



HAL
open science

Contribution à la compréhension et à la prévention de la mort massive des cellules souches mésenchymateuses post-implantation : application à l'ingénierie tissulaire

Cyprien Denoeud

► To cite this version:

Cyprien Denoeud. Contribution à la compréhension et à la prévention de la mort massive des cellules souches mésenchymateuses post-implantation : application à l'ingénierie tissulaire. Biochimie, Biologie Moléculaire. Université Paris Cité, 2019. Français. NNT : 2019UNIP7105 . tel-03131381

HAL Id: tel-03131381

<https://theses.hal.science/tel-03131381>

Submitted on 4 Feb 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.

UNIVERSITÉ DE PARIS

ÉCOLE DOCTORALE N°561 – HÉMATOLOGIE, ONCOGÉNÈSE ET BIOTHÉRAPIES (HOB)

Spécialité : Biothérapies

THÈSE DE SCIENCES

Cyprien DENOEU

Contribution à la compréhension et à la prévention de la mort massive des cellules souches mésenchymateuses post-implantation: Application à l'ingénierie tissulaire

Thèse dirigée par **Hervé PETITE**

Soutenance prévue le **30 Septembre 2019** devant un jury composé de :

Dr. Astrid PINZANO , Chargée de Recherche CNRS	Rapporteur
Dr. Catherine LEVISAGE , Directrice de Recherche INSERM	Rapporteur
Dr. Denis LOURDIN , Directeur de Recherche INRA	Examineur
Pr. Emmanuel PAUTHE , Professeur des Universités	Membre invité
Dr. Stéphane MARINESCO , Chargé de Recherche INSERM	Membre invité
Mr. Daniel WILS , Responsable R&D Nutrition Santé de la société ROQUETTE FRÈRES	Membre invité
Dr. Esther POTIER , Chargée de recherche CNRS	Codirectrice de thèse
Dr. Hervé PETITE , Directeur de recherche INSERM	Directeur de thèse

Laboratoire de Biologie, Bioingénierie et Bioimagerie Ostéo-Articulaires (B3OA)

UMR CNRS 7052, INSERM U1271
10 Avenue de Verdun, 75010 Paris, France



R *emerciements*

Le doctorat est à l'image d'un premier marathon. Au préalable, on s'interroge sur notre participation à la course, on doute, puis une fois la décision prise, on a hâte de commencer l'épreuve. Quand le départ est lancé, on court, on observe, on analyse, puis on court sans relâche cette fois, ne sachant plus vraiment parfois vers quel objectif. De nombreux supporters encouragent les participants. Au cours de l'épreuve, un esprit d'équipe naît puis grandit entre les coureurs. Et toujours les supporters au bord de la route qui nous aident à avancer et à garder le rythme. Petit à petit, l'arrivée se profile au loin, le rythme s'accélère. Une fois la ligne franchie, on retiendra les innombrables encouragements de tous ces supporters présents pendant la course. Alors, un IMMENSE MERCI à vous!

Tout d'abord, je tiens à remercier fortement le Dr. Hervé PETITE pour avoir dirigé ce projet de doctorat. Un grand merci pour ta confiance, pour m'avoir offert l'opportunité de travailler en tant qu'ingénieur d'études au sein du laboratoire B3OA, puis de m'avoir aidé à obtenir le financement doctoral via le concours d'Etat. Tu as toujours su te rendre disponible (malgré ton emploi du temps plus que surchargé), être à l'écoute, et demeurer source de précieux conseils.

Je remercie vivement la Dr. Esther POTIER, co-directrice du projet au cours de ces 3 années. Merci de m'avoir accompagné dans cette aventure doctorale, d'avoir pris le temps de répondre à mes (nombreuses !) interrogations, et de m'avoir laissé libre d'explorer plusieurs pistes de recherche et de développement. Ce fut un grand plaisir de participer à la « team glucose », que tu co-encadres avec Hervé, cherchant toujours à concevoir et à développer des projets bien prometteurs !

Un grand merci également aux membres du Jury qui m'ont fait l'honneur d'évaluer mon travail: Dr. Astrid WATRIN-PINZANO et Dr. Catherine LEVISAGE en tant que rapporteurs, Dr. Denis LOURDIN en tant qu'examineur. Je remercie également les membres invités du Jury ainsi que leurs équipes, ayant contribué à l'avancée des différentes phases du projet : Dr. Stéphane MARINESCO et la plateforme NEUROCHEM de l'Université de Lyon I, Dr. Emmanuel PAUTHE et le laboratoire ERRMECe de l'Université de Cergy-Pontoise, ainsi que Mr. Daniel WILS et de la collaboration établie avec la société ROQUETTE FRERES.

Ce doctorat n'aurait pas été aussi appréciable sans les membres du laboratoire B3OA, toujours présents ou partis depuis pour d'autres aventures, et sans cette ambiance de travail très conviviale, voire même familiale, qui règne dans les locaux. Ainsi, un immense merci à Marianne et Hanane (les « 2 Mamans du labo »), Fani et Jonathan (et les bons souvenirs dans cette ancienne équipe), Channing,

Nathanaël, Mathilde, Guavri, Delphine, Stéphane et Hugues (les inséparables STUGS), Adrien (qui m'a offert une formation en or en début de doctorat), Morad, Mickaël, Pierre, Joseph, Karim, Pauline, Cloé, Giuli, Victoria et Simon (pas de blague cette fois, on est dans les remerciements officiels... ou presque), Céline, Carole, Stephanos, Angelina, Christelle et Christine.

Je remercie également Hilel, Chloé et Alexandre, les stagiaires que j'ai eu l'occasion d'encadrer et ayant chacun apporté leur pierre à cet édifice doctoral. Bon courage et belle réussite à tous les trois dans la suite de vos projets respectifs, tant professionnels que personnels !

Une mention spéciale à Stéphanie (qui a toujours des réserves secrètes de gâteaux), Gaëlle (qui garde toujours le sourire), Guotian (qui aime plus son chat que son doctorat) et Cibèle (qui est de retour en France !). Cette petite troupe ne serait bien évidemment jamais complète sans Moustapha, fidèle acolyte et ami depuis maintenant plus de 4 années (j'avais un peu plus de cheveux à cette époque, et toi, un peu moins de cheveux « assaisonnés »...). Courage Mousse pour cette fin de doctorat, « ne lâche pas l'affaire ». Et surtout, je te souhaite d'être heureux avec Adama et de mener tous deux la vie dont vous rêvez. A quand la petite visite à Dakar ?

Je ne pourrais pas poursuivre ces remerciements sans évoquer la belle troupe d'amis qui fait de l'Île-de-France une région où il y fait très bon vivre, entre les murs comme à l'extérieur: Solène, Sylvain, Jérôme, Julien, Eliot et Marie, Camille, Aude, Agathe, Mickaël, Quentin, Pauline et Matthieu (les futurs mariés !), Emilie et Léonard, , Victoria et Edouard (désormais Nantais), Astrid et Maxance, Théotime, Marielle et Martin (les tout jeunes parents !).

Les mots les plus simples étant les plus forts, je souhaiterais pour finir remercier de tout cœur ma famille, en particulier ceux qui m'accompagnent dans la vie de tous les jours : mes parents, pour leur amour et leur soutien intemporel. Merci infiniment d'avoir constamment été et d'être encore aujourd'hui les parents dont rêve chaque enfant ; mon frère pour m'avoir transmis (simple hypothèse, mais allez le prouver) la passion pour la recherche et pour toujours garder en lui cette graine de folie qui nous permet de retourner, le temps d'un instant, en enfance chaque fois que l'on se retrouve. Merci à Lucile, sa femme (car ils viennent tout juste de se marier, oléééééé !!) de rendre mon frère aussi heureux qu'il ne l'est aujourd'hui et ce depuis que vous vous êtes rencontrés. Enfin, la plus belle des découvertes au cours de ce doctorat est de loin Aurélie, avec qui je partage ma vie aujourd'hui et qui fait de moi au quotidien un homme comblé et heureux.

Cyprien

RÉSUMÉ

Les cellules souches mésenchymateuses (CSMs) apparaissent comme des candidates idéales en ingénierie tissulaire. De plus en plus d'essais cliniques utilisent aujourd'hui cette source cellulaire dans l'objectif de réparer des tissus ou organes lésés afin de restaurer leur fonction. Cependant, une fois implantées, les CSMs meurent rapidement et massivement, réduisant considérablement le succès de cette approche thérapeutique. Bien que cette mort massive soit multifactorielle, l'environnement ischémique (caractérisé entre autre, par la déplétion en oxygène et en nutriments) dans lequel les cellules sont confrontées une fois implantées, semble être la cause principale. De plus, le facteur limitant la survie cellulaire au sein de cet environnement avasculaire est de façon surprenante, non pas l'absence d'oxygène, mais l'absence de glucose.

Toutefois, les voies métaboliques utilisées par les CSMs après implantation afin de convertir le glucose en énergie ne sont, à ce jour, que peu comprises. De plus, aucune stratégie basée sur l'apport continu de glucose aux cellules n'a été jusqu'à présent établie afin d'améliorer la survie, et par conséquent, la fonctionnalité des CSMs après implantation.

La première étude de ce projet de doctorat vise à comprendre davantage le métabolisme énergétique emprunté par le glucose au sein des CSMs après implantation.

Nous avons démontré que les conditions quasi-anoxiques (0.1% pO₂) associées à l'absence de glucose et de sérum reflètent au mieux *in vitro* le microenvironnement d'implantation *in vivo*. Au sein de cet environnement, les CSMs produisent leur énergie sous forme d'ATP exclusivement via la glycolyse anaérobie à partir d'un unique substrat, le glucose. Or, le glucose manque dans cet environnement ischémique et les CSMs possèdent des réserves glycolytiques très limitées qu'elles vident en 24 heures, puis consomment la totalité de leurs réserves d'ATP en 3 jours, entraînant une mort cellulaire massive et rapide.

La seconde (et principale) étude consiste à développer et à évaluer une stratégie basée sur l'apport continu de glucose pour améliorer la survie et la fonctionnalité des CSMs après implantation.

Nous avons, pour la première fois, apporté la preuve de concept qu'un hydrogel nutritif, composé d'un système de polymère de glucose (amidon) et d'une enzyme (amyloglucosidase), ayant préalablement fait l'objet d'un brevet (EP 14306700), permet d'améliorer la survie de CSMs pendant 14 jours, à la fois au sein d'un modèle ischémique *in vitro* ainsi que dans un modèle ectopique post-implantation. De plus, ce dispositif innovant permet d'améliorer les fonctions paracrines des CSMs, augmentant notamment la néovascularisation jusqu'à 21 jours après implantation.

En augmentant la survie et la fonctionnalité des CSMs après implantation grâce à un apport continu en glucose, l'hydrogel nutritif composé d'amidon et d'AMG apparaît comme une stratégie d'intérêt pour améliorer les résultats thérapeutiques des produits à base de cellules souches en ingénierie tissulaire.

Mots clés : Ingénierie tissulaire, Cellules souches mésenchymateuses, Ischémie, Métabolisme énergétique, Glucose, Hydrogel, Amidon, Amyloglucosidase, Survie cellulaire, Fonctionnalité cellulaire.

SUMMARY

Mesenchymal stem cells (MSCs) are appealing candidates for regenerative medicine applications. Today, MSCs are more and more using to clinical trials for repairing injured tissues or organs. Upon implantation, however, cells encounter an avascular microenvironment depleted of oxygen and nutrients that is responsible for their massive death post-transplantation, a major roadblock to successful clinical therapies. This issue can be overcome by *in situ* supplying glucose that acts as the main metabolic fuel for MSCs in hypoxia and enhances their survival and functionality.

However, energy-providing pathways used by MSCs upon transplantation and their plausible metabolic switches in response to this ischemic environment are not well understood. Moreover, any strategy, based on continuous glucose delivery to fuel cells, have not been designed for improving MSC survival and functionality post-implantation.

The first aim of this PhD project is to better understand the energetic metabolism used by MSCs upon transplantation. We establish for the first time that the *in vivo* environment experienced by hMSCs is best reflected by near-anoxia (0.1% pO₂) *in vitro* associated with glucose and serum depletion. Under this « ischemic » *in vitro* model, hMSCs rely almost exclusively on glucose through anaerobic glycolysis to produce ATP. Moreover, hMSCs are unable to adapt their energetic metabolism to the lack of exogenous glucose, possess a very limited stock of glucose and no ATP reserves. This lack of downregulation of energy turnover results in a rapid depletion of hMSCs energy reserves, explaining their poor survival rate.

The next (and main) aim of this PhD project is to develop and test an enzyme-controlled, nutritive hydrogel with an inbuilt system of glucose delivery to improve MSC survival and functionality. This novel hydrogel, previously based on a patent (EP14306700), is made of both fibrin, starch (a polymer of glucose), and amyloglucosidase (AMG, an enzyme that releases glucose from starch), and provides physiological levels of glucose to fuel MSCs via glycolysis. hMSCs loaded in the novel starch/AMG hydrogel exhibit improved cell viability and paracrine functions for up to 14 days under the “ischemic” *in vitro* model. Most importantly, in addition to enhanced MSC viability, this nutritive hydrogel promoted paracrine functions when implanted in an ectopic model.

Looking forward, and given the current wide interest in the use of stem cells for regenerative medicine applications, the novel inbuilt system of glucose delivery has the potential of improved tissue engineering and regenerative methodologies, which enhance cell survival and functionality after implantation.

Key-words: Tissue engineering, Mesenchymal stem cells, Ischemia, Metabolism, Glucose, Hydrogel, Starch, Amyloglucosidase, Cell survival, Cell paracrine functions.

TABLE DES FIGURES

Figure 1 : Le triangle de l'ingénierie tissulaire	5
Figure 2 : Cellules souches et potentiel de différenciation	7
Figure 3 : Différenciation des CSMs vers les voies ostéogénique, adipogénique et chondrogénique	10
Figure 4 : Potentiel direct et indirect des CSMs	12
Figure 5 : Mécanismes d'action d'HIF-1 α en présence et absence d'oxygène	18
Figure 6 : Catabolisme et anabolisme, deux mécanismes complémentaires pour l'équilibre du métabolisme énergétique cellulaire	20
Figure 7 : La glycolyse et ses 10 réactions enzymatiques	21
Figure 8 : Cycle de l'acide citrique ou TCA	22
Figure 9 : Principe de fonctionnement de la chaîne respiratoire	23
Figure 10 : Réaction de fermentation lactique.....	23
Figure 11 : Rôles et protéines cibles activées et inhibées par la voie AKT	25
Figure 12 : Rôles et protéines cibles activées et inhibées par la voie AMPK	26
Figure 13 : Mécanisme de régulation de la voie mTORC1	26
Figure 14 : Métabolisme énergétique des CSMs en conditions normoxique et anoxique	27
Figure 15 : Etude de la survie des hCSMs, avec présence ou absence de glucose, en condition quasi- anoxique dans un modèle <i>in vitro</i> et dans un modèle <i>in vivo</i> en site ectopique chez la souris immunodéprimée	56
Figure 16 : Hydrolyse de l'amidon par l'AMG.....	57
Figure 17 : Photographie des hydrogels nutritifs <i>in vitro</i> et représentation schématique de leur composition interne	58

TABLE DES TABLEAUX

Tableau 1: Cahier des charges d'un biomatériau en ingénierie tissulaire	6
Tableau 2 : Potentiel de différenciation des CSMs	11
Tableau 3 : PO ₂ macroscopiques mesurées au sein de différents tissus humains.....	17
Tableau 4 : Gènes régulés par le facteur de transcription HIF-1.....	19
Tableau 5 : Bilan énergétique au sein des CSMs en condition normoxique ou anoxique.	27
Tableau 6 : Cinétiques de formation de vaisseaux sanguins et de migration de cellules endothéliales.	54

LISTE DES ABBRÉVIATIONS

2DG: 2-Deoxy-D-Glucose

ADP: Adenosine Diphosphate

ADSCs: Adipose tissue-Derived Stem Cells

AKT: Protein Kinase B

AMG: Amyloglucosidase

AMPK: Adenosine Monophosphate-activated Protein Kinase

Ana: Antimycine-A

ANG: Angiogénine

ANGPT: Angiopoiétine

Atb/Atm: Antibiotiques/Antimycotiques

ATP: Adenosine Tri Phosphate

BMMSCs: Bone Marrow derived Mesenchymal Stem Cells

BMP: Bone Morphogenetic Protein

CFUf: Colony Forming Unit fibroblastic

CO₂: Dioxyde de carbone

CSMs: Cellules Souches Mésoenchymateuses

CXCL: C-X-C motif chemokine

FGF: Fibroblast Growth Factor

hCSMs: Cellules Souches Mésoenchymateuses humaines

HGF: Hepatocyte Growth Factor

HIF: Hypoxia Inducible Factor

HUVECs: Human Umbilical Vein Endothelial Cells

IGF: Insulin-like Growth Factor

IL: Interleukine

IP: Iodure de Propidium

IT: Ingénierie Tissulaire

JFBTM: Journées Françaises de Biologie des Tissus Minéralisés

LDH: Lactate Deshydrogenase

Malo: Malonate

MCP-1: Monocyte Chemoattractant Protein 1

MEM: Minimum Essential Medium

MIP-2: Macrophage Inflammatory Protein - 2

MMP-9: Matrix Metallopeptidase 9

mTOR: mamalian Target Of Rapamycin

NADH: Nicotinamide Adenine Dinucleotide réduit

O₂: Oxygène

ORS: Orthopaedic Research Society

pCO₂: Pression partielle de dioxyde de carbone

PFCs: Perfluorocarbones

Pi: Phosphate inorganique

PI3K: Lipid Kinase Phosphoinositide 3-kinase

PIT: Produits d'Ingénierie Tissulaire

pO₂: Pression partielle d'oxygène

PPP: Pentose Phosphates Pathway

SDF: Stromal cell-Derived Factor

Sfrp2: Secreted Frizzled-Related Protein 2

SVF: Sérum de Veau Fœtal

TCA: Cycle de l'Acide Citrique

TERMIS: Tissue Engineering and Regenerative Medicine International Society

TNF: Tumor Necrosis Factor

VEGF: Vascular Endothelial Growth Factor

TABLE DES MATIÈRES

INTRODUCTION	2
CHAPITRE 1 : LES CSMs DANS LA RÉPARATION TISSULAIRE	4
1.1 Généralités	4
1.1.1 Définition de l'ingénierie tissulaire.....	4
1.1.2 Acteurs de l'ingénierie tissulaire	4
1.1.2.1 Les biomatériaux	5
1.1.2.2 Les facteurs biologiques	6
1.1.2.3 Les cellules souches.....	7
1.1.2.3.1 Généralités	7
1.1.2.3.2 Les cellules souches adultes	8
1.2 Les CSMs.....	9
1.2.1 Les CSMs : un concept toujours débattu.....	9
1.2.2 Caractérisation des CSMs	9
1.2.3 Potentiel de différenciation des CSMs	10
1.2.4 Effet paracrin des CSMs.....	11
1.3 Exemple d'études pré-cliniques et cliniques.....	12
1.4 La mort massive des CSMs après implantation : un obstacle majeur pour l'ingénierie tissulaire.....	14
CHAPITRE 2 : COMPRENDRE LA MORT DES CSMs APRÈS IMPLANTATION: ISCHÉMIE ET MÉTABOLISME CELLULAIRE	16
2.1 L'ischémie: un microenvironnement hostile à la survie cellulaire	16
2.1.1 Définition	16
2.1.2 Hypoxie.....	16
2.1.3 HIF-1 α	18
2.1.4 Absence de nutriments	19
2.1.5 Accumulation de déchets et hypercapnie.....	19
2.2 Voies métaboliques	20
2.2.1 Les voies métaboliques principales	21
2.2.1.1 La glycolyse.....	21
2.2.1.2 Le cycle de l'acide citrique et la chaîne respiratoire	22

2.2.2 Les voies métaboliques alternatives	23
2.2.2.1 Le métabolisme lié au glycogène	23
2.2.2.2 Le métabolisme lié à la glutamine et à la sérine	24
2.2.2.3 Le métabolisme lié aux lipides	24
2.3 Voies de signalisation principales engagées dans la survie des CSMs	24
2.3.1 La voie AKT	25
2.3.2 La voie AMPK.....	25
2.3.3 La voie mTORC1.....	26
2.4 Introduction au métabolisme des CSMs en conditions anoxiques	27
2.5 Comprendre le métabolisme énergétique des CSMs post-implantation pour améliorer leur survie	28
CHAPITRE 3 : STRATEGIES POUR AMÉLIORER LA SURVIE DES CSMs APRÈS IMPLANTATION	50
3.1 Le pré-conditionnement métabolique	50
3.2 L'accélération de la vascularisation.....	52
3.3 L'apport d'oxygène.....	54
3.4 L'apport de glucose	55
3.5 Application de la stratégie d'apport de glucose : hydrogel à délivrance contrôlée de glucose pour alimenter le métabolisme des CSMs après implantation	56
PROBLÉMATIQUE	60
RÉSULTATS.....	64
ARTICLE 1 : HUMAN MESENCHYMAL STEM CELL FAILURE TO ADAPT TO GLUCOSE SHORTAGE AND RAPIDLY USE INTRACELLULAR ENERGY RESERVES THROUGH GLYCOLYSIS EXPLAINS POOR CELL SURVIVAL AFTER IMPLANTATION.....	66
ARTICLE 2 : ENZYME-CONTROLLED, NUTRITIVE HYDROGEL FOR MESENCHYMAL STEM CELL SURVIVAL AND REGENERATIVE FUNCTION.....	90
DISCUSSION.....	126

CONCLUSION142

RÉFÉRENCES.....146

ANNEXES158

ARTICLE 3 : INJECTABLE ALLOGRAFT ENHANCES VERTICAL BONE AUGMENTATION IN RAT CALVARIUM.....160

ARTICLE 4 : EXPERIMENTAL TYPE 2 DIABETES IMPACTS DIFFERENTLY SELECT FUNCTIONS OF BONE MARROW MESENCHYMAL STROMAL CELLS.....164

COMPTE-RENDUS SCIENTIFIQUES190

INTRODUCTION

CHAPITRE 1

LES CSMs DANS LA RÉPARATION TISSULAIRE

« Tu es fait de cent mille milliards de cellules. Nous sommes, chacun, une multitude ».

Carl SAGAN

1.1 Généralités

1.1.1 Définition de l'ingénierie tissulaire

L'ingénierie tissulaire a été initialement définie comme « un domaine interdisciplinaire appliquant les principes d'ingénierie et des sciences de la vie dans le but de développer des substituts qui restaurent, maintiennent et améliorent la fonction des tissus vivants » (Langer and Vacanti, 1999). L'ingénierie tissulaire est souvent associée à la médecine régénérative, qui comme son nom l'indique, vise à régénérer un tissu ou un organe. Aujourd'hui, l'ingénierie tissulaire se définit par l'utilisation d'un matériau biocompatible associé ou non à des facteurs biologiques et/ou des cellules, afin de remplacer ou de réparer des tissus ou organes dans le but de restaurer leur fonction au sein de l'organisme. Il s'agit d'une discipline récente qui doit, à l'heure actuelle, faire la démonstration de son intérêt chez l'homme, lorsque le choix du support et l'exploitation du matériel cellulaire auront été maîtrisés.

En apportant une nouvelle approche de la médecine par le développement de thérapies innovantes cherchant à réparer le tissu ou organe lésé, l'ingénierie tissulaire présente un intérêt certain dans le domaine de la Santé.

1.1.2 Acteurs de l'ingénierie tissulaire

Le produit d'ingénierie tissulaire repose sur l'interaction de trois composantes (Figure 1):

- Une composante matricielle : un matériau biocompatible,
- Une composante moléculaire : des facteurs biologiques,
- Une composante cellulaire.

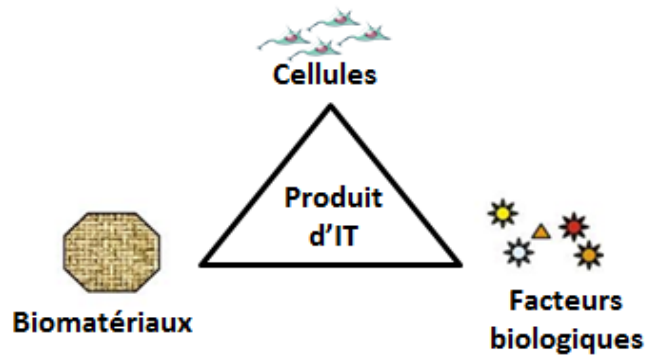


Figure 1: Le triangle de l'ingénierie tissulaire (*adapté de Van Griensven and Lemoine, 2009*).

Après implantation, le produit d'ingénierie tissulaire (PIT) peut contribuer de manière directe à la réparation du tissu lésé. Pour cela, les cellules présentes sur le biomatériau prolifèrent puis se différencient afin de former un néo-tissu. Alternativement, le PIT peut jouer un rôle indirect. Dans ce cas, les cellules présentes sur le PIT sécrètent un panel de facteurs biologiques (effet paracrin) capables de moduler l'activité des cellules hôtes environnantes. A plus ou moins long terme, le PIT est alors incorporé par le tissu hôte.

1.1.2.1 Les biomatériaux

La définition initiale d'un biomatériau comme « un matériau non vivant utilisé dans un dispositif médical et destiné à interagir avec des systèmes biologiques » (Williams, 1986) a fortement évolué, en intégrant les récentes avancées biomédicales, notamment en termes de thérapies cellulaires, d'ingénierie tissulaire, de délivrance moléculaire ou encore d'impression 3D cellulaire. En effet, un biomatériau est aujourd'hui défini comme « une substance conçue pour prendre une forme et qui, seule ou faisant partie d'un système complexe, et grâce à des interactions avec des composants de systèmes vivants, est utilisée pour diriger une procédure thérapeutique ou diagnostique pratiquée chez l'homme ou en médecine vétérinaire (Williams, 2009).

