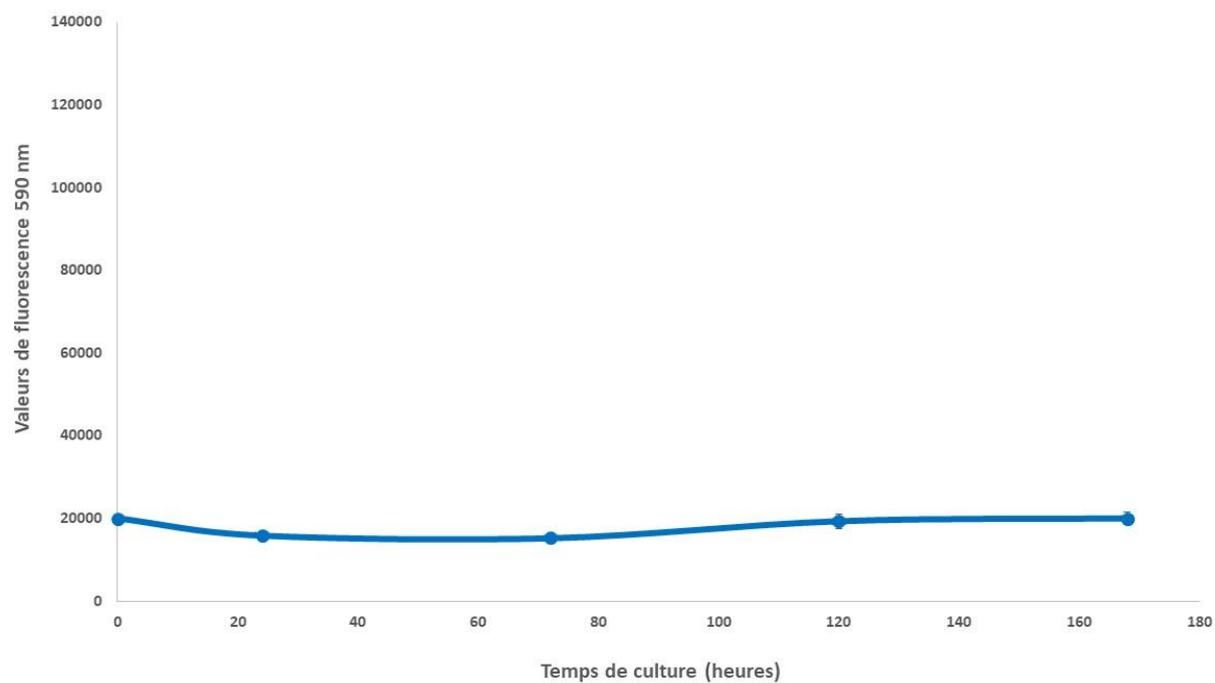


Figure 52 : Croissance statique des ASC cultivées sur microporteurs disques fonctionnalisés au HAP. Densité d'ensemencement = 10 000 cellules / cm².

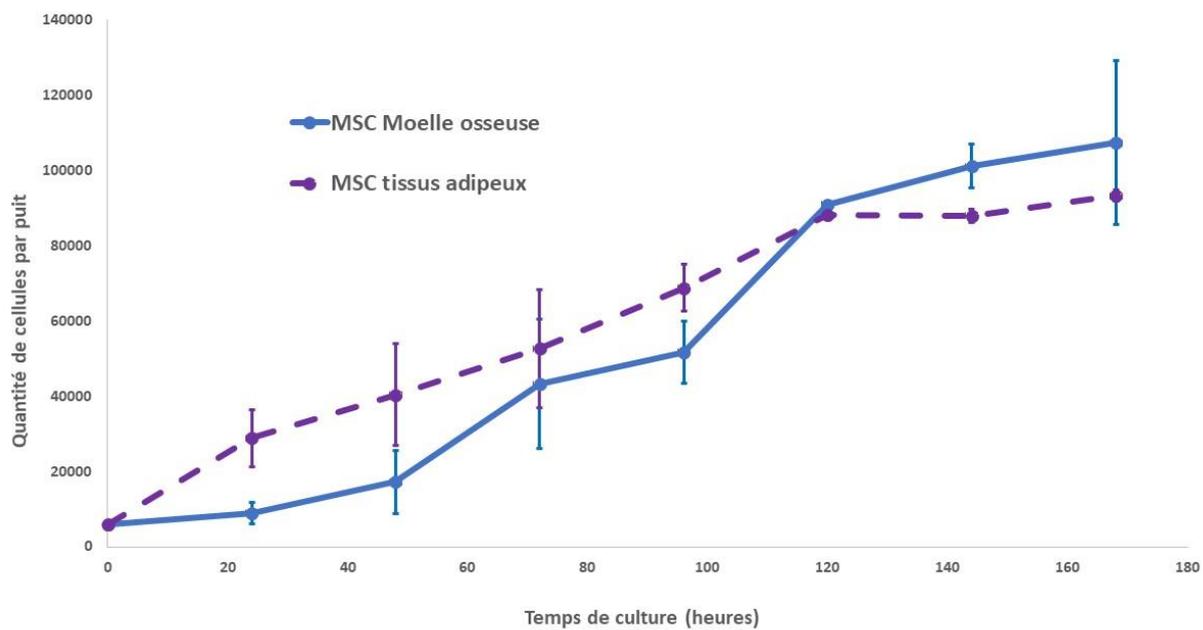


Figure 53 : Croissance statique de CSM issues de moelle osseuse et de tissu adipeux sur microporteurs HAP-Collagène. Densité d'ensemencement = 3000 cellules / cm².

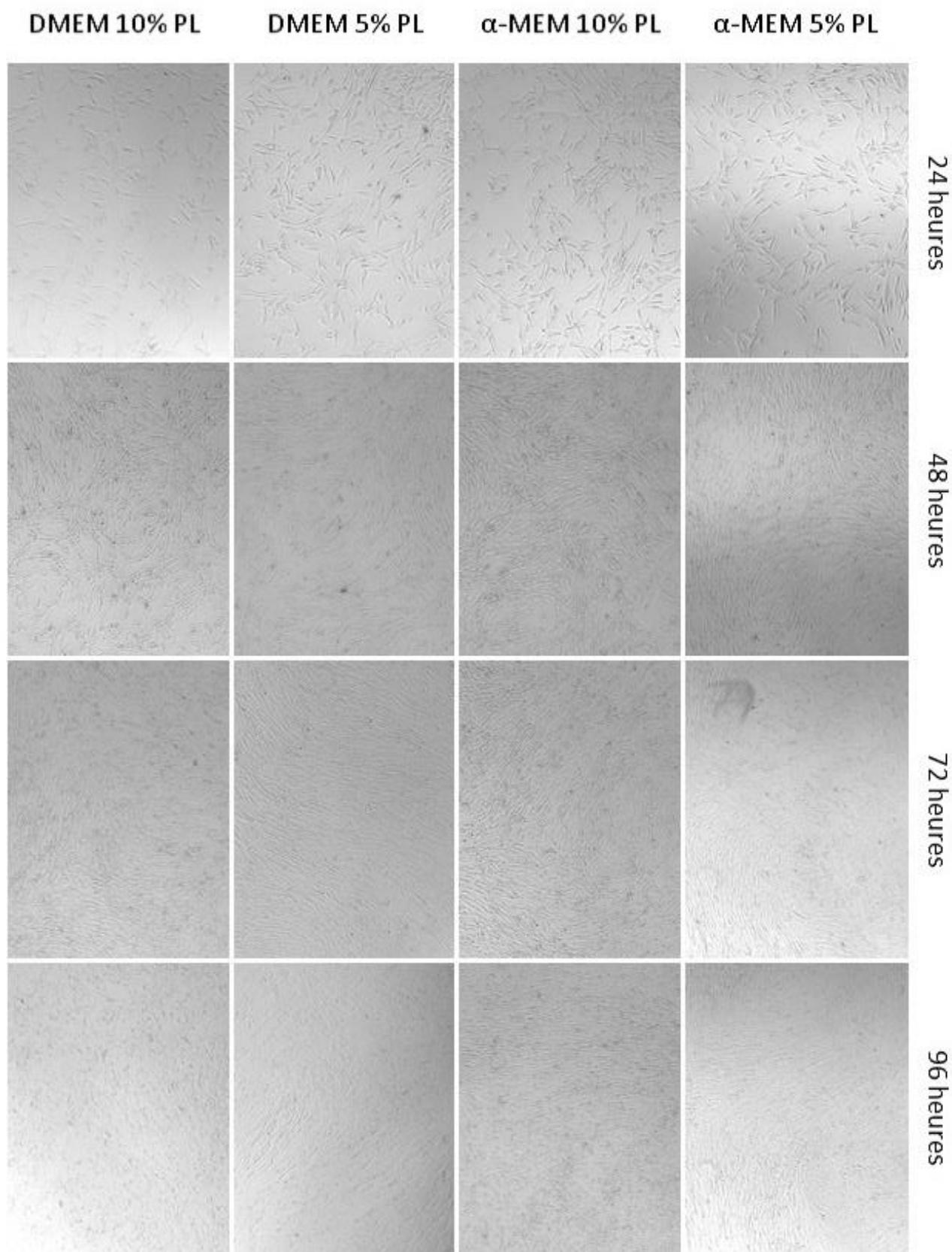


Figure 54 : Croissance statique d'ASC en milieux DMEM et α -MEM supplémentés par 5 ou 10% de lysat plaquettaire (PL). Densité d'ensemencement = 3000 cellules / cm².

Réactifs utilisés pour le western blot :

Tampon de migration : 25 mM Tris ; 190 mM Glycine et 0,1% Sodium Dodecyl Sulfate (SDS) dans H₂O distillée.

Tampon de transfert : 25 mM Tris ; 190 mM Glycine et 20% Ethanol dans H₂O distillée.

Tampon salin tris (TBS) : 20 mM Tris pH 7,5 ; 150 mM NaCl dans H₂O distillée.

Gel de concentration : 2,9 ml H₂O distillée ; 0,75 ml Acrylamide 40% ; 1,25 ml Tris 0,5 M pH 6,8 ; 50 µl SDS 10% ; 50 µl APS 10% et 5 µl TEMED. Volume final = 5 ml.

Gel de séparation : 3,8 ml H₂O distillée ; 2 ml Acrylamide 40% ; 2 ml Tris 1,5 M pH 8,8 ; 80 µl SDS 10% ; 80 µl APS 10% et 8 µl TEMED. Volume final = 8 ml.

Tampon Laemmli (4X) : 0,25 M Tris-HCl pH 6,8 ; 8% SDS ; 30% Glycérol et 0,1% Bleu de bromophénol.

Liste des figures

Synthèse bibliographique

Figure 1 : la thérapie cellulaire.	10
Figure 2 : Les pathologies traitées par thérapie cellulaire.....	10
Figure 3 : Etapes du traitement par thérapie cellulaire Holoclar®.	11
Figure 4 : Représentation d'un blastocyste d'où sont extraites les ES.....	11
Figure 5 : Facteurs extrinsèques impliqués dans la spécification des tissus.	13
Figure 6 : Description du dispositif VC-01, composé du système de véctorisation Encaptra et des cellules ES différenciées PEC-01.	14
Figure 7 : L'utilisation des iPS en recherche et en clinique.	16
Figure 8 : Utilisation des iPS patients spécifiques pour le développement de nouvelles drogues thérapeutiques.	16
Figure 9 : Différenciation des CSH en effecteurs du système hématopoïétique.....	18
Figure 10 : La niche des cellules souches hématopoïétiques.	19
Figure 11 : Marquage histologique de CSM différenciées in vitro.....	22
Figure 12 : Interaction des CSM avec les différents composants du système immunitaire et origine des capacités immunomodulatrices de ces cellules.	22
Figure 13 : Essais cliniques utilisant des CSM en 2016.	24
Figure 14 : Représentation des T-flasks Corning®, CellSTACK® Corning® et du Roller Bottle Versa-Roll utilisés dans l'amplification cellulaire.....	26
Figure 15 : Schémas explicatifs et images des principaux types de bioréacteurs utilisés en bio fabrication.	28
Figure 16 : Gamme de bioréacteurs Sartorius représentant des bioréacteurs à hélice de différents volumes.....	29
Figure 17 : Représentation du système de perfusion.	30
Figure 18 : Différentes caractéristiques et classification des microporteurs développés au niveau académique et industriel.	32
Figure 19 : Microporteurs de différentes formes.	34
Figure 20 : Quantité de cellules souches nécessaires par patient selon la pathologie traitée.....	36
Figure 21 : Isolement de lysat plaquettaire à partir d'une unité plaquettaire.	38
Figure 22 : Composition moléculaire de l'hUCBP et de deux lots de SVF différents.	39
Figure 23 : Représentation d'une niche de cellules souches, de ses composants et de son impact sur la physiologie des cellules.	40
Figure 24 : Structure moléculaire de l'hydroxyapatite (HAP).	41
Figure 25 : Impact de la rigidité du substrat d'adhérence sur la différenciation des CSM.	42

Figure 26 : Influence de la voie des MAPK dans le contrôle de la différenciation ostéogénique des CSM via la rigidité du substrat.	42
Figure 27 : Impact de la rigidité d'hydrogels sur leur capacité de reconstruction osseuse à 12 semaines in vivo.	43
Figure 28 : Structure poreuse des microporteurs DAT et Cultispher-S observée par microscopie électronique.	45
Figure 29 : Représentation des zones de stress mécanique et de l'échelle de Kolmogorov dans le cadre d'une culture en bioréacteur à hélice (coupe transversale) à une vitesse d'agitation de 60 rpm.	46
Figure 30 : Description des principaux types d'EV.	51
Figure 31 : Biogénèse des exosomes par voie endosomale.	52
Figure 32 : Description des systèmes de formation des exosomes.	52
Figure 33 : Effecteurs impliqués dans le transport intracellulaire des MVE et dans la libération des exosomes.	53
Figure 34 : Interactions des EV avec leurs cellules cibles.	54
Figure 35 : Imagerie d'EV par TEM et Cryo-EM.	55
Figure 36 : Aperçu des différents effets thérapeutiques observés suite à l'injection d'EV issues de CSM dans des modèles animaux de pathologies neuronales, rénales, cardiaques et hépatiques.	57
Figure 37 : Différentes stratégies étudiées pour améliorer l'efficacité thérapeutique des EV sécrétés par les CSM.	59
Figure 38 : Principe de l'encapsulation de cellules à visé thérapeutique.	63
Figure 39 : Etapes impliquées dans la réparation secondaire de l'os suite à une fracture.	64
Figure 40 : Caractérisation de supports de titane non traités, traités par SLA et traités par direct metal laser sintering (DMLS).	68
Figure 41 : Nanotubes de différents diamètres créés par anodisation.	68
Figure 42 : Activité bactéricide de certains métaux.	70
Figure 43 : Effet bactéricide de supports de titane fonctionnalisés au molybdène.	71
Figure 44 : Effet antibactérien de surfaces bio inspirées.	73
Figure 45 : Intérêt des biomatériaux nanostructurés dans la course pour la surface entre les cellules COS-7 et les bactéries p. aeruginosa et s. aureus.	74
Partie I : Développement de microporteurs innovants pour l'amplification à grande échelle d'ASC	
Figure 46 : Influence du milieu de culture et de la fonctionnalisation sur la croissance des ASC.	79
Article 1	
Figure 1: ASC adhesion in static conditions according to the MC, distribution of ASC on MC and phase contrast images of ASC attached to the different microcarriers in static conditions after 72 hours of expansion.	101
Figure 2: ASC expansion on different types of MC in static conditions.	102
Figure 3: ASC harvesting from the different MC studied.	103

Figure 4: Characterization of ASC harvested from the different MC after spinner flask amplification.....	105
Partie II : Etude du comportement d'ASC sur des biomatériaux de titane nanostructurés	
Article 2	
Fig. 1. Surface characterisation of polished and nanostructured surfaces.	128
Fig. 2. Dynamic of hASC attachment on different types of Ti surfaces.	129
Fig. 3. hASC morphology on Ti surfaces over 24 hours.	131
Fig. 4. hASC growth on nanostructured titanium surfaces for 96 h.	132
Fig. 5. Maintenance of the functional properties of hASC after amplification on Ti supports.....	133
Fig. 6. Ti supports induced osteogenic differentiation of hASC.....	134
Figure S1. Antibacterial activity of Polished, Two-tier and HTE Ti surfaces towards <i>Pseudomonas aeruginosa</i> and <i>Staphylococcus aureus</i> , represented by CLSM and SEM images, respectively.	147
Figure S2. Surface Chemical Characterisation of modified and polished Ti surfaces.....	149
Figure S3. Surface roughness analysis of polished, Two-tier and HTE surfaces.	150
Figure S4. Nanoindentation of Two-tier surfaces.....	152
Partie III : Impact des conditions de culture d'ASC sur la production de vésicules extracellulaires (EV)	
Figure 47 : Morphologie des EV sécrétées par des ASC cultivées 120 heures sur microporteurs Enhanced attachment (préparation 2).	159
Figure 48 : Analyse des préparations d'EV.....	160
Figure 49 : Présence de flotilline 1 dans les EV issues d'ASC cultivées sur microporteurs Enhanced attachment.....	162
Annexes	
Figure 50 : Schéma explicatif du principe du Nanoparticle tracking analysis (NTA).....	168
Figure 51 : Quantification de la fluorescence des cellules restantes dans les filtres suite à l'étape de séparation entre les ASC et les microporteurs Cytodex 1 et HAP-NH ₃	169
Figure 52 : Croissance statique des ASC cultivées sur microporteurs disques fonctionnalisés au HAP.....	170
Figure 53 : Croissance statique de CSM issues de moelle osseuse et de tissu adipeux sur microporteurs HAP-Collagène.....	171
Figure 54 : Croissance statique d'ASC en milieux DMEM et α -MEM supplémentés par 5 ou 10% de lysat plaquettaire (PL).....	172

Liste des tableaux

Synthèse bibliographique

Tableau 1 : Classification des différents types de cellules souches et de leurs capacités de différenciation.	8
Tableau 2 : Tableau comparatif des avantages et des contraintes liées à l'utilisation de cellules souches à visée thérapeutique allant de leur capacité d'isolement et de culture ex vivo à différents aspects de leurs utilisation clinique.....	25
Tableau 3 : Microporteurs commerciaux classés selon leurs différentes propriétés et caractéristiques.....	33
Tableau 4 : Représentation de plusieurs milieux de culture utilisées pour l'amplification de CSM en condition " xeno-free" et de leur effet sur les cellules.	37
Tableau 5 : Liste de différents traitements physiques, chimiques et enzymatiques pouvant être combinés pour la décellularisation des tissus.	44
Tableau 6 : Différentes enzymes utilisées pour le décollement cellulaire.	48
Tableau 7 : Utilisation préclinique d'EV issues de CSM et enrichies en miRNA.....	60
Tableau 8 : Peptides ayant été intégrés dans des biomatériaux.....	62
Tableau 9 : Propriétés et limites des substituts osseux (hormis les substituts métalliques) utilisés en reconstruction osseuse.	65
Article 1	
Table 1. Characteristics of microcarriers used in this study.	99
Table 2. Surface composition of the disc microcarriers.....	100
Table 3. Cell yield, viability and senescence after amplification in spinner flask according to the type of MC.....	104
Table S1. Cell yield, viability and senescence after amplification in spinner flask according to the type of MC and the ASC donor.	108
Table S2. Flow cytometry analysis of expression of positive cell surface markers (CD73, CD90, and CD105) of ASC cultured in spinner Flasks, according to the MC and the cell donor.....	109
Article 2	
Table 1. Characterization of surface physico-chemical characteristics	129
Table S1. Assessment of bactericidal properties of nanostructured Ti surfaces.....	148
Table S2. AFM surface roughness analysis of polished, Two-tier and HTE Ti surfaces	151
Partie III : Impact des conditions de culture d'ASC sur la production de vésicules extracellulaires (EV)	
Tableau 10 : Quantité de protéines présentes et pureté des échantillons d'EV isolées suite à la culture d'ASC sur microporteurs Enhanced attachment.....	161

Listes des abréviations

AFM : microscopie de force atomique	DMSO : diméthylsulfoxyde
AF4 : asymmetric flow field-flow fractionation	EBL : electron beam lithography
ALP : phosphatase alcaline	EFS : établissement français du sang
APS : persulfate d'ammonium	EGM-2MV : endothelial growth medium-2 microvascular
ASC : cellules souches mésenchymateuses issues de tissu adipeux	ERK : extracellular signal-regulated kinase
ArfGAP : ADP-ribosylation factor GTPase-activating protein	ES : cellules souches embryonnaires
ATF : alternating tangential flow	ESCRT : endosomal sorting complex required for transport
AVC : accident vasculaire cérébral	EV : vésicule extracellulaire
α -MEM : alpha modified eagle medium	FAAS : focal adhesion analysis server
α -SMA : alpha smooth muscle actin	FDA : food and drug administration
BAL : foie bioartificiel	FGF : fibroblast growth factor
BMP : bone morphogenic protein	FOXA2 : forkhead box protein A2
BMSC : cellules souches mésenchymateuses de la moelle osseuse	FN : fibronectine
BPF : bonnes pratiques de fabrication (GMP)	GAG : glycosaminoglycane
BSA : albumine sérique bovine	G-CSF : granulocyte-colony stimulating factor
CD : cluster de différenciation	GFOGER : glycine-phenylalanine-hydroxyproline-glycine-glutamate-arginine
CE : cellules endothéliales	GPTMS : (3-Glycidoxypropyl)trimethoxysilane
CHO : chinese hamster ovary	GPX1 : glutathion peroxidase1
CLSM : confocal laser scanning microscopy	GRO : growth related oncogene
CS : cellules souches	GSH : glutathion réduit
CSH : cellules souches hématopoïétiques	GSK3 : glycogen synthase kinase-3
CSM : cellules souches mésenchymateuses	GvHD : maladie du greffon contre l'hôte
DAT : tissus adipeux décellularisés	GvT : graft versus tumor effect
DEAE : diéthylaminoéthyle	HAP : hydroxyapatite
DMEM : dulbecco's modified eagle medium	HGF : hepatocyte growth factor
DMLA : dégénérescence maculaire liée à l'âge	HIF : hypoxia-inducible factor
DMLS : direct metal laser sintering	HPM : hydroxypropylmethacrylate

HTE : hydrothermally etched	NMR : Nuclear magnetic resonance spectroscopy
hUCBP : plasma sanguin de cordon ombilical humain	NTA : nanoparticle tracking analysis
ICAM : intercellular adhesion molecule	OGP : osteogenic growth peptide
IDO : indoleamine 2,3-dioxygenase	PAA : acide polyacrylique
IFN- γ : interféron gamma	PAAm : polyacrylamide
IGF-1 : insulin-like growth factor-1	PAO : plasma amine oxydase
IKVAV : isoleucine-lysine-valine-alanine-valine	PAT : process analytical technology
IL : interleukine	PBMC : cellules mononuclées de sang périphérique
ILV : vésicule intraluminale	PDGF : platelet-derived growth factor
iPS : cellules souches pluripotentes induites	PDMS : polydiméthylsiloxane
ISCT : société internationale pour la thérapie cellulaire	PEG : poly-éthylène-glycol
LP : lysat plaquettaire	PFD : perfluorodécane
LPS : lipopolysaccharide	PGE2 : prostaglandine E2
MAP : mytogen-activated protein	PHEMA : polyhydroxyethylmethacrylate
MC : microcarrier	PI3K : phosphatidylinositol 3-kinase
MCI : masse cellulaire interne	PLA : polylactide
MCP-1 : monocyte chemoattractant protein 1	PLC : poly- ϵ -caprolactone
MDC : macrophage-derived chemokine	PLG : polyglycolide
MEC : matrice extracellulaire	PLGA : poly(lactide-co-glycolide)
MIP-1 α : Macrophage inflammatory protein alpha	PLL : poly-L-lysine
miRNA : micro-ARN	PMA : procréation médicalement assistée
MRSA : staphylococcus aureus résistante à la méticilline	PMMA : Poly(methyl methacrylate)
MTT : 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl) -2,5-diphenyl tetrazolium bromide	pNIPAAm : poly-n-isopropylacrylamide
MVE : corps multivésiculaire	PFA : paraformaldehyde
NF- κ B : nuclear factor-kappa B	PVA : alcool polyvinylique
NGS : séquençage nouvelle génération	RhoA : ras homolog family member A
NIR : near-infra-red	RIE : reactive ion etching
NLRP3 : NOD-like receptor family, pyrin domain containing 3	ROCK : rho-associated protein kinase
	ROS : espèces réactives de l'oxygène
	RGD : arginine-glycine-acide aspartique
	RPM : rotations par minute

SDF-1 : stromal cell-derived factor 1	SVF : sérum de veau fœtal
SDS : sodium dodecyl sulfate	TBS : tampon salin tris
SEM : scanning electron microscopy	TC : thérapie cellulaire
SiRNA : petit ARN interférant	TCPS : tissue culture polystyrene
SLA : sandblasted, large grit, acid etching	TEM : microscopie électronique à transmission
SH : serum humain	TEMED : Tétraméthyléthylènediamine
SSEA : stage specific embryonic antigen	TEOS : Tetraethoxysilane
TFF : tangential flow filtration	VEGF : vascular endothelial growth factor
TFF3: trefoil factor 3	WCA : water contact angle
TGF- β : transforming growth factor beta	YIGSR : tyrosine-isoleucine-glycine-serine-arginine
TMOS : Tetramethoxysilane	

Bibliographie

- [1] Buzhor E, Leshansky L, Blumenthal J, Barash H, Warshawsky D, Mazor Y and Shtrichman R 2014 Cell-based therapy approaches: the hope for incurable diseases *Regenerative Medicine* **9** 649–72
- [2] Wang Y, Huso D L, Harrington J, Kellner J, Jeong D K, Turney J and McNiece I K 2005 Outgrowth of a transformed cell population derived from normal human BM mesenchymal stem cell culture *Cytotherapy* **7** 509–19
- [3] Arrighi N 2018 Stem Cells at the Core of Cell Therapy *Stem Cells* (Elsevier) pp 73–100
- [4] Kidd S, Spaeth E, Dembinski J L, Dietrich M, Watson K, Klopp A, Battula V L, Weil M, Andreeff M and Marini F C 2009 Direct Evidence of Mesenchymal Stem Cell Tropism for Tumor and Wounding Microenvironments Using In Vivo Bioluminescent Imaging *Stem Cells* **27** 2614–23
- [5] Chulpanova D S, Kitaeva K V, Tazetdinova L G, James V, Rizvanov A A and Solovyeva V V 2018 Application of Mesenchymal Stem Cells for Therapeutic Agent Delivery in Anti-tumor Treatment *Front. Pharmacol.* **9** 259
- [6] Tuthill M and Hatzimichael 2010 Hematopoietic stem cell transplantation *SCCA* 105
- [7] de Miguel-Berriain I 2015 The ethics of stem cells revisited *Advanced Drug Delivery Reviews* **82–83** 176–80
- [8] Yu J and Thomson J A 2006 1. EMBRYONIC STEM CELLS *Embryonic Stem Cells* 12
- [9] Tandis V and J F W 2010 Human embryonic stem cells: Derivation, culture, and differentiation: A review *Restorative Neurology and Neuroscience* 589–603
- [10] Turetsky T, Aizenman E, Gil Y, Weinberg N, Shufaro Y, Revel A, Laufer N, Simon A, Abeliovich D and Reubinoff B E 2007 Laser-assisted derivation of human embryonic stem cell lines from IVF embryos after preimplantation genetic diagnosis *Human Reproduction* **23** 46–53
- [11] Rodin S, Antonsson L, Niaudet C, Simonson O E, Salmela E, Hansson E M, Domogatskaya A, Xiao Z, Damdimopoulou P, Sheikhi M, Inzunza J, Nilsson A-S, Baker D, Kuiper R, Sun Y, Blennow E, Nordenskjöld M, Grinnemo K-H, Kere J, Betsholtz C, Hovatta O and Tryggvason K 2014 Clonal culturing of human embryonic stem cells on laminin-521/E-cadherin matrix in defined and xeno-free environment *Nat Commun* **5** 3195
- [12] Bai Q, Desprat R, Klein B, Lemaître J-M and De Vos J 2013 Embryonic stem cells or induced pluripotent stem cells? A DNA integrity perspective *Curr Gene Ther* **13** 93–8
- [13] Murry C E and Keller G 2008 Differentiation of Embryonic Stem Cells to Clinically Relevant Populations: Lessons from Embryonic Development *Cell* **132** 661–80
- [14] Wang L and Chen Y-G 2016 Signaling Control of Differentiation of Embryonic Stem Cells toward Mesendoderm *Journal of Molecular Biology* **428** 1409–22
- [15] Reubinoff B E, Pera M F, Fong C-Y, Trounson A and Bongso A 2000 Embryonic stem cell lines from human blastocysts: somatic differentiation in vitro *Nat Biotechnol* **18** 399–404