En ingénierie tissulaire, bien que les propriétés physico-chimiques et mécaniques d'un biomatériau restent très importantes, la qualité de ses interactions avec les composants des systèmes vivants de l'hôte détermine le choix du biomatériau à utiliser. Les biomatériaux dit « bio-inertes », non invasifs et interagissant peu ou pas avec le vivant, sont progressivement remplacés par des biomatériaux « bioactifs », capables de remplir la fonction souhaitée sans provoquer d'effet indésirable local ou systémique chez l'hôte, et générant une réponse cellulaire bénéfique ainsi qu'une augmentation de la performance clinique relative à cette thérapie (Williams, 2014-a). En d'autres termes, l'objectif est

aujourd'hui que le biomatériau participe activement au processus de réparation du tissu ou de l'organe lésé. Ainsi, en ingénierie tissulaire, le biomatériau idéal devrait respecter le cahier des charges mentionné dans le tableau 1 (Williams, 2014-b).

Actions primaires	Non cytotoxique, non immunogène et peu inflammatoire
	Propriétés surfaciques adaptées pour faciliter adhésion et fonctionnalité cellulaire
	Propriétés mécaniques adaptées au tissu à réparer et permettre la différenciation et prolifération cellulaire
	Dimensions et formes adaptées à la morphologie du tissu à réparer
	Transfert des signaux biologiques orientant les cellules cibles vers leurs fonctions souhaitées
	Optimisation du transport de nutriments et d'oxygène vers les cellules
	Colonisation par les vaisseaux sanguins et les fibres nerveuses de l'hôte
Actions secondaires	Propriétés de résorption à une vitesse de dégradation appropriée
	Injectable dans un organisme sans altération des propriétés cellulaires

Tableau 1: Cahier des charges d'un biomatériau en ingénierie tissulaire (adapté de Williams, 2014-b).

1.1.2.2 Les facteurs biologiques

Les biomatériaux sont souvent associés à des facteurs biologiques qu'ils délivrent *in situ*. Dans notre organisme, les facteurs biologiques représentent les signaux, ou messagers chimiques, par lesquels les cellules communiquent entre elles. Ils sont capables d'être diffusés rapidement dans l'espace extracellulaire par voie nerveuse, humorale ou locale. Il existe de nombreux types de messagers chimiques, notamment les cytokines, séquences peptidiques, enzymes ou facteurs de croissance. En ingénierie tissulaire, ces messagers chimiques, judicieusement choisis et intégrés au biomatériau, ont pour rôle d'améliorer la bioactivité de ce dernier, en augmentant notamment son attractivité vis-à-vis des cellules du tissu hôte, ou en stimulant des fonctions spécifiques des cellules intégrées à celui-ci. Par exemple, des séquences peptiques impliquées dans l'adhésion cellulaire peuvent être adsorbées à la surface d'un biomatériau, comme les séquences contenant les motifs peptidiques RGD (Guillemot et al., 2006). Dans le cadre de l'ingénierie tissulaire osseuse, les protéines morphogéniques osseuses (BMPs), connues pour leur capacité à favoriser l'ostéogénèse, sont associées aux céramiques (Ramos et al., 2008 ; Loozen et al., 2013). Enfin, il est à noter que certaines cellules intégrées au biomatériau peuvent également jouer le rôle de délivrance de facteurs biologiques pertinents pour la réparation du tissu ou organe lésé.

1.1.2.3 Les cellules souches

1.1.2.3.1 Généralités

Idéalement, les cellules utilisées en ingénierie tissulaire doivent posséder un potentiel prolifératif élevé (mais limité) associé à une capacité de différenciation en cellules du tissu à traiter. Ces deux propriétés caractérisent les cellules souches qui se distinguent des autres cellules de notre organisme de part (i) leur capacité d'auto-renouvellement, en se divisant indéfiniment à l'identique, ainsi que de (ii) leur capacité de différenciation, en se transformant en un ou plusieurs types cellulaires différenciés (Sylvester and Longaker, 2004). Les cellules souches sont classées selon leur potentiel de différenciation (Figure 2).

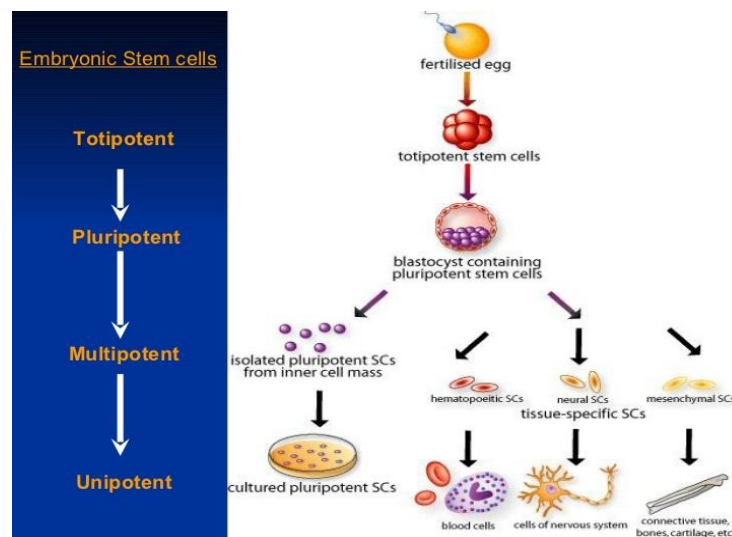


Figure 2 : Cellules souches et potentiel de différenciation
(https://www.slideshare.net/punnu_malik/induced-pluripotent-stem-cells).

Les cellules souches totipotentes sont capables de donner naissance à tout type cellulaire et de générer un organisme entier. La cellule zygote (cellule œuf) et les cellules issues des trois premières divisions de l'embryogénèse sont totipotentes.

Les cellules souches pluripotentes, ou cellules souches embryonnaires, sont capables de donner naissance à n'importe quel tissu spécialisé dérivant des feuilletts embryonnaires (mésoderme, ectoderme, endoderme). Cependant, elles ne donnent pas naissance à un organisme complet.

Les cellules souches multipotentes sont capables de donner naissance à l'ensemble des cellules composant un tissu ou un organe. Ces cellules sont primordiales dans l'homéostasie tissulaire, en étant responsables du renouvellement des cellules de l'organisme et en permettant le maintien du réservoir de

cellules souches. Les cellules souches mésenchymateuses, détaillées dans le prochain paragraphe, appartiennent par exemple à cette classification.

Les cellules souches unipotentes ne sont capables de donner naissance qu'à un seul type cellulaire. Elles jouent également un rôle important dans l'homéostasie tissulaire. Les cellules souches épidermiques par exemple appartiennent à cette classification, n'étant capables de générer que des kératinocytes.

Le pouvoir de différenciation des cellules souches diminue en fonction du stade de développement de l'individu. Trois familles de cellules souches sont ainsi distinguées en fonction du stade de développement auquel ces dernières ont été prélevées: les cellules souches embryonnaires, fœtales et adultes. Toutefois, du fait des nombreuses restrictions thérapeutiques et réglementaires liées aux cellules souches embryonnaires et fœtales, nous ne nous intéresserons dans ce chapitre qu'aux cellules souches adultes.

1.1.2.3.2 Les cellules souches adultes

Les cellules souches adultes sont des cellules non différenciées multipotentes ou unipotentes, dispersées au sein de tissus différenciés dont elles constituent le réservoir de cellules réparatrices. Les cellules souches adultes assurent l'homéostasie tissulaire en réparant les tissus lésés après un traumatisme, une pathologie ou en cas de besoin physiologique. Ces cellules sont localisées dans des zones précises d'un tissu spécifique appelées niches, aux propriétés micro-environnementales propices au maintien de leur survie, ainsi que de l'équilibre entre leur auto-renouvellement et différenciation.

De nombreux types de cellules souches adultes ont été découverts et sont étudiés à ce jour : les cellules souches hématopoïétiques (Morrison et al., 1996), épidermiques (Rochat et al., 1994), nerveuses (Snyder et al., 1998), intestinales (Slack, 2000) ou encore mésenchymateuses (Friedenstein et al., 1968 ; Pittenger, 1999). Il est à noter que cette liste n'est pas exhaustive.

Outre leur capacité d'auto-renouvellement et de différenciation, les cellules souches adultes peuvent être prélevées directement chez le patient (cellules autologues), contrairement aux cellules souches embryonnaires (ES), et ne présentent pas les risques de tumorigénicité de ces dernières. Ces caractéristiques font des cellules souches adultes des candidates de choix pour l'ingénierie tissulaire, notamment les cellules souches mésenchymateuses (CSMs), communément appelées en anglais Mesenchymal Stromal Cells (MSCs), ou encore cellules souches multipotentes du stroma. L'ensemble des propriétés de ces cellules sera détaillé dans les paragraphes suivants.

1.2 Les CSMs

1.2.1 Les CSMs : un concept toujours débattu

Tavassoli et Crosby démontrèrent le potentiel ostéogène de la moelle osseuse en utilisant des fragments d'os entier sans toutefois identifier l'origine des cellules responsables de cette néoformation osseuse (Tavassoli and Crosby, 1969). Sans le savoir, les CSMs venaient d'être mises en lumière ! Dans les années 1960, Friedenstein démontra que le potentiel ostéogène de la moelle osseuse est associé à une sous-population cellulaire contenue dans cette dernière, de forme fibroblastique, indiquant son origine stromale médullaire. Dix ans plus tard, il démontra le potentiel d'auto-renouvellement de cette sous-population en mettant en évidence leur capacité à former des colonies de cellules identiques à partir d'une seule cellule, appelée *Colony Forming Unit fibroblastic* (CFUf). Une fois transplantées, ces cellules sont capables de générer du tissu osseux, cartilagineux et adipeux (Friedenstein et al., 1970). Friedenstein et Owen nommèrent tout d'abord cette sous-population *Osteogenic Stem Cells* (Friedenstein and Owen, 1987), puis *Bone Marrow Stromal Cells* (BMSCs) (Owen and Friedenstein, 1988). Le terme *Mesenchymal Stem Cells* est utilisé pour la première fois en 1991 par Caplan (Caplan, 1991) décrivant ces cellules comme des cellules progénitrices pluripotentes capables de générer le tissu osseux, cartilagineux, tendineux, ligamenteux, adipeux, musculaire, dermique et conjonctif. L'acronyme MSC, ou CSM, est vivement débattu dans les années 2000 (Dominici et al., 2006), les cellules s'avérant incapables de générer l'ensemble des tissus décrits dans les travaux de Caplan et l'origine des progéniteurs n'étant pas la même pour les différents tissus. Enfin, en 2005, la société internationale de thérapie cellulaire (SITC) décide de conserver l'acronyme MSC mais modifie sa signification pour *Multipotent Mesenchymal Stromal Cells* (Horwit et al, 2005).

1.2.2 Caractérisation des CSMs

Les CSMs pouvant être isolées à partir de nombreux tissus, elles représentent ainsi une population très hétérogène (Charbord et al., 2010). La SITC a statué sur l'ensemble des caractéristiques essentielles à l'identification des CSMs : (i) la capacité d'adhérence sur plastique, (ii) l'expression de marqueurs membranaires spécifiques (CD73, CD90, CD105) associés à l'absence de marqueurs membranaires hématopoïétiques (CD14, CD19, CD34, CD45, HLA-DR) et, (iii) la capacité à se différencier *in vitro* en chondrocytes, adipocytes et ostéoblastes en présence de milieux de culture spécifiques (Dominici et al., 2006 ; Chamberlain et al., 2007).

1.2.3 Potentiel de différenciation des CSMs

Les CSMs pouvant être isolées à partir de nombreux tissus, elles possèdent des caractéristiques de différenciation, ou effets directs, propres à leur tissu d'origine (Tuan et al., 2002 ; Charbord et al., 2010). Comme mentionné dans le paragraphe précédent, les CSMs sont capables de se différencier en cellules de la lignée mésodermale, incluant les ostéoblastes (Jaiwal et al., 1997), les chondrocytes (Hammouda et al., 2011) et les adipocytes (Fink and Zackar, 2012). Le potentiel de différenciation de ces cellules est majoritairement examiné par des études *in vitro* utilisant des milieux de culture chargés par des facteurs de différenciation spécifiques (Figure 3).

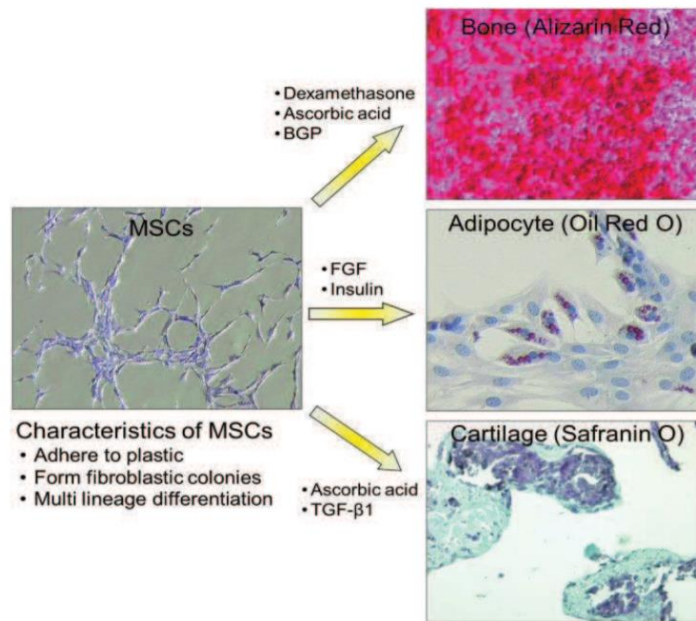


Figure 3 : Différenciation des CSMs vers les voies ostéogénique, adipogénique et chondrogénique (adapté de Tuan et al., 2002 et Chamberlain et al., 2007)

Plusieurs études montrent également que le potentiel de différenciation des CSMs peut s'étendre au-delà de la lignée mésodermale. Ces cellules sont en effet capables de se différencier en hépatocytes (Reinhardt et al., 2007), neurones (Tropel et al., 2006), ou cardiomyocytes (Kehat et al., 2001 ; Xu et al., 2002). Cette liste non exhaustive du potentiel de différenciation est résumée dans le tableau 2.

Tissus sources des MSCs	Différenciations
Moelle osseuse	Ostéoblastes, Chondrocytes, Adipocytes, Cardiomyocytes, Cellules musculaires, Hépatocytes, Cellules stromales, (Neurones, Astrocytes?)
Os trabéculaire	Ostéoblastes, Chondrocytes, Adipocytes
Périoste	Ostéoblastes, Chondrocytes
Muscle	Ostéocytes, Chondrocytes, Adipocytes, Myotubes, Cellules endothéliales, Neurones
Sang	Ostéoblastes, Ostéoclastes, Adipocytes, Fibroblastes
Tissu adipeux	Ostéoblastes, Chondrocytes, Cellules musculaires, Cellules stromales
Derme	Ostéoblastes, Chondrocytes, Adipocytes, Cellules musculaires
Membrane synoviale	Ostéoblastes, Chondrocytes, Adipocytes, Cellules musculaires

Tableau 2 : Potentiel de différenciation des CSMs (adapté de Chamberlain et al., 2007 et de Charbord et al., 2010).

1.2.4 Effet paracrin des CSMs

En plus de posséder des propriétés de prolifération et de différenciation, ces cellules souches adultes multipotentes présentent également des fonctions paracrines, via la sécrétion d'un panel de médiateurs bioactifs (Figure 4):

- proangiogènes, favorisant la formation de nouveau vaisseaux sanguins : sécrétion de VEGF, IL-6, IL-8, IGF, FGF (Kinnaird et al., 2004 ; Zhang et al., 2007 ; Boomsma et al., 2012),
- chimioattractants, favorisant le recrutement d'autres types cellulaires au niveau du site à réparer : sécrétion de HGF, IGF-1, FGF-2, SDF-1, CXCL12 (Fiedler et al., 2006 ; Mishima et al., 2008 ; Van Poll et al., 2008),
- anti-apoptotiques, inhibant les voies responsables de la mort cellulaire : sécrétion de VEGF, Sfrp2, SDF-1, IGF (Kinnaird et al., 2004 ; Zhang et al., 2007),
- anti-fibrotique et favorisant le remodelage tissulaire : MMP-9, IL-10, HGF, TNF- α (Sakaida et al., 2011),
- immunomodulateur, modulant la balance des cytokines et développant même un pouvoir immunosuppresseur (Ménard and Tarte, 2011 ; Wang et al, 2014).

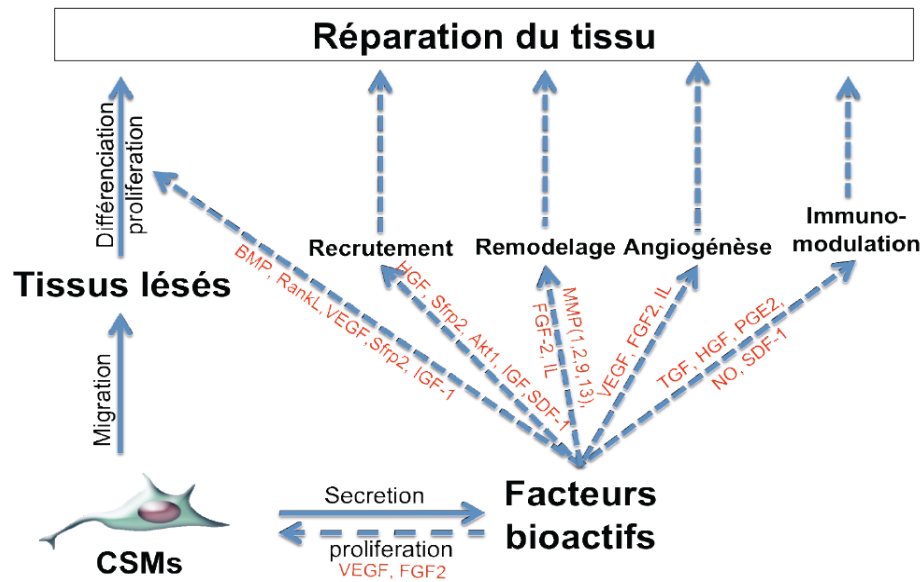


Figure 4 : Potentiel direct (flèches pleines) et indirect (flèches pointillées) des CSMs (d'après Deschepper, 2011).

Avec l'ensemble de ces propriétés, les CSMs ont la capacité d'agir à plusieurs niveaux pour favoriser la réparation de tissus lésés. De plus, ces propriétés sont modulables en fonction du tissu à réparer. En effet, le choix du type de CSMs (issues de la moelle osseuse, issues du tissu adipeux, etc.), ou encore leur orientation vers un profil anti ou pro-inflammatoire, offrent de nombreuses possibilités dans la réalisation de thérapies ciblées. Par exemple, le choix de CSMs issues de la moelle osseuse associées à un matériau céramique semble être adapté pour l'ingénierie tissulaire osseuse, mais ce choix n'est pas judicieux pour réparer le tissu cardiaque.

1.3 Exemple d'études pré-cliniques et cliniques

D'après le registre de l' « US National Institutes of Health », 5111 essais cliniques dans le monde utilisent ou ont utilisé des cellules souches adultes pour la réparation d'organes et de tissus depuis 2008, dont 878 études avec des CSMs (clinicaltrials.gov).

Dans le traitement de la réparation de grands défauts osseux (ne se réparant pas naturellement), des CSMs associées à une céramique ont étéensemencées au sein de grands défauts osseux (21mm) chez le chien (Bruder et al., 1994 ; 1999). Malgré une augmentation significative de la néoformation osseuse dans le groupe injecté avec les CSMs, les défauts osseux n'ont pas été comblés dans leur intégralité. Une autre étude, consistant à combler intégralement un défaut de taille critique (25mm) dans le métatarsien chez la brebis, a montré que l'injection de CSMs associées à des particules de corail entraînait un

rétablissement de la continuité osseuse (6 cas sur 7), ainsi qu'une consolidation osseuse complète (3 cas sur 7) (Petite et al., 2000). Toutefois, l'efficacité thérapeutique des CSMs dans cette réparation osseuse restait nettement inférieure à l'autogreffe osseuse.

Aucune étude clinique utilisant des CSMs n'a, à ce jour, été menée dans le cadre de la réparation de grands défauts osseux. Cependant, deux cas cliniques peuvent être rapportés, l'un concernant la réparation de la phalange distale d'un pouce (Vacanti et al., 2001) et l'autre concernant la réparation de grandes pertes de substances osseuses au niveau du tibia, de l'ulna et de l'humérus (Quarto et al., 2001).

Dans le traitement des pertes du tissu cartilagineux (tissu non vascularisé), une étude pré-clinique menée chez le lapin a montré que les CSMs associées à une matrice et implantées au niveau du défaut cartilagineux étaient capables de se différencier en chondrocytes après 2 semaines, puis d'induire une néoformation cartilagineuse après 14 semaines (Yan et al., 2007). Toutefois, ce néo cartilage présentait des propriétés mécaniques différentes par rapport à celui des groupes sains, notamment en terme de rigidité.

Au niveau clinique, l'injection de CSMs autologues a montré, après 6 semaines, une atténuation de symptômes, notamment douleur et mobilité, chez 12 patients traités contre l'ostéo-arthrose du genou, bien que du fibrocartilage, et non du cartilage hyalin, soit formé (Wakitani et al., 2004).

Dans le traitement contre l'infarctus du myocarde, sur 13 études cliniques regroupant un total de 811 patients, l'injection de CSMs autologues au niveau du tissu cardiaque lésé a montré une augmentation de 2.99% de la fraction d'éjection du volume sanguin du ventricule gauche au cours des 6 premiers mois, ainsi qu'une réduction de la lésion myocardique de 3.51% par rapport aux patients n'ayant pas été traités avec les CSMs (Martin-Rendon et al., 2008). De plus, sur 50 études cliniques regroupant 2600 patients, l'injection de CSMs chez des individus porteurs de stents cardiaques a montré une réduction significative de thrombose autour du dispositif médical (Jeevanantham et al., 2012). Toutefois, d'autres études cliniques similaires ne démontrent pas le bénéfice thérapeutique des CSMs, présentant des résultats identiques chez les patients traités et non traités avec ces cellules (Lunde et al., 2006).

Il est clair que l'utilisation des CSMs en IT présente un intérêt thérapeutique très important pour la réparation de tissus ou organes lésés. A ce stade, nous ne pouvons pas savoir si les effets bénéfiques observés dans ces études pré-cliniques et cliniques, proviennent de la différenciation des CSMs, de leur effet paracrin, ou encore de ces deux effets combinés. Cependant, en plus d'être difficilement reproductibles, les résultats issus des études montrent que l'efficacité thérapeutique obtenue avec les CSMs reste égale et parfois même inférieure aux standards cliniques.

1.4 La mort massive des CSMs après implantation : un obstacle majeur pour l'ingénierie tissulaire

De nombreuses études ont démontré une mortalité massive et rapide des CSMs associées à un biomatériau (plus de 90% de mort cellulaire en moins de 10 jours) après implantation en sous-cutanée (Logeart-Avramoglou et al., 2010 ; Becquart et al., 2012 ; Giannoni et al., 2010 ; McGinley et al., 2013), ou au sein de défauts osseux de calvaria (Dégano et al., 2008 ; Geuze et al., 2010), ou de fémur (Manassero et al., 2016) chez la souris. Cette mortalité atteint même 98% en 3 jours dans le cadre de traitement d'ischémie cardiaque (Toma et al., 2008) ou de lésions sévères du rein (Togel et al., 2008) chez la souris. Ce phénomène n'est pas un problème récent et est malheureusement bien loin de se limiter aux CSMs. En effet, dès 1988, l'équipe de Vacanti cherchait déjà à comprendre les raisons de la mort massive et rapide d'hépatocytes implantés chez le rat et la souris (Vacanti et al., 1988).

Après implantation, les CSMs sont confrontées à de nombreux stress dont la réaction immunitaire de l'hôte. De plus, le site d'implantation se caractérise très souvent par une absence de vascularisation, dépourvu d'oxygène, de nutriments et de système d'élimination de déchets métaboliques. Cet environnement hostile, caractérisé comme ischémique, impacte très négativement la survie des CSMs et semble d'ailleurs représenter le principal facteur de cette mort cellulaire massive (Becquart et al., 2012).

CHAPITRE 2

COMPRENDRE LA MORT DES CSMs APRÈS IMPLANTATION: ISCHÉMIE ET MÉTABOLISME CELLULAIRE

« Ne me dites pas que ce problème est difficile. S'il n'était pas difficile, ce ne serait pas un problème ».

Ferdinand FOCH

2.1 L'ischémie: un microenvironnement hostile à la survie cellulaire

2.1.1 Définition

L'ischémie se définit au niveau de l'organisme par une diminution de l'apport sanguin artériel. Ainsi, l'ischémie entraîne (i) une diminution des apports en oxygène, (ii) une déplétion en nutriments, (iii) une accumulation des déchets métaboliques et (iv) une hypercapnie (augmentation de la pression partielle de dioxyde de carbone) (Russ et al., 2007). Il est à noter que la diffusion de l'oxygène et des nutriments se limite à un périmètre de 200 à 300 μm autour d'un vaisseau sanguin (Folkman and Hochberg, 1973 ; Sutherland, 1986 ; Skuk et al., 2007). Autrement dit, dans les nombreuses applications cliniques utilisant des CSMs implantées au sein d'un tissu lésé, celles-ci sont éloignées du réseau vasculaire et ainsi confrontées à un microenvironnement ischémique, hostile à leur survie.