- [16] Ilic D and Ogilvie C 2017 Concise Review: Human Embryonic Stem Cells-What Have We Done? What Are We Doing? Where Are We Going?: hESC: Past, Present and Future *Stem Cells* **35** 17–25
- [17] Agulnick A D, Ambruzs D M, Moorman M A, Bhoumik A, Cesario R M, Payne J K, Kelly J R, Haakmeester C, Srijemac R, Wilson A Z, Kerr J, Frazier M A, Kroon E J and D'Amour K A 2015 Insulin-Producing Endocrine Cells Differentiated In Vitro From Human Embryonic Stem Cells Function in Macroencapsulation Devices In Vivo: Insulin-Producing Endocrine Cells From hESCs *STEM CELLS Translational Medicine* **4** 1214–22
- [18] Takahashi K and Yamanaka S 2006 Induction of Pluripotent Stem Cells from Mouse Embryonic and Adult Fibroblast Cultures by Defined Factors *Cell* **126** 663–76
- [19] Takahashi K, Tanabe K, Ohnuki M, Narita M, Ichisaka T, Tomoda K and Yamanaka S 2007 Induction of Pluripotent Stem Cells from Adult Human Fibroblasts by Defined Factors *Cell* **131** 861–72
- [20] Hirschi K K, Li S and Roy K 2014 Induced pluripotent stem cells for regenerative medicine *Annu Rev Biomed Eng* **16** 277–94
- [21] Singh V K, Kalsan M, Kumar N, Saini A and Chandra R 2015 Induced pluripotent stem cells: applications in regenerative medicine, disease modeling, and drug discovery *Front. Cell Dev. Biol.* **3**
- [22] Mandai M, Kurimoto Y and Takahashi M 2017 Autologous Induced Stem-Cell-Derived Retinal Cells for Macular Degeneration *N. Engl. J. Med.* **377** 792–3
- [23] Bragança J, Lopes J A, Mendes-Silva L and Almeida Santos J M 2019 Induced pluripotent stem cells, a giant leap for mankind therapeutic applications *World J Stem Cells* **11** 421–30
- [24] Robinton D A and Daley G Q 2012 The promise of induced pluripotent stem cells in research and therapy *Nature* **481** 295–305
- [25] Okita K, Ichisaka T and Yamanaka S 2007 Generation of germline-competent induced pluripotent stem cells *Nature* **448** 313–7
- [26] Kavyasudha C, Macrin D, ArulJothi K N, Joseph J P, Harishankar M K and Devi A 2018 Clinical Applications of Induced Pluripotent Stem Cells – Stato Attuale *Cell Biology and Translational Medicine, Volume 1* vol 1079, ed K Turksen (Cham: Springer International Publishing) pp 127–49
- [27] Li Y, Zhang Q, Yin X, Yang W, Du Y, Hou P, Ge J, Liu C, Zhang W, Zhang X, Wu Y, Li H, Liu K, Wu C, Song Z, Zhao Y, Shi Y and Deng H 2011 Generation of iPSCs from mouse fibroblasts with a single gene, Oct4, and small molecules *Cell Res* **21** 196–204
- [28] Moad M, Pal D, Hepburn A C, Williamson S C, Wilson L, Lako M, Armstrong L, Hayward S W, Franco O E, Cates J M, Fordham S E, Przyborski S, Carr-Wilkinson J, Robson C N and Heer R 2013 A Novel Model of Urinary Tract Differentiation, Tissue Regeneration, and Disease: Reprogramming Human Prostate and Bladder Cells into Induced Pluripotent Stem Cells *European Urology* **64** 753–61
- [29] Kang L, Wang J, Zhang Y, Kou Z and Gao S 2009 iPS cells can support full-term development of tetraploid blastocyst-complemented embryos *Cell Stem Cell* **5** 135–8

- [30] Bryder D, Rossi D J and Weissman I L 2006 Hematopoietic Stem Cells *The American Journal of Pathology* **169** 338–46
- [31] Mosaad Y M 2014 Hematopoietic stem cells: An overview *Transfusion and Apheresis Science* **51** 68–82
- [32] Yu V W C and Scadden D T 2016 Hematopoietic Stem Cell and Its Bone Marrow Niche *Current Topics in Developmental Biology* vol 118 (Elsevier) pp 21–44
- [33] Perlin J R, Sporrij A and Zon L I 2017 Blood on the tracks: hematopoietic stem cell-endothelial cell interactions in homing and engraftment *J Mol Med* **95** 809–19
- [34] Barriga F, Rojas N and Wietstruck A 2013 Alternative Donor Sources for Hematopoietic Stem Cell Transplantation *Innovations in Stem Cell Transplantation* ed T Demirer (InTech)
- [35] Vogelsang G B 2001 How I treat chronic graft-versus-host disease *Blood* **97** 1196–201
- [36] Barkholt L, Bregni M, Remberger M, Blaise D, Peccatori J, Massenkeil G, Pedrazzoli P, Zambelli A, Bay J-O, Francois S, Martino R, Bengala C, Brune M, Lenhoff S, Porcellini A, Falda M, Siena S, Demirer T, Niederwieser D and Ringdén O 2006 Allogeneic haematopoietic stem cell transplantation for metastatic renal carcinoma in Europe *Annals of Oncology* **17** 1134–40
- [37] Childs R, Chernoff A, Contentin N, Bahceci E, Schrupp D, Leitman S, Read E J, Tisdale J, Dunbar C, Linehan W M, Young N S, Clave E, Epperson D, Mayo V and Barrett A J 2000 Regression of Metastatic Renal-Cell Carcinoma after Nonmyeloablative Allogeneic Peripheral-Blood Stem-Cell Transplantation *N Engl J Med* **343** 750–8
- [38] Wysoczynski M, Reza R, Ratajczak J, Kucia M, Shirvaikar N, Honczarenko M, Mills M, Wanzeck J, Janowska-Wieczorek A and Ratajczak M Z 2005 Incorporation of CXCR4 into membrane lipid rafts primes homing-related responses of hematopoietic stem/progenitor cells to an SDF-1 gradient *Blood* **105** 40–8
- [39] Mafi R 2011 Sources of Adult Mesenchymal Stem Cells Applicable for Musculoskeletal Applications - A Systematic Review of the Literature *TOORHTJ* **5** 242–8
- [40] Dominici M, Le Blanc K, Mueller I, Slaper-Cortenbach I, Marini F C, Krause D S, Deans R J, Keating A, Prockop D J and Horwitz E M 2006 Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement *Cytotherapy* **8** 315–7
- [41] Sharma R R, Pollock K, Hubel A and McKenna D 2014 Mesenchymal stem or stromal cells: a review of clinical applications and manufacturing practices: MSC Clinical Applications and Manufacturing *Transfusion* **54** 1418–37
- [42] Han Y, Li X, Zhang Y, Han Y, Chang F and Ding J 2019 Mesenchymal Stem Cells for Regenerative Medicine *Cells* **8** 886
- [43] Zhao Q, Ren H and Han Z 2016 Mesenchymal stem cells: Immunomodulatory capability and clinical potential in immune diseases *Journal of Cellular Immunotherapy* **2** 3–20
- [44] Chen K, Wang D, Du W T, Han Z-B, Ren H, Chi Y, Yang S G, Zhu D, Bayard F and Han Z C 2010 Human umbilical cord mesenchymal stem cells hUC-MSCs exert immunosuppressive activities through a PGE2-dependent mechanism *Clinical Immunology* **135** 448–58

- [45] Spaggiari G M, Abdelrazik H, Becchetti F and Moretta L 2009 MSCs inhibit monocyte-derived DC maturation and function by selectively interfering with the generation of immature DCs: central role of MSC-derived prostaglandin E2 *Blood* **113** 6576–83
- [46] Raffaghello L, Bianchi G, Bertolotto M, Montecucco F, Busca A, Dallegri F, Ottonello L and Pistoia V 2008 Human Mesenchymal Stem Cells Inhibit Neutrophil Apoptosis: A Model for Neutrophil Preservation in the Bone Marrow Niche *Stem Cells* **26** 151–62
- [47] Gao S, Mao F, Zhang B, Zhang L, Zhang X, Wang M, Yan Y, Yang T, Zhang J, Zhu W, Qian H and Xu W 2014 Mouse bone marrow-derived mesenchymal stem cells induce macrophage M2 polarization through the nuclear factor- κ B and signal transducer and activator of transcription 3 pathways *Exp Biol Med (Maywood)* **239** 366–75
- [48] Ren G, Zhang L, Zhao X, Xu G, Zhang Y, Roberts A I, Zhao R C and Shi Y 2008 Mesenchymal Stem Cell-Mediated Immunosuppression Occurs via Concerted Action of Chemokines and Nitric Oxide *Cell Stem Cell* **2** 141–50
- [49] Lee R H, Seo M J, Reger R L, Spees J L, Pulin A A, Olson S D and Prockop D J 2006 Multipotent stromal cells from human marrow home to and promote repair of pancreatic islets and renal glomeruli in diabetic NOD/scid mice *Proceedings of the National Academy of Sciences* **103** 17438–43
- [50] Schneider S, Unger M, van Griensven M and Balmayor E R 2017 Adipose-derived mesenchymal stem cells from liposuction and resected fat are feasible sources for regenerative medicine *Eur J Med Res* **22** 17
- [51] Neri S 2019 Genetic Stability of Mesenchymal Stromal Cells for Regenerative Medicine Applications: A Fundamental Biosafety Aspect *IJMS* **20** 2406
- [52] Turinetto V, Vitale E and Giachino C 2016 Senescence in Human Mesenchymal Stem Cells: Functional Changes and Implications in Stem Cell-Based Therapy *IJMS* **17** 1164
- [53] Squillaro T, Peluso G and Galderisi U 2016 Clinical Trials with Mesenchymal Stem Cells: An Update *Cell Transplantation* **25** 829–48
- [54] Ullah I, Subbarao R B and Rho G J 2015 Human mesenchymal stem cells - current trends and future prospective *Bioscience Reports* **35** 1–18
- [55] Kim D H, Lee D, Lim H, Choi S J, Oh W, Yang Y S, Chang J H and Jeon H B 2018 Effect of growth differentiation factor-15 secreted by human umbilical cord blood-derived mesenchymal stem cells on amyloid beta levels in in vitro and in vivo models of Alzheimer's disease *Biochemical and Biophysical Research Communications* **504** 933–40
- [56] Krueger T E G, Thorek D L J, Denmeade S R, Isaacs J T and Brennen W N 2018 Concise Review: Mesenchymal Stem Cell-Based Drug Delivery: The Good, the Bad, the Ugly, and the Promise: MSC-Based Drug Delivery: Good, Bad, Ugly, & Promise *STEM CELLS Translational Medicine* **7** 651–63
- [57] Tavassoli H, Alhosseini S N, Tay A, Chan P P Y, Weng Oh S K and Warkiani M E 2018 Large-scale production of stem cells utilizing microcarriers: A biomaterials engineering perspective from academic research to commercialized products *Biomaterials* **181** 333–46

- [58] Zhang Y-H P, Sun J and Ma Y 2017 Biomanufacturing: history and perspective *J Ind Microbiol Biotechnol* **44** 773–84
- [59] Carvalho L S, Silva O B da, Almeida G C da, Oliveira J D de, Parachin N S and Carmo T S 2017 Production Processes for Monoclonal Antibodies *Fermentation Processes* ed A F Jozala (InTech)
- [60] Wang D, Liu W, Han B and Xu R 2005 The Bioreactor: A Powerful Tool for Large-Scale Culture of Animal Cells *CPB* **6** 397–403
- [61] Li F, Vijayasankaran N, Shen A (Yijuan), Kiss R and Amanullah A 2010 Cell culture processes for monoclonal antibody production *mAbs* **2** 466–79
- [62] Fischer S, Handrick R and Otte K 2015 The art of CHO cell engineering: A comprehensive retrospect and future perspectives *Biotechnology Advances* **33** 1878–96
- [63] Gallo–Ramírez L E, Nikolay A, Genzel Y and Reichl U 2015 Bioreactor concepts for cell culture-based viral vaccine production *Expert Review of Vaccines* **14** 1181–95
- [64] Lourenço N D, Lopes J A, Almeida C F, Sarraguça M C and Pinheiro H M 2012 Bioreactor monitoring with spectroscopy and chemometrics: a review *Anal Bioanal Chem* **404** 1211–37
- [65] Bielser J-M, Wolf M, Souquet J, Broly H and Morbidelli M 2018 Perfusion mammalian cell culture for recombinant protein manufacturing – A critical review *10.1016/j.biotechadv.2018.04.011* **36** 1328–40
- [66] Bausch M, Schultheiss C and Sieck J B 2019 Recommendations for Comparison of Productivity Between Fed-Batch and Perfusion Processes *Biotechnol. J.* **14** 1700721
- [67] Bunnak P, Allmendinger R, Ramasamy S V, Lettieri P and Titchener-Hooker N J 2016 Life-cycle and cost of goods assessment of fed-batch and perfusion-based manufacturing processes for mAbs *Biotechnol Progress* **32** 1324–35
- [68] Junne S and Neubauer P 2018 How scalable and suitable are single-use bioreactors? *Current Opinion in Biotechnology* **53** 240–7
- [69] Shukla A A and Gottschalk U 2013 Single-use disposable technologies for biopharmaceutical manufacturing *Trends in Biotechnology* **31** 147–54
- [70] van Wezel A L 1967 Growth of cell-strains and primary cells on micro-carriers in homogeneous culture *Nature* **216** 64–5
- [71] van der Velden-de Groot C A M 1995 Microcarrier technology, present status and perspective *Cytotechnology* **18** 51–6
- [72] Chen X-Y, Chen J-Y, Tong X-M, Mei J-G, Chen Y-F and Mou X-Z 2020 Recent advances in the use of microcarriers for cell cultures and their ex vivo and in vivo applications *Biotechnol Lett* **42** 1–10
- [73] Pilarek M, Grabowska I, Ciemerych M A, Dąbkowska K and Szewczyk K W 2013 Morphology and growth of mammalian cells in a liquid/liquid culture system supported with oxygenated perfluorodecalin *Biotechnol Lett* **35** 1387–94

- [74] Hanga M P, Murasiewicz H, Pacek A W, Nienow A W, Coopman K and Hewitt C J 2017 Expansion of bone marrow-derived human mesenchymal stem/stromal cells (hMSCs) using a two-phase liquid/liquid system: Expansion of bone marrow-derived human mesenchymal stem/stromal cells *J. Chem. Technol. Biotechnol* **92** 1577–89
- [75] Hassanzade S M, Zavareh A, Shokrgozar M A, Ramezani A and Fayaz A 2011 High Vero Cell Density and Rabies Virus Proliferation on Fibracel Disks Versus Cytodex-1 in Spinner Flask *Pakistan J. of Biological Sciences* **14** 441–8
- [76] Chen A K-L, Chen X, Choo A B H, Reuveny S and Oh S K W 2011 Critical microcarrier properties affecting the expansion of undifferentiated human embryonic stem cells *Stem Cell Research* **7** 97–111
- [77] Witkowska-Zimny M and Walenko K 2011 Stem cells from adipose tissue *Cellular and Molecular Biology Letters* **16**
- [78] Cai J, Miao X, Li Y, Smith C, Tsang K, Cheng L and Wang Q 2014 Whole-Genome Sequencing Identifies Genetic Variances in Culture-Expanded Human Mesenchymal Stem Cells *Stem Cell Reports* **3** 227–33
- [79] Mendicino M, Bailey A M, Wonnacott K, Puri R K and Bauer S R 2014 MSC-Based Product Characterization for Clinical Trials: An FDA Perspective *Cell Stem Cell* **14** 141–5
- [80] Crapnell K, Blaesius R, Hastings A, Lennon D P, Caplan A I and Bruder S P 2013 Growth, differentiation capacity, and function of mesenchymal stem cells expanded in serum-free medium developed via combinatorial screening *Experimental Cell Research* **319** 1409–18
- [81] Gottipamula S, Muttigi M S, Chaansa S, Ashwin K M, Priya N, Kolkundkar U, Sundar Raj S, Majumdar A S and Seetharam R N 2016 Large-scale expansion of pre-isolated bone marrow mesenchymal stromal cells in serum-free conditions: Serum-free culture of pre-isolated MSCs *Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine* **10** 108–19
- [82] Al-Saqi S H, Saliem M, Asikainen S, Quezada H C, Ekblad Å, Hovatta O, Le Blanc K, Jonasson A F and Götherström C 2014 Defined serum-free media for in vitro expansion of adipose-derived mesenchymal stem cells *Cytotherapy* **16** 915–26
- [83] Gerby S, Attebi E, Vlaski M and Ivanovic Z 2017 A new clinical-scale serum-free xeno-free medium efficient in ex vivo amplification of mesenchymal stromal cells does not support mesenchymal stem cells: MSCs IN SERUM-FREE MEDIUM *Transfusion* **57** 433–9
- [84] Strioga M, Viswanathan S, Darinskas A, Slaby O and Michalek J 2012 Same or Not the Same? Comparison of Adipose Tissue-Derived Versus Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stem and Stromal Cells *Stem Cells and Development* **21** 2724–52
- [85] Fernandez-Rebollo E, Mentrup B, Ebert R, Franzen J, Abagnale G, Sieben T, Ostrowska A, Hoffmann P, Roux P-F, Rath B, Goodhardt M, Lemaitre J-M, Bischof O, Jakob F and Wagner W 2017 Human Platelet Lysate versus Fetal Calf Serum: These Supplements Do Not Select for Different Mesenchymal Stromal Cells *Sci Rep* **7** 5132
- [86] Fekete N, Rojewski M T, Lotfi R and Schrezenmeier H 2014 Essential Components for Ex Vivo Proliferation of Mesenchymal Stromal Cells *Tissue Engineering Part C: Methods* **20** 129–39

- [87] Tozetti P A, Caruso S R, Mizukami A, Fernandes T R, da Silva F B, Traina F, Covas D T, Orellana M D and Swiech K 2017 Expansion strategies for human mesenchymal stromal cells culture under xeno-free conditions *Biotechnol Progress* **33** 1358–67
- [88] Caseiro A R, Ivanova G, Pedrosa S S, Branquinho M V, Georgieva P, Barbosa P P, Santos J D, Magalhães R, Teixeira P, Pereira T and Maurício A C 2018 Human umbilical cord blood plasma as an alternative to animal sera for mesenchymal stromal cells in vitro expansion – A multicomponent metabolomic analysis ed Z Ivanovic *PLOS ONE* **13** e0203936
- [89] Hemedá H, Giebel B and Wagner W 2014 Evaluation of human platelet lysate versus fetal bovine serum for culture of mesenchymal stromal cells *Cytotherapy* **16** 170–80
- [90] Abdelrazik H, Spaggiari G M, Chiossone L and Moretta L 2011 Mesenchymal stem cells expanded in human platelet lysate display a decreased inhibitory capacity on T- and NK-cell proliferation and function *Eur. J. Immunol.* **41** 3281–90
- [91] Becherucci V, Piccini L, Casamassima S, Bisin S, Gori V, Gentile F, Ceccantini R, De Rienzo E, Bindi B, Pavan P, Cunial V, Allegro E, Ermini S, Brugnolo F, Astori G and Bambi F 2018 Human platelet lysate in mesenchymal stromal cell expansion according to a GMP grade protocol: a cell factory experience *Stem Cell Res Ther* **9** 124
- [92] dos Santos V T M, Mizukami A, Orellana M D, Caruso S R, da Silva F B, Traina F, de Lima Prata K, Covas D T and Swiech K 2017 Characterization of Human AB Serum for Mesenchymal Stromal Cell Expansion *Transfus Med Hemother* **44** 11–21
- [93] Ding Y, Yang H, Feng J B, Qiu Y, Li D S and Zeng Y 2013 Human umbilical cord-derived MSC culture: the replacement of animal sera with human cord blood plasma *In Vitro Cell.Dev.Biol.-Animal* **49** 771–7
- [94] Schop D, van Dijkhuizen-Radersma R, Borgart E, Janssen F W, Rozemuller H, Prins H-J and de Bruijn J D 2010 Expansion of human mesenchymal stromal cells on microcarriers: growth and metabolism *Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine* **4** 131–40
- [95] Rafiq Q A, Coopman K, Nienow A W and Hewitt C J 2016 Systematic microcarrier screening and agitated culture conditions improves human mesenchymal stem cell yield in bioreactors *Biotechnology Journal* **11** 473–86
- [96] Jhala D and Vasita R 2015 A Review on Extracellular Matrix Mimicking Strategies for an Artificial Stem Cell Niche *Polymer Reviews* **55** 561–95
- [97] Cha C, Liechty W B, Khademhosseini A and Peppas N A 2012 Designing Biomaterials To Direct Stem Cell Fate *ACS Nano* **6** 9353–8
- [98] Bertolo A, Arcolino F, Capossela S, Taddei A R, Baur M, Pötzel T and Stoyanov J 2015 Growth Factors Cross-Linked to Collagen Microcarriers Promote Expansion and Chondrogenic Differentiation of Human Mesenchymal Stem Cells *Tissue Engineering Part A* **21** 2618–28
- [99] Michel J, Penna M, Kochen J and Cheung H 2015 Recent Advances in Hydroxyapatite Scaffolds Containing Mesenchymal Stem Cells *Stem Cells International* **2015** 1–13
- [100] Engler A J, Sen S, Sweeney H L and Discher D E 2006 Matrix Elasticity Directs Stem Cell Lineage Specification *Cell* **126** 677–89

- [101] Hwang J-H, Byun M R, Kim A R, Kim K M, Cho H J, Lee Y H, Kim J, Jeong M G, Hwang E S and Hong J-H 2015 Extracellular Matrix Stiffness Regulates Osteogenic Differentiation through MAPK Activation ed A J Engler *PLoS ONE* **10** e0135519
- [102] Yang C, Tibbitt M W, Basta L and Anseth K S 2014 Mechanical memory and dosing influence stem cell fate *Nature Materials* **13** 645–52
- [103] Schellenberg A, Joussem S, Moser K, Hampe N, Hersch N, Hemeda H, Schnitker J, Denecke B, Lin Q, Pallua N, Zenke M, Merkel R, Hoffmann B and Wagner W 2014 Matrix elasticity, replicative senescence and DNA methylation patterns of mesenchymal stem cells *Biomaterials* **35** 6351–8
- [104] Olivares-Navarrete R, Lee E M, Smith K, Hyzy S L, Doroudi M, Williams J K, Gall K, Boyan B D and Schwartz Z 2017 Substrate Stiffness Controls Osteoblastic and Chondrocytic Differentiation of Mesenchymal Stem Cells without Exogenous Stimuli ed A van Wijnen *PLoS ONE* **12** e0170312
- [105] Huebsch N, Lippens E, Lee K, Mehta M, Koshy S T, Darnell M C, Desai R M, Madl C M, Xu M, Zhao X, Chaudhuri O, Verbeke C, Kim W S, Alim K, Mammoto A, Ingber D E, Duda G N and Mooney D J 2015 Matrix elasticity of void-forming hydrogels controls transplanted-stem-cell-mediated bone formation *Nature Materials* **14** 1269–77
- [106] Haugh M G, Vaughan T J, Madl C M, Raftery R M, McNamara L M, O'Brien F J and Heilshorn S C 2018 Investigating the interplay between substrate stiffness and ligand chemistry in directing mesenchymal stem cell differentiation within 3D macro-porous substrates *Biomaterials* **171** 23–33
- [107] Darnell M, Gu L and Mooney D 2018 RNA-seq reveals diverse effects of substrate stiffness on mesenchymal stem cells *Biomaterials* **181** 182–8
- [108] Gilbert T, Sellaro T and Badylak S 2006 Decellularization of tissues and organs *Biomaterials*
- [109] Brown B N, Freund J M, Han L, Rubin J P, Reing J E, Jeffries E M, Wolf M T, Tottey S, Barnes C A, Ratner B D and Badylak S F 2011 Comparison of Three Methods for the Derivation of a Biologic Scaffold Composed of Adipose Tissue Extracellular Matrix *Tissue Engineering Part C: Methods* **17** 411–21
- [110] Turner A E B, Yu C, Bianco J, Watkins J F and Flynn L E 2012 The performance of decellularized adipose tissue microcarriers as an inductive substrate for human adipose-derived stem cells *Biomaterials* **33** 4490–9
- [111] Yu C, Kornmuller A, Brown C, Hoare T and Flynn L E 2017 Decellularized adipose tissue microcarriers as a dynamic culture platform for human adipose-derived stem/stromal cell expansion *Biomaterials* **120** 66–80
- [112] Löffelholz S, Löffelholz C, Werner S and Eibl D 2011 CFD for Characterizing Standard and Single-use Stirred Cell Culture Bioreactors *Computational Fluid Dynamics Technologies and Applications* ed O Minin (InTech)
- [113] Ponnuru K, Wu J, Ashok P, Tzanakakis E and Furlani E 2014 Analysis of stem cell culture performance in a microcarrier bioreactor system *Technical Proceedings of the 2014 NSTI Nanotechnology Conference and Expo, NSTI-Nanotech 2014* **2** 132–5

- [114] Lu J, Fan Y, Gong X, Zhou X, Yi C, Zhang Y and Pan J 2016 The Lineage Specification of Mesenchymal Stem Cells Is Directed by the Rate of Fluid Shear Stress: THE MECHANOSENSITIVITY OF MESENCHYMAL STEM CELLS *J. Cell. Physiol.* **231** 1752–60
- [115] Ma T, Tsai A-C and Liu Y 2016 Biomanufacturing of human mesenchymal stem cells in cell therapy: Influence of microenvironment on scalable expansion in bioreactors *Biochemical Engineering Journal* **108** 44–50
- [116] Mohyeldin A, Garzón-Muvdi T and Quiñones-Hinojosa A 2010 Oxygen in Stem Cell Biology: A Critical Component of the Stem Cell Niche *Cell Stem Cell* **7** 150–61
- [117] Lennon D P, Edmison J M and Caplan A I 2001 Cultivation of rat marrow-derived mesenchymal stem cells in reduced oxygen tension: Effects on in vitro and in vivo osteochondrogenesis *Journal of Cellular Physiology* **187** 345–55
- [118] Volkmer E, Kallukalam B C, Maertz J, Otto S, Drosse I, Polzer H, Bocker W, Stengele M, Docheva D, Mutschler W and Schieker M 2010 Hypoxic Preconditioning of Human Mesenchymal Stem Cells Overcomes Hypoxia-Induced Inhibition of Osteogenic Differentiation *Tissue Engineering Part A* **16** 153–64
- [119] Gómez-Leduc T, Desancé M, Hervieu M, Legendre F, Ollitrault D, de Vienne C, Herlicoviez M, Galéra P and Demoor M 2017 Hypoxia Is a Critical Parameter for Chondrogenic Differentiation of Human Umbilical Cord Blood Mesenchymal Stem Cells in Type I/III Collagen Sponges *IJMS* **18** 1933
- [120] Kheirandish M, Gavvani S P and Samiee S 2017 The effect of hypoxia preconditioning on the neural and stemness genes expression profiling in human umbilical cord blood mesenchymal stem cells *Transfusion and Apheresis Science* **56** 392–9
- [121] Wagegg M, Gaber T, Lohanatha F L, Hahne M, Strehl C, Fangradt M, Tran C L, Schönbeck K, Hoff P, Ode A, Perka C, Duda G N and Buttgereit F 2012 Hypoxia Promotes Osteogenesis but Suppresses Adipogenesis of Human Mesenchymal Stromal Cells in a Hypoxia-Inducible Factor-1 Dependent Manner ed D T Covas *PLoS ONE* **7** e46483
- [122] dos Santos F, Andrade P Z, Boura J S, Abecasis M M, da Silva C L and Cabral J M S 2009 Ex vivo expansion of human mesenchymal stem cells: A more effective cell proliferation kinetics and metabolism under hypoxia *Journal of Cellular Physiology* n/a-n/a
- [123] Martínez V G, Ontoria-Oviedo I, Ricardo C P, Harding S E, Sacedon R, Varas A, Zapata A, Sepulveda P and Vicente A 2017 Overexpression of hypoxia-inducible factor 1 alpha improves immunomodulation by dental mesenchymal stem cells *Stem Cell Res Ther* **8** 208
- [124] Kim Y, Jin H J, Heo J, Ju H, Lee H-Y, Kim S, Lee S, Lim J, Jeong S Y, Kwon J, Kim M, Choi S J, Oh W, Yang Y S, Hwang H H, Yu H Y, Ryu C-M, Jeon H B and Shin D-M 2018 Small hypoxia-primed mesenchymal stem cells attenuate graft-versus-host disease *Leukemia* **32** 2672–84
- [125] Nienow A W, Hewitt C J, Heathman T R J, Glyn V A M, Fonte G N, Hanga M P, Coopman K and Rafiq Q A 2016 Agitation conditions for the culture and detachment of hMSCs from microcarriers in multiple bioreactor platforms *Biochemical Engineering Journal* **108** 24–9
- [126] Schnitzler A C, Verma A, Kehoe D E, Jing D, Murrell J R, Der K A, Aysola M, Rapiejko P J, Punreddy S and Rook M S 2016 Bioprocessing of human mesenchymal stem/stromal cells for

- therapeutic use: Current technologies and challenges *Biochemical Engineering Journal* **108** 3–13
- [127] Cha Y and Pitt C G 1990 The biodegradability of polyester blends *Biomaterials* **11** 108–12
- [128] Sinha V R, Bansal K, Kaushik R, Kumria R and Trehan A 2004 Poly- ϵ -caprolactone microspheres and nanospheres: an overview *International Journal of Pharmaceutics* **278** 1–23
- [129] Shekaran A, Lam A, Sim E, Jialing L, Jian L, Wen J T P, Chan J K Y, Choolani M, Reuveny S, Birch W and Oh S 2016 Biodegradable ECM-coated PCL microcarriers support scalable human early MSC expansion and in vivo bone formation *Cytotherapy* **18** 1332–44
- [130] Li J, Lam A T-L, Toh J P W, Reuveny S, Oh S K-W and Birch W R 2017 Tunable Volumetric Density and Porous Structure of Spherical Poly- ϵ -caprolactone Microcarriers, as Applied in Human Mesenchymal Stem Cell Expansion *Langmuir* **33** 3068–79
- [131] Lam A T-L, Li J, Toh J P-W, Sim E J-H, Chen A K-L, Chan J K-Y, Choolani M, Reuveny S, Birch W R and Oh S K-W 2017 Biodegradable poly- ϵ -caprolactone microcarriers for efficient production of human mesenchymal stromal cells and secreted cytokines in batch and fed-batch bioreactors *Cytotherapy* **19** 419–32
- [132] Lam A T-L, Sim E J-H, Shekaran A, Li J, Teo K-L, Goggi J L, Reuveny S, Birch W R and Oh S K-W 2019 Sub-confluent culture of human mesenchymal stromal cells on biodegradable polycaprolactone microcarriers enhances bone healing of rat calvarial defect *Cytotherapy* **21** 631–42
- [133] Bouffi C, Thomas O, Bony C, Giteau A, Venier-Julienne M-C, Jorgensen C, Montero-Menei C and Noël D 2010 The role of pharmacologically active microcarriers releasing TGF- β 3 in cartilage formation in vivo by mesenchymal stem cells *Biomaterials* **31** 6485–93
- [134] Morille M, Van-Thanh T, Garric X, Cayon J, Coudane J, Noël D, Venier-Julienne M-C and Montero-Menei C N 2013 New PLGA–P188–PLGA matrix enhances TGF- β 3 release from pharmacologically active microcarriers and promotes chondrogenesis of mesenchymal stem cells *Journal of Controlled Release* **170** 99–110
- [135] Morille M, Toupet K, Montero-Menei C N, Jorgensen C and Noël D 2016 PLGA-based microcarriers induce mesenchymal stem cell chondrogenesis and stimulate cartilage repair in osteoarthritis *Biomaterials* **88** 60–9
- [136] Zhang B-J, Han Z-W, Duan K, Mu Y-D and Weng J 2018 Multilayered pore-closed PLGA microsphere delivering OGP and BMP-2 in sequential release patterns for the facilitation of BMSCs osteogenic differentiation: MULTILAYERED PORE-CLOSED PLGA MICROSPHERE *J. Biomed. Mater. Res.* **106** 95–105
- [137] Gao T, Zhang N, Wang Z, Wang Y, Liu Y, Ito Y and Zhang P 2015 Biodegradable Microcarriers of Poly(Lactide-co-Glycolide) and Nano-Hydroxyapatite Decorated with IGF-1 via Polydopamine Coating for Enhancing Cell Proliferation and Osteogenic Differentiation: Biodegradable Microcarriers of Poly(Lactide-co-Glycolide) ... *Macromolecular Bioscience* **15** 1070–80
- [138] Zhang H, Jiao J and Jin H 2019 Degradable poly-L-lysine-modified PLGA cell microcarriers with excellent antibacterial and osteogenic activity *Artificial Cells, Nanomedicine, and Biotechnology* **47** 2391–404