2.1.2 Hypoxie

Le terme « hypoxie » est une notion subjective, dépendante de l'échelle d'observation à laquelle on se place. On parle généralement de conditions hypoxiques lors d'une inadéquation entre la demande et l'offre en oxygène, c'est-à-dire entre les besoins en oxygène d'un organisme et la quantité d'oxygène

disponible. A l'échelle cellulaire, les cellules sont confrontées à des conditions hypoxiques lorsque la quantité en oxygène disponible est insuffisante pour alimenter leur métabolisme. A l'échelle de l'organisme, la pression partielle en oxygène (pO_2) varie en fonction des tissus. Par exemple, une pO_2 d'environ 14% est mesurée au niveau de la peau et des poumons (Ivanovic, 2009; Wild et al., 2005) alors que le cœur, les reins, le cerveau et le foie présentent une pO_2 proche de 7% (Lopez-Barneo et al., 2008 ; Mik et al., 2004; Hemphill et al., 2005 ; Jungermann and Kietzmann, 1997). La pO_2 au niveau de la moelle osseuse, une des principales niches des CSMs, atteint 0.5 à 4% (Chow et al., 2001; Hung et al., 2007). Il est à noter que ces pO_2 mesurées sont d'ordre macroscopique et ne reflètent pas exactement la pO_2 locale perçue par les cellules au sein de leur tissu. Lorsque la pO_2 atteint un niveau proche de l'anoxie (absence d'oxygène), on parle de quasi-anoxie ou encore d'hypoxie sévère. Le tableau 3 présente les pO_2 macroscopiques mesurées dans divers tissus.

Tissus	$P(O_2)$	Références
Peau	15 %	Ivanovic <i>et al.</i> , 2009
Poumons	14 %	Wild <i>et al.</i> , 2005
Foie	12 %	Holland <i>et al.</i> , 1993 Jungermann <i>et al.</i> , 1997
Cœur	6 - 10 %	Roy <i>et al.</i> , 2003 Lopez-Barneo <i>et al.</i> , 2008
Reins	4 - 6 %	Liss <i>et al.</i> , 1998 Mik <i>et al.</i> , 2004
Rate	3 %	Holland <i>et al.</i> , 1993
Cerveau	2 - 7 %	Hemphill <i>et al.</i> , 2005
Thymus	1%	Braun <i>et al.</i> , 2005
Moelle osseuse	0.5 - 4 %	Chow <i>et al.</i> , 2001 Hung <i>et al.</i> , 2007

Tableau 3 : PO_2 macroscopiques mesurées au sein de différents tissus humains.

En fonction du type cellulaire et de leur localisation au sein de l'organisme, les cellules sont donc exposées à des pO_2 variables, caractérisées de « physiologiques » ou encore de « physioxiques », auxquelles les cellules fonctionnent correctement sans adaptation métabolique préalable. Par abus de langage, le terme « normoxie » est communément employé pour définir la pression partielle atmosphérique de l'oxygène, soit environ 21%. Bien que cette pO_2 soit nettement supérieure aux pressions partielles physiologiques, elle reste classiquement utilisée en culture cellulaire en tant que condition standard (Carrancio et al., 2008)! D'un point de vue biologique, une cellule est considérée en

conditions hypoxiques lorsque la sous-unité α du facteur de transcription Hypoxia Inducible Factor (HIF-1 α) est non dégradée, entraînant ainsi l'activation de HIF (Cowen et al, 2001 ; Stegen et al., 2016).

2.1.3 HIF-1 α

Le facteur de transcription HIF est un hétérodimère composé d'une sous-unité β , stable et ubiquitaire, ainsi que d'une sous-unité α , dont la stabilité dépend directement du taux d'oxygène. En présence d'une quantité suffisante d'oxygène, la sous-unité α est rapidement dégradée (Simon and Keith, 2008). Les prolyhydroxylases, enzymes utilisant l'oxygène comme co-substrat, catalysent l'hydroxylation de ces sous-unités α et permettent l'activation du complexe protéique Van Hippel-Lindau (pVHL) entraînant ainsi la dégradation complète de HIF-1 α par le protéasome. Au contraire, à défaut d'une quantité suffisante d'oxygène, la sous-unité α reste stable, c'est-à-dire non dégradée par les prolyhydroxylases, puis est transloquée dans le noyau pour s'associer à la sous-unité β (Wenger et al., 2002). Le complexe HIF-1 ainsi formé se fixe aux séquences spécifiques de gènes cibles, séquences appelées Hypoxia Responsive Elements (HRE) (Figure 5) (Wenger et al., 2005).

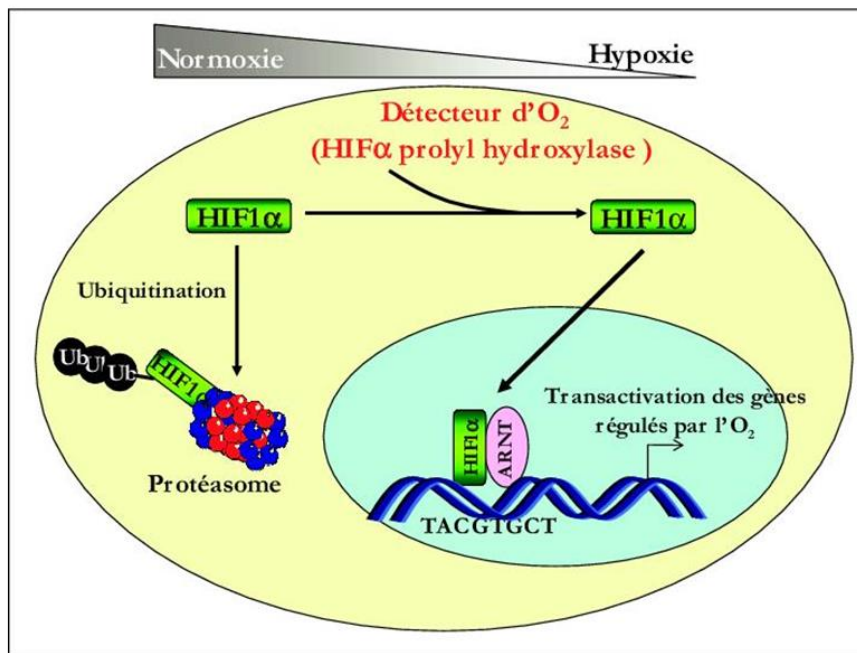


Figure 5 : Mécanismes d'action d'HIF-1 α en présence et absence d'oxygène (Massaad-Massade, 2004).

Ces gènes cibles sont directement impliqués dans la régulation de fonctions physiologiques majeures de la cellule, notamment dans le métabolisme du glucose, la survie et prolifération cellulaire, ou encore l'angiogenèse (Benita et al., 2009) (Tableau 4).

Fonctions régulées	Gènes cibles
Métabolisme du glucose	Glucose transporter 1 and 3, Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, Hexokinase 1 and 2, Lactate dehydrogenase A
Viabilité et prolifération cellulaire	Insulin-like growth factor 2, IGF binding protein 1, 2 and 3, Transforming growth factor β 3
Angiogenèse	Endotheline-1, Heme oxygenase-1, Nitric oxyde synthase 2, Plasminogen activator inhibitor 1, Vascular endothelial growth factor

Tableau 4 : Gènes régulés par le facteur de transcription HIF-1 (adapté de Gotié and Pouysségur, 2002).

2.1.4 Absence de nutriments

Après que les CSMs soient implantées dans un environnement avasculaire, l'apport de nutriments dépend alors de leur simple diffusion passive, ce qui rend leur biodisponibilité quasiment nulle et entraîne une déplétion en substrats métaboliques critiques, notamment en glucose, représentant la principale source nécessaire à la synthèse d'Adenosine Triphosphate (ATP) dans ces conditions (Lunt and Vander Hein, 2011). L'ATP est la molécule énergétique essentielle pour un organisme qui, par son hydrolyse, fournit l'énergie aux cellules pour alimenter leur métabolisme. Dans le contexte ischémique, le métabolisme énergétique des cellules repose sur leurs réserves intrinsèques, c'est-à-dire le glucose résiduel, le glycogène (forme de stockage de glucose chez les animaux) et les lipides (Folmes et al., 2012). Par exemple, au cours d'une ischémie cardiaque chez le rat, la production en ATP est diminuée par 50 par rapport à un environnement sain, et la consommation des réserves énergétiques (glucose résiduel) est 2 fois plus importante (Lloyd et al., 2004). Les différentes voies métaboliques cellulaires seront détaillées en section 2.2 de ce manuscrit.

2.1.5 Accumulation de déchets et hypercapnie

Une fois implantées dans un environnement avasculaire, les CSMs ne disposent d'aucun système de recyclage ni d'évacuation de leurs déchets métaboliques. Dans cet environnement, les CSMs s'orientent vers un métabolisme anaérobie (décrit dans les sections 2.4 et 2.5 de ce manuscrit) entraînant une production d'acide lactique, appelé également lactate (Tracey et al., 2004). L'accumulation de lactate ainsi que l'hydrolyse de l'ATP engendrent une production puis une accumulation de protons (H^+), responsables de l'acidification locale du site d'implantation. De plus, le dioxyde de carbone (CO_2) s'accumule également dans cet environnement et, par réaction avec l'eau ($CO_2 + H_2O \rightarrow HCO_3^- + H^+$), contribue à une hypercapnie locale (augmentation de la pression partielle de

CO₂), contribuant également à l'acidification locale de l'environnement (Rose et al., 1995). Une acidification locale de l'environnement peut impacter négativement la survie cellulaire. En effet, la viabilité des CSMs cultivées dans un environnement à un pH égal à 6.8 pendant deux semaines est diminuée de plus de 2.5 fois par rapport à la viabilité de CSMs cultivées en conditions standard à un pH égal à 7.4 (Wuertz et al., 2008). Il est à noter que peu d'études intègrent l'hypercapnie dans les modèles ischémiques *in vitro*, sans doute expliqué par le fait que le CO₂ soit un déchet métabolique et non un régulateur central du métabolisme cellulaire (à l'inverse de l'oxygène ou du glucose).

2.2 Voies métaboliques

Le métabolisme cellulaire est le résultat d'une somme de réactions cataboliques et anaboliques. Les réactions cataboliques dégradent les macromolécules en substrats utilisés dans les voies anaboliques et permettent la libération d'énergie sous forme d'ATP et de transporteurs de protons (par exemple, le Nicotinamide Adenine Dinucleotide Réduit ou NADH). Les réactions anaboliques quant à elles consomment de l'énergie afin de synthétiser l'ensemble des molécules essentielles aux cellules pour assurer leur bon fonctionnement, tels les lipides ou les protéines (Figure 6) (Little et al., 2007).

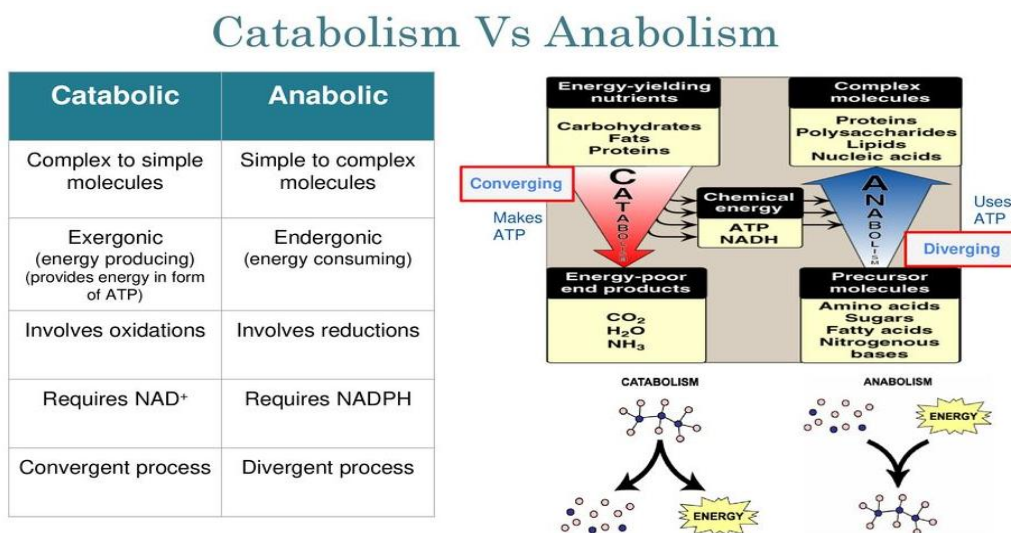


Figure 6: Catabolisme et anabolisme, deux mécanismes complémentaires pour l'équilibre du métabolisme énergétique cellulaire (d'après King Saud University, Biochemistry Team, 2009).

Afin de fournir l'énergie suffisante pour leur fonctionnement, les CSMs exploitent principalement (mais pas uniquement) deux voies cataboliques : la glycolyse et le cycle de l'acide citrique couplé à la chaîne respiratoire (Shyh-Chang and Ng, 2017). Toutefois, ce scénario est altéré lorsqu'elles sont confrontées à un environnement hypoxique. Cette partie sera abordée dans les sections 2.4 et 2.5 du présent manuscrit.

2.2.1 Les voies métaboliques principales

2.2.1.1 La glycolyse

La glycolyse est la voie catabolique par laquelle une molécule de glucose ($C_6H_{12}O_6$) est dégradée, suite à une cascade de réactions enzymatiques, en 2 molécules de pyruvate ($C_3H_4O_3$). Cette chaîne métabolique permet la production de 2 molécules d'ATP et 2 molécules de NADH (Figure 7) (Harper and Harris, 2005).

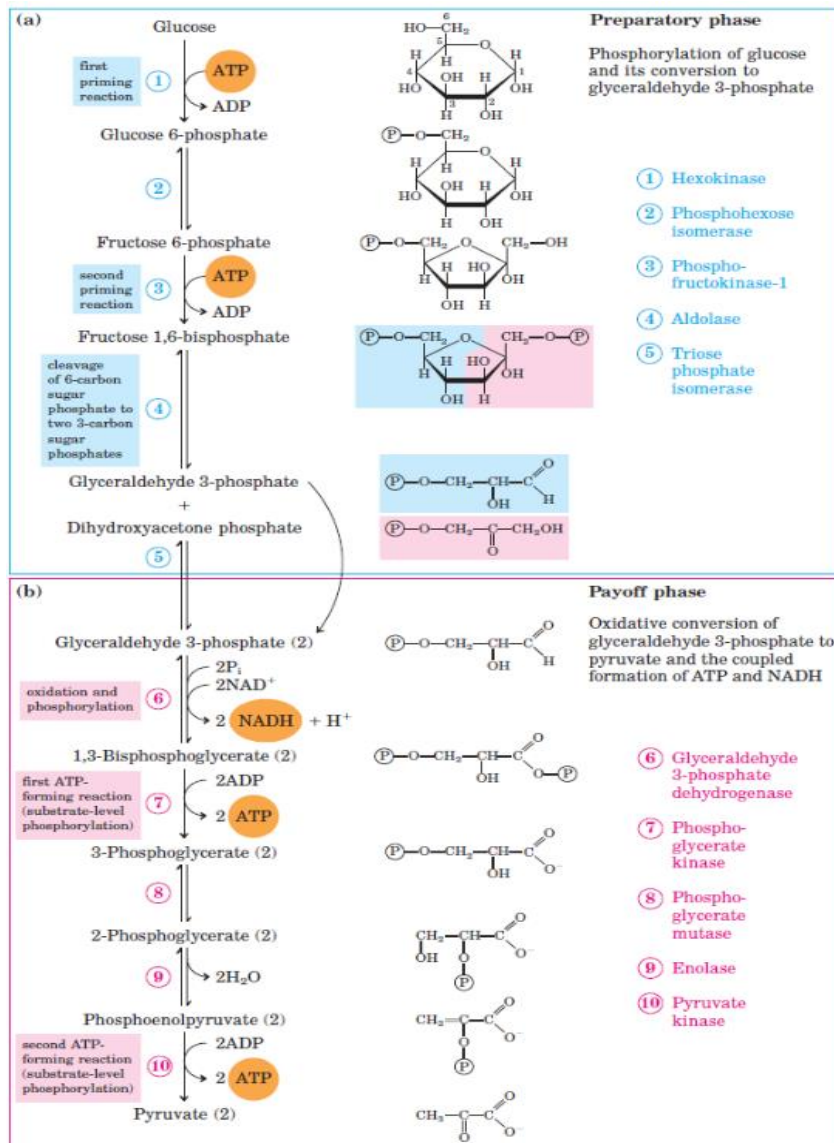


Figure 7: La glycolyse et ses 10 réactions enzymatiques. (a) : phase de consommation d'ATP pour la phosphorylation du glucose en glycéraldéhyde-3-phosphate ; (b) : phase de production d'ATP par l'oxydation du glycéraldéhyde-3-phosphate (<https://laboratoryinfo.com/glycolysis-steps-diagram-energy-yield-and-significance/>).

2.2.1.2 Le cycle de l'acide citrique et la chaîne respiratoire

Au sein d'un environnement où la quantité d'oxygène est suffisante (milieu aérobie), le pyruvate est transporté au sein de la mitochondrie pour être converti en Acetyl-Coa via l'action de l'enzyme pyruvate deshydrogenase. Cette étape constitue le point d'entrée principal du cycle de l'acide citrique, aussi appelé TCA ou cycle de Krebs. En fin de TCA, une molécule de pyruvate génère une molécule d'ATP et de nombreux transporteurs de protons (NADH et FADH₂) (Figure 8).

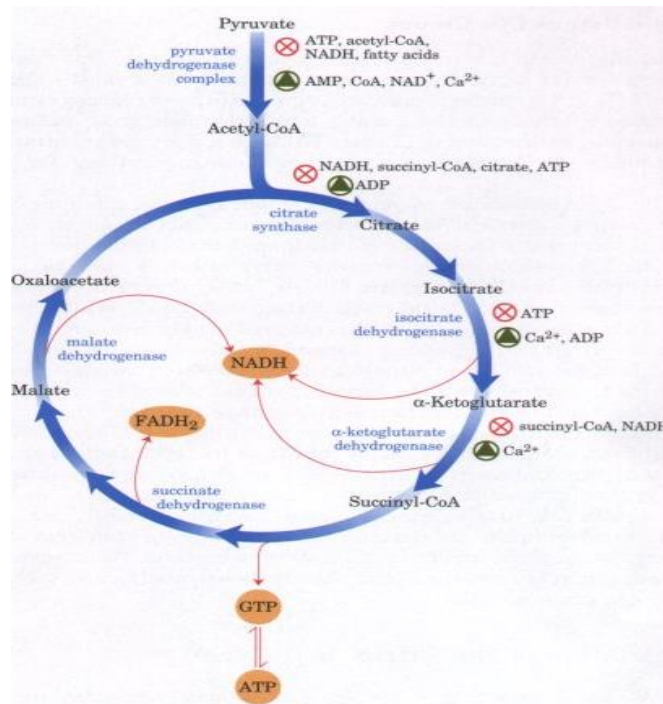


Figure 8 : Cycle de l'acide citrique ou TCA (d'après Leninger et al., 2008).

Ces transporteurs de protons sont ensuite utilisés au niveau de la membrane mitochondriale pour des réactions d'oxydo-réductions dans le système de phosphorylation oxydative, appelé aussi OXPHOS ou respiration mitochondriale. L'ensemble des électrons libérés participe à la chaîne respiratoire et les protons obtenus par les réactions d'oxydoréduction sont transportés vers l'ATP synthase. Cette enzyme transmembranaire fonctionne comme une pompe à protons, synthétisant une molécule d'ATP à partir d'ADP et de phosphate inorganique (Pi). Grâce à l'ATP synthase, la chaîne respiratoire contribue à la production de 30 molécules d'ATP supplémentaires pour chaque molécule de glucose (Figure 9). Pour fonctionner, le cycle TCA et la chaîne respiratoire nécessitent un apport d'oxygène.

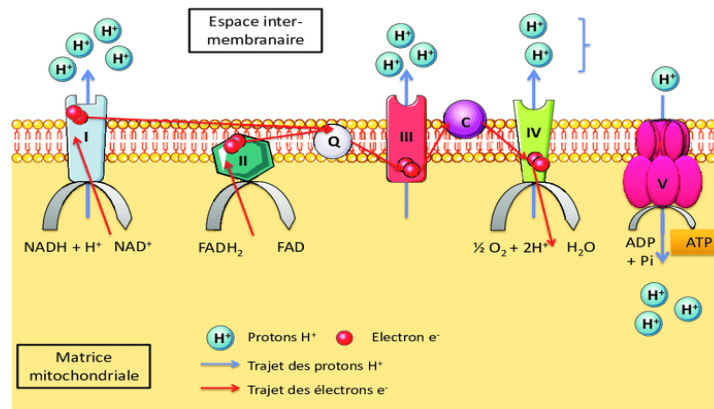


Figure 9: Principe de fonctionnement de la chaîne respiratoire (d'après Villedieu, 2018).

Toutefois, en absence d'oxygène (milieu anaérobie), le pyruvate issu de la glycolyse ne peut pas entrer dans le TCA. Il est alors directement converti en lactate via l'action de l'enzyme lactate deshydrogénase (LDH) au cours de la fermentation lactique, générant 2 molécules d'ATP supplémentaires (Figure 10).

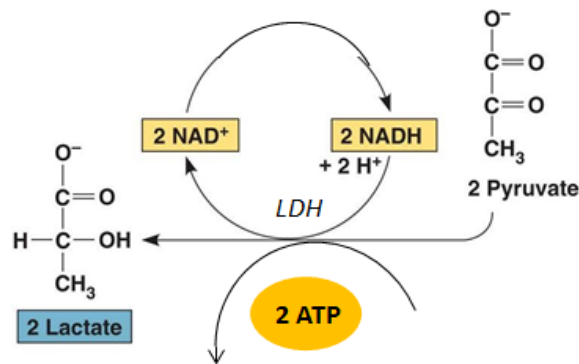


Figure 10: Réaction de fermentation lactique. En absence d'oxygène, les 2 molécules de pyruvate produites après la glycolyse à partir d'une molécule de glucose sont converties en 2 molécules de lactate, générant 2 molécules d'ATP (adapté de Freeman et al., 2012).

2.2.2 Les voies métaboliques alternatives

2.2.2.1 Le métabolisme lié au glycogène

Le glucose est stocké sous forme de glycogène ((C₆H₁₀O₅)_n) chez les cellules animales via la voie de la glycogénogénèse. Les CSMs possèdent des réserves de glycogène qu'elles maintiennent stockées en conditions physiologiques. A l'inverse, en conditions hypoxiques ou ischémiques, les CSMs utilisent leurs réserves de glycogène afin de les dégrader en glucose, via la voie de la glycogénolyse, et de faire fonctionner à plein régime la glycolyse pour produire l'ATP. Toutefois, en conditions quasi-anoxiques, les

CSMs vident leurs réserves de glycogène en moins de 24 heures, ne permettant pas le maintien de leur survie au-delà de 3 jours. Cette partie sera abordée en section *Résultats* du présent manuscrit (article 1).

2.2.2.2 Le métabolisme lié à la glutamine et à la sérine

La glutamine est un acide aminé pouvant être hydrolysé en glutamate via l'enzyme glutaminase dans les mitochondries (Berl and Clark, 1969). En présence d'oxygène, le glutamate peut être converti en α -ketoglutarate et intégrer le cycle TCA pour produire de l'énergie.

La sérine est un acide aminé pouvant intégrer la glycolyse (étape du glycérate-2-phosphate) après une série de réactions d'oxydo-réduction utilisant le glutamate, générant ainsi du pyruvate donc de l'ATP (McKeehan, 1986). En condition quasi-anoxique, ces deux voies métaboliques ne sont toutefois pas empruntées par les CSMs pour fournir leur énergie. Cette partie sera abordée en section *Résultats* du présent manuscrit (article 1).

2.2.2.3 Le métabolisme lié aux lipides

Les lipides sont constitués d'acides gras et représentent la réserve énergétique à long terme des cellules, contrairement au glycogène qui représente la réserve énergétique à court terme. En présence d'oxygène, les lipides sont synthétisés au sein des CSMs principalement à partir d'acétyl-CoA via la lipogenèse, moyennant des molécules d'ATP et de NADPH. En retour, la dégradation des réserves de lipides via la voie de β -oxydation fournit de l'acétyl-CoA, du NADH et du FADH₂ qui, associés à la chaîne respiratoire (cf. section 2.2.1.2), génèrent de l'ATP. En condition quasi-anoxique, cette voie métabolique ne peut donc pas être empruntée par les CSMs pour fournir leur énergie.

2.3 Voies de signalisation principales engagées dans la survie des CSMs

Comme toutes cellules eucaryotes, les CSMs captent leurs nutriments sous le contrôle des voies de signalisation. Ces voies régulent le métabolisme cellulaire, favorisant les réactions cataboliques ou anaboliques en fonction de la quantité de nutriments disponibles, et/ou de la quantité d'oxygène, et/ou de facteurs de croissance. En condition quasi-anoxique, de par leur activation ou inhibition, plusieurs voies de signalisation au sein des CSMs permettent d'orienter les cellules sur leur principale fonction : la survie. Trois de ces principales voies sont détaillées dans ce manuscrit.

2.3.1 La voie AKT

Les facteurs de croissance, en se fixant sur les récepteurs à activité tyrosine kinase (RTKs) activent les enzymes PI3Ks (lipid kinase phosphoinositide 3-kinases) qui, à leur tour, stimulent la voie de la protéine kinase B, appelée aussi voie AKT (Figure 11). Cette voie de signalisation favorise les voies anaboliques ainsi que l'absorption de nutriments (Ward et al., 2012). Toutefois, la protéine kinase B étant ubiquitaire, la voie AKT peut également stimuler la glycolyse. En conditions aérobies ou hypoxiques, cette voie peut stimuler l'activité de plusieurs enzymes directement impliquées dans la glycolyse, comme l'hexokinase, impliquée dès la première étape (Yu and Cui, 2016).