- [139] Lanzalaco S and Armelin E 2017 Poly(N-isopropylacrylamide) and Copolymers: A Review on Recent Progresses in Biomedical Applications *Gels* **3** 36
- [140] Yang H S, Jeon O, Bhang S H, Lee S-H and Kim B-S 2010 Suspension Culture of Mammalian Cells Using Thermosensitive Microcarrier that Allows Cell Detachment without Proteolytic Enzyme Treatment *Cell Transplantation* **19** 1123–32
- [141] Gümüşderelioğlu M, Çakmak S, Timuçin H Ö and Çakmak A S 2013 Thermosensitive PHEMA microcarriers: ATRP synthesis, characterization, and usabilities in cell cultures *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition* **24** 2110–25
- [142] Çetinkaya G, Kahraman A S, Gümüşderelioğlu M, Arat S and Onur M A 2011 Derivation, characterization and expansion of fetal chondrocytes on different microcarriers *Cytotechnology* **63** 633–43
- [143] Song K, Yang Y, Wu S, Zhang Y, Feng S, Wang H, Wang Y, Wang L and Liu T 2016 In vitro culture and harvest of BMMSCs on the surface of a novel thermosensitive glass microcarrier *Materials Science and Engineering: C* **58** 324–30
- [144] Colombo M, Raposo G and Théry C 2014 Biogenesis, Secretion, and Intercellular Interactions of Exosomes and Other Extracellular Vesicles *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **30** 255–89
- [145] van Niel G, D'Angelo G and Raposo G 2018 Shedding light on the cell biology of extracellular vesicles *Nat Rev Mol Cell Biol* **19** 213–28
- [146] Raposo G and Stoorvogel W 2013 Extracellular vesicles: Exosomes, microvesicles, and friends *The Journal of Cell Biology* **200** 373–83
- [147] Palmulli R and van Niel G 2018 To be or not to be... secreted as exosomes, a balance finely tuned by the mechanisms of biogenesis ed P Stahl and G Raposo *Essays in Biochemistry* **62** 177–91
- [148] Théry C, Amigorena S, Raposo G and Clayton A 2006 Isolation and Characterization of Exosomes from Cell Culture Supernatants and Biological Fluids *Current Protocols in Cell Biology* **30** 3.22.1-3.22.29
- [149] Coumans F A W, Brisson A R, Buzas E I, Dignat-George F, Drees E E E, El-Andaloussi S, Emanuelli C, Gasecka A, Hendrix A, Hill A F, Lacroix R, Lee Y, van Leeuwen T G, Mackman N, Mäger I, Nolan J P, van der Pol E, Pegtel D M, Sahoo S, Siljander P R M, Sturk G, de Wever O and Nieuwland R 2017 Methodological Guidelines to Study Extracellular Vesicles *Circ Res* **120** 1632–48
- [150] Gardiner C, Ferreira Y J, Dragovic R A, Redman C W G and Sargent I L 2013 Extracellular vesicle sizing and enumeration by nanoparticle tracking analysis *Journal of Extracellular Vesicles* **2** 19671
- [151] Rani S, Ryan A E, Griffin M D and Ritter T 2015 Mesenchymal Stem Cell-derived Extracellular Vesicles: Toward Cell-free Therapeutic Applications *Molecular Therapy* **23** 812–23
- [152] Théry C, Witwer K W, Aikawa E, Alcaraz M J, Anderson J D, Andriantsitohaina R, Antoniou A, Arab T, Archer F, Atkin-Smith G K, Ayre D C, Bach J-M, Bachurski D, Baharvand H, Balaj L, Baldacchino S, Bauer N N, Baxter A A, Bebawy M, Beckham C, Bedina Zavec A, Benmoussa A, Berardi A C, Bergese P, Bielska E, Blenkiron C, Bobis-Wozowicz S, Boilard E, Boireau W,

- Bongiovanni A, Borràs F E, Bosch S, Boulanger C M, Breakefield X, Breglio A M, Brennan M Á, Brigstock D R, Brisson A, Broekman M L, Bromberg J F, Bryl-Górecka P, Buch S, Buck A H, Burger D, Busatto S, Buschmann D, Bussolati B, Buzás E I, Byrd J B, Camussi G, Carter D R, Caruso S, Chamley L W, Chang Y-T, Chen C, Chen S, Cheng L, Chin A R, Clayton A, Clerici S P, Cocks A, Cocucci E, Coffey R J, Cordeiro-da-Silva A, Couch Y, Coumans F A, Coyle B, Crescitelli R, Criado M F, D'Souza-Schorey C, Das S, Datta Chaudhuri A, de Candia P, De Santana E F, De Wever O, del Portillo H A, Demaret T, Deville S, Devitt A, Dhondt B, Di Vizio D, Dieterich L C, Dolo V, Dominguez Rubio A P, Dominici M, Dourado M R, Driedonks T A, Duarte F V, Duncan H M, Eichenberger R M, Ekström K, EL Andaloussi S, Elie-Caille C, Erdbrügger U, Falcón-Pérez J M, Fatima F, Fish J E, Flores-Bellver M, et al 2018 Minimal information for studies of extracellular vesicles 2018 (MISEV2018): a position statement of the International Society for Extracellular Vesicles and update of the MISEV2014 guidelines *Journal of Extracellular Vesicles* **7** 1535750
- [153] Lo Cicero A, Stahl P D and Raposo G 2015 Extracellular vesicles shuffling intercellular messages: for good or for bad *Current Opinion in Cell Biology* **35** 69–77
- [154] Hergenreider E, Heydt S, Tréguer K, Boettger T, Horrevoets A J G, Zeiher A M, Scheffer M P, Frangakis A S, Yin X, Mayr M, Braun T, Urbich C, Boon R A and Dimmeler S 2012 Atheroprotective communication between endothelial cells and smooth muscle cells through miRNAs *Nat Cell Biol* **14** 249–56
- [155] Ciullo A, Biemmi V, Milano G, Bolis S, Cervio E, Fertig E T, Gherghiceanu M, Moccetti T, Camici G G, Vassalli G and Barile L 2019 Exosomal Expression of CXCR4 Targets Cardioprotective Vesicles to Myocardial Infarction and Improves Outcome after Systemic Administration *IJMS* **20** 468
- [156] Hu Y, Rao S-S, Wang Z-X, Cao J, Tan Y-J, Luo J, Li H-M, Zhang W-S, Chen C-Y and Xie H 2018 Exosomes from human umbilical cord blood accelerate cutaneous wound healing through miR-21-3p-mediated promotion of angiogenesis and fibroblast function *Theranostics* **8** 169–84
- [157] Costa-Silva B, Aiello N M, Ocean A J, Singh S, Zhang H, Thakur B K, Becker A, Hoshino A, Mark M T, Molina H, Xiang J, Zhang T, Theilen T-M, García-Santos G, Williams C, Ararso Y, Huang Y, Rodrigues G, Shen T-L, Labori K J, Lothe I M B, Kure E H, Hernandez J, Doussot A, Ebbesen S H, Grandgenett P M, Hollingsworth M A, Jain M, Mallya K, Batra S K, Jarnagin W R, Schwartz R E, Matei I, Peinado H, Stanger B Z, Bromberg J and Lyden D 2015 Pancreatic cancer exosomes initiate pre-metastatic niche formation in the liver *Nat Cell Biol* **17** 816–26
- [158] Qin X, Guo H, Wang X, Zhu X, Yan M, Wang X, Xu Q, Shi J, Lu E, Chen W and Zhang J 2019 Exosomal miR-196a derived from cancer-associated fibroblasts confers cisplatin resistance in head and neck cancer through targeting CDKN1B and ING5 *Genome Biol* **20** 12
- [159] Meunier M, Guttin A, Ancelet S, Laurin D, Zannoni J, Lefebvre C, Tondeur S, Persoons V, Pezet M, Pernet-Gallay K, Chuffart F, Rousseaux S, Testard Q, Thevenon J, Jouzier C, Deleuze J-F, Laulagnier K, Sadoul R, Chatellard C, Hainaut P, Polack B, Cahn J-Y, Issartel J-P and Park S 2020 Extracellular vesicles from myelodysplastic mesenchymal stromal cells induce DNA damage and mutagenesis of hematopoietic stem cells through miRNA transfer *Leukemia*
- [160] Li S, Lin Z, Jiang X and Yu X 2018 Exosomal cargo-loading and synthetic exosome-mimics as potential therapeutic tools *Acta Pharmacol Sin* **39** 542–51

- [161] Tian Y, Li S, Song J, Ji T, Zhu M, Anderson G J, Wei J and Nie G 2014 A doxorubicin delivery platform using engineered natural membrane vesicle exosomes for targeted tumor therapy *Biomaterials* **35** 2383–90
- [162] Melzer C, Rehn V, Yang Y, Bähre H, von der Ohe J and Hass R 2019 Taxol-Loaded MSC-Derived Exosomes Provide a Therapeutic Vehicle to Target Metastatic Breast Cancer and Other Carcinoma Cells *Cancers* **11** 798
- [163] Phinney D G and Pittenger M F 2017 Concise Review: MSC-Derived Exosomes for Cell-Free Therapy: MSC-Derived Exosomes *Stem Cells* **35** 851–8
- [164] Börger V, Bremer M, Ferrer-Tur R, Gockeln L, Stambouli O, Becic A and Giebel B 2017 Mesenchymal Stem/Stromal Cell-Derived Extracellular Vesicles and Their Potential as Novel Immunomodulatory Therapeutic Agents *IJMS* **18** 1450
- [165] Reis L A, Borges F T, Simões M J, Borges A A, Sinigaglia-Coimbra R and Schor N 2012 Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stem Cells Repaired but Did Not Prevent Gentamicin-Induced Acute Kidney Injury through Paracrine Effects in Rats ed G Camussi *PLoS ONE* **7** e44092
- [166] Xin H, Wang F, Li Y, Lu Q-E, Cheung W L, Zhang Y, Zhang Z G and Chopp M 2017 Secondary Release of Exosomes from Astrocytes Contributes to the Increase in Neural Plasticity and Improvement of Functional Recovery after Stroke in Rats Treated with Exosomes Harvested from MicroRNA 133b-Overexpressing Multipotent Mesenchymal Stromal Cells *Cell Transplant* **26** 243–57
- [167] Yan Y, Jiang W, Tan Y, Zou S, Zhang H, Mao F, Gong A, Qian H and Xu W 2017 hucMSC Exosome-Derived GPX1 Is Required for the Recovery of Hepatic Oxidant Injury *Mol Ther* **25** 465–79
- [168] Rozier P, Maumus M, Maria A, Jorgensen C, Noël D and Guilpain P 2019 Effet thérapeutique des vésicules extracellulaires isolées de cellules souches mésenchymateuses dans la fibrose sclérodermique : implication potentielle de miR-29a *La Revue de Médecine Interne* **40** A82
- [169] Rahman M J, Regn D, Bashratyan R and Dai Y D 2014 Exosomes Released by Islet-Derived Mesenchymal Stem Cells Trigger Autoimmune Responses in NOD Mice *Diabetes* **63** 1008–20
- [170] Katakowski M, Buller B, Zheng X, Lu Y, Rogers T, Osobamiro O, Shu W, Jiang F and Chopp M 2013 Exosomes from marrow stromal cells expressing miR-146b inhibit glioma growth *Cancer Letters* **335** 201–4
- [171] Roccaro A M, Sacco A, Maiso P, Azab A K, Tai Y-T, Reagan M, Azab F, Flores L M, Campigotto F, Weller E, Anderson K C, Scadden D T and Ghobrial I M 2013 BM mesenchymal stromal cell-derived exosomes facilitate multiple myeloma progression *J. Clin. Invest.* **123** 1542–55
- [172] Zhu W, Huang L, Li Y, Zhang X, Gu J, Yan Y, Xu X, Wang M, Qian H and Xu W 2012 Exosomes derived from human bone marrow mesenchymal stem cells promote tumor growth in vivo *Cancer Letters* **315** 28–37
- [173] Mendt M, Rezvani K and Shpall E 2019 Mesenchymal stem cell-derived exosomes for clinical use *Bone Marrow Transplant* **54** 789–92
- [174] Zhang Y, Chopp M, Zhang Z G, Katakowski M, Xin H, Qu C, Ali M, Mahmood A and Xiong Y 2017 Systemic administration of cell-free exosomes generated by human bone marrow

- derived mesenchymal stem cells cultured under 2D and 3D conditions improves functional recovery in rats after traumatic brain injury *Neurochemistry International* **111** 69–81
- [175] Phan J, Kumar P, Hao D, Gao K, Farmer D and Wang A 2018 Engineering mesenchymal stem cells to improve their exosome efficacy and yield for cell-free therapy *Journal of Extracellular Vesicles* **7** 1522236
- [176] Datta A, Kim H, McGee L, Johnson A E, Talwar S, Marugan J, Southall N, Hu X, Lal M, Mondal D, Ferrer M and Abdel-Mageed A B 2018 High-throughput screening identified selective inhibitors of exosome biogenesis and secretion: A drug repurposing strategy for advanced cancer *Sci Rep* **8** 8161
- [177] Laulagnier K, Grand D, Dujardin A, Hamdi S, Vincent-Schneider H, Lankar D, Salles J-P, Bonnerot C, Perret B and Record M 2004 PLD2 is enriched on exosomes and its activity is correlated to the release of exosomes *FEBS Letters* **572** 11–4
- [178] Joo, Suh, Lee, Bang and Lee 2020 Current Knowledge and Future Perspectives on Mesenchymal Stem Cell-Derived Exosomes as a New Therapeutic Agent *IJMS* **21** 727
- [179] Harting M T, Srivastava A K, Zhaorigetu S, Bair H, Prabhakara K S, Toledano Furman N E, Vykoukal J V, Ruppert K A, Cox C S and Olson S D 2018 Inflammation-Stimulated Mesenchymal Stromal Cell-Derived Extracellular Vesicles Attenuate Inflammation: Stimulated EVs Attenuate Inflammation *Stem Cells* **36** 79–90
- [180] Zhang Q, Fu L, Liang Y, Guo Z, Wang L, Ma C and Wang H 2018 Exosomes originating from MSCs stimulated with TGF- β and IFN- γ promote Treg differentiation *J Cell Physiol* **233** 6832–40
- [181] Cosenza S, Ruiz M, Toupet K, Jorgensen C and Noël D 2017 Mesenchymal stem cells derived exosomes and microparticles protect cartilage and bone from degradation in osteoarthritis *Sci Rep* **7** 16214
- [182] Xu R, Zhang F, Chai R, Zhou W, Hu M, Liu B, Chen X, Liu M, Xu Q, Liu N and Liu S 2019 Exosomes derived from pro-inflammatory bone marrow-derived mesenchymal stem cells reduce inflammation and myocardial injury via mediating macrophage polarization *J Cell Mol Med* **23** 7617–31
- [183] Alzahrani F A 2019 Melatonin improves therapeutic potential of mesenchymal stem cells-derived exosomes against renal ischemia-reperfusion injury in rats *Am J Transl Res* **11** 2887–907
- [184] Ding J, Wang X, Chen B, Zhang J and Xu J 2019 Exosomes Derived from Human Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells Stimulated by Deferoxamine Accelerate Cutaneous Wound Healing by Promoting Angiogenesis *BioMed Research International* **2019** 1–12
- [185] Du W, Zhang K, Zhang S, Wang R, Nie Y, Tao H, Han Z, Liang L, Wang D, Liu J, Liu N, Han Z, Kong D, Zhao Q and Li Z 2017 Enhanced proangiogenic potential of mesenchymal stem cell-derived exosomes stimulated by a nitric oxide releasing polymer *Biomaterials* **133** 70–81
- [186] Bai Y, Han Y, Yan X, Ren J, Zeng Q, Li X, Pei X and Han Y 2018 Adipose mesenchymal stem cell-derived exosomes stimulated by hydrogen peroxide enhanced skin flap recovery in ischemia-reperfusion injury *Biochemical and Biophysical Research Communications* **500** 310–7