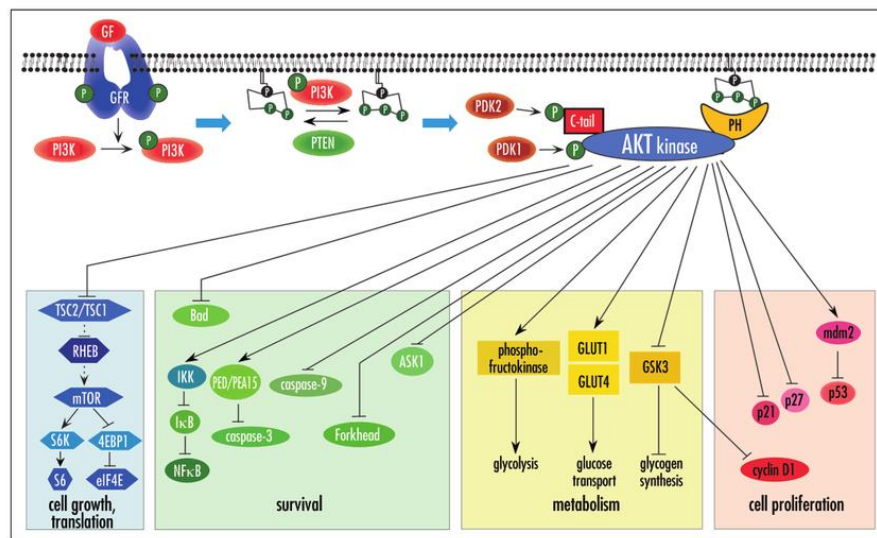


Figure 11: Rôles et protéines cibles activées (flèches) et inhibées (barres) par la voie AKT (d'après Larue et al., 2004).

2.3.2 La voie AMPK

L'AMPK (5' Adenosine Monophosphate-activated Protein Kinase) est l'enzyme responsable de l'équilibre entre demandes et ressources énergétiques, adaptant ainsi en permanence les fonctions cellulaires à leur environnement local (Figure 12). Afin de maintenir leurs fonctions et d'assurer leur survie, les cellules ont constamment besoin d'une balance optimale entre demandes et ressources d'énergie. En condition ischémique, la demande énergétique des CSMs excède leurs ressources énergétiques. Dans ces conditions, le ratio ATP/ADP diminue, la quantité d'ADP augmentant au sein des CSMs afin d'être rapidement convertie en ATP par les enzymes adénylates kinases ($2 \text{ ADP} \rightarrow 1 \text{ ATP} + 1 \text{ AMP}$) (Das et al., 2010). Les enzymes kinases AMPK sont alors activées, entraînant l'activation des voies cataboliques et l'inhibition des voies anaboliques afin de répondre à la demande énergétique des CSMs (Valcourt et al., 2012).

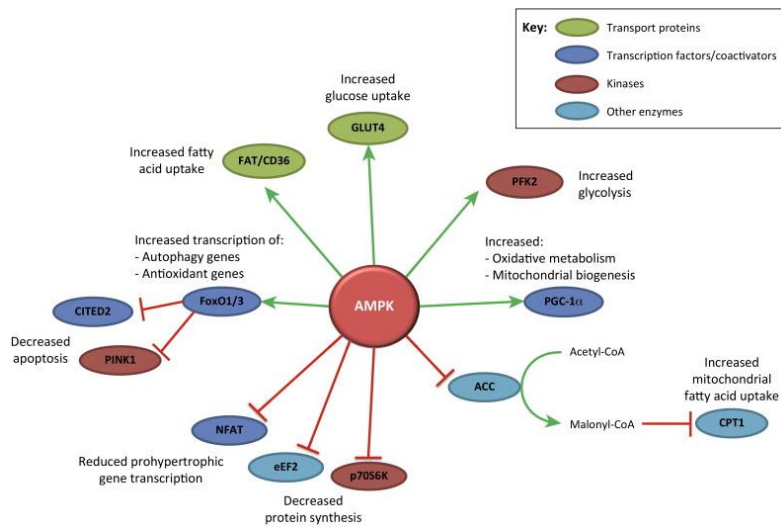


Figure 12: Rôles et protéines cibles activées (flèches vertes) et inhibées (flèches rouges) par la voie AMPK (d'après Kim and Dick, 2015).

2.3.3 La voie mTORC1

La voie mTORC1, activée par la voie AKT et inhibée par la voie AMPK, est également au cœur de la régulation du métabolisme des CSMs. En présence de nutriments et de facteurs de croissance, l'activation de mTORC1 stimule les voies anaboliques, notamment la synthèse de protéines et de lipides (Figure 13) (Chandel, 2015). Toutefois, en condition quasi-anoxique, la voie mTORC1 reste inhibée (Hindupur et al., 2015).

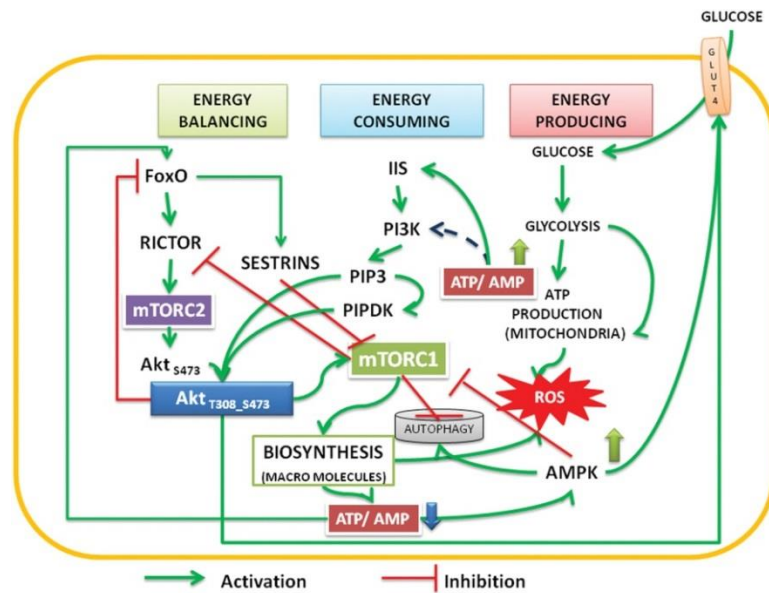


Figure 13: Mécanisme de régulation de la voie mTORC1 (d'après Chandel, 2015).

2.4 Introduction au métabolisme des CSMs en conditions anoxiques

En anoxie, les CSMs orientent leur métabolisme vers la glycolyse et la fermentation lactique (respiration anaérobie), au détriment du cycle TCA et de la chaîne respiratoire (respiration aérobie) (Figure 14).

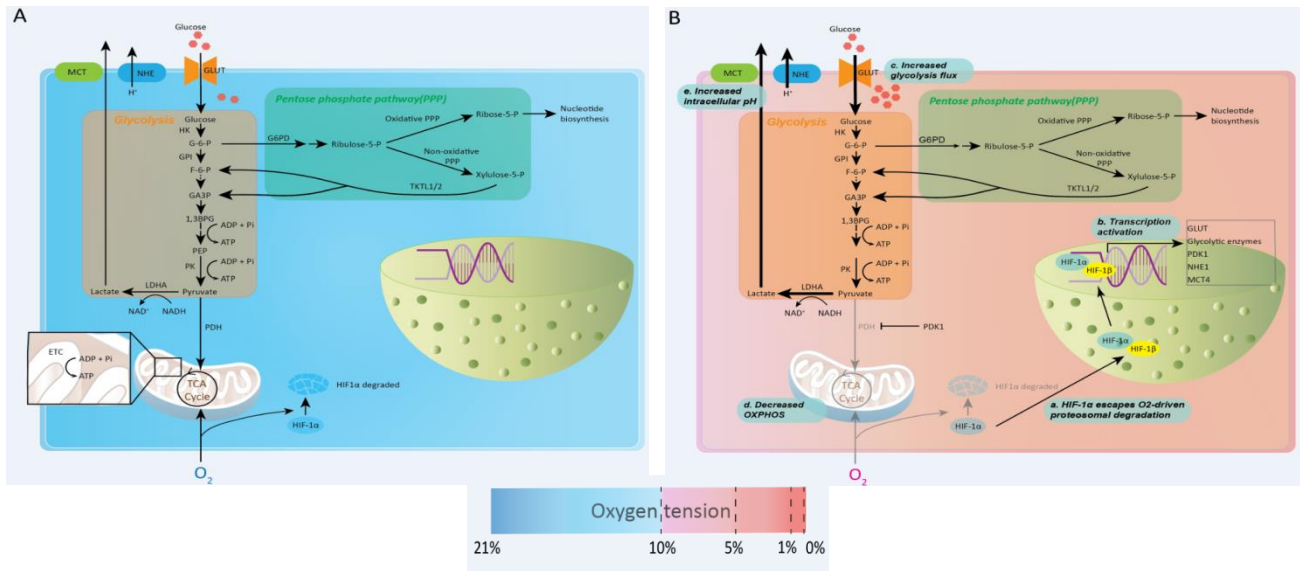


Figure 14: Métabolisme énergétique des CSMs en conditions normoxique (A) et anoxique (B) (adapté de Salazar-Noratto et al., soumis à publication, 2019).

Dans ces conditions, le rendement énergétique de la respiration anaérobie est de 4 molécules d'ATP produites par molécule de glucose consommée, nettement inférieur à celui de la respiration aérobie produisant 32 à 36 molécules d'ATP par molécule de glucose consommée (Tableau 5).

Environnements	Substrats	Réactions métaboliques	Produits	Molécules d'ATP formées par molécule de glucose consommée
Normoxique (21% pO ₂)	Glucose Oxygène	1. Glycolyse (2 ATPs) 2. Cycle TCA + Chaîne respiratoire (30 à 34 ATPs)	Eau Dioxyde de carbone	32 à 36
Quasi-anoxique (0.1% pO ₂)	Glucose	1. Glycolyse (2 ATPs) 2. Fermentation lactique (2ATPs)	Lactate	4

Tableau 5 : Bilan énergétique au sein des CSMs en condition normoxique ou anoxique.

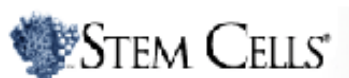
Au sein de cet environnement quasi-anoxique, retrouvé notamment au sein d'un environnement avasculaire, les CSMs doivent adapter leur activité afin de pallier à ce déficit énergétique, en se concentrant sur leur principale fonction: le maintien de leur survie. La voie de signalisation AMPK est alors activée, entraînant une réduction de la consommation énergétique cellulaire (inhibition des voies

anaboliques) pour favoriser la production énergétique (stimulation des voies cataboliques). La voie AKT est également activée dans ces conditions et stimule la glycolyse (cf. section 2.3.1) tandis que la voie mTOR reste inhibée (cf. section 2.3.3).

L'adaptation du métabolisme des CSMs aux conditions hypoxiques sera davantage abordée dans la section 2.5 ainsi que dans la section *Résultats* du présent manuscrit (articles 1 et 2).

2.5 Comprendre le métabolisme énergétique des CSMs après implantation pour améliorer leur survie

La présente section est extraite de la revue bibliographique (pages 1 - 13 ; 20 – 24 ; 28-29) intitulée « *Understanding and leveraging cell metabolism to enhance mesenchymal stem cell transplantation survival in tissue engineering and regenerative medicine* », soumise au journal Stem Cells le 10 Avril 2019. L'extrait original présenté ici est axé autour du métabolisme énergétique des CSMs confrontées à un environnement ischémique.



**UNDERSTANDING AND LEVERAGING CELL METABOLISM TO
ENHANCE MESENCHYMAL STEM CELL TRANSPLANTATION
SURVIVAL IN TISSUE ENGINEERING AND REGENERATIVE
MEDICINE APPLICATIONS**

Journal:	<i>Stem Cells</i>
Manuscript ID	SC-19-0143
Wiley - Manuscript Type:	Concise Reviews
Date Submitted by the Author:	10-Apr-2019
Complete List of Authors:	Salazar-Noratto, Giuliana; Laboratory of Osteoarticular Biology, Bioengineering and Bioimaging (UMR CNRS 7052 INSERM U1271); Université Paris Diderot Luo, Guotian; Laboratory of Osteoarticular Biology, Bioengineering and Bioimaging (UMR CNRS 7052 INSERM U1271); Université Paris Diderot Denoeud, Cyprien; Laboratory of Osteoarticular Biology, Bioengineering and Bioimaging (UMR CNRS 7052 INSERM U1271); Université Paris Diderot Padrona, Mathilde; Laboratory of Osteoarticular Biology, Bioengineering and Bioimaging (UMR CNRS 7052 INSERM U1271); Université Paris Diderot Bensidhoum, Morad; Laboratory of Osteoarticular Biology, Bioengineering and Bioimaging (UMR CNRS 7052 INSERM U1271); Université Paris Diderot Moya, Adrien; South Florida Veterans Affairs Foundation for Research and Education, Inc; Bruce W Carter Department of Veterans Affairs Medical Center, Geriatric Research, Education, and Clinical Center and Research Service Bizios, Rena; University of Texas at San Antonio, Department of Biomedical Engineering Potier, Esther; Laboratory of Osteoarticular Biology, Bioengineering and Bioimaging (UMR CNRS 7052 INSERM U1271); Université Paris Diderot Logeart-Avramoglou, Delphine; Laboratory of Osteoarticular Biology, Bioengineering and Bioimaging (UMR CNRS 7052 INSERM U1271); Université Paris Diderot Petite, Herve; Laboratory of Osteoarticular Biology, Bioengineering and Bioimaging (UMR CNRS 7052 INSERM U1271); Université Paris Diderot
Keywords:	Adult stem cells, Autologous stem cell transplantation, Bone marrow stromal cells (BMSCs), Cell biology, Mesenchymal stem cells (MSCs), Stem cell transplantation, Stem cell-microenvironment interactions, Tissue-specific stem cells
Journal Section:	Tissue-Specific Stem Cells
Cell Types:	Bone Marrow Stem Cells, Mesenchymal Stem Cells, Tissue Specific Stem Cells
Diseases/Processes/Areas:	Cell Delivery Strategies, Clinical Application / Translation

ScholarOne Support: (434) 964-4100

ABSTRACT

In tissue engineering and regenerative medicine, stem cell—particularly mesenchymal stromal/stem cells (MSCs)—therapies have fallen short of their initial promise and hype. The observed marginal, to no benefit, success in several applications has been attributed primarily to poor cell survival and engraftment at transplantation sites. MSCs have a remarkably flexible metabolism, which enables them to fulfill their cellular functions and adapt to different cellular and environmental cues. At the transplantation sites, however, MSCs experience hostile environments devoid or, at the very least, severely depleted of oxygen and nutrients. The impact of this particular setting on MSC metabolism ultimately affects their survival and function. In order to develop the next generation of cell-delivery materials and methods, scientists must have a better understanding of the metabolic switches MSCs experience upon transplantation. By designing treatment strategies with cell metabolism in mind, scientists may improve survival and the overall therapeutic potential of MSCs. Here, we provide a comprehensive review of plausible metabolic switches in response to implantation and the various strategies currently used to leverage MSC metabolism to improve stem cell-based therapeutics.

SIGNIFICANCE STATEMENT

The lack of success of stem cell-based therapies has been largely attributed to the massive cell death observed post-transplantation, which is caused by the metabolic shock these cells experience as they transition from *in vitro* to a hostile, injured site. Mesenchymal stem cells (MSC), specifically, have a remarkably flexible metabolism, and they are highly sensitive to cellular and environmental cues. In order to improve cell survival rate post-transplantation, it is important that scientists understand and take into account the needs and demands of MSC metabolism as they design the next-generation of MSC-based therapies.

For Peer Review

INTRODUCTION

Mesenchymal stromal/stem cells (MSCs), also referred to as tissue-specific skeletal stem cells (Robey, 2017), are a non-hematopoietic subpopulation of cells with multi-lineage potential to differentiate into various tissues of mesodermal origin (Farini et al., 2014; Li et al., 2016). MSCs possess a promising therapeutic potential for tissue engineering applications because of both their ability to differentiate into distinctive mesenchymal phenotypes and to induce a regenerative microenvironment by secreting bioactive chemical compounds which inhibit tissue scarring, inhibit apoptosis, narrow or contain the field of injury, promote angiogenesis, and stimulate the mitosis of tissue-intrinsic stem or progenitor cells (Caplan, 2007; Friedenstein et al., 1968). Nevertheless, stem cell-based therapeutics have fallen short of the initial promise and hype, resulting in inconsistent preclinical and clinical trial outcomes. While several studies addressing various medical applications confirmed the efficacy of MSC therapy, other investigations reported no benefits (Kawate et al., 2006; Lunde et al., 2006; Nejadnik et al., 2010; Telukuntla et al., 2013; Ting and Sherman, 2012). In many instances, the therapeutic effect of MSC-based therapies either decreased or disappeared over long-term outcome assessments (Ankrum and Karp, 2010; Meyer et al., 2006; Wollert et al., 2017), or underperformed compared to conventional therapies and/or therapeutic expectations (Farrell et al., 2014; Wakitani et al., 2007).

The shortcomings of stem cell-based therapeutics have been attributed primarily to poor cell survival and engraftment, with cell survival being crucial. It is now well established that cells experience high mortality rate upon transplantation at the injury site; in fact, as low as 1% of MSCs survive one day after implantation (Li et al., 2016; McGinley et al., 2013; Toma et al., 2002). In material scaffolds, which are meant to provide the appropriate structure and environment for delivered cells to take effect, studies have also shown low survival rates, with as high as 90% MSC mortality by day seven post-ectopic implantation (Becquart et al., 2012; Degano et al., 2008; Logeart-Avramoglou et al., 2010) and 85% by day fourteen when implanted in a critical segmental femoral bone defect (Manassero et al., 2016). For these reasons, observed benefits due to MSC therapy have been largely credited

to the delivery of cell signals, or paracrine effects, instead of the direct differentiation of MSCs (Chimenti et al., 2010). Improved survival of transplanted MSCs, however, could increase direct contributions by cell differentiation, extracellular matrix deposition, cell-host-cell interactions, and/or, at the very least, longer-term secretion of paracrine factors. Such outcomes could subsequently increase the overall therapeutic potential of MSCs, and in applications where the beneficial effect of MSCs is marginal to none, improved MSC survival may reverse previously unsuccessful clinical/therapeutic strategies.

Upon transplantation, cells experience a hostile, injured microenvironment of ischemia (lack of oxygen and nutrition) (Becquart et al., 2012), inflammation, and oxidative stress comprising of superoxide anions and hydrogen peroxide (Elsasser et al., 2001; Li et al., 2016). This situation is further exacerbated by poor removal of metabolic waste due to lack of functional vascular networks at the injury site. This adverse microenvironment of the transplanted cells has direct effects on cell metabolism, which is the set of life-sustaining chemical reactions. Vital cell processes are powered through the metabolism of energy substrates supplied by the environment, such as glucose, fatty acids, and amino acids (Folmes et al., 2012). Beyond survival of transplanted cells, tissue repair is an energy-demanding task, and metabolism fuels organogenesis, including processes involved in directing stem cell fate, proliferation, and self-renewal (Folmes et al., 2012). Therefore, understanding and addressing the metabolic needs of MSCs may enhance their survival upon transplantation and subsequently therapeutic effect. While various approaches aiming at enhancing cell survival exist—including, but not limited to gene-editing, biomaterials, growth-factor signaling, etc.—the present review will focus on approaches and methods which either directly or indirectly affect the metabolism of MSCs. Specifically, in this review, we will discuss metabolism in MSCs in different scenarios as well as research seeking to improve cell survival and, thus, therapeutics, by leveraging cell metabolomics.

MSC METABOLISM

Metabolic Plasticity

Cell metabolism is the sum of all chemical reactions through which energy is created from breaking chemical bonds and used to synthesize basic components. These reactions are directly linked to the activity of the cell; in fact, different activities and functions have different energy demands and require synthesis/removal of different molecules. In this regard, plasticity in energy metabolism (or bioenergetics) allows stem cells to match the divergent energy demands of self-renewal and lineage specification (Folmes et al., 2012) and, in the case of transplanted cells, of cell survival.

Figure 1a illustrates the basic bioenergetics reactions that take place in MSCs. Energy generated in cells is stored in energy carrier molecules called adenosine triphosphate (ATP), which can be used in future cell chemical reactions. In MSCs, ATP is produced by two pathways: glycolysis and oxidative phosphorylation (OXPHOS). In glycolysis, glucose is consumed to produce pyruvate and ATP; and pyruvate is later oxidized in mitochondria to acetyl-CoA, which feeds into the tricarboxylic acid (TCA) or, Krebs, cycle. In OXPHOS, electron byproducts of the TCA cycle pass through the electron transport chain (ETC) at the mitochondrial cristae and produce ATP molecules. Although OXPHOS averages a significantly higher ATP production than glycolysis (specifically, 34 to 36 versus two ATP molecules per glucose molecule (Folmes et al., 2012; Lunt and Vander Heiden, 2011)), studies have consistently shown that MSC survival is not dependent on OXPHOS, but rather on glycolysis. Treatment of bone marrow-derived (BM) rat MSCs (rMSCs) with 2,4-dinitrophenol (DNP), a mitochondrial uncoupler which inhibits OXPHOS, showed no increase in cell death up to 72 hours post-DNP treatment (Mylotte et al., 2008); whereas inhibition of glycolysis by 2-deoxyglucose induced a significant decrease in cell viability as early as 24 hours post-treatment in BM-rMSCs (Mylotte et al., 2008) and BM-human MSCs (hMSCs) (Moya et al., 2018).

Beyond survival, glycolysis is also a hallmark of "stemness" and the preferred pathway for stem cell self-renewal/proliferation. Compared to OXPHOS, glycolysis is less efficient generating energy; however, inefficient ATP production is a problem only when resources are scarce and this is not the case for proliferating mammalian cells *in vivo* (Vander

et al., 2015). In fact, proliferating cells have important metabolic requirements that extend beyond ATP, and glycolysis meets both the bioenergetics and biosynthetic demands of producing new cells (Lunt and Vander Heiden, 2011; Vander et al., 2015). Glycolysis is able to fuel anabolic intermediates needed for the synthesis of amino acids and nucleotides, via the Pentose Phosphate pathway (Figure 1a) (Lunt and Vander Heiden, 2011; Shyh-Chang and Ng, 2017; Vander et al., 2015).

Similarly, when MSCs begin to differentiate, they switch their metabolic activity depending on the differentiation pathway they undertake. For example, BM-hMSCs cultured under chondrogenic conditions prefer glycolysis, as demonstrated by their reduced oxygen consumption and OXPHOS activity (Pattappa et al., 2011). In contrast, BM-hMSCs undergoing osteogenic differentiation exhibit a decrease in glycolytic enzymes and an increase in respiratory enzymes, oxygen consumption, and mitochondrial biogenesis; suggesting a bioenergetics switch from glycolysis to OXPHOS (Chen et al., 2008). hMSCs experience a similar switch to promote adipogenic differentiation (Tormos et al., 2011). However, because these experiments have been conducted *in vitro*, differentiation protocols may play a role in the observed metabolic changes.

Metabolic flexibility allows MSCs to perform their functions, as well as to adapt and survive in less than ideal circumstances. It should be noted that metabolic pathways are highly sensitive to cellular cues as well as environmental ones, such as oxygen levels, availability of substrates, pH levels, etc. In order to develop better cell-based therapies and improve MSC survival and therapeutic potential, scientists should consider the microenvironment in which the cells are transplanted and its potential effect on cellular metabolic activities, which ultimately affect cell survival and function.

Effects of different oxygen tension levels

It is well-established that oxygen tension has a direct effect on cellular energy metabolism and, thus, affects cell survival and therapeutic potential. For this reason, it is important to understand the oxygen tension levels that cells will experience upon transplantation and their pertinent effects on cell metabolism. Oxygen tension varies greatly

depending on the targeted tissue, as well as the state of said tissue (healthy vs. injured). Oxygen tension has shown to fall from 2.6-3.3% to 0.9% pO_2 within the first five minutes of an arterial occlusion in rodent hearts (Khan et al., 2015) and to reach near-anoxia (0.2% pO_2) after 30 minutes of ischemia (Zhao et al., 2005). In joint diseases, oxygenation levels of the synovial fluid are lower in inflammatory cases (Ng et al., 2010; Treuhaff and McCarty, 1971). *In situ* measurements in the intervertebral disc, however, recorded a minimum of 0.3-0.7% pO_2 in the disc center in both healthy canine (Holm et al., 1982, 1981) and degenerated human discs (Bartels et al., 1998). In general, oxygen tension in various parts of the mammalian body is considerably lower *in vivo* than the atmospheric oxygen tension (21%), and ranges from 12% in the blood to as low as 1% in the deep zone of cartilage regions (Das et al., 2010).

Under standard cell culture conditions, MSCs are kept at 21% pO_2 , which is considered "normoxia" but is not physiologically relevant (physioxia). Upon implantation, cells must adapt to their new microenvironment, which triggers metabolic changes and signaling pathways. Overall, lack of oxygen triggers the "switch" from high-energy yielding processes (specifically, glycolysis combined with OXPHOS) to the low-energy yielding process of glycolysis alone (Figure 1b) (Das et al., 2010). In environments with pO_2 between 1% to 3%, BM-hMSCs (Rosova et al., 2008) and BM-rMSCs (Peterson et al., 2011) further activate the Akt signaling pathway by phosphorylation. Akt facilitates metabolic reprogramming towards glycolysis and maintains cell proliferation when the oxygen supply is restricted (Chae et al., 2016). This signaling pathway plays a key role in the stabilization of the transcription factor hypoxia inducible factor (HIF)-1 (Das et al., 2010).

In the presence of "sufficient" oxygen levels, oxygen-regulated HIF-1 α subunit is degraded by proteasomes (Palomäki et al., 2013; Simon and Keith, 2008). Under hypoxic conditions, however, HIF-1 α escapes oxygen-driven proteasomal degradation. Moya *et al.* found that exposure of BM-hMSCs to near-anoxia (specifically, 0.1% pO_2) for 3 days resulted in significantly higher expression of HIF-1 α expression and bioactivity compared to results obtained when BM-hMSCs were maintained at 1, 5 and 21% pO_2 (Moya et al., 2018).