- [187] Xue C, Shen Y, Li X, Li B, Zhao S, Gu J, Chen Y, Ma B, Wei J, Han Q and Zhao R C 2018 Exosomes Derived from Hypoxia-Treated Human Adipose Mesenchymal Stem Cells Enhance Angiogenesis Through the PKA Signaling Pathway *Stem Cells and Development* **27** 456–65
- [188] Almeria C, Weiss R, Roy M, Tripisciano C, Kasper C, Weber V and Egger D 2019 Hypoxia Conditioned Mesenchymal Stem Cell-Derived Extracellular Vesicles Induce Increased Vascular Tube Formation in vitro *Front. Bioeng. Biotechnol.* **7** 292
- [189] Cui G-H, Wu J, Mou F-F, Xie W-H, Wang F-B, Wang Q-L, Fang J, Xu Y-W, Dong Y-R, Liu J-R and Guo H-D 2018 Exosomes derived from hypoxia-preconditioned mesenchymal stromal cells ameliorate cognitive decline by rescuing synaptic dysfunction and regulating inflammatory responses in APP/PS1 mice *The FASEB Journal* **32** 654–68
- [190] Yu B, Kim H W, Gong M, Wang J, Millard R W, Wang Y, Ashraf M and Xu M 2015 Exosomes secreted from GATA-4 overexpressing mesenchymal stem cells serve as a reservoir of anti-apoptotic microRNAs for cardioprotection *International Journal of Cardiology* **182** 349–60
- [191] Ma J, Zhao Y, Sun L, Sun X, Zhao X, Sun X, Qian H, Xu W and Zhu W 2017 Exosomes Derived from Akt-Modified Human Umbilical Cord Mesenchymal Stem Cells Improve Cardiac Regeneration and Promote Angiogenesis via Activating Platelet-Derived Growth Factor D *STEM CELLS Translational Medicine* **6** 51–9
- [192] Yuan Z, Kolluri K K, Gowers K H C and Janes S M 2017 TRAIL delivery by MSC-derived extracellular vesicles is an effective anticancer therapy *Journal of Extracellular Vesicles* **6** 1265291
- [193] Lemons J E and Lucas L C 1986 Properties of biomaterials *The Journal of Arthroplasty* **1** 143–7
- [194] Xu Y, Chen C, Hellwarth P B and Bao X 2019 Biomaterials for stem cell engineering and biomanufacturing *Bioactive Materials* **4** 366–79
- [195] Qi C, Yan X, Huang C, Melerzanov A and Du Y 2015 Biomaterials as carrier, barrier and reactor for cell-based regenerative medicine *Protein Cell* **6** 638–53
- [196] Erdoğan N, Akkin S and Bilensoy E 2019 Nanocapsules for Drug Delivery: An Updated Review of the Last Decade *DDF* **12** 252–66
- [197] Jeannot V, Gauche C, Mazzaferro S, Couvet M, Vanwonderghem L, Henry M, Didier C, Voltaire J, Josserand V, Coll J-L, Schatz C, Lecommandoux S and Hurbin A 2018 Anti-tumor efficacy of hyaluronan-based nanoparticles for the co-delivery of drugs in lung cancer *Journal of Controlled Release* **275** 117–28
- [198] Michy, Massias, Bernard, Vanwonderghem, Henry, Guidetti, Royal, Coll, Texier, Josserand and Hurbin 2019 Verteporfin-Loaded Lipid Nanoparticles Improve Ovarian Cancer Photodynamic Therapy In Vitro and In Vivo *Cancers* **11** 1760
- [199] Heath D E and Cooper S L 2017 The development of polymeric biomaterials inspired by the extracellular matrix *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition* **28** 1051–69
- [200] Steward A J and Kelly D J 2015 Mechanical regulation of mesenchymal stem cell differentiation *J. Anat.* **227** 717–31

- [201] Hashemi M and Kalalinia F 2015 Application of encapsulation technology in stem cell therapy *Life Sciences* **143** 139–46
- [202] Won Y-W, Patel A N and Bull D A 2014 Cell surface engineering to enhance mesenchymal stem cell migration toward an SDF-1 gradient *Biomaterials* **35** 5627–35
- [203] Bello Y M, Falabella A F and Eaglstein W H 2001 Tissue-Engineered Skin: Current Status in Wound Healing *American Journal of Clinical Dermatology* **2** 305–13
- [204] Othman Z, Cillero Pastor B, van Rijt S and Habibovic P 2018 Understanding interactions between biomaterials and biological systems using proteomics *Biomaterials* **167** 191–204
- [205] Kaufman-Francis K, Koffler J, Weinberg N, Dor Y and Levenberg S 2012 Engineered Vascular Beds Provide Key Signals to Pancreatic Hormone-Producing Cells ed S Gerecht *PLoS ONE* **7** e40741
- [206] Wang W and Yeung K W K 2017 Bone grafts and biomaterials substitutes for bone defect repair: A review *Bioactive Materials* **2** 224–47
- [207] Spicer P P, Kretlow J D, Young S, Jansen J A, Kasper F K and Mikos A G 2012 Evaluation of bone regeneration using the rat critical size calvarial defect *Nat Protoc* **7** 1918–29
- [208] Bouyer M, Guillot R, Lavaud J, Plettinx C, Olivier C, Curry V, Boutonnat J, Coll J-L, Peyrin F, Josserand V, Bettega G and Picart C 2016 Surface delivery of tunable doses of BMP-2 from an adaptable polymeric scaffold induces volumetric bone regeneration *Biomaterials* **104** 168–81
- [209] Sampson S, Gerhardt M and Mandelbaum B 2008 Platelet rich plasma injection grafts for musculoskeletal injuries: a review *Curr Rev Musculoskelet Med* **1** 165–74
- [210] Zhao H, Wu J, Zhu J, Xiao Z, He C, Shi H, Li X, Yang S and Xiao J 2015 Research Advances in Tissue Engineering Materials for Sustained Release of Growth Factors *BioMed Research International* **2015** 1–7
- [211] Martin V and Bettencourt A 2018 Bone regeneration: Biomaterials as local delivery systems with improved osteoinductive properties *Materials Science and Engineering: C* **82** 363–71
- [212] Coleman J E 1992 Structure and Mechanism of Alkaline Phosphatase *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* **21** 441–83
- [213] Hedgepeth C M, Conrad L J, Zhang J, Huang H-C, Lee V M Y and Klein P S 1997 Activation of the Wnt Signaling Pathway: A Molecular Mechanism for Lithium Action *Developmental Biology* **185** 82–91
- [214] Chai Y C, Mendes L F, van Gestel N, Carmeliet G and Luyten F P 2018 Fine-tuning pro-angiogenic effects of cobalt for simultaneous enhancement of vascular endothelial growth factor secretion and implant neovascularization *Acta Biomaterialia* **72** 447–60
- [215] Lee J S, Lee J-C and Heo J S 2018 Polydopamine-assisted BMP-2 immobilization on titanium surface enhances the osteogenic potential of periodontal ligament stem cells via integrin-mediated cell-matrix adhesion *J. Cell Commun. Signal.* **12** 661–72
- [216] Haimov H, Yosupov N, Pinchasov G and Juodzbaly G 2017 Bone Morphogenetic Protein Coating on Titanium Implant Surface: a Systematic Review *JOMR* **8**

- [217] Guillot R, Pignot-Paintrand I, Lavaud J, Decambron A, Bourgeois E, Josserand V, Logeart-Avramoglou D, Viguier E and Picart C 2016 Assessment of a polyelectrolyte multilayer film coating loaded with BMP-2 on titanium and PEEK implants in the rabbit femoral condyle *Acta Biomaterialia* **36** 310–22
- [218] Jiang X, Wang G, Li J, Zhang W, Xu L, Pan H, Wen J, Liu X, Wu Q, Jiao T and She W 2014 Magnesium ion implantation on a micro/nanostructured titanium surface promotes its bioactivity and osteogenic differentiation function *IJN* 2387
- [219] Huanhuan J, Pengjie H, Sheng X, Binchen W and Li S 2017 The effect of strontium-loaded rough titanium surface on early osseointegration *J Biomater Appl* **32** 561–9
- [220] Jin G, Cao H, Qiao Y, Meng F, Zhu H and Liu X 2014 Osteogenic activity and antibacterial effect of zinc ion implanted titanium *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* **117** 158–65
- [221] Jin G, Qin H, Cao H, Qian S, Zhao Y, Peng X, Zhang X, Liu X and Chu P K 2014 Synergistic effects of dual Zn/Ag ion implantation in osteogenic activity and antibacterial ability of titanium *Biomaterials* **35** 7699–713
- [222] Zhao Q, Yi L, Jiang L, Ma Y, Lin H and Dong J 2019 Surface functionalization of titanium with zinc/strontium-doped titanium dioxide microporous coating via microarc oxidation *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine* **16** 149–61
- [223] Guo J, Zhou H, Wang J, Liu W, Cheng M, Peng X, Qin H, Wei J, Jin P, Li J and Zhang X 2018 Nano vanadium dioxide films deposited on biomedical titanium: a novel approach for simultaneously enhanced osteogenic and antibacterial effects *Artificial Cells, Nanomedicine, and Biotechnology* **46** 58–74
- [224] Tracey A S and Gresser M J 1986 Interaction of vanadate with phenol and tyrosine: implications for the effects of vanadate on systems regulated by tyrosine phosphorylation. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **83** 609–13
- [225] Kim B-S, Kim J S, Park Y M, Choi B-Y and Lee J 2013 Mg ion implantation on SLA-treated titanium surface and its effects on the behavior of mesenchymal stem cell *Materials Science and Engineering: C* **33** 1554–60
- [226] Olivares-Navarrete R, Hyzy S L, Hutton D L, Erdman C P, Wieland M, Boyan B D and Schwartz Z 2010 Direct and indirect effects of microstructured titanium substrates on the induction of mesenchymal stem cell differentiation towards the osteoblast lineage *Biomaterials* **31** 2728–35
- [227] Zheng G, Guan B, Hu P, Qi X, Wang P, Kong Y, Liu Z, Gao P, Li R, Zhang X, Wu X and Sui L 2018 Topographical cues of direct metal laser sintering titanium surfaces facilitate osteogenic differentiation of bone marrow mesenchymal stem cells through epigenetic regulation *Cell Prolif* **51** e12460
- [228] Wang N, Li H, Lü W, Li J, Wang J, Zhang Z and Liu Y 2011 Effects of TiO₂ nanotubes with different diameters on gene expression and osseointegration of implants in minipigs *Biomaterials* **32** 6900–11
- [229] Concia E, Prandini N, Massari L, Ghisellini F, Consoli V, Menichetti F and Lazzeri E 2006 Osteomyelitis: clinical update for practical guidelines: *Nuclear Medicine Communications* **27** 645–60

- [230] Li J, Cha R, Mou K, Zhao X, Long K, Luo H, Zhou F and Jiang X 2018 Nanocellulose-Based Antibacterial Materials *Adv. Healthcare Mater.* **7** 1800334
- [231] Kaya S, Cresswell M and Boccaccini A R 2018 Mesoporous silica-based bioactive glasses for antibiotic-free antibacterial applications *Materials Science and Engineering: C* **83** 99–107
- [232] Paladini F, Pollini M, Sannino A and Ambrosio L 2015 Metal-Based Antibacterial Substrates for Biomedical Applications *Biomacromolecules* **16** 1873–85
- [233] Li S, Dong S, Xu W, Tu S, Yan L, Zhao C, Ding J and Chen X 2018 Antibacterial Hydrogels *Adv. Sci.* **5** 1700527
- [234] Owens G J, Singh R K, Foroutan F, Alqaysi M, Han C-M, Mahapatra C, Kim H-W and Knowles J C 2016 Sol–gel based materials for biomedical applications *Progress in Materials Science* **77** 1–79
- [235] Nie B, Ao H, Zhou J, Tang T and Yue B 2016 Biofunctionalization of titanium with bacitracin immobilization shows potential for anti-bacteria, osteogenesis and reduction of macrophage inflammation *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* **145** 728–39
- [236] Liu Y, Zhang X, Liu Y, Jin X, Fan C, Ye H, Ou M, Lv L, Wu G and Zhou Y 2014 Bi-Functionalization of a Calcium Phosphate-Coated Titanium Surface with Slow-Release Simvastatin and Metronidazole to Provide Antibacterial Activities and Pro-Osteodifferentiation Capabilities ed M A Barbosa *PLoS ONE* **9** e97741
- [237] Su H-L, Chou C-C, Hung D-J, Lin S-H, Pao I-C, Lin J-H, Huang F-L, Dong R-X and Lin J-J 2009 The disruption of bacterial membrane integrity through ROS generation induced by nanohybrids of silver and clay *Biomaterials* **30** 5979–87
- [238] Wang X, Cheng F, Liu J, Smått J-H, Gepperth D, Lastusaari M, Xu C and Hupa L 2016 Biocomposites of copper-containing mesoporous bioactive glass and nanofibrillated cellulose: Biocompatibility and angiogenic promotion in chronic wound healing application *Acta Biomaterialia* **46** 286–98
- [239] Neibert K, Gopishetty V, Grigoryev A, Tokarev I, Al-Hajaj N, Vorstenbosch J, Philip A, Minko S and Maysinger D 2012 Wound-Healing with Mechanically Robust and Biodegradable Hydrogel Fibers Loaded with Silver Nanoparticles *Advanced Healthcare Materials* **1** 621–30
- [240] Niu Y, Guo T, Yuan X, Zhao Y and Ren L 2018 An injectable supramolecular hydrogel hybridized with silver nanoparticles for antibacterial application *Soft Matter* **14** 1227–34
- [241] Yuan Z, Tao B, He Y, Liu J, Lin C, Shen X, Ding Y, Yu Y, Mu C, Liu P and Cai K 2019 Biocompatible MoS₂/PDA-RGD coating on titanium implant with antibacterial property via intrinsic ROS-independent oxidative stress and NIR irradiation *Biomaterials* **217** 119290
- [242] Liu W, Su P, Chen S, Wang N, Wang J, Liu Y, Ma Y, Li H, Zhang Z and Webster T J 2015 Antibacterial and osteogenic stem cell differentiation properties of photoinduced TiO₂ nanoparticle-decorated TiO₂ nanotubes *Nanomedicine* **10** 713–23
- [243] Lee J-H, El-Fiqi A, Mandakhbayar N, Lee H-H and Kim H-W 2017 Drug/ion co-delivery multi-functional nanocarrier to regenerate infected tissue defect *Biomaterials* **142** 62–76

- [244] Jebali A, Hekmatimoghaddam S, Behzadi A, Rezapour I, Mohammadi B H, Jasemizad T, Yasini S A, Javadzadeh M, Amiri A, Soltani M, Rezaei Z, Sedighi N, Seyfi M, Rezaei M and Sayadi M 2013 Antimicrobial activity of nanocellulose conjugated with allicin and lysozyme *Cellulose* **20** 2897–907
- [245] Varaprasad K, Mohan Y M, Vimala K and Mohana Raju K 2011 Synthesis and characterization of hydrogel-silver nanoparticle-curcumin composites for wound dressing and antibacterial application *J. Appl. Polym. Sci.* **121** 784–96
- [246] Halpenny G M, Steinhardt R C, Okialda K A and Mascharak P K 2009 Characterization of pHEMA-based hydrogels that exhibit light-induced bactericidal effect via release of NO *J Mater Sci: Mater Med* **20** 2353–60
- [247] Halpenny G M, Heilman B and Mascharak P K 2012 Nitric Oxide (NO)-Induced Death of Gram-Negative Bacteria from a Light-Controlled NO-Releasing Platform *Chemistry & Biodiversity* **9** 1829–39
- [248] Bai J, Chen C, Wang J, Zhang Y, Cox H, Zhang J, Wang Y, Penny J, Waigh T, Lu J R and Xu H 2016 Enzymatic Regulation of Self-Assembling Peptide A9K2 Nanostructures and Hydrogelation with Highly Selective Antibacterial Activities *ACS Appl. Mater. Interfaces* **8** 15093–102
- [249] Fraioli R, Tsimbouri P M, Fisher L E, Nobbs A H, Su B, Neubauer S, Rechenmacher F, Kessler H, Ginebra M-P, Dalby M J, Manero J M and Mas-Moruno C 2017 Towards the cell-instructive bactericidal substrate: exploring the combination of nanotopographical features and integrin selective synthetic ligands *Sci Rep* **7** 16363
- [250] Linklater D P, Juodkazis S, Crawford R J and Ivanova E P 2019 Mechanical inactivation of *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa* by titanium substrata with hierarchical surface structures *Materialia* **5** 100197
- [251] Bhadra C M, Khanh Truong V, Pham V T H, Al Kobaisi M, Seniutinas G, Wang J Y, Juodkazis S, Crawford R J and Ivanova E P 2015 Antibacterial titanium nano-patterned arrays inspired by dragonfly wings *Sci Rep* **5** 16817
- [252] Elbourne A, Crawford R J and Ivanova E P 2017 Nano-structured antimicrobial surfaces: From nature to synthetic analogues *Journal of Colloid and Interface Science* **508** 603–16
- [253] Wandiyanto J V, Tamanna T, Linklater D P, Truong V K, Al Kobaisi M, Baulin V A, Juodkazis S, Thissen H, Crawford R J and Ivanova E P 2020 Tunable morphological changes of asymmetric titanium nanosheets with bactericidal properties *Journal of Colloid and Interface Science* **560** 572–80
- [254] Wandiyanto J V, Truong V K, Al Kobaisi M, Juodkazis S, Thissen H, Bazaka O, Bazaka K, Crawford R J and Ivanova E P 2019 The Fate of Osteoblast-Like MG-63 Cells on Pre-Infected Bactericidal Nanostructured Titanium Surfaces *Materials* **12** 1575
- [255] Pham V T H, Truong V K, Orłowska A, Ghanaati S, Barbeck M, Booms P, Fulcher A J, Bhadra C M, Buividas R, Baulin V, Kirkpatrick C J, Doran P, Mainwaring D E, Juodkazis S, Crawford R J and Ivanova E P 2016 “Race for the Surface”: Eukaryotic Cells Can Win *ACS Appl. Mater. Interfaces* **8** 22025–31

- [256] Meuwly F, Ruffieux P-A, Kadouri A and von Stockar U 2007 Packed-bed bioreactors for mammalian cell culture: Bioprocess and biomedical applications *Biotechnology Advances* **25** 45–56
- [257] Liu W, Hu D, Gu C, Zhou Y and Tan W-S 2019 Fabrication and in vitro evaluation of a packed-bed bioreactor based on an optimum two-stage culture strategy *Journal of Bioscience and Bioengineering* **127** 506–14
- [258] McCarron A, Donnelley M, McIntyre C and Parsons D 2019 Transient Lentiviral Vector Production Using a Packed-Bed Bioreactor System *Human Gene Therapy Methods* **30** 93–101
- [259] Markvicheva E and Grandfils C 2004 Microcarriers for Animal Cell Culture *Fundamentals of Cell Immobilisation Biotechnology Focus on Biotechnology* vol 8A, ed V Nedović and R Willaert (Dordrecht: Springer Netherlands) pp 141–61
- [260] Chen A K-L, Reuveny S and Oh S K W 2013 Application of human mesenchymal and pluripotent stem cell microcarrier cultures in cellular therapy: Achievements and future direction *Biotechnology Advances* **31** 1032–46
- [261] Hu W S, Meier J and Wang D I C 1985 A mechanistic analysis of the inoculum requirement for the cultivation of mammalian cells on microcarriers *Biotechnol. Bioeng.* **27** 585–95
- [262] Ferrari C, Balandras F, Guedon E, Olmos E, Chevalot I and Marc A 2012 Limiting cell aggregation during mesenchymal stem cell expansion on microcarriers *Biotechnology Progress* **28** 780–7
- [263] Jossen V, van den Bos C, Eibl R and Eibl D 2018 Manufacturing human mesenchymal stem cells at clinical scale: process and regulatory challenges *Appl Microbiol Biotechnol* **102** 3981–94
- [264] Cunha B, Peixoto C, Silva M M, Carrondo M J T, Serra M and Alves P M 2015 Filtration methodologies for the clarification and concentration of human mesenchymal stem cells *Journal of Membrane Science* **478** 117–29
- [265] Murtagh M J, Graham E K and Pantano C G 1986 Elastic Moduli of Silica Gels Prepared with Tetraethoxysilane *J American Ceramic Society* **69** 775–9
- [266] Lee E-J, Jun S-H, Kim H-E, Kim H-W, Koh Y-H and Jang J-H 2010 Silica xerogel-chitosan nano-hybrids for use as drug eluting bone replacement *J Mater Sci: Mater Med* **21** 207–14
- [267] Ardeshiryajimi A, Delgoshaie M, Mirzaei S and Khojasteh A 2018 Different Porosities of Chitosan Can Influence the Osteogenic Differentiation Potential of Stem Cells. *J. Cell. Biochem.* **119** 625–33
- [268] Chui C-Y, Odeleye A, Nguyen L, Kasoju N, Soliman E and Ye H 2019 Electrospayed genipin cross-linked alginate-chitosan microcarriers for ex vivo expansion of mesenchymal stem cells. *J Biomed Mater Res* **107** 122–33
- [269] Li C, Qian Y, Zhao S, Yin Y and Li J 2016 Alginate/PEG based microcarriers with cleavable crosslinkage for expansion and non-invasive harvest of human umbilical cord blood mesenchymal stem cells *Materials Science and Engineering: C* **64** 43–53

- [270] Murakata T, Sato S, Ohgawara T, Watanabe T and Suzuki T 1992 Control of pore size distribution of silica gel through sol-gel process using inorganic salts and surfactants as additives *J Mater Sci* **27** 1567–74
- [271] Ramesh N, Moratti S C and Dias G J 2018 Hydroxyapatite-polymer biocomposites for bone regeneration: A review of current trends. *J. Biomed. Mater. Res.* **106** 2046–57
- [272] Fricain J C, Schlaubitz S, Le Visage C, Arnault I, Derkaoui S M, Siadous R, Catros S, Lalande C, Bareille R, Renard M, Fabre T, Cornet S, Durand M, Léonard A, Sahraoui N, Letourneur D and Amédée J 2013 A nano-hydroxyapatite – Pullulan/dextran polysaccharide composite macroporous material for bone tissue engineering *Biomaterials* **34** 2947–59
- [273] Feng J, Chong M, Chan J, Zhang Z, Teoh S H and Thian E S 2014 A scalable approach to obtain mesenchymal stem cells with osteogenic potency on apatite microcarriers *Journal of Biomaterials Applications* **29** 93–103
- [274] Shadjou N and Hasanzadeh M 2015 Bone tissue engineering using silica-based mesoporous nanobiomaterials:Recent progress *Materials Science and Engineering: C* **55** 401–9
- [275] Zhang D, Wu X, Chen J and Lin K 2018 The development of collagen based composite scaffolds for bone regeneration *Bioactive Materials* **3** 129–38
- [276] Perez R A, Altankov G, Jorge-Herrero E and Ginebra M P 2013 Micro- and nanostructured hydroxyapatite-collagen microcarriers for bone tissue-engineering applications: Micro- and nanostructured hydroxyapatite-collagen microcarriers *Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine* **7** 353–61
- [277] Kim S-K 2013 *Marine Proteins and Peptides: Biological Activities and Applications* (Chichester, UK: John Wiley & Sons, Ltd)
- [278] Guo S, Zhu X, Li M, Shi L, Ong J L T, Jańczewski D and Neoh K G 2016 Parallel Control over Surface Charge and Wettability Using Polyelectrolyte Architecture: Effect on Protein Adsorption and Cell Adhesion *ACS Appl. Mater. Interfaces* **8** 30552–63
- [279] Babaki M, Yousefi M, Habibi Z, Brask J and Mohammadi M 2015 Preparation of highly reusable biocatalysts by immobilization of lipases on epoxy-functionalized silica for production of biodiesel from canola oil *Biochemical Engineering Journal* **101** 23–31
- [280] Sart S, Agathos S N and Li Y 2013 Engineering stem cell fate with biochemical and biomechanical properties of microcarriers *Biotechnol Progress* **29** 1354–66
- [281] Yu Y, Park Y S, Kim H S, Kim H Y, Jin Y M, Jung S-C, Ryu K-H and Jo I 2014 Characterization of long-term in vitro culture-related alterations of human tonsil-derived mesenchymal stem cells: role for CCN1 in replicative senescence-associated increase in osteogenic differentiation *J. Anat.* **225** 510–8
- [282] Jiang Y, Mishima H, Sakai S, Liu Y, Ohyabu Y and Uemura T 2008 Gene expression analysis of major lineage-defining factors in human bone marrow cells: Effect of aging, gender, and age-related disorders *J. Orthop. Res.* **26** 910–7
- [283] Jung E M, Kwon O, Kwon K-S, Cho Y S, Rhee S K, Min J-K and Oh D-B 2011 Evidences for correlation between the reduced VCAM-1 expression and hyaluronan synthesis during

- cellular senescence of human mesenchymal stem cells *Biochemical and Biophysical Research Communications* **404** 463–9
- [284] Yang Y-H K, Ogando C R, Wang See C, Chang T-Y and Barabino G A 2018 Changes in phenotype and differentiation potential of human mesenchymal stem cells aging in vitro *Stem Cell Res Ther* **9** 131
- [285] Li Y, Wu Q, Wang Y, Li L, Bu H and Bao J 2017 Senescence of mesenchymal stem cells (Review) *International Journal of Molecular Medicine* **39** 775–82
- [286] Wei F, Qu C, Song T, Ding G, Fan Z, Liu D, Liu Y, Zhang C, Shi S and Wang S 2012 Vitamin C treatment promotes mesenchymal stem cell sheet formation and tissue regeneration by elevating telomerase activity *J. Cell. Physiol.* **227** 3216–24
- [287] Liao N, Shi Y, Zhang C, Zheng Y, Wang Y, Zhao B, Zeng Y, Liu X and Liu J 2019 Antioxidants inhibit cell senescence and preserve stemness of adipose tissue-derived stem cells by reducing ROS generation during long-term in vitro expansion *Stem Cell Res Ther* **10** 306
- [288] Sauer M, Branduardi P, Valli M and Porro D 2004 Production of l-Ascorbic Acid by Metabolically Engineered *Saccharomyces cerevisiae* and *Zygosaccharomyces bailii* *AEM* **70** 6086–91
- [289] Bertolo A, Baur M, Guerrero J, Pötzel T and Stoyanov J 2019 Autofluorescence is a Reliable in vitro Marker of Cellular Senescence in Human Mesenchymal Stromal Cells *Sci Rep* **9** 2074
- [290] Ang J, Lee Y, Raghothaman D, Jayaraman P, Teo K L, Khan F J, Reuveny S, Chang Y, Kang N and Oh S 2019 Rapid Detection of Senescent Mesenchymal Stromal Cells by a Fluorescent Probe *Biotechnol. J.* **14** 1800691
- [291] Wu S-C, Yu J-C, Hsu S and Chen D C 2006 Artificial extracellular matrix proteins contain heparin-binding and RGD-containing domains to improve osteoblast-like cell attachment and growth *Journal of Biomedical Materials Research Part A* **79A** 557–65
- [292] Wang P-Y, Wu T-H, Tsai W-B, Kuo W-H and Wang M-J 2013 Grooved PLGA films incorporated with RGD/YIGSR peptides for potential application on skeletal muscle tissue engineering *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* **110** 88–95
- [293] Paiva dos Santos B, Garbay B, Pasqua M, Chevron E, Chinoy Z S, Cullin C, Bathany K, Lecommandoux S, Amédée J, Oliveira H and Garanger E 2019 Production, purification and characterization of an elastin-like polypeptide containing the Ile-Lys-Val-Ala-Val (IKVAV) peptide for tissue engineering applications *Journal of Biotechnology* **298** 35–44
- [294] Lee M Y, Ryu J M, Lee S H, Park J H and Han H J 2010 Lipid rafts play an important role for maintenance of embryonic stem cell self-renewal *J. Lipid Res.* **51** 2082–9
- [295] Li H, Guo H and Li H 2013 Cholesterol loading affects osteoblastic differentiation in mouse mesenchymal stem cells *Steroids* **78** 426–33
- [296] Jung S, Sen A, Rosenberg L and Behie L A 2010 Identification of growth and attachment factors for the serum-free isolation and expansion of human mesenchymal stromal cells *Cytotherapy* **12** 637–57