Stabilized HIF-1 α is able to translocate to the cell nucleus, where it dimerizes with HIF-1 β (Figure 1b). The HIF-1 α/β dimers activate the transcription of genes encoding glycolytic enzymes and glucose transporters (Saraswati et al., 2015; Zhu et al., 2014). These upregulated glycolytic enzymes aid in shunting energy metabolism from OXPHOS to glycolysis alone and in boosting glycolytic activity (Figure 1b) (Ladurner, 2006; Lavrentieva et al., 2010). Increased expression of glucose transporters further increases the influx of glucose molecules and overall glycolytic activity in cells.

It is worth noting that small differences in oxygen tension (e.g. 1% vs. 0.1%) result in a cascade of metabolic and signaling pathways in MSCs. For this reason, it is essential that studies report the level of oxygen tension as accurately as possible. Traditionally, control of pericellular oxygen tension is achieved by fixing the oxygen tension in the gas phase above the medium in which cells are cultured (Mamchaoui and Saumon, 2000; Pettersen et al., 2005; Wolff et al., 1993). Pericellular tension, however, also depends on the number of cells and their metabolic rate as well as the diffusion distance from the medium surface to the bottom of the cell culture plasticware where cells are attached (Pettersen et al., 2005). Pettersen *et al.* (Pettersen et al., 2005) showed that after 7 days under standard cell culture conditions (21% pO₂) of human T47D cells, the pO₂ was 17.63% at the top of the culture medium and only 7.51% at the bottom of the plastic surface where the cells were cultured. In order to better simulate the milieu of the transplantation site *in vitro*, researchers should study the oxygen tension level that more closely resembles that of the targeted site *in vivo*.

Effects of energy substrate availability

Historically, lack of oxygen had been regarded as the primary cause of cell death in an ischemic environment. Recent research, however, provided evidence that lack of nutrients, notably glucose, is the main culprit of cell death post-implantation. Published reports by many groups have shown that BM-hMSCs (Deschepper et al., 2013; Moya et al., 2018; Nuschke et al., 2016), BM-rMSCs (Mylotte et al., 2008) and BM-sheep MSCs (Deschepper et al., 2011) are able to survive in a hypoxic to near-anoxic environment *in vitro*, given that glucose is available. Glycolysis, an anaerobic process, is the only production path

for ATP in cases where little-to-no oxygen is present, which renders glucose the most important energy substrate for MSC survival. Moya *et al.* (Moya *et al.*, 2018) confirmed experimentally that BM-hMSCs cultured under 0.1% pO₂ are unable to use exogenous glutamine, serine or pyruvate to produce ATP. The MSC mortality rate under each of these conditions was approximately 93% by day 14 of cell culture *in vitro* (Moya *et al.*, 2018). In contrast, BM-hMSCs supplied with glucose remained up to 60% viable under near-anoxia by day 14 of cell culture (Moya *et al.*, 2018). Nevertheless, it should be noted that the high sensitivity of MSC survival to glucose deprivation cannot be explained solely by the loss of ATP (Mylotte *et al.*, 2008). It is now known that, beyond ATP depletion, inhibition of glycolysis due to glucose deprivation also leads to loss of essential prosurvival signals such as Akt (Mylotte *et al.*, 2008; Rathmell *et al.*, 2003). Furthermore, glucose deprivation or starvation activates metabolic stresses, which may induce cell death (Altman and Rathmell, 2012; Deldicque *et al.*, 2012). In this scenario, autophagy is activated as a protective mechanism to mitigate cell stress-induced damage and provide nutrients for short-term survival (Figure 2) (Altman and Rathmell, 2012).

In the face of limited or no access to nutrients, cells activate their nutrient-sensing mechanisms to switch from an anabolic program to a catabolic one (Figure 2). By decreasing their anabolic activities, cells diminish their metabolic demand, and by activating catabolic pathways, they cannibalize themselves in order to increase their metabolic supply. Cells accomplish this switch through two major cell signaling mechanisms: (i) inactivation of the target of the rapamycin (TOR) pathway, a master regulator of protein translation and proliferation; and (ii) activation of the AMP-activated protein kinase (AMPK). These mutually antagonistic signaling pathways reduce energy-intensive processes (such as protein and lipid synthesis) and induce autophagy and lysosomal biogenesis in order to recover metabolites and energy from existing macromolecules to ensure cell survival (Hindupur *et al.*, 2015; Valcourt *et al.*, 2012). A study by Nuschke *et al.* (Nuschke *et al.*, 2016) reported that MSC autophagy was highly sensitive to glucose concentrations. BM-hMSCs that were transferred from a hyperglycemic to a normal glucose media, thereby lowering their glucose

supply, accumulated higher levels of LC3-II (an autophagy marker) as a function of time. In contrast, different oxygen tensions (specifically, 21, 4 and 1% pO₂) did not have an effect on the accumulation, or lack, of autophagosomes (Nuschke et al., 2016).

Compromised or absence of vasculature at the sites of tissue injury leads to ischemia and lack of nutrients. However, some tissues are naturally avascular, such as the articular cartilage. To the best of our knowledge there are no reported *in vivo* measurements of glucose concentrations in the heart, bone, or articular cartilage in the literature. Because glucose is paramount for the survival of MSCs, knowledge of this parameter is needed and should be used by scientists when designing delivery vehicles for MSCs for tissue engineering and regenerative medicine applications.

Effects of the mechanical microenvironment

Recent scientific studies provided evidence that the mechanical environment is an integral component of mammalian cell and tissue milieu and should also be taken into account regarding cell metabolism. For example, dynamic compression has been shown to increase ATP and lactate production as well as glucose consumption of pig intervertebral disc cells (Fernando et al., 2011; Salvatierra et al., 2011), and to enhance glycolytic energy flux in human chondrocytes (Zignego et al., 2015). Mechanical stress has also been shown to facilitate the transport of glucose into rat podocytes by increasing the number of glucose transporters on the surface of these cells, thus altering energy production and metabolism (Lewko et al., 2005). Despite the absence of literature reports regarding MSC metabolism, MSCs are highly mechanosensitive, as shown by many studies regarding the determination of stem-cell fate in response to mechanical stimulation (Peng et al., 2017; Yavropoulou and Yovos, n.d.; Yeatts et al., 2013).

Effects of pH

In addition to the effects on oxygen and nutrient levels, lack of vascular network results in accumulation of lactic acid (the end product of anaerobic glycolysis), which acidifies the local environment (Figure 1b). Although less detrimental than glucose shortage, lower intracellular and extracellular pH levels inhibit MSC metabolism, proliferation and

osteogenic differentiation (Chano et al., 2016; Chen et al., 2009; Fliefel et al., 2016; Kohn et al., 2002; Massa et al., 2017; Meleshina et al., 2018; Monfoulet et al., 2014). Acidifying the extracellular medium of rabbit MSCs to pH 6.8-7.0 resulted in large decreases in the glucose consumption rate and the lactate production rate (48.3% and 95.1%, respectively), compared to standard cell culture conditions at pH >7.4 (Chen et al., 2009). This finding suggests a reduction in glycolysis, which may be a feedback system to avoid further acidification of the extracellular space that would ultimately lead to an excessive acidification of the cytosol and cell death (Chano et al., 2016; Chen et al., 2009). Moreover, Massa *et al.* (Massa et al., 2017) showed that extracellular acidosis (specifically, pH 6.5) induces the quiescence state in BM-hMSCs, which may partially explain the reduction in observed cell proliferation and differentiation potential under acidosis.

In conclusion, the effects of oxygen tension levels, glucose supply, mechanical stress and pH levels so far reported in the literature on MSC metabolism highlight and reiterate the importance of these conditions in the microenvironment that MSCs will encounter upon transplantation *in vivo*. Unfortunately, there is limited pertinent information in the literature about the *in vivo* conditions at different transplantation sites and their impact on cell metabolism. Furthermore, research on MSC metabolism has been largely restricted to standard cell culture practices, which are not analogous to transplantation sites or other *in vivo* scenarios. For all the aforementioned reasons, there is a crucial need to bridge this gap in knowledge in order to elucidate the processes of MSC metabolism and, ultimately, improve MSC-based therapeutics.

REFERENCES

- Altman, B.J., Rathmell, J.C., 2012. Metabolic stress in autophagy and cell death pathways. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 4, a008763. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a008763>
- Ankrum, J., Karp, J.M., 2010. Mesenchymal stem cell therapy: Two steps forward, one step back. *Trends Mol. Med.* 16, 203–209. <https://doi.org/10.1016/j.molmed.2010.02.005>
- Bartels, E.M., Fairbank, J.C.T., Winlove, C.P., Urban, J.P.G., 1998. Oxygen and lactate concentrations measured in vivo in the intervertebral discs of patients with scoliosis and back pain. *Spine (Phila. Pa. 1976)*. 23, 1–7.
- Becquart, P., Cambon-Binder, A., Monfoulet, L.-E., Bourguignon, M., Vandamme, K., Bensidhoum, M., Petite, H., Logeart-Avramoglou, D., 2012. Ischemia is the prime but not the only cause of human multipotent stromal cell death in tissue-engineered constructs in vivo. *Tissue Eng. Part A* 18, 2084–2094. <https://doi.org/10.1089/ten.TEA.2011.0690>
- Beegle, J., Lakatos, K., Kalomoiris, S., Stewart, H., Isseroff, R.R., Nolte, J.A., Fierro, F.A., 2015. Hypoxic preconditioning of mesenchymal stromal cells induces metabolic changes, enhances survival, and promotes cell retention in vivo. *Stem Cells* 33, 1818–1828. <https://doi.org/10.1002/stem.1976>
- Boutillier, R.G., 2001. Mechanisms of cell survival in hypoxia and hypothermia. *J. Exp. Biol.* 204, 3171–3181.
- Caplan, A.I., 2007. Adult mesenchymal stem cells for tissue engineering versus regenerative medicine. *J. Cell. Physiol.* 213, 341–347. <https://doi.org/10.1002/jcp.21200>
- Chae, Y.C., Vaira, V., Caino, M.C., Tang, H.-Y., Seo, J.H., Kossenkov, A. V., Ottobriani, L., Martelli, C., Lucignani, G., Bertolini, I., Locatelli, M., Bryant, K.G., Ghosh, J.C., Lisanti, S., Ku, B., Bosari, S., Languino, L.R., Speicher, D.W., Altieri, D.C., 2016. Mitochondrial Akt Regulation of Hypoxic Tumor Reprogramming. *Cancer Cell* 30, 257–272. <https://doi.org/10.1016/j.ccell.2016.07.004>
- Chano, T., Avnet, S., Kusuzaki, K., Bonuccelli, G., Sonveaux, P., Rotili, D., Mai, A., Baldini, N., 2016. Tumour-specific metabolic adaptation to acidosis is coupled to epigenetic stability in osteosarcoma cells. *Am. J. Cancer Res.* 6, 859–875.
- Chen, C.-T., Shih, Y.-R. V., Kuo, T.K., Lee, O.K., Wei, Y.-H., 2008. Coordinated Changes of Mitochondrial Biogenesis and Antioxidant Enzymes During Osteogenic Differentiation of Human Mesenchymal Stem Cells. *Stem Cells*. <https://doi.org/10.1634/stemcells.2007-0509>
- Chen, T., Zhou, Y., Tan, W.-S., 2009. Influence of lactic acid on the proliferation, metabolism, and differentiation of rabbit mesenchymal stem cells. *Cell Biol. Toxicol.* 25, 573–586. <https://doi.org/10.1007/s10565-008-9113-7>
- Chimenti, I., Smith, R.R., Li, T.-S., Gerstenblith, G., Messina, E., Giacomello, A., Marban, E., 2010. Relative roles of direct regeneration versus paracrine effects of human cardiosphere-derived cells transplanted into infarcted mice. *Circ. Res.* 106, 971–980. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.109.210682>
- Cook, C.A., Hahn, K.C., Morrissette-McAlmon, J.B.F., Grayson, W.L., 2015. Oxygen delivery from hyperbarically loaded microtanks extends cell viability in anoxic environments. *Biomaterials* 52, 376–384. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2015.02.036>
- Das, R., Jahr, H., Van Osch, G.J.V.M., Farrell, E., 2010. The Role of Hypoxia in Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stem Cells: Considerations for Regenerative Medicine Approaches. *Tissue Eng. Part B Rev.* 16, 159–168.
- Degano, I.R., Vilalta, M., Bago, J.R., Matthies, A.M., Hubbell, J.A., Dimitriou, H., Bianco, P., Rubio, N., Blanco, J., 2008. Bioluminescence imaging of calvarial bone repair using bone marrow and adipose tissue-derived mesenchymal stem cells. *Biomaterials* 29, 427–437. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2007.10.006>
- Deldicque, L., Hespel, P., Francaux, M., 2012. Endoplasmic reticulum stress in skeletal muscle: origin and metabolic consequences. *Exerc. Sport Sci. Rev.* 40, 43–49. <https://doi.org/10.1097/JES.0b013e3182355e8c>

- Denoeud, C., Paquet, J., Boisselier, J., Becquart, P., Barbosa, M., Moya, A., Marinesco, S., Meiller, A., Larreta-Garde, V., Pauthe, E., Potier, E., Petite, H., 2019. Enzyme-controlled, Starch-based Hydrogels for Mesenchymal Stromal Cell Survival And Paracrine Functions, in: Orthopaedic Research Society (ORS). Austin, TX, USA.
- Deschepper, M., Manassero, M., Oudina, K., Paquet, J., Monfoulet, L.-E., Bensidhoum, M., Logeart-Avramoglou, D., Petite, H., 2013. Proangiogenic and prosurvival functions of glucose in human mesenchymal stem cells upon transplantation. *Stem Cells* 31, 526–35. <https://doi.org/10.1002/stem.1299>
- Deschepper, M., Oudina, K., David, B., Myrtil, V., Collet, C., Bensidhoum, M., Logeart-Avramoglou, D., Petite, H., 2011. Survival and function of mesenchymal stem cells (MSCs) depend on glucose to overcome exposure to long-term, severe and continuous hypoxia. *J. Cell. Mol. Med.* <https://doi.org/10.1111/j.1582-4934.2010.01138.x>
- Deschepper, M., Petite, H., Avramoglou, D.L., Paquet, J., Pauthe, E., Bidault, L., Garde, V.L., 2016. Time-controlled glucose releasing hydrogels and applications thereof. WO2016/062876A1.
- Elsasser, A., Suzuki, K., Lorenz-Meyer, S., Bode, C., Schaper, J., 2001. The role of apoptosis in myocardial ischemia: a critical appraisal. *Basic Res. Cardiol.* 96, 219–226.
- Farini, A., Sitzia, C., Erratico, S., Meregalli, M., Torrente, Y., 2014. Clinical applications of mesenchymal stem cells in chronic diseases. *Stem Cells Int.* 2014, 306573. <https://doi.org/10.1155/2014/306573>
- Farrell, M.J., Fisher, M.B., Huang, A.H., Shin, J.I., Farrell, K.M., Mauck, R.L., 2014. Functional properties of bone marrow-derived MSC-based engineered cartilage are unstable with very long-term in vitro culture. *J. Biomech.* 47, 2173–2182. <https://doi.org/10.1016/j.jbiomech.2013.10.030>
- Fernando, H.N., Czamanski, J., Yuan, T.Y., Gu, W., Salahadin, A., Huang, C.Y.C., 2011. Mechanical loading affects the energy metabolism of intervertebral disc cells. *J. Orthop. Res.* 29, 1634–41. <https://doi.org/10.1002/jor.21430>
- Fliedel, R., Popov, C., Troltsch, M., Kuhnisch, J., Ehrenfeld, M., Otto, S., 2016. Mesenchymal stem cell proliferation and mineralization but not osteogenic differentiation are strongly affected by extracellular pH. *J. Craniomaxillofac. Surg.* 44, 715–724. <https://doi.org/10.1016/j.jcms.2016.03.003>
- Folmes, C.D.L., Dzeja, P.P., Nelson, T.J., Terzic, A., 2012. Metabolic plasticity in stem cell homeostasis and differentiation. *Cell Stem Cell* 11, 596–606. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2012.10.002>
- Friedenstein, A.J., Petrakova, K. V., Kurolesova, A.I., Frolova, G.P., 1968. Heterotopic of bone marrow. Analysis of precursor cells for osteogenic and hematopoietic tissues. *Transplantation* 6, 230–247.
- Granados, D.P., Tanguay, P.-L., Hardy, M.-P., Caron, É., de Verteuil, D., Meloche, S., Perreault, C., 2009. ER stress affects processing of MHC class I-associated peptides. *BMC Immunol.* 10, 10.
- Hindupur, S.K., Gonzalez, A., Hall, M.N., 2015. The opposing actions of target of rapamycin and AMP-activated protein kinase in cell growth control. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 7, a019141. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a019141>
- Holm, S., Maroudas, A., Urban, J.P.G., Selstam, G., Nachemson, A., 1981. Nutrition of the intervertebral disc: Solute transport and metabolism. *Connect. Tissue Res.* 8, 101–19. <https://doi.org/10.3109/03008208109152130>
- Holm, S., Selstam, G., Nachemson, A., 1982. Carbohydrate metabolism and concentration profiles of solutes in the canine lumbar intervertebral disc. *Acta Physiol. Scand.* 115, 147–56. <https://doi.org/10.1111/j.1748-1716.1982.tb07057.x>
- Hu, X., Yu, S.P., Fraser, J.L., Lu, Z., Ogle, M.E., Wang, J.-A., Wei, L., 2008. Transplantation of hypoxia-preconditioned mesenchymal stem cells improves infarcted heart function via enhanced survival of implanted cells and angiogenesis. *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.* 135, 799–808. <https://doi.org/10.1016/j.jtcvs.2007.07.071>
- Huang, W.-H., Chen, H.-L., Huang, P.-H., Yew, T.-L., Lin, M.-W., Lin, S.-J., Hung, S.-C., 2014. Hypoxic mesenchymal stem cells engraft and ameliorate limb ischaemia in

- allogeneic recipients. *Cardiovasc. Res.* 101, 266–276. <https://doi.org/10.1093/cvr/cvt250>
- Karande, T.S., Ong, J.L., Agrawal, C.M., 2004. Diffusion in musculoskeletal tissue engineering scaffolds: design issues related to porosity, permeability, architecture, and nutrient mixing. *Ann. Biomed. Eng.* 32, 1728–1743.
- Kawate, K., Yajima, H., Ohgushi, H., Kotobuki, N., Sugimoto, K., Ohmura, T., Kobata, Y., Shigematsu, K., Kawamura, K., Tamai, K., 2006. Tissue-engineered approach for the treatment of steroid-induced osteonecrosis of the femoral head: transplantation of autologous mesenchymal stem cells cultured with beta-tricalcium phosphate ceramics and free vascularized fibula. *Artif. Organs* 30, 960–962.
- Khan, N., Hou, H., Swartz, H.M., Kuppusamy, P., 2015. Direct and repeated measurement of heart and brain oxygenation using in vivo EPR oximetry., First. ed, *Methods in Enzymology*. Elsevier Inc., Waltham. <https://doi.org/10.1016/bs.mie.2015.06.023>
- Kimelman-Bleich, N., Pelled, G., Sheyn, D., Kallai, I., Zilberman, Y., Mizrahi, O., Tal, Y., Tawackoli, W., Gazit, Z., Gazit, D., 2009. The use of a synthetic oxygen carrier-enriched hydrogel to enhance mesenchymal stem cell-based bone formation in vivo. *Biomaterials* 30, 4639–4648. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2009.05.027>
- Kohn, D.H., Sarmadi, M., Helman, J.I., Krebsbach, P.H., 2002. Effects of pH on human bone marrow stromal cells in vitro: implications for tissue engineering of bone. *J. Biomed. Mater. Res.* 60, 292–299.
- Ladurner, A.G., 2006. Rheostat control of gene expression by metabolites. *Mol. Cell* 24, 1–11. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2006.09.002>
- Lavrentieva, A., Majore, I., Kasper, C., Hass, R., 2010. Effects of hypoxic culture conditions on umbilical cord-derived human mesenchymal stem cells. *Cell Commun. Signal.* <https://doi.org/10.1186/1478-811X-8-18>
- Lee, H.Y., Kim, H.W., Lee, J.H., Oh, S.H., 2015. Controlling oxygen release from hollow microparticles for prolonged cell survival under hypoxic environment. *Biomaterials* 53, 583–591. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2015.02.117>
- Lee, J.H., Yoon, Y.M., Lee, S.H., 2017. Hypoxic Preconditioning Promotes the Bioactivities of Mesenchymal Stem Cells via the HIF-1 α -GRP78-Akt Axis. *Int. J. Mol. Sci.* 18. <https://doi.org/10.3390/ijms18061320>
- Lewko, B., Bryl, E., Witkowski, J.M., Latawiec, E., Angielski, S., Stepinski, J., 2005. Mechanical stress and glucose concentration modulate glucose transport in cultured rat podocytes. *Nephrol. Dial. Transplant* 20, 306–311. <https://doi.org/10.1093/ndt/gfh612>
- Li, L., Chen, X., Wang, W.E., Zeng, C., 2016. How to Improve the Survival of Transplanted Mesenchymal Stem Cell in Ischemic Heart? *Stem Cells Int.* 2016, 9682757. <https://doi.org/10.1155/2016/9682757>
- Logeart-Avramoglou, D., Oudina, K., Bourguignon, M., Delpierre, L., Nicola, M.-A., Bensidhoum, M., Arnaud, E., Petite, H., 2010. In vitro and in vivo bioluminescent quantification of viable stem cells in engineered constructs. *Tissue Eng. Part C. Methods* 16, 447–458. <https://doi.org/10.1089/ten.TEC.2009.0004>
- Lunde, K., Solheim, S., Aakhus, S., Arnesen, H., Abdelnoor, M., Egeland, T., Endresen, K., Ilebakk, A., Mangschau, A., Fjeld, J.G., Smith, H.J., Taraldsrud, E., Groggaard, H.K., Bjornerheim, R., Brekke, M., Muller, C., Hopp, E., Ragnarsson, A., Brinchmann, J.E., Forfang, K., 2006. Intracoronary injection of mononuclear bone marrow cells in acute myocardial infarction. *N. Engl. J. Med.* 355, 1199–1209. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa055706>
- Lunt, S.Y., Vander Heiden, M.G., 2011. Aerobic Glycolysis: Meeting the Metabolic Requirements of Cell Proliferation. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 27, 441–464. <https://doi.org/10.1146/annurev-cellbio-092910-154237>
- Lv, B., Hua, T., Li, F., Han, J., Fang, J., Xu, L., Sun, C., Zhang, Z., Feng, Z., Jiang, X., 2017. Hypoxia-inducible factor 1 α protects mesenchymal stem cells against oxygen-glucose deprivation-induced injury via autophagy induction and PI3K/AKT/mTOR signaling pathway. *Am. J. Transl. Res.* 9, 2492–2499.
- Mamchaoui, K., Saumon, G., 2000. A method for measuring the oxygen consumption of intact cell monolayers. *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.* 278, L858–63.

- <https://doi.org/10.1152/ajplung.2000.278.4.L858>
- Manassero, M., Paquet, J., Deschepper, M., Viateau, V., Retortillo, J., Bensidhoum, M., Logeart-Avramoglou, D., Petite, H., 2016. Comparison of Survival and Osteogenic Ability of Human Mesenchymal Stem Cells in Orthotopic and Ectopic Sites in Mice. *Tissue Eng. Part A* 22, 534–544. <https://doi.org/10.1089/ten.TEA.2015.0346>
- Massa, A., Perut, F., Chano, T., Woloszyk, A., Mitsiadis, T.A., Avnet, S., Baldini, N., 2017. The effect of extracellular acidosis on the behaviour of mesenchymal stem cells in vitro. *Eur. Cell. Mater.* 33, 252–267. <https://doi.org/10.22203/eCM.v033a19>
- McGinley, L.M., McMahon, J., Stocca, A., Duffy, A., Flynn, A., O'Toole, D., O'Brien, T., 2013. Mesenchymal stem cell survival in the infarcted heart is enhanced by lentivirus vector-mediated heat shock protein 27 expression. *Hum. Gene Ther.* 24, 840–851. <https://doi.org/10.1089/hum.2011.009>
- Meleshina, A. V., Kashirina, A.S., Dudenkova, V. V., Vdovina, N. V., Cherkasova, E.I., Zagaynova, E. V., 2018. Intracellular pH monitoring in stem cells during differentiation using fluorescence microscopy and pH-sensor SypHer-2. *Sovrem. Tehnol. v Med.* 10, 93–102. <https://doi.org/10.17691/stm2018.10.1.12>
- Meyer, G.P., Wollert, K.C., Lotz, J., Steffens, J., Lippolt, P., Fichtner, S., Hecker, H., Schaefer, A., Arseniev, L., Hertenstein, B., Ganser, A., Drexler, H., 2006. Intracoronary bone marrow cell transfer after myocardial infarction: eighteen months' follow-up data from the randomized, controlled BOOST (BOne marrOw transfer to enhance ST-elevation infarct regeneration) trial. *Circulation* 113, 1287–1294. <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.105.575118>
- Mohyeldin, A., Garzón-Muvdi, T., Quiñones-Hinojosa, A., 2010. Oxygen in stem cell biology: A critical component of the stem cell niche. *Cell Stem Cell.* <https://doi.org/10.1016/j.stem.2010.07.007>
- Monfoulet, L.-E., Becquart, P., Marchat, D., Vandamme, K., Bourguignon, M., Pacard, E., Viateau, V., Petite, H., Logeart-Avramoglou, D., 2014. The pH in the microenvironment of human mesenchymal stem cells is a critical factor for optimal osteogenesis in tissue-engineered constructs. *Tissue Eng. Part A* 20, 1827–1840. <https://doi.org/10.1089/ten.TEA.2013.0500>
- Moya, A., Larochette, N., Paquet, J., Deschepper, M., Bensidhoum, M., Izzo, V., Kroemer, G., Petite, H., Logeart-Avramoglou, D., 2017. Quiescence Preconditioned Human Multipotent Stromal Cells Adopt a Metabolic Profile Favorable for Enhanced Survival under Ischemia. *Stem Cells.* <https://doi.org/10.1002/stem.2493>
- Moya, A., Paquet, J., Deschepper, M., Larochette, N., Oudina, K., Denoëud, C., Bensidhoum, M., Logeart-Avramoglou, D., Petite, H., 2018. Human Mesenchymal Stem Cell Failure to Adapt to Glucose Shortage and Rapidly Use Intracellular Energy Reserves Through Glycolysis Explains Poor Cell Survival After Implantation. *Stem Cells* 36, 363–376. <https://doi.org/10.1002/stem.2763>
- Mylotte, L.A., Duffy, A.M., Murphy, M., O'Brien, T., Samali, A., Barry, F., Szegezdi, E., 2008. Metabolic Flexibility Permits Mesenchymal Stem Cell Survival in an Ischemic Environment. *Stem Cells* 26, 1325–1336. <https://doi.org/10.1634/stemcells.2007-1072>
- Nejadnik, H., Hui, J.H., Feng Choong, E.P., Tai, B.-C., Lee, E.H., 2010. Autologous bone marrow-derived mesenchymal stem cells versus autologous chondrocyte implantation: an observational cohort study. *Am. J. Sports Med.* 38, 1110–1116.
- Ng, C.T., Biniiecka, M., Kennedy, A., McCormick, J., Fitzgerald, O., Bresnihan, B., Buggy, D., Taylor, C.T., O'sullivan, J., Fearon, U., 2010. Synovial tissue hypoxia and inflammation in vivo. *Ann. Rheum. Dis.* 69, 1389–1395.
- Novosel, E.C., Kleinhans, C., Kluger, P.J., 2011. Vascularization is the key challenge in tissue engineering. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 63, 300–311. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2011.03.004>
- Nuschke, A., Rodrigues, M., Wells, A.W., Sylakowski, K., Wells, A., 2016. Mesenchymal stem cells/multipotent stromal cells (MSCs) are glycolytic and thus glucose is a limiting factor of in vitro models of MSC starvation. *Stem Cell Res. Ther.* <https://doi.org/10.1186/s13287-016-0436-7>

- Palomäki, S., Pietilä, M., Laitinen, S., Pesälä, J., Sormunen, R., Lehenkari, P., Koivunen, P., 2013. HIF-1 α is upregulated in human mesenchymal stem cells. *Stem Cells*.
<https://doi.org/10.1002/stem.1435>
- Paquet, J., Deschepper, M., Moya, A., Legear-Avramoglou, D., Boisson-Vidal, C., Petite, H., 2015. Oxygen Tension Regulates Human Mesenchymal Stem Cell Paracrine Functions. *Stem Cells Transl. Med.* 4, 1–13.
- Pattappa, G., Heywood, H.K., de Bruijn, J.D., Lee, D.A., 2011. The metabolism of human mesenchymal stem cells during proliferation and differentiation. *J. Cell. Physiol.*
<https://doi.org/10.1002/jcp.22605>
- Peng, T., Liu, L., MacLean, A.L., Wong, C.W., Zhao, W., Nie, Q., 2017. A mathematical model of mechanotransduction reveals how mechanical memory regulates mesenchymal stem cell fate decisions. *BMC Syst. Biol.* 11, 55.
<https://doi.org/10.1186/s12918-017-0429-x>
- Peterson, K.M., Aly, A., Lerman, A., Lerman, L.O., Rodriguez-Porcel, M., 2011. Improved survival of mesenchymal stromal cell after hypoxia preconditioning: role of oxidative stress. *Life Sci.* 88, 65–73. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2010.10.023>
- Pettersen, E.O., Larsen, L.H., Ramsing, N.B., Ebbesen, P., 2005. Pericellular oxygen depletion during ordinary tissue culturing, measured with oxygen microsensors. *Cell Prolif.* 38, 257–267. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2184.2005.00345.x>
- Rathmell, J.C., Fox, C.J., Plas, D.R., Hammerman, P.S., Cinalli, R.M., Thompson, C.B., 2003. Akt-directed glucose metabolism can prevent Bax conformation change and promote growth factor-independent survival. *Mol. Cell. Biol.* 23, 7315–7328.
- Robey, P.G., 2017. "Mesenchymal stem cells": fact or fiction, and implications in their therapeutic use. *F1000Research* 6, 524.
<https://doi.org/10.12688/f1000research.10955.1>
- Rosova, I., Dao, M., Capoccia, B., Link, D., Nolte, J.A., 2008. Hypoxic preconditioning results in increased motility and improved therapeutic potential of human mesenchymal stem cells. *Stem Cells* 26, 2173–2182. <https://doi.org/10.1634/stemcells.2007-1104>
- Rouwkema, J., Khademhosseini, A., 2016. Vascularization and Angiogenesis in Tissue Engineering: Beyond Creating Static Networks. *Trends Biotechnol.* 34, 733–745.
<https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2016.03.002>
- Rouwkema, J., Rivron, N.C., van Blitterswijk, C.A., 2008. Vascularization in tissue engineering. *Trends Biotechnol.* 26, 434–441.
<https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2008.04.009>
- Salvatierra, J.C., Yuan, T.Y., Fernando, H., Castillo, A., Gu, W.Y., Cheung, H.S., Charles Huang, C.Y., 2011. Difference in energy metabolism of annulus fibrosus and nucleus pulposus cells of the intervertebral disc. *Cell. Mol. Bioeng.* 4, 302–10.
<https://doi.org/10.1007/s12195-011-0164-0>
- Saraswati, S., Guo, Y., Atkinson, J., Young, P.P., 2015. Prolonged hypoxia induces monocarboxylate transporter-4 expression in mesenchymal stem cells resulting in a secretome that is deleterious to cardiovascular repair. *Stem Cells*.
<https://doi.org/10.1002/stem.1935>
- Sharifi, A.M., Eslami, H., Larijani, B., Davoodi, J., 2009. Involvement of caspase-8, -9, and -3 in high glucose-induced apoptosis in PC12 cells. *Neurosci. Lett.* 459, 47–51.
<https://doi.org/10.1016/j.neulet.2009.03.100>
- Shyh-Chang, N., Ng, H.H., 2017. The metabolic programming of stem cells. *Genes Dev.* 31, 336–346. <https://doi.org/10.1101/gad.293167.116>
- Simon, M.C., Keith, B., 2008. The role of oxygen availability in embryonic development and stem cell function. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 9, 285–296. <https://doi.org/10.1038/nrm2354>
- Stegen, S., van Gastel, N., Eelen, G., Ghesquiere, B., D'Anna, F., Thienpont, B., Goveia, J., Torrekens, S., Van Looveren, R., Luyten, F.P., Maxwell, P.H., Wielockx, B., Lambrechts, D., Fendt, S.-M., Carmeliet, P., Carmeliet, G., 2016. HIF-1 α Promotes Glutamine-Mediated Redox Homeostasis and Glycogen-Dependent Bioenergetics to Support Postimplantation Bone Cell Survival. *Cell Metab.* 23, 265–279.
<https://doi.org/10.1016/j.cmet.2016.01.002>

- Telukuntla, K.S., Suncion, V.Y., Schulman, I.H., Hare, J.M., 2013. The advancing field of cell-based therapy: insights and lessons from clinical trials. *J. Am. Heart Assoc.* 2, e000338. <https://doi.org/10.1161/JAHA.113.000338>
- Ting, A.E., Sherman, W., 2012. Allogeneic stem cell transplantation for ischemic myocardial dysfunction. *Curr. Opin. Organ Transplant.* 17, 675–680. <https://doi.org/10.1097/MOT.0b013e32835a66a1>
- Toma, C., Pittenger, M.F., Cahill, K.S., Byrne, B.J., Kessler, P.D., 2002. Human mesenchymal stem cells differentiate to a cardiomyocyte phenotype in the adult murine heart. *Circulation* 105, 93–98.
- Tormos, K. V, Anso, E., Hamanaka, R.B., Eisenbart, J., Joseph, J., Kalyanaraman, B., Chandel, N.S., 2011. Mitochondrial complex III ROS regulate adipocyte differentiation. *Cell Metab.* 14, 537–544.
- Treuhaff, P.S., McCarty, D.J., 1971. Synovial fluid pH, lactate, oxygen and carbon dioxide partial pressure in various joint diseases. *Arthritis Rheum.* 14, 475–84. <https://doi.org/10.1002/art.1780140407>
- Valcourt, J.R., Lemons, J.M.S., Haley, E.M., Kojima, M., Demuren, O.O., Collier, H.A., 2012. Staying alive: metabolic adaptations to quiescence. *Cell Cycle* 11, 1680–1696. <https://doi.org/10.4161/cc.19879>
- Vander, M.G., Cantley, L.C., Thompson, C.B., Thompson, C.B., Heiden, M.G. Vander, Cantley, L.C., 2015. Understanding The Metabolic the Warburg Effect : of Requirements Cell Proliferation 324, 1029–1033.
- Wakitani, S., Nawata, M., Tensho, K., Okabe, T., Machida, H., Ohgushi, H., 2007. Repair of articular cartilage defects in the patello-femoral joint with autologous bone marrow mesenchymal cell transplantation: three case reports involving nine defects in five knees. *J. Tissue Eng. Regen. Med.* 1, 74–79.
- Wolff, M., Fandrey, J., Jelkmann, W., 1993. Microelectrode measurements of pericellular PO₂ in erythropoietin-producing human hepatoma cell cultures. *Am. J. Physiol.* 265, C1266–70. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.1993.265.5.C1266>
- Wollert, K.C., Meyer, G.P., Muller-Ehmsen, J., Tschope, C., Bonarjee, V., Larsen, A.I., May, A.E., Empen, K., Chorianopoulos, E., Tebbe, U., Waltenberger, J., Mahrholdt, H., Ritter, B., Pirr, J., Fischer, D., Korf-Klingebiel, M., Arseniev, L., Heuft, H.-G., Brinckmann, J.E., Messinger, D., Hertenstein, B., Ganser, A., Katus, H.A., Felix, S.B., Gawaz, M.P., Dickstein, K., Schultheiss, H.-P., Ladage, D., Greulich, S., Bauersachs, J., 2017. Intracoronary autologous bone marrow cell transfer after myocardial infarction: the BOOST-2 randomised placebo-controlled clinical trial. *Eur. Heart J.* 38, 2936–2943. <https://doi.org/10.1093/eurheartj/ehx188>
- Yavropoulou, M.P., Yovos, J.G., n.d. The molecular basis of bone mechanotransduction. *J. Musculoskelet. Neuronal Interact.* 16, 221–236.
- Yeatts, A.B., Choquette, D.T., Fisher, J.P., 2013. Bioreactors to influence stem cell fate: augmentation of mesenchymal stem cell signaling pathways via dynamic culture systems. *Biochim. Biophys. Acta* 1830, 2470–2480. <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2012.06.007>
- Zhao, X., He, G., Chen, Y.R., Pandian, R.P., Kuppusamy, P., Zweier, J.L., 2005. Endothelium-derived nitric oxide regulates postischemic myocardial oxygenation and oxygen consumption by modulation of mitochondrial electron transport. *Circulation* 111, 2966–72. <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.104.527226>
- Zhu, H., Sun, A., Zou, Y., Ge, J., 2014. Inducible metabolic adaptation promotes mesenchymal stem cell therapy for ischemia: A hypoxia-induced and glycogen-based energy prestorage strategy. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* <https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.114.303194>
- Zignego, D.L., Hilmer, J.K., June, R.K., 2015. Mechanotransduction in primary human osteoarthritic chondrocytes is mediated by metabolism of energy, lipids, and amino acids. *J. Biomech.* 48, 4253–61. <https://doi.org/10.1016/j.jbiomech.2015.10.038>

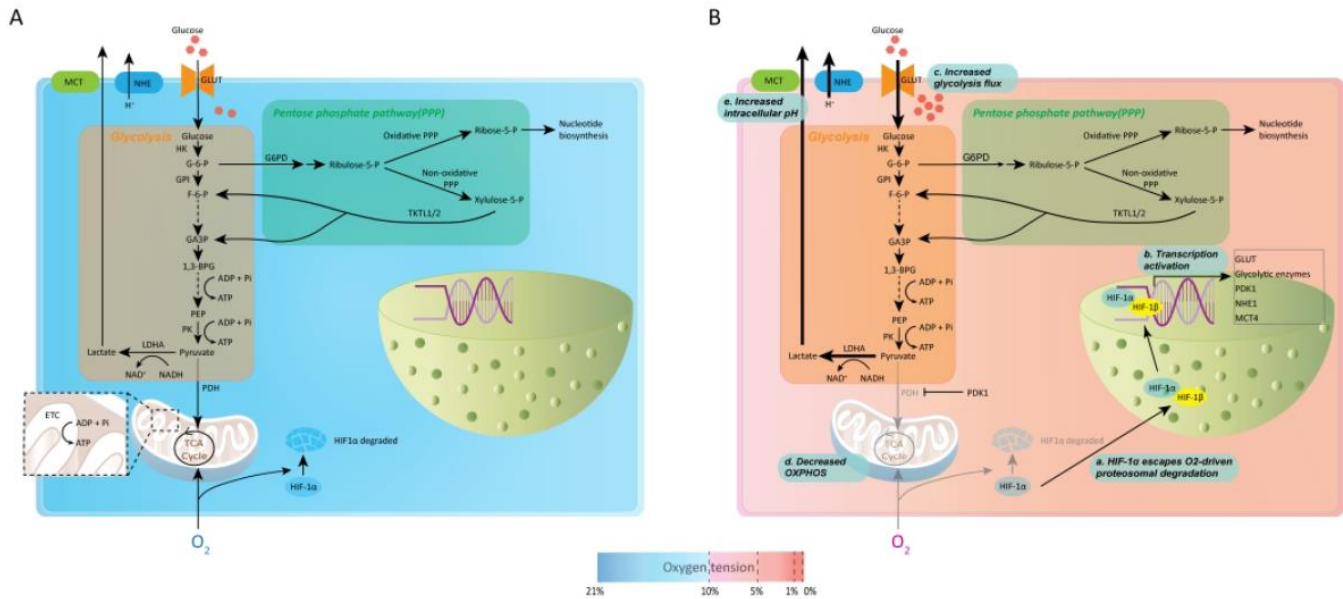


Figure 1. Schematic diagrams illustrate metabolism in mesenchymal stem cells (MSCs) under different oxygen tension levels. A. Under sufficient oxygen, glucose molecules are broken down in glycolysis for the production of ATP molecules. Byproducts of glycolysis and other chemical components enter the tricarboxylic acid (TCA) cycle in mitochondria. In OXPHOS, electron byproducts of the TCA cycle pass through the electron transport chain (ETC) at the mitochondrial cristae and produce more ATP molecules. Moreover, HIF-1 α is degraded under sufficient oxygen level conditions by proteasomes. B. In a near-anoxia environment ($pO_2 < 0.1\%$), however, (a) HIF-1 α escapes oxygen-driven proteosomal degradation and translocates to the nucleus, where it dimerizes with HIF-1 β . Accumulation of HIF-1 α/β activates (b) the transcription of genes that increase expression of glucose transporters and glycolytic enzymes, which (c) increase glycolytic flux; and (d) decrease activity and eventually block the OXPHOS pathway. Increased activity of the glycolytic pathway yields a build-up of lactate, which (e) increases intracellular pH. Abbreviations: G-6-P stands for glucose-6-phosphate; F-6-P, fructose-6-phosphate; GAP3P, glyceraldehyde-3-phosphate; 1,3BPG, 1,3-bisphosphoglycerate; PEP, phospho-enol-pyruvate; Ribulose-5-P, ribulose-5-phosphate; Ribose-5-P, ribose-5-phosphate; Xylulose-5-P, xylulose-5-phosphate; ATP, adenosine triphosphate; ADP, adenosine diphosphate; Pi, inorganic phosphate; HK, hexokinase; GPI, glucose-6-phosphate isomerase; PK, pyruvate kinase; LDHA, lactate dehydrogenase; TKTL1/2, transketolase1/2; PDH, pyruvate dehydrogenase; PDK1, pyruvate dehydrogenase kinase; GLUT, glucose transporter; MCT, Monocarboxylate transporter; NHE, Na⁺-H⁺-exchanger; PPP, pentose phosphate pathway.

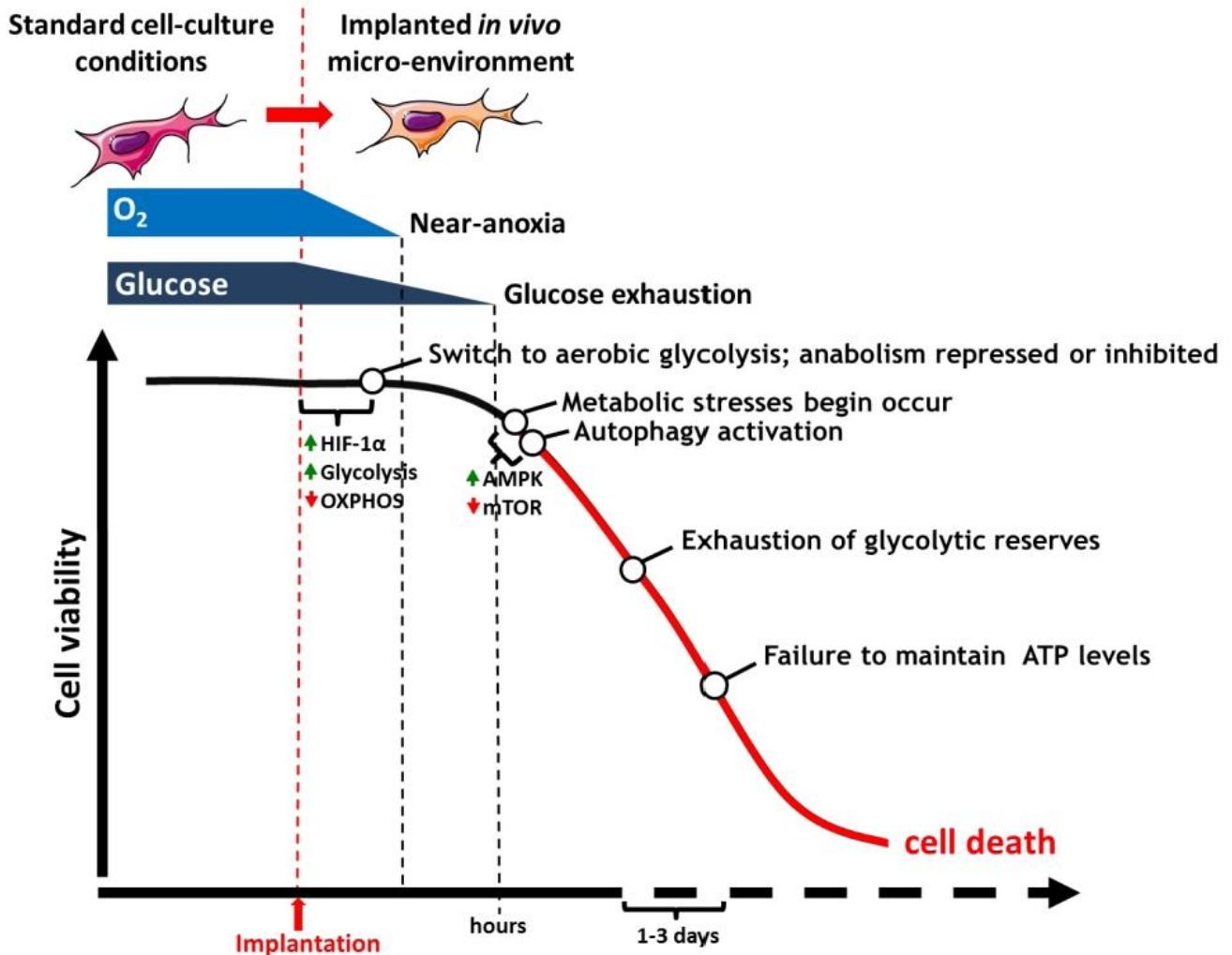


Figure 2. Diagram illustrates the envisioned timeline of bioenergetic metabolic activity of cells upon implantation. Before implantation, MSCs are generally cultured under standard conditions of 21 pO₂ and with sufficient glucose. Upon implantation in an ischemic site, MSCs experience insufficient levels of oxygen tension, which triggers a switch to aerobic glycolysis and represses, eventually inhibiting, anabolic activities. Upon glucose exhaustion, MSCs begin to experience metabolic stresses, which are, in part, counteracted by the activation of autophagy. Autophagy, or self-catabolism, reduces sources of stress and provides nutrients during times of nutrient withdrawal. Eventually, glycolytic reserves are exhausted, and autophagy is unable to provide MSCs additional cell nutrients or mitigate cell stress. Ultimately, cell death occurs when cells do not meet their minimal bioenergetics demands. The timepoints indicated are according to the literature (Granados et al., 2009; Lv et al., 2017; Moya et al., 2018, 2017), and they may vary according to different culture conditions such as cell density and mass transport parameters. Figure modified from graphical abstract from Moya et al. (Moya et al., 2018).

300x220mm (150 x 150 DPI)

CHAPITRE 3

STRATEGIES POUR AMÉLIORER LA SURVIE DES CSMs APRÈS IMPLANTATION

« Que la stratégie soit belle est un fait. Mais n'oubliez pas de regarder le résultat ».

Wilson CHURCHILL

Afin d'améliorer le potentiel thérapeutique des PITs, il convient de maintenir la viabilité des cellules implantées de sorte à maximiser leurs fonctions réparatrices. Pour cela, les cellules implantées doivent maintenir un niveau d'énergie compatible avec leur survie, c'est-à-dire être capables de synthétiser suffisamment de molécules d'ATP via la glycolyse pour satisfaire leur besoin énergétique post-implantation. Il convient également de réduire le temps d'exposition des cellules à l'environnement ischémique post-implantation.

Pour cela, plusieurs stratégies sont développées autour (i) du pré-conditionnement métabolique des cellules avant implantation, (ii) de l'accélération de la vascularisation sur le site d'implantation, et de l'apport (iii) d'oxygène ou (iv) de glucose aux cellules implantées.

3.1 Le pré-conditionnement métabolique

Dans le contexte d'amélioration de la survie et de la fonctionnalité cellulaire post-implantation, les stratégies de pré-conditionnement métabolique visent à modifier, préalablement à l'implantation, le métabolisme des cellules afin de réduire leurs demandes bioénergétiques une fois implantées au sein de l'environnement ischémique.

La quiescence est un état physiologique adopté par les cellules souches au sein de leur niche, réduisant leurs demandes énergétiques et préservant leurs principales fonctions, notamment leur viabilité (Cheung et al. 2013). Au cours d'une étude menée au laboratoire B3OA, des hCSMs ont été pré-

conditionnées pendant 48 heures au sein d'un environnement normoxique (21% pO₂) sans sérum, induisant ces dernières en état de quiescence. Ce pré-conditionnement a permis aux hCSMs de maintenir leur survie pendant 14 jours au sein d'un environnement quasi-anoxique *in vitro* (0,1% pO₂) associé à une déplétion de glucose (Moya et al., 2017). A l'inverse, les hCSMs non pré-conditionnées montraient un taux de survie inférieur à 10% après 7 jours dans ces conditions. De plus, la survie des hCSMs pré-conditionnées puis implantées dans un modèle ectopique (sous-cutané) de souris, était améliorée après 7 jours par rapport aux hCSMs non pré-conditionnées (Moya et al., 2017). D'un point de vue métabolique, les hCSMs quiescentes réduisent leur consommation d'ATP au sein des réactions anaboliques, en diminuant par exemple leur synthèse protéique, appuyant ainsi l'hypothèse selon laquelle les cellules en quiescence réduisent leur métabolisme énergétique pour maintenir leur fonction vitale, comme suggéré par Boutilier et al. pour les animaux tolérants à l'anoxie (Boutilier, 2001). Cette réduction des réactions anaboliques est directement associée à l'inhibition de la voie mTOR (cf. 2.3.3). En effet, cette voie de signalisation pro-apoptotique est inhibée chez les hCSMs pré-conditionnées en quiescence au cours des 3 premiers jours d'exposition en quasi-anoxie *in vitro* (0,1% pO₂) et en absence de glucose (Moya et al., 2017).

La stratégie de pré-conditionnement hypoxique a également été proposée pour tenter d'améliorer la survie des CSMs après implantation. Beegle et al. ont par exemple observé que les hCSMs pré-conditionnées à une pO₂ de 1% pendant 96 heures réduisaient leur consommation de glucose et devenaient plus résistantes à l'ischémie après implantation en site ectopique murin, par rapport aux CSMs non pré-conditionnées à l'hypoxie (Beegle et al. 2015). De plus, l'implantation de CSMs pré-conditionnées à l'hypoxie sévère (0,5% pO₂ pendant 24 heures), puis implantées dans un modèle d'ischémie cardiaque (infarctus du myocarde) chez le rat, montrent (i) une augmentation de la vascularisation dans les zones ischémiées, (ii) une augmentation de l'expression de la sous-unité HIF1- α ainsi que des facteurs pro-angiogènes VEGF et Angiopoétine 1, et (iii) une amélioration des fonctions cardiaques après 6 semaines par rapport aux animaux traités avec les CSMs non pré-conditionnées à l'hypoxie (Hu et al., 2008). Cette stratégie améliore également la vascularisation dans des modèles d'ischémie de pattes arrière chez la souris (Huang et al., 2014 ; Lee et al., 2017). D'un point de vue métabolique, le pré-conditionnement hypoxique des CSMs entraîne la réduction de leur consommation de glucose ainsi que de la sécrétion de lactate (Beegle et al. 2015). De plus, après ce type de pré-conditionnement, les CSMs réorientent leur métabolisme vers la glycogénèse via la voie AKT (cf. 2.3.1), augmentant ainsi leurs réserves de glycogène (Zhu et al., 2014). Les CSMs pré-conditionnées par l'hypoxie sur-expriment la sous-unité HIF-1 α (Zhu et al., 2014), et survivent mieux en conditions ischémiques via une adaptation du métabolisme dépendant de la glutamine et du glycogène, formant par ailleurs plus de

tissu osseux après implantation en site ectopique (sous-cutané) chez la souris que les CSMs non pré-conditionnées à l'hypoxie (Stegen et al. 2016).