- [297] Schmidt J J, Jeong J and Kong H 2011 The Interplay Between Cell Adhesion Cues and Curvature of Cell Adherent Alginate Microgels in Multipotent Stem Cell Culture *Tissue Engineering Part A* **17** 2687–94
- [298] Li Z, Cao B, Wang X, Ye K, Li S and Ding J 2015 Effects of RGD nanospacing on chondrogenic differentiation of mesenchymal stem cells *J. Mater. Chem. B* **3** 5197–209
- [299] Kaiser S, Jossen V, Schirmaier C, Eibl D, Brill S, van den Bos C and Eibl R 2013 Fluid Flow and Cell Proliferation of Mesenchymal Adipose-Derived Stem Cells in Small-Scale, Stirred, Single-Use Bioreactors *Chemie Ingenieur Technik* **85** 95–102
- [300] Lindroos B, Suuronen R and Miettinen S 2011 The Potential of Adipose Stem Cells in Regenerative Medicine *Stem Cell Rev and Rep* **7** 269–91
- [301] Collignon M-L, Delafosse A, Calvo S, Martin C, Marc A, Toye D and Olmos E 2016 Large-Eddy Simulations of microcarrier exposure to potentially damaging eddies inside mini-bioreactors *Biochemical Engineering Journal* **108** 30–43
- [302] Eibl R, Werner S and Eibl D 2009 Bag Bioreactor Based on Wave-Induced Motion: Characteristics and Applications *Disposable Bioreactors Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology* vol 115, ed R Eibl and D Eibl (Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg) pp 55–87
- [303] Tsai A-C, Liu Y, Yuan X, Chella R and Ma T 2017 Aggregation kinetics of human mesenchymal stem cells under wave motion *Biotechnol. J.* **12** 1600448
- [304] Mizukami A, Pereira Chilima T D, Orellana M D, Neto M A, Covas D T, Farid S S and Swiech K 2018 Technologies for large-scale umbilical cord-derived MSC expansion: Experimental performance and cost of goods analysis *Biochemical Engineering Journal* **135** 36–48
- [305] Timmins N E, Kiel M, Günther M, Heazlewood C, Doran M R, Brooke G and Atkinson K 2012 Closed system isolation and scalable expansion of human placental mesenchymal stem cells *Biotechnol. Bioeng.* **109** 1817–26
- [306] Campoccia D, Montanaro L, Speziale P and Arciola C R 2010 Antibiotic-loaded biomaterials and the risks for the spread of antibiotic resistance following their prophylactic and therapeutic clinical use *Biomaterials* **31** 6363–77
- [307] Nguyen D H K, Pham V T H, Truong V K, Sbarski I, Wang J, Balčytis A, Juodkazis S, Mainwaring D E, Crawford R J and Ivanova E P 2018 Role of topological scale in the differential fouling of *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus aureus* bacterial cells on wrinkled gold-coated polystyrene surfaces *Nanoscale* **10** 5089–96
- [308] Lu H, Liu Y, Guo J, Wu H, Wang J and Wu G 2016 Biomaterials with Antibacterial and Osteoinductive Properties to Repair Infected Bone Defects *IJMS* **17** 334
- [309] McBeath R, Pirone D M, Nelson C M, Bhadriraju K and Chen C S 2004 Cell Shape, Cytoskeletal Tension, and RhoA Regulate Stem Cell Lineage Commitment *Developmental Cell* **6** 483–95
- [310] Tsimbouri P M, Murawski K, Hamilton G, Herzyk P, Oreffo R O C, Gadegaard N and Dalby M J 2013 A genomics approach in determining nanotopographical effects on MSC phenotype *Biomaterials* **34** 2177–84

- [311] Hankenson K D, Dishowitz M, Gray C and Schenker M 2011 Angiogenesis in bone regeneration *Injury* **42** 556–61
- [312] Ge Q, Zhang H, Hou J, Wan L, Cheng W, Wang X, Dong D, Chen C, Xia J, Guo J, Chen X and Wu X 2017 VEGF secreted by mesenchymal stem cells mediates the differentiation of endothelial progenitor cells into endothelial cells via paracrine mechanisms *Mol Med Report*
- [313] Przekora A 2019 The summary of the most important cell-biomaterial interactions that need to be considered during in vitro biocompatibility testing of bone scaffolds for tissue engineering applications *Materials Science and Engineering: C* **97** 1036–51
- [314] Grémare A, Aussel A, Bareille R, Paiva dos Santos B, Amédée J, Thébaud N B and Le Nihouannen D 2019 A Unique Triculture Model to Study Osteoblasts, Osteoclasts, and Endothelial Cells *Tissue Engineering Part C: Methods* **25** 421–32
- [315] Zannoni J, Mauz N, Seyve L, Meunier M, Pernet-Gallay K, Brault J, Jouzier C, Laurin D, Pezet M, Pernollet M, Cahn J-Y, Cognasse F, Polack B and Park S 2019 Tumor microenvironment and clonal monocytes from chronic myelomonocytic leukemia induce a procoagulant climate *Blood Advances* **3** 1868–80
- [316] Webber J and Clayton A 2013 How pure are your vesicles? *Journal of Extracellular Vesicles* **2** 19861
- [317] Otto G P and Nichols B J 2011 The roles of flotillin microdomains - endocytosis and beyond *Journal of Cell Science* **124** 3933–40
- [318] Meister M and Tikkanen R 2014 Endocytic Trafficking of Membrane-Bound Cargo: A Flotillin Point of View *Membranes* **4** 356–71
- [319] Ludwig N, Whiteside T L and Reichert T E 2019 Challenges in Exosome Isolation and Analysis in Health and Disease *IJMS* **20** 4684
- [320] Eitan E, Zhang S, Witwer K W and Mattson M P 2015 Extracellular vesicle-depleted fetal bovine and human sera have reduced capacity to support cell growth *Journal of Extracellular Vesicles* **4** 26373
- [321] Li J, Lee Y, Johansson H J, Mäger I, Vader P, Nordin J Z, Wiklander O P B, Lehtiö J, Wood M J A and Andaloussi S E 2015 Serum-free culture alters the quantity and protein composition of neuroblastoma-derived extracellular vesicles *Journal of Extracellular Vesicles* **4** 26883
- [322] Burger D, Turner M, Xiao F, Munkonda M N, Akbari S and Burns K D 2017 High glucose increases the formation and pro-oxidative activity of endothelial microparticles *Diabetologia* **60** 1791–800
- [323] Garcia N A, Ontoria-Oviedo I, González-King H, Diez-Juan A and Sepúlveda P 2015 Glucose Starvation in Cardiomyocytes Enhances Exosome Secretion and Promotes Angiogenesis in Endothelial Cells ed P Busson *PLoS ONE* **10** e0138849
- [324] Patel D B, Gray K M, Santharam Y, Lamichhane T N, Stroka K M and Jay S M 2017 Impact of cell culture parameters on production and vascularization bioactivity of mesenchymal stem cell-derived extracellular vesicles *Bioengineering & Translational Medicine* **2** 170–9

- [325] Langevin S M, Kuhnell D, Orr-Asman M A, Biesiada J, Zhang X, Medvedovic M and Thomas H E 2019 Balancing yield, purity and practicality: a modified differential ultracentrifugation protocol for efficient isolation of small extracellular vesicles from human serum *RNA Biology* **16** 5–12
- [326] Cvjetkovic A, Lötvall J and Lässer C 2014 The influence of rotor type and centrifugation time on the yield and purity of extracellular vesicles *Journal of Extracellular Vesicles* **3** 23111
- [327] Haraszti R A, Miller R, Stoppato M, Sere Y Y, Coles A, Didiot M-C, Wollacott R, Sapp E, Dubuke M L, Li X, Shaffer S A, DiFiglia M, Wang Y, Aronin N and Khvorova A 2018 Exosomes Produced from 3D Cultures of MSCs by Tangential Flow Filtration Show Higher Yield and Improved Activity *Molecular Therapy* **26** 2838–47
- [328] Nordin J Z, Lee Y, Vader P, Mäger I, Johansson H J, Heusermann W, Wiklander O P B, Hällbrink M, Seow Y, Bultema J J, Gilthorpe J, Davies T, Fairchild P J, Gabrielsson S, Meisner-Kober N C, Lehtiö J, Smith C I E, Wood M J A and Andaloussi S E 2015 Ultrafiltration with size-exclusion liquid chromatography for high yield isolation of extracellular vesicles preserving intact biophysical and functional properties *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine* **11** 879–83
- [329] Baranyai T, Herczeg K, Onódi Z, Voszka I, Módos K, Marton N, Nagy G, Mäger I, Wood M J, El Andaloussi S, Pálincás Z, Kumar V, Nagy P, Kittel Á, Buzás E I, Ferdinandy P and Giricz Z 2015 Isolation of Exosomes from Blood Plasma: Qualitative and Quantitative Comparison of Ultracentrifugation and Size Exclusion Chromatography Methods ed M Rito-Palomares *PLoS ONE* **10** e0145686
- [330] Zhang H, Freitas D, Kim H S, Fabijanic K, Li Z, Chen H, Mark M T, Molina H, Martin A B, Bojmar L, Fang J, Rampersaud S, Hoshino A, Matei I, Kenific C M, Nakajima M, Mutvei A P, Sansone P, Buehring W, Wang H, Jimenez J P, Cohen-Gould L, Paknejad N, Brendel M, Manova-Todorova K, Magalhães A, Ferreira J A, Osório H, Silva A M, Massey A, Cubillos-Ruiz J R, Galletti G, Giannakakou P, Cuervo A M, Blenis J, Schwartz R, Brady M S, Peinado H, Bromberg J, Matsui H, Reis C A and Lyden D 2018 Identification of distinct nanoparticles and subsets of extracellular vesicles by asymmetric flow field-flow fractionation *Nat Cell Biol* **20** 332–43
- [331] Colao I L, Corteling R, Bracewell D and Wall I 2018 Manufacturing Exosomes: A Promising Therapeutic Platform *Trends in Molecular Medicine* **24** 242–56
- [332] Tauro B J, Greening D W, Mathias R A, Ji H, Mathivanan S, Scott A M and Simpson R J 2012 Comparison of ultracentrifugation, density gradient separation, and immunoaffinity capture methods for isolating human colon cancer cell line LIM1863-derived exosomes *Methods* **56** 293–304
- [333] Kanwar S S, Dunlay C J, Simeone D M and Nagrath S 2014 Microfluidic device (ExoChip) for on-chip isolation, quantification and characterization of circulating exosomes *Lab Chip* **14** 1891–900
- [334] Zhao Z, Yang Y, Zeng Y and He M 2016 A microfluidic ExoSearch chip for multiplexed exosome detection towards blood-based ovarian cancer diagnosis *Lab Chip* **16** 489–96
- [335] Cooper J D 2018 Tracheal Injuries Complicating Prolonged Intubation and Tracheostomy *Thoracic Surgery Clinics* **28** 139–44

- [336] Jakobsen K K, Grønhøj C, Jensen D H, Fischer-Nielsen A, Hjuler T and von Buchwald C 2017 Mesenchymal stem cell therapy for laryngotracheal stenosis: A systematic review of preclinical studies ed G Papaccio *PLoS ONE* **12** e0185283
- [337] de Marco B A, Rechelo B S, Tótolí E G, Kogawa A C and Salgado H R N 2019 Evolution of green chemistry and its multidimensional impacts: A review *Saudi Pharmaceutical Journal* **27** 1–8

Résumé

Les cellules souches mésenchymateuses (CSM) sont largement utilisées en thérapie cellulaire et en ingénierie tissulaire. Leur intérêt est lié à leur activité paracrine ainsi qu'à leur capacité de différenciation. Les CSM sont des cellules rares qui ont besoin d'être amplifiées à grande échelle pour une utilisation clinique. Comme ce sont des cellules adhérentes, elles peuvent être amplifiées en bioréacteurs via l'utilisation de microporteurs. Afin d'améliorer qualitativement et quantitativement la production de CSM, il est nécessaire d'adapter les différents paramètres de culture. En collaboration avec la société Carroucell, nous avons étudié le comportement de CSM issues de tissu adipeux (ASC) lors de leur culture sur des microporteurs de silice originaux, ayant une forme discoïdale. En comparaison avec des microporteurs sphériques commerciaux, les microporteurs disques permettent une culture plus homogène, limitent la mort cellulaire liée à l'agrégation et favorisent l'étape de décollement. En spinner flasks, des rendements intéressants ont été obtenus et les cellules récupérées ont conservé une très bonne viabilité, l'expression de leur marqueurs spécifiques ainsi que leur capacité de différenciation. Le potentiel thérapeutique des CSM est lié à leur activité paracrine. Ces dernières années, les vésicules extracellulaires (EV) issues de CSM ont donc été largement étudiées au niveau préclinique. À l'image des CSM, la production d'EV nécessite d'être améliorée au niveau quantitatif pour une utilisation clinique. Au cours de cette thèse, l'intérêt d'une culture sur microporteurs dans la production d'EV par les ASC a été étudié. En comparaison avec une culture 2D, la quantité d'EV produite est près de deux fois supérieure. Les préparations sont composées majoritairement d'exosomes. Néanmoins, une optimisation des conditions de culture et d'isolement des EV sera nécessaire à l'amélioration des rendements et de la pureté des échantillons obtenus.

Associés aux cellules souches, les biomatériaux ont démontré un potentiel thérapeutique intéressant pour le traitement de nombreuses pathologies. Dans le cas de la reconstruction osseuse, les échecs de traitements sont principalement liés aux infections bactériennes. Afin de limiter l'utilisation d'antibiotiques, de nouveaux biomatériaux possédant des propriétés bactéricides et ostéogéniques doivent être développés. En collaboration avec l'équipe d'Elena Ivanova (RMIT, Melbourne, Australie), le comportement d'ASC sur des biomatériaux de titane rendus antibactériens grâce à une topographie nanostructurée a été étudié. Ces matériaux nanostructurés permettent l'adhérence des ASC, tout en modifiant la morphologie des cellules et la formation d'adhérences focales. De plus, les supports nanostructurés permettent la prolifération des cellules, ne sont pas toxiques et les ASC conservent leurs propriétés multipotentes. Enfin, lors de cultures prolongées, ces biomatériaux ont démontré des effets ostéoinducteurs. Ces biomatériaux de titane nanostructurés sont donc prometteurs pour une future application en tant qu'implants pour la régénération osseuse.

Mots clés : Cellules souches mésenchymateuses, Microporteur, Bioréacteur, Biomatériau, Thérapie cellulaire

Abstract

Mesenchymal stem cells (MSC) are widely used in cell therapy and tissue engineering. Their interest is linked to their paracrine activity and their differentiation potential. MSC are rare cells that need to be amplified at large scale for clinical applications. Since MSC are adherent cells, they may be amplified in bioreactors with the help of microcarriers. In order to improve MSC production both qualitatively and quantitatively, it is necessary to adapt the different culture parameters. In collaboration with Carroucell industry, we studied the behavior of MSC from adipose tissue (ASC) along their culture on innovative silica disc microcarriers. In comparison with spherical commercial microcarriers, disc microcarriers increase culture homogeneity, decrease aggregation related cell death and improve cell harvesting step. In spinner flasks, interesting yields have been obtained and harvested cells kept an excellent viability, their specific markers expression as well as their differentiation ability. Therapeutic potential of MSC is linked to their paracrine activity. These last years, extracellular vesicles (EV) produced by MSC were thereby largely studied at preclinical step. As for the MSC themselves, EV production needs to be improved quantitatively for a clinical application. Along this thesis, the interest of a microcarriers based culture on EV production by ASC was assessed. In comparison with 2D culture, produced EV amount was almost twice higher. Samples are mainly composed of exosomes. Nevertheless, an optimization of both culture conditions and EV isolation will be required to ameliorate obtained yields as well as obtained samples.

Associated with stem cells, biomaterials showed interesting therapeutic potential for the treatment of numerous pathologies. For bone repair, one of the main treatments failing cause is linked to bacterial infections. In order to limit antibiotic using, new biomaterial possessing both bactericidal and osteogenic properties shall be developed. In collaboration with Elena Ivanova's team (RMIT, Melbourne, Australia), ASC behavior on nanostructures induced antibacterial titanium biomaterials was investigated. Those materials permit ASC adhesion while modifying cell morphology and focal adhesion formation. Moreover, nanostructured scaffolds permit cell proliferation, are not toxic and ASC keep their multipotency. Finally, in the case of prolonged cultures, these biomaterials showed osteoinductive properties. That is why these nanostructured titanium biomaterials are promising for their future using as implants for bone regeneration.

Keywords : Mesenchymal stem cells, Microcarrier, Bioreactor, Biomaterial, Cell therapy