L'ensemble de ces observations appuie l'hypothèse selon laquelle le pré-conditionnement métabolique des CSMs, via la déprivation de sérum (pré-conditionnement en quiescence) ou d'oxygène (pré-conditionnement hypoxique), permet de réorienter le métabolisme énergétique cellulaire vers un métabolisme moins énergivore, ou encore vers des voies métaboliques alternatives, une fois les CSMs confrontées à l'environnement ischémique. Cette stratégie de pré-conditionnement métabolique s'avère donc bénéfique pour améliorer la survie et la fonctionnalité (notamment les fonctions pro-angiogènes) des CSMs post-implantation.

3.2 L'accélération de la vascularisation

Accélérer la revascularisation du site d'implantation permettrait de réduire le temps d'exposition des CSMs aux conditions ischémiques (Boomsma et al., 2012). En effet, les nouveaux vaisseaux sanguins permettraient de rétablir l'accès aux nutriments et à l'oxygène, ainsi que l'évacuation des déchets métaboliques, réduisant notamment l'hypercapnie locale (cf. 2.1.5).

La combinaison de facteurs de croissance pro-angiogènes au sein de matrices cellularisées a déjà fait l'objet de plusieurs études prometteuses. En effet, la vascularisation après 2 semaines à l'intérieur et en périphérie de matrices combinées à du VEGF ou du bFGF est augmentée par rapport à celle de matrices non combinées à ces facteurs de croissance, à la fois dans un modèle *in vitro* contenant des cellules endothéliales (Laschke and Menger, 2012) et après implantation en site orthotopique (calvaria) chez le rat (Kaigler et al., 2006). De même, le nombre de vaisseaux nouvellement formés au sein de matrices combinées à du PDGF est augmenté de près de 2 fois par rapport aux matrices dépourvues de PDGF, après 2 semaines d'implantation en site ectopique (sous-cutané) chez le rat (Li et al., 2009). La liste de ces études n'est pas exhaustive.

La macroarchitecture des matrices est également un élément impactant leur revascularisation. En effet, des matrices (en polyéther-ester) implantées en site sous-cutané chez la souris pendant 8, 12 et 20 jours, contenant des pores de 200 à 250 μm , montrent une colonisation plus importante par les vaisseaux sanguins du tissu hôte que les matrices contenant des pores de tailles inférieures (20 à 75 μm et 75 à 200 μm) (Druecke et al., 2004). De plus, les avancées technologiques des dernières années en terme d'impression 3D et de fabrication additive, permettent de construire aujourd'hui des matrices aux macroarchitectures complexes, notamment en modulant la taille et l'orientation des pores (Galperin et

al., 2010 ; Madden et al., 2010). Par exemple, Yang et al. ont conçu une matrice céramique par fabrication additive, combinant des pores de 10 μm (dû au frittage) permettant une interface importante entre la matrice et le tissu hôte, avec des pores de 200 à 600 μm permettant une invasion vasculaire par le tissu hôte (Yang et al., 2006). En créant, par impression 3D, des réseaux poreux interconnectés au sein des matrices, plusieurs équipes cherchent à guider l'invasion vasculaire vers les cellulesensemencées dans celles-ci (Santos et al., 2010).

L'utilisation de cellules génétiquement modifiées pour surexprimer le VEGF ou HIF1- α est une stratégie également proposée afin d'accélérer la revascularisation des PITs. Par exemple, des cellules endothéliales génétiquement modifiées surexprimant le VEGF montrent une survie de 95% après 5 jours d'implantation en site ectopique chez le lapin alors qu'uniquelement 40% des cellules endothéliales non génétiquement modifiées survivent (Lasso et al., 2007). Des hCSMs génétiquement modifiées pour surexprimer le bFGFensemencées sur une matrice d'hydroxyapatite, puis implantées 4 semaines en site orthotopique (calvaria) chez le rat, induisent un nombre de nouveaux vaisseaux sanguins 1.7 fois supérieur à celui des matricesensemencées avec des hCSMs non génétiquement modifiées (Qu et al., 2011).

Enfin, une autre stratégie consiste à implanter, via plusieurs interventions chirurgicales, de fines couches de cellules (mono ou bicouches). Une fois les premières couches cellulaires vascularisées, de nouvelles couches de cellules sont implantées (Lovett et al., 2003). Cette dernière approche permet la création d'une connexion directe des couches cellulaires avec la vascularisation environnante. Toutefois, cette stratégie est chronophage pour les étapes de vascularisation consécutives par les diverses couches cellulaires, et nécessite une intervention chirurgicale à chaque nouvelle couche.

Bien que pouvant être accélérée par (i) la combinaison de facteurs de croissance pro-angiogènes, (ii) la modulation de la macroarchitecture des matrices, ou encore (iii) la modification génétique des cellulesensemencées, la revascularisation d'un PIT reste un processus physiologique relativement lent (Tableau 6). Cette propriété représente une limite majeure pour réduire le temps d'exposition des CSMs aux conditions ischémiques après implantation.

Vitesse de formation des vaisseaux sanguins ($\mu\text{m}/\text{jour}$)	Modèle	Espèce	Références
80	Formation de pseudo-tubes à partir de cellules HUVECs dans un hydrogel de fibrine (3D, <i>in vitro</i>)	Humain	Griffith et al., 2005
60	Formation de pseudo-tubes à partir de cellules HUVECs en conditions standards (2D, <i>in vitro</i>)	Humain	Schechner et al., 2000
120	Migration de cellules endothéliales en conditions standards (2D, <i>in vitro</i>)	Souris	Orr et al., 2003 Zarem et al., 1969

Tableau 6 : Cinétiques de formation de vaisseaux sanguins et de migration de cellules endothéliales.

3.3 L'apport d'oxygène

En partant de l'hypothèse selon laquelle l'apport d'oxygène permettrait d'améliorer la survie des CSMs après implantation, plusieurs équipes ont développé des systèmes de délivrance d'oxygène, cherchant notamment à augmenter la quantité d'oxygène stockée au sein des matrices dans lesquelles les cellules sont ensemencées.

Des études *in vitro* ont démontré que l'utilisation de microsphères encapsulant de l'oxygène, sont capables de diffuser cette molécule en continu aux cellules stromales dérivées du tissu adipeux (ADSCs) pendant 6 jours en conditions hypoxiques sévères (1% pO_2). Toutefois, la survie cellulaire dans ces conditions ne dépasse pas 6 jours, et le maintien de la fonctionnalité cellulaire (notamment la prolifération, différenciation et effets paracrins) n'a pas été étudié (Cook et al., 2015).

Les perfluorocarbones (PFCs) sont des molécules capables, en fonction de la pO_2 locale, de libérer de l'oxygène. Des études *in vivo* ont démontré que des cellules C3H10T1/2 encapsulées avec des PFCs et implantées en site sous-cutané chez la souris présentaient un taux de survie supérieur aux cellules encapsulées sans PFCs après 3 jours (Kimelman-Bleich et al., 2009). Toutefois, cette observation n'a pas été confirmée après 7 jours d'implantation dans ce modèle ectopique. De plus, l'apport d'oxygène dans cette étude ne stimule pas l'angiogenèse autour du site d'implantation. L'hypothèse pouvant expliquer cette observation serait que l'apport d'oxygène maintient les CSMs en conditions physioxiques plutôt que d'initier la cascade proangiogène, elle-même initiée par l'activation de HIF (cf. 2.1.3 et 2.5). En effet, des cellules MC3Y3-E1 cultivées *in vitro* en conditions hypoxiques sévères (1% pO_2) et en présence de microréservoirs remplis d'oxygène montrent une sous-régulation des gènes codant pour la sous-unité HIF-1 α ainsi que pour le facteur pro-angiogène VEGF (Lee et al.,

2015), par rapport aux cellules cultivées avec les microréservoirs sans oxygène. De plus, d'autres études démontrent que des milieux conditionnés par les hCSMs en quasi-anoxie (0,1% pO₂) pendant 7 et 14 jours présentent un potentiel chimiotactique et pro-angiogène augmentés par rapport aux milieux conditionnés par les hCSMs à 5% pO₂ (Paquet et al., 2015).

Ainsi, la stratégie d'apport d'oxygène permet, au stade actuel des recherches, d'améliorer la survie cellulaire sur un temps relativement court en conditions quasi anoxiques *in vitro* (6 jours) ainsi qu'en conditions ischémiques *in vivo* (entre 3 et 7 jours). Cependant, cette stratégie est défavorable à l'angiogenèse, ce qui peut s'avérer problématique dans l'objectif de réparation d'un tissu lésé.

3.4 L'apport de glucose

Une série d'études menées au laboratoire B3OA a permis d'établir, qu'après implantation au sein d'un environnement ischémique, le facteur limitant responsable de la mort massive et rapide des CSMs n'est pas l'oxygène mais le glucose (Deschepper *et al.*, 2011 and 2013 ; Moya *et al.*, 2017). En effet, des hCSMs ainsi que des CSMs de brebis exposées en continu, *in vitro*, à une quasi-anoxie (0,1% pO₂) combinée à une absence de glucose, meurent massivement après 7 jours (mortalité supérieure à 90%). Toutefois, dans ces conditions quasi-anoxiques, et avec un apport de glucose (1 g/L ou 5 g/L), les CSMs sont capables de survivre au moins 21 jours, sans perte de fonctionnalité (Figure 15-A) (Deschepper et al., 2011 ; 2013). De plus, le facteur de transcription HIF-1 est surexprimé dans ces conditions et uniquement en présence de glucose.

Le rôle central du glucose dans le maintien de la survie des CSMs a été également confirmé *in vivo* en démontrant qu'une supplémentation des PITs par ce nutriment conduit à une augmentation de la survie des CSMs dans un modèle ectopique, ainsi qu'à une augmentation du nombre de nouveaux vaisseaux sanguins autour de l'implant (Deschepper et al., 2013). En effet, le taux de survie des hCSMs ensemencées dans un hydrogel de fibrine contenant du glucose (10 g/L) et implantées en sous-cutanée chez la souris est plus de 4 fois supérieur à celui de hCSMs ensemencées dans un hydrogel dépourvu de glucose (Figure 15-B).

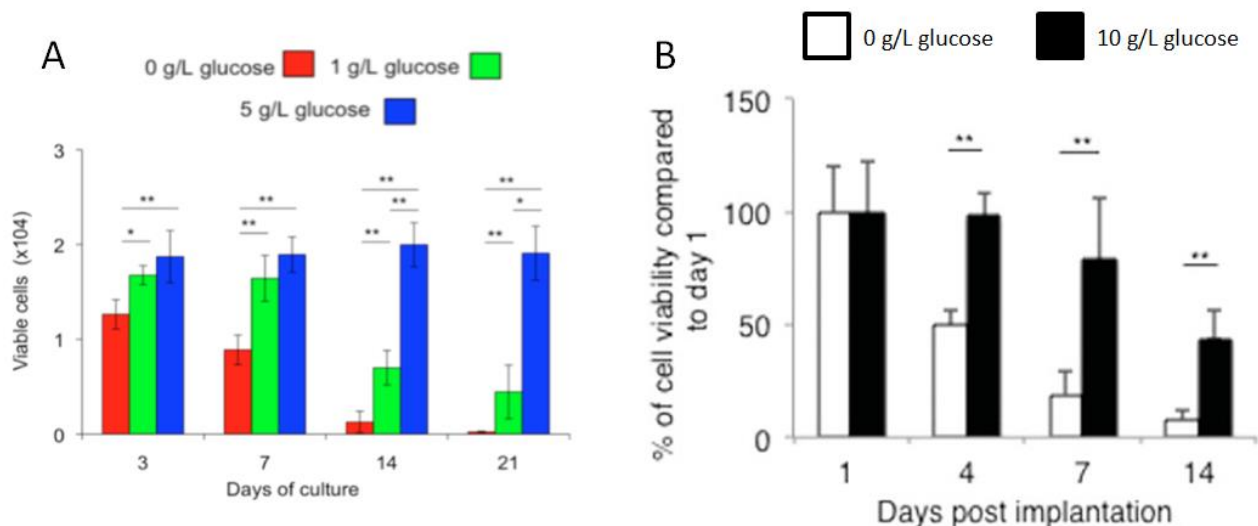


Figure 15 : Etude de la survie des hCSMs, avec présence ou absence de glucose, en condition quasi-anoxique (0,1% pO₂) dans un modèle *in vitro* (A) et dans un modèle *in vivo* en site ectopique chez la souris immunodéprimée (B) (adapté de Deschepper et al., 2013).

Toutefois, le glucose est une molécule non chargée de petite taille (180 g/mol), n'ayant aucune affinité spécifique pour une matrice, et très difficile à délivrer de façon contrôlée. Sa délivrance par diffusion à partir d'hydrogels ou de céramiques, par exemple, aboutit à sa libération quasi-immédiate (Papenburg et al., 2007 ; Suhaimi et al., 2015).

3.5 Application de la stratégie d'apport de glucose : hydrogel à délivrance contrôlée de glucose pour alimenter le métabolisme des CSMs après implantation

Les hydrogels sont des réseaux tridimensionnels composés de polymères hydrophiles réticulés par formation de liaisons covalentes, capables d'absorber une importante quantité de liquide, leur permettant ainsi de confiner des molécules au sein de leur réseau (Chirani et al., 2013). Les polymères d'origine naturelle, grâce à leur biocompatibilité et biodégradabilité, sont fréquemment utilisés dans la conception d'hydrogels en ingénierie tissulaire (Cattelas et al., 2006 ; Eyrich et al., 2007).

Afin de développer un système de délivrance contrôlée de glucose, nous avons fait l'hypothèse qu'un hydrogel de fibrine/amidon contenant une enzyme, l'amyloglucosidase (AMG), pourrait servir de source de glucose aux CSMs, afin de maintenir leur survie au sein de l'environnement ischémique post-implantation. L'hydrogel conçu par le laboratoire B3OA, en collaboration avec l'Equipe de Recherche sur

les Relations Matrice Extracellulaire-Cellule (ERRMECE, Université Cergy-Pontoise), est composé des produits suivants :

- **Fibrinogène** : protéine constituée de fibrinopeptides, jouant un rôle essentiel dans le maintien de l'homéostasie et la formation de caillot sanguin (Kostelansky et al., 2004). Cette protéine est ici utilisée pour être associée à la thrombine.
- **Thrombine** : enzyme hydrolysant spécifiquement les fibrinopeptides du fibrinogène. La thrombine est ici utilisée pour synthétiser le réseau tridimensionnel de fibrine, appelé aussi hydrogel de fibrine (Hantgan and Hermans, 1979). Le réseau de fibrine favorise l'adhérence et la prolifération de nombreux types cellulaires (Zhao et al., 2008 ; Janmey et al., 2009), dont les CSMs (Bensaïd et al., 2003).
- **Aprotinine** : inhibiteur de protéases, doté de propriétés anti-fibrinolytiques. Elle est ici utilisée pour maintenir l'hydrogel de fibrine dans le temps en limitant notamment sa dégradation par les protéases (Jockhoveel et al., 2001).
- **Amidon de blé** : l'amidon est la forme de stockage de glucose chez les végétaux, composé de deux types de polymères de glucose liés entre eux par des liaisons $\alpha(1-4)$ glucosidiques : l'amylose (30%) et l'amylopectine (70%). L'amylose est constitué d'une chaîne linéaire de glucose (Buléon et al., 1998) ; l'amylopectine porte quant à elle des ramifications de chaînes de glucose reliées par des liaisons $\alpha(1-6)$ à la chaîne linéaire principale (Perez et al., 2010).
- **Amyloglucosidase** : enzyme de finition hydrolysant successivement les liaisons glucosidiques $\alpha(1-4)$ de l'amidon à partir des extrémités non réductrices, ainsi que les liaisons $\alpha(1-6)$, entraînant le débranchement de l'amylopectine dans l'amidon (Figure 16) (Pazur et al., 1959).

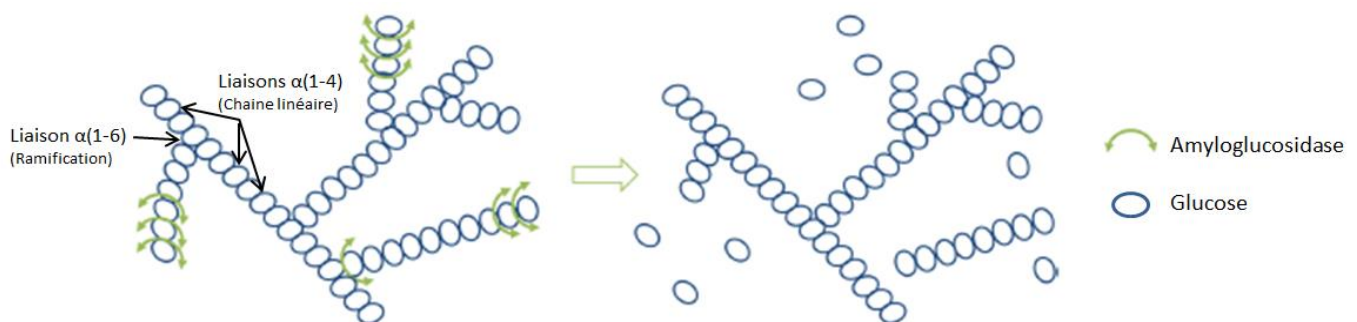


Figure 16 : Hydrolyse de l'amidon par l'AMG (adapté de Boisselier, 2016)

Toutefois, l'activité de l'AMG sur les liaisons $\alpha(1,6)$ est très faible comparée à celle sur les liaisons $\alpha(1,4)$ et ne représente que 0,2% de l'activité enzymatique (Batey, 1982).

Le principe de cet hydrogel est que l'amidon est hydrolysé par l'AMG, permettant ainsi la production de glucose afin d'alimenter les CSMs ensemencées au sein de l'hydrogel (Figure 17). Ce dispositif innovant, qualifié d'hydrogel nutritif, a d'ailleurs fait l'objet d'un dépôt de brevet Européen concernant le système de délivrance de glucose (EP14306700, CNRS, 2014).

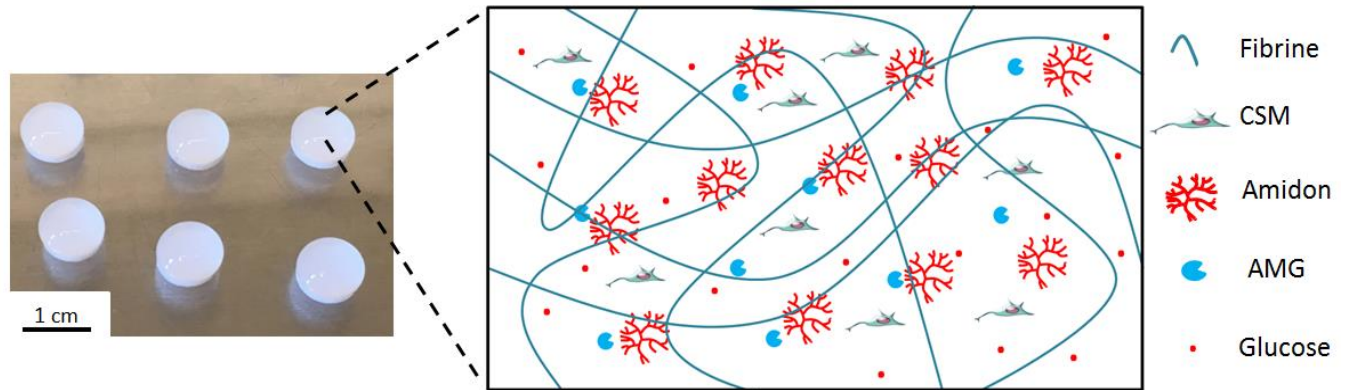


Figure 17: Photographie des hydrogels nutritifs *in vitro* (gauche) et représentation schématique de leur composition interne (droite).

A l'heure actuelle, la preuve de concept de l'hydrogel nutritif d'amidon/AMG dans l'amélioration de la survie et de la fonctionnalité des CSMs post-implantation, n'a jamais été démontrée.

PROBLÉMATIQUE

Les CSMs apparaissent comme des candidates idéales en ingénierie tissulaire. De plus en plus d'essais cliniques utilisent aujourd'hui cette source cellulaire dans l'objectif de réparer des tissus ou organes et de restaurer leur fonction (Martin-Rendon et al., 2008 ; Jeevanantham et al., 2012).

Cependant, une fois implantées *in vivo*, les CSMs meurent rapidement et massivement, réduisant considérablement le succès de cette approche thérapeutique. De nombreuses études ont démontré une mortalité des CSMs supérieure à 90% en moins de 10 jours après implantation au sein de nombreux tissus, par exemple en site sous-cutané (Logeart-Avramoglou et al., 2010 ; Giannoni et al., 2010), intracardiaque (Toma et al., 2009 ; Li et al., 2016) ou encore au sein de défauts osseux (Manassero et al., 2016).

Bien que cette mort massive soit multifactorielle, l'environnement ischémique (caractérisé, entre autre, par la déplétion en oxygène et en nutriments) auquel les cellules sont confrontées une fois implantées, semble en être la cause principale (Becquart et al., 2012). De récentes études menées au laboratoire, ainsi que par d'autres équipes, ont mis en évidence que le facteur limitant la survie cellulaire au sein de cet environnement avasculaire était de façon surprenante, non pas l'absence d'oxygène, mais l'absence de glucose (Deschepper et al., 2011 and 2013 ; Moya et al., 2018 ; Mylotte et al., 2008 ; Nuschke et al., 2016). L'apport de glucose permet en effet de maintenir la survie *in vitro* des CSMs pendant 21 jours en conditions quasi-anoxiques (0.1% pO₂) et pendant 14 jours après implantation en site ectopique chez la souris (Deschepper et al., 2013).

L'objectif de ce projet de doctorat est (i) de mieux comprendre le métabolisme énergétique emprunté par le glucose au sein des CSMs après implantation, puis (ii) de développer et d'évaluer une stratégie basée sur l'apport continu de glucose pour améliorer la survie et la fonctionnalité des CSMs post-implantation.

Dans un premier temps, nous avons étudié les voies métaboliques empruntées par le glucose chez les CSMs confrontées à un environnement semblable à celui post-implantation, puis évalué les réserves glycolytiques de ces cellules ainsi que leur consommation énergétique au sein de cet environnement ischémique. Au cours de ce projet de doctorat, j'ai participé aux expérimentations conduisant aux figures 1, 3, 4 et 6 de l'article 1, intitulé "Human mesenchymal stem cell failure to adapt to glucose shortage and rapidly use intracellular energy reserves through glycolysis explains poor cell survival after implantation".

[Durée du projet : 4 mois]

Dans un second temps, basé sur la conception préalable de l'hydrogel nutritif, nous avons évalué l'efficacité biologique de ce dispositif innovant sur la survie ainsi que sur les fonctions chimiotactiques et pro-angiogènes des CSMs, à la fois dans un modèle *in vitro* d'ischémie prolongée, puis après implantation *in vivo* au sein d'un modèle ectopique de souris. Ces données correspondent à l'ensemble de l'article 2, intitulé « Enzyme controlled, nutritive hydrogel for mesenchymal stem cell survival and regenerative functions ». [Durée du projet : 32 mois].

RÉSULTATS

ARTICLE 1

**HUMAN MESENCHYMAL STEM CELL FAILURE TO ADAPT TO
GLUCOSE SHORTAGE AND RAPIDLY USE INTRACELLULAR ENERGY
RESERVES THROUGH GLYCOLYSIS EXPLAINS POOR CELL SURVIVAL
AFTER IMPLANTATION**

INTRODUCTION

Une fois implantées *in vivo*, les CSMs meurent rapidement et massivement, réduisant considérablement leur potentiel thérapeutique. Comme mentionné dans le chapitre 3, le facteur limitant la survie cellulaire au sein de cet environnement avasculaire ischémique est, non pas l'absence d'oxygène, mais l'absence de glucose (Deschepper et al., 2011 and 2013 ; Moya et al., 2018 ; Mylotte et al., 2008 ; Nuschke et al., 2016).

Le microenvironnement *in vivo* (notamment la pO_2) auquel les CSMs sont confrontées après implantation est peu ou pas caractérisé. Au cours de cette étude, nous avons tout d'abord cherché à déterminer la pO_2 à laquelle les CSMs,ensemencées au sein d'un PIT (hydrogel), sont exposées après implantation en site sous-cutané chez la souris. Afin d'approcher au mieux cette réalité post-implantation, les marqueurs caractéristiques de l'hypoxie cellulaire (expression de la sous-unité HIF-1 α , expression de l'enzyme LDH-A, activité mitochondriale) ont été analysés chez des hCSMs exposées *in vitro* pendant 3 jours à des pO_2 hypoxiques plus ou moins sévères (0.1%, 1%, 5%), puis comparés à ces mêmes marqueurs d'hypoxie exprimés chez des hCSMs ayant été implantées en sous-cutané chez la souris pendant 3 jours.

Le glucose n'est qu'un des nutriments utilisables par les CSMs pour produire de l'énergie sous forme d'ATP (Liu et al., 2015 ; Tohyama et al., 2016). Nous nous sommes donc également interrogés sur la possible utilisation de voies métaboliques alternatives, notamment la glutaminolyse (catabolisme de la glutamine) et la sérinolyse (catabolisme de la sérine), par les CSMs lorsque celles-ci sont exposées à des conditions reflétant le microenvironnement post-implantation. Pour cela, nous avons évalué la survie des hCSMs maintenues pendant 14 jours en quasi-anoxie (0.1% pO_2) *in vitro* sans glucose et sans sérum, en présence de glutamine ou de sérine. Nous avons ensuite cherché à identifier la (ou les) voie(s) métabolique(s) principale(s) empruntée(s) par les hCSMs après implantation pour convertir le glucose en énergie. Ainsi, l'expression de gènes impliqués dans (i) la chaîne respiratoire, (ii) la voie des pentoses phosphates, (iii) la glycogénolyse et (iv) la glycolyse, a été évaluée chez des hCSMs ayant été maintenues pendant 3 jours en quasi-anoxie sans glucose et sans sérum. De plus, la survie *in vitro* des hCSMs maintenues dans cet environnement a été étudiée après l'inhibition respective de chaque voie métabolique mentionnée dans ce paragraphe.

Enfin, nous nous sommes interrogés sur la possible réduction du métabolisme du glucose au sein des CSMs après implantation. Pour cela, nous avons évalué les réserves énergétiques initiales des hCSMs (réserves de glucose, de glycogène et d'ATP intracellulaire), puis avons suivi la consommation de ces

réserves d'énergie une fois les hCSMs maintenues en conditions quasi-anoxiques sans glucose et sans sérum pendant 7 jours.

Laboratoire de Bioingénierie et Biomécanique Ostéo-articulaire UMR CNRS 7052 (B2OA), Université Denis-Diderot, Faculté de Médecine Lariboisière-Saint-Louis, Paris, France


Correspondence information: Hervé Petite; Laboratoire B2OA, 10 Avenue de Verdun, 75010 Paris, FRANCE; Phone: (+33)155278533; Fax: (+33)157278570; e-mail: herve.petite@univ-paris-diderot.fr Received July 26, 2017; accepted for publication December 04, 2017; available online without subscription through the open access option.

©AlphaMed Press

1066-5099/2017/\$30.00/0

This article has been accepted for publication and undergone full peer review but has not been through the copyediting, typesetting, pagination and proofreading process which may lead to differences between this version and the Version of Record. Please cite this article as doi: 10.1002/stem.2763

Human Mesenchymal Stem Cell Failure to Adapt to Glucose Shortage and Rapidly use Intracellular Energy Reserves through Glycolysis Explains Poor Cell Survival After Implantation

MOYA A.,  PAQUET J., DESCHEPPER M., LAROCLETTE N., OUDINA K., DENOEU D., BENSIDHOUM M., LOGEART-AVRAMOGLOU D., PETITE H.

Key words. Mesenchymal Stem Cells • Multipotent Stromal Cells • Metabolism • Hypoxia • Anoxia • Survival • Ischemia • Glycolysis • Bioenergetic • Glycolytic Reserves.

ABSTRACT

Mesenchymal stem cells (MSCs) hold considerable promise in tissue engineering (TE). Their poor survival when exogenously administered, however, limits their therapeutic potential. Previous studies from our group demonstrated that lack of glucose (but not of oxygen) is fatal to human MSCs because it serves as a pro-survival and pro-angiogenic molecule for hMSC upon transplantation. However, which energy-providing pathways MSCs use to metabolize glucose upon transplantation? Are there alternative energetic nutrients to replace glucose? And most importantly, do hMSCs possess significant intracellular glucose reserves for ensuring their survival upon transplantation? These remain open questions at the forefront of TE based-therapies. In the present study, we established for the first time that the *in vivo* environment experienced by hMSCs is best reflected by near-anoxia (0.1% O₂) rather than hypoxia (1% -5% O₂) *in vitro*. Under these near-anoxia conditions, hMSCs rely almost exclusively on glucose through anaerobic glycolysis for ATP production and are unable to use either exogenous glutamine, serine or pyruvate as energy substrates. Most importantly, hMSCs are unable to adapt their metabolism to the lack of exogenous glucose, possess a very limited internal stock of glucose and virtually no ATP reserves. This lack of downregulation of energy turnover as a function of exogenous glucose level results in a rapid depletion of hMSC energy reserves that explains their poor survival rate. These new insights prompt for the development of glucose-releasing scaffolds to overcome this roadblock plaguing the field of TE based-therapies. *STEM CELLS* 2017; 00:000-000

SIGNIFICANCE STATEMENT

Poor survival of grafted cells at the injury site is the major impediment for developing successful cell based therapies. In the present study, we demonstrated that hMSCs fail to survive in the ischemic environment that they face *in vivo*, because these cells are not capable to adapt their glucose consumption and do not possess the necessary glycolytic reserves to maintain their

metabolism for more than 3 days. As a result, upon exhaustion of available glucose these, cells die

rapidly and massively. These new insights prompt for the development of strategies aiming at providing extracellular glucose to overcome this major roadblock

INTRODUCTION

Mesenchymal stem cells (often referred to as multipotent stromal cells; MSCs) have elicited great interest in the field of tissue engineering (TE) and regenerative medicine due to their capability to (i) proliferate, (ii) secrete various growth factors and cytokines pertinent to new tissue formation, and (iii) differentiate into cells such as osteoblasts, chondrocytes and adipocytes [1–3]. Because of these remarkable properties, TE grafts using MSCs have become the “gold standard” for numerous medical investigations and pertinent applications around the world. Although it is still early to draw definitive conclusions, the results of preclinical animal studies are not as promising as hoped. In fact, in the context of regenerative medicine, exogenously administered MSCs loaded into material scaffolds exhibited poor survival in bone [4,5], cardiac [6,7] and kidney [8] applications.

A possible explanation for this limited cell survival is that, upon implantation, MSCs encounter a considerable bioenergetic challenge in a harsh ischemic microenvironment characterized by low oxygen tension and nutrient deprivation. In fact, MSCs must rely on energy not only to ensure their homeostasis (which entails non-spontaneous, energy-consuming processes including maintenance of concentration gradients of different ions, cytoskeletal dynamics, DNA repair, basal transcription and translation, protein turnover, and vesicle trafficking [9]), but also to “fuel” their regenerative function. Although a comprehensive accounting of the complete metabolic requirements of MSCs which trigger such responses has never been reported, it is reasonable to hypothesize that an imbalance between the cell energy demand and supply needed to maintain homeostasis and to enact the transcriptional and translational programs which promote effector functions leads to the death of MSCs into implanted TE constructs. It is, therefore, of paramount importance to determine the intracellular energy reserves human MSCs (hMSCs) can rely on upon implantation and to decipher the mechanisms by which these cells align their bioenergetic needs with available energy resources post implantation.

Oxygen and nutrients are both critically required for energy-related metabolic pathways in cells and have both the potential to significantly affect cell metabolism and survival. Until very recently, however, emphasis has been placed solely on the role of oxygen tension because it modulates several critical cellular processes (e.g., cell adhesion [10,11], metabolism, proliferation, and differentiation [12,13]). In addition, since passive diffusion of oxygen from blood capillaries is limited to 100–200 μm radius [14,15], a hypoxic or even near-anoxic microenvironment surrounding cell-containing

constructs of clinical relevant volume is established upon implantation.

To date, the mechanism by which MSCs uptake and utilize oxygen and nutrients under ischemic conditions remains poorly investigated and understood. Recent studies in sheep [16], mice [17] and humans [18] MSCs challenged the pivotal role of oxygen and established that MSCs adapt to near-anoxia conditions *in vitro* and increased their *in vivo* survival rate as long as they have a sufficient glucose supply [18]. The present study aims at further elucidating the mechanisms by which glucose and its end-products are used by hMSCs to fuel their metabolism upon transplantation. To this aim, we determined the oxygen tension that best reflected the milieu encountered by hMSCs post-implantation and then investigated whether alternative exogenous nutrients can be used to ensure hMSC survival, which energy-providing pathways are active, and how hMSCs allocate their energy-reserves in order to meet their bioenergetic demands. The present paper demonstrates, for the first time, that the 0.1% oxygen level best reflects the *in vivo* situation encountered by hMSCs located at the core of TE constructs. Under this condition, hMSCs have a very limited internal stock of glucose and virtually no ATP reserves. In fact, our data provide evidence of a scenario where implanted hMSCs consume their glycolytic reserves through glycolysis in less than 24 hours. Once these glycolytic reserves are exhausted, hMSCs cannot maintain their ATP content and are unable to meet their bioenergetic requirements; ultimately leading to an early and massive cell-death within 3 days post-implantation.

MATERIAL AND METHODS

Chemicals

The chemicals used in the present study and their respective supplier, were as follows: Alpha minimum essential medium (α MEM) without glucose from Dominique Dutscher (Brumath, France); Dulbecco's Minimum essential medium (DMEM), Super script II enzyme, TaqMan[®] primers and Trizol[®] from LifeTechnologies (Saint Aubin, France); Human RT2 Glucose Metabolism PCR Array and the RNeasy MiniKit from Qiagen (Venlo, Netherlands); 2-deoxyglucose (2DG), 3-methyl-adenine (3MA), 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT), Antimycin A (Ana), Citrate buffer, Deferoxamine (DFx), Dimethyl sulfoxide (DMSO), Fibrinogen, Glucose (glc), Glutamine (glut), Malonate (Malo), Propidium Iodide (PI), Pyruvate (pyr), Serine (ser), Sodium oxamate (NaOx) and Trypsin-EDTA from Sigma-Aldrich (St Quentin Fallavier, France); Antibiotics, Foetal Bovine Serum (FBS) and Trypsin (10X)

from PAA (Pasching, Austria); CellTiter-Glo[®] Luminescent cell assay from Promega (Charbonnières-les-Bains, France); Glycogen Assay Kit from Biovision (Mountain View, CA, USA); HIF-1 α Antibody from Novus Biological (Bio-Techne, Lille, France); β -actin Antibody from Abcam (Paris, France) and Thrombin from Baxter (Guyancourt, France).

Cells and cell culture

Bone marrow was obtained as discarded tissue during routine bone surgery from 5 adult donors with the respective patient consent according to Lariboisière hospital (Paris, France) regulations. hMSCs were then isolated and expanded in α MEM supplemented with 10 % FBS using a procedure adapted from literature reports [19]. Cells were characterized by fluorescence-activated cell sorting (FACS) analyses and differentiation assays. Briefly, these cells were positive for CD90, CD73 and CD105 and negative for CD45 markers. Their osteogenic, adipogenic and chondrogenic differentiation potentials were validated (data not shown). Cells from the 5 donors were then pooled at an equal ratio at passage 1, and cultured under standard cell culture conditions, that is, a humidified 37°C, 5% CO₂, 95% air environment. At 80-85% confluence, the cells were trypsinized using trypsin-EDTA and passaged. Cells from passage up to numbers 4 and 5 were used for the experiments.

Hypoxic conditions

Hypoxic conditions were achieved using a well-characterized, finely-controlled, proOx-C-chamber system (C-Chamber, C-374, Biospherix, USA). The oxygen concentration in this chamber was maintained at either 0.1, 1, 5 or 21% with the residual gas mixture composed of 5% CO₂ and balance nitrogen for the duration of the experiments.

For experiments under hypoxic conditions, the hMSCs were seeded at 12,000 cells/cm² in individual wells of 24-well cell-culture plate and further cultured in minimal medium (D-Glucose-, L-Glutamine-, Phenol Red- and Sodium Pyruvate-free DMEM) containing no serum unless stated otherwise. The culture media were supplemented with either glucose (5 g/L), glutamine (5 g/L), serine (5 g/L) or pyruvate (5 g/L) for assessing the effect of energy-related metabolites on hMSC survival. The culture media were supplemented with either Malo (10mM), Ana (5 μ M), NaOx (100mM), or 2DG (10 μ M) for assessing the role of glycolysis and TCA on hMSC survival. In order to ensure constant oxygen levels, the hMSC cultures were maintained undisturbed and without supernatant medium changes until the end of the respective experiments.

In vitro 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) assay

The MTT assay was based on the protocol reported for the first time by Mosmann 1983 [20]. Briefly, at the prescribed time points, hMSCs were treated with 0.8

mg/ml of MTT dissolved in serum-free α MEM medium for 4 h. Cells were then washed with PBS and incubated with DMSO under gentle shaking for 10 min. The respective light absorbance of the resulting solutions was read at 560 nm using a microplate spectrophotometer (Spectra max190-Molecular Devices). These results were expressed as the absorbance normalized to the total cell protein content: "abs/ protein (mg)".

Effects of oxygen tension on hypoxia inducible factor 1 α (HIF-1 α) bioactivity and expression

hMSCs were exposed to either 0.1, 1, 5 or 21% oxygen for 3 days. The positive control for HIF-1 α bioactivity was obtained by adding 500 μ M DFX to the supernatant medium of hMSCs cultured under the normoxic (*i.e.*, 21% oxygen) condition.

HIF-1 α bioactivity was evaluated by transfecting hMSCs with the reporter plasmid pGL3/5HRE.CMVmp-Luc which contained five copies of the hypoxia responsive element (HRE), a DNA binding sequence for HIF-1 α . In addition, antibodies against HIF-1 α (in a dilution of 1:750) and antibodies against β -actin (used as a loading control; in a dilution of 1:5000) were used for immunoblotting. Chemiluminescence. HIF-1 α bioactivity and immunoblotting signals were quantified using the IVIS Lumina Bioluminescent imaging system (Xenogen, Caliper Life Science, Tremblay-en-France, France). HIF-1 α bioactivity results are expressed as a bioluminescent signal (p/s), HIF-1 α expression results are expressed Chemiluminescence signal (p/s/cm²/sr).

Determination of hMSC viability

Evaluation of cell viability was performed at days 0, 1, 3, 7 and 14 of culture or implantation unless otherwise stated. Cells were recovered after trypsinization and cell viability was assessed using the PI (at a final concentration of 0.5 mg/ml) staining assay. Briefly, the fluorescent PI is incorporated into cells after loss of their cell membrane integrity. Data for the determination of cell viability were collected using the Attune[®] Cytometer (LifeTechnologies, France) and were analyzed using Attune[®] software.

Real-Time-Polymerase Chain Reaction analysis

mRNA of metabolic genes expressed by hMSCs under the conditions of interest to the present study was quantified using quantitative RT-PCR and the Human RT² Glucose Metabolism PCR Array (Qiagen). Briefly, hMSCs were exposed to either 0.1, 1, 5 or 21% oxygen in the presence of 5 g/L glucose for 3 days *in vitro*. At that time, the hMSCs were rinsed with PBS once, and their RNAs were extracted using Trizol[®], collected, and kept at -80°C until further analyses. The RNA samples were purified using the RNeasy MiniKit. Reverse transcriptase was performed using 1.5 μ g of purified RNA with the super script II enzyme. The cDNA from hMSCs

exposed to 0.1 and 21% oxygen were used for the Glucose Metabolism RT² Profiler PCR Array analysis following the manufacturer's instructions and using the MyiQ™ Single-Color Real-Time PCR Detection System (Biorad, Marnes-la-Coquette, France). LDH-A gene expression from hMSCs exposed to either 0.1, 1, 5 or 21% oxygen was quantified using quantitative RT-qPCR and specific TaqMan[®] primers following instructions described earlier in this section. These results are expressed using the $2^{-\Delta\Delta Ct}$ method, normalized to house-keeping genes and presented as a fold-change relative to the results obtained under 21% oxygen tension.

Determination of adenosine triphosphate (ATP) levels, intracellular glycolytic reserves, exogenous glucose contents, and glucose consumption

hMSCs were cultured in α MEM (0% FBS) supplemented or not with either 0.25, 0.5, 1 or 5 g/L of glucose in near-anoxia (0.1% O₂) for 7 days and analyses were performed at days 1, 3 and 7 of culture. At these time points, hMSCs were rinsed with phosphate buffer saline (PBS) once, detached using a scraper, collected in citrate buffer and stored at -20°C until further analysis. ATP contents of these hMSC cultures were quantified using the CellTiter-Glo[®] Luminescent cell assay according to manufacturer's instructions. Intracellular glycogen and glucose contents were measured using the Glycogen Assay Kit following the manufacturer's instructions. The results were reported as "glycolytic reserves per cell" (glucose and glycogen pg/cell). In parallel, supernatants from these cell-cultures were collected and stored at -80°C until further analyses. Exogenous glucose contents present in the media were monitored using a biomedical ARCHITECT C8000 (Abbott Diagnostic) robot. Data were presented as "exogenous glucose level" (mmol/well). Glucose consumption of these cell cultures were determined based on the exogenous glucose contents and the number of viable cells over the 7 days of exposure to near-anoxia. Results were reported as "glucose consumption" (pmol/day/cell).

3D hydrogels *in vitro* experiments

For assessment of hMSC viability, ATP content and glycolytic reserves in hydrogels, 10⁵ hMSCs were loaded first in 100 μ L fibrin hydrogels (fibrinogen at 18 mg/mL; Thrombin at 0.72 U/mL) and then placed in individual wells of 12 well cell-culture plate and further cultured in serum-free α MEM medium in the presence or absence of glucose (1 g/L) in near-anoxia *in vitro* for 7 days. At the prescribed time points (d0, d1, d3 and d7), the hydrogels were removed from the hypoxic chambers and cells were recovered for further analyses according to the method described in the paragraph "Enzymatic digestion of hydrogels".

Enzymatic digestion of hydrogels

The cells present in each construct were released from the fibrin hydrogels by digestion with 10 X Trypsin at 37°C for 15 min. The glycolytic reserves, ATP levels and cell viability were assessed following the protocol described in the paragraphs entitled "Determination of intracellular glycolytic reserves and adenosine triphosphate (ATP) levels" and "Determination of hMSC viability", respectively.

In vivo implantation

Ten-week-old male nude mice were obtained from JanvierLabs (Saint-Berthevin, France) and handled in accordance with the new European Directive 2010/63/EU regarding the protection of animals used for scientific purposes. All experimental animal procedures were approved by the Ethics Committee on Animal Research of Lariboisière/Villemin, Paris, France.

Preparation of hydrogel constructs:

For both the analyses of HIF-1 α and LDH-A expression and the assessment of the TCA activity (via the MTT assay) *in vivo*, 10⁶ hMSCs were loaded in 100 μ L fibrin hydrogels and implanted subcutaneously in nude mice as previously described [21]. For assessment of hMSC viability, ATP contents and glycolytic reserves *in vivo*, 2.10⁵ hMSCs were loaded in a "closed system" consisting in a fibrin hydrogel (200 μ L) placed in diffusion chambers (membrane filters with 0.45 μ m diameter pores; Millipore, France) as previously described in Moya *et al.*, 2017 [22]. The diffusion chambers were then implanted subcutaneously in mice. At days 1, 3 and 7 post-implantation, the diffusion chambers were explanted and cells were recovered for further analyses according to the method described in the paragraph "Enzymatic digestion of hydrogels".

Assessment of oxygen tension in hydrogel constructs *in vivo*

Oxygen tension in the hydrogel constructs, as well as the oxygen tension of the external environment were assessed *in vivo* using a Presense[®] Needle Type Microsensor (PreSens, Germany) prior implantation (day 0) and at day 1 and 3 post-implantation.

Immunohistochemistry of HIF-1 α and LDH-A

Prior to implantation (day 0) and at day 3 post-implantation, the hydrogel constructs were explanted and fixed in 4% paraformaldehyde (pH=7.4) for 36 h and then embedded in paraffin. A set of non-implanted hydrogel constructs were prepared in parallel at day 0 and processed similarly for histology. Immunodetection of HIF-1 α and LDH-A was performed according to a published method by Becquart *et al.*, 2012 [21].

In vivo MTT assay

Prior to implantation (day 0) and at day 3 post-implantation, 10 μ L of a solution containing 0.8 mg/ml

of MTT in α MEM was directly injected in the hydrogel constructs. After 2 hours, the hydrogel constructs were explanted, fixed in 4% paraformaldehyde (pH=7.4) for 36 h and then embedded in paraffin. Sections, each 5 μ m thin, were cut and analyzed using light microscopy.

Statistical analyses

Numerical data were expressed as the mean \pm standard deviation (SD) and were analyzed statistically using the GraphPad Prism Software v6.01 (GraphPad Software, Inc, California, USA). The quantitative kinetics data were analyzed using two-way analysis of variance followed by Bonferroni's post hoc test. The nonparametric Mann-Whitney U test was used to analyze data from two independent samples. For all analyses, differences at $p < 0.05$ were considered statistically significant.

RESULTS

hMSCs present in the core of the implanted hydrogel constructs exhibited an up-regulation of HIF-1 α and LDH-A and a down-regulation of the mitochondrial activity

The large range of oxygen tension used *in vitro* to culture hMSCs under hypoxic conditions epitomizes the difficulty in defining the one that best represents the *in vivo* ischemic milieu encountered by hMSCs loaded in hydrogel constructs post-implantation. To address this issue, oxygen tensions of the subcutaneous tissue and at the core of the hydrogel constructs were monitored prior implantation (at day 0) and post-implantation (at days 1 and 3). hMSCs located at the core of the hydrogel construct were exposed to oxygen tensions of $5.95 \pm 0.67\%$ prior implantation and of $0.13 \pm 0.06\%$ and $0.14 \pm 0.04\%$ at day 1 and 3 post-implantation, respectively (Fig. 1A). At the same time, the subcutaneous oxygen tension ranged from $3.30 \pm 0.08\%$ to $3.65 \pm 0.13\%$ (Fig. 1A).

To further characterize the milieu to which hMSCs are exposed post-implantation, the expression of HIF-1 α (hallmark of hypoxia) and of LDH-A (index of an anaerobic metabolism) as well as the mitochondrial activity were assessed either prior or at day 3 post-implantation. Expression of HIF-1 α and LDH-A were found to be up-regulated after implantation, especially when hMSCs were located at the core of the hydrogel constructs (Fig.1B-C). However, it is noteworthy that, even prior to implantation, expression of HIF-1 α in hMSCs located at the core of the hydrogel construct was higher than the one of cells located at the periphery (Fig1. Ba vs. Bc). This increase in HIF-1 α expression is likely the result of the steep gradient of oxygen present in the hydrogel constructs prior implantation, where hMSCs located at the periphery are exposed to higher (>15% O₂) oxygen tension; a situation not faced by implanted hMSCs where subcutaneous oxygen tension was inferior to 4% (Fig. 1A). Along the same lines, prior to implantation, the MTT staining of hMSCs was

identical whether cells were located at the core or at the periphery of the hydrogel constructs (Fig. 1Da-d). In contrast, after 3 days post-implantation, the MTT staining of hMSCs present in the core of the explanted hydrogel constructs (Fig. 1Ec-d), was strongly reduced in comparison to the one obtained at day 0 (Fig. 1Dc-d) and to the one of cells located in the outer part (Fig. 1Ea-b). These data indicate a decrease of the mitochondrial activity of hMSCs located at the core of the hydrogel constructs after 3 days of implantation.

These results provided evidence that hMSCs seeded in hydrogel constructs expressed the hallmarks of ischemia after 3 days of ectopic implantation in nude mice. In addition, hMSCs experienced different levels of hypoxia depending on whether they were located in the outer or in the inner part of the constructs; the hypoxic stress in the core of the constructs was the most impactful one.

The 0.1% oxygen tension condition *in vitro* best reflected the *in vivo* milieu experienced by implanted hMSCs

The oxygen tension milieu to which cells are exposed is not a definitive predictor of the energy-related metabolic pathways of cells. In fact, the balance between oxygen demand by cells and its availability is a better predictor for cell metabolism. In order to establish the oxygen tension that best reflects the *in vivo* cell metabolism in the core of the hydrogel constructs, hMSCs were exposed to four different oxygen tensions (*i.e.*, 0.1, 1, 5 and 21%) *in vitro*. At day 3 of culture, the expression and bioactivity of the hypoxic marker HIF-1 α , the lactate metabolism and mitochondrial activity were assessed (Fig. 2).

Firstly, the HIF-1 α expression assessed by western blotting (Fig. 2A) and the HIF-1 α bioactivity assessed by the HRE/Luc expression (Fig. 2B), were both affected by the level of oxygen under which the hMSCs were cultured. Exposure of hMSCs to 0.1% oxygen levels, resulted in a 8.9-, 8.7- and 36.5-fold increase in HIF-1 α expression and in a 3.1-, 18.7- and 32.2-fold increase in HIF-1 α bioactivity compared to those of cells maintained at 1, 5 and 21% oxygen, respectively (Fig. 2A and 2B). These data highlighted the specific effect of near-anoxia (0.1% O₂) on hMSCs.

Secondly, LDH-A mRNA expression was evaluated in hMSCs cultured either at 0.1, 1, 5 or 21 % oxygen. A significant ($p < 0.05$) increase of LDH-A mRNA expression was observed in hMSCs cultured at 0.1% oxygen (Fig. 2C) when compared to either 1, 5 or 21% oxygen. These data suggest that through activation of HIF-1 α , LDH-A expression was up-regulated and that anaerobic conversion of glucose into lactate appeared to be the preferred pathway for hMSCs under near-anoxia.

Thirdly, mitochondrial activity (determined using the MTT assay) was similar in hMSCs cultured at 1, 5 and 21% oxygen but significantly ($p < 0.05$) decreased when the hMSCs were cultured at 0.1% oxygen (Fig. 2D).

Overall, the results of these experiments provided evidence of an oxygen-dose effect on the hMSC response to oxygen tension: a 36.5-fold increase in HIF-1 α expression, a 32.2-fold induction HIF-1 α bioactivity, a drastic increase in LDH-A gene expression and, most importantly, a significant ($p < 0.05$) decrease in mitochondrial activity was observed when hMSCs were cultured at 0.1% oxygen. For these reasons, we conclude that 0.1% oxygen tension best reflected the *in vivo* milieu to which the hMSCs located at the core of the hydrogel constructs were exposed. The 0.1% oxygen condition *in vitro* was used throughout the rest of the study.

The presence of extracellular glucose is essential for hMSC long-term survival under near-anoxia *in vitro*

After establishing an *in vitro* model reflecting the *in vivo* milieu experienced by hMSCs post-implantation, the main cellular metabolism and its related pathways (summarized in Fig. 3A) used by hMSCs when cultured under near-anoxia (0.1% O₂) were investigated.

The potential benefits of exogenous glucose and other energy-related metabolites (specifically, glutamine, serine and pyruvate; all present in the α MEM media) were studied.

The amino acids glutamine and serine can be metabolized through glutaminolysis and serinolysis processes, respectively (Fig. 3A). The pyruvate plays a pivotal role in hMSC metabolism as both the end-product of glycolysis and substrate of either Acetyl-CoA or lactate (Fig. 3A). In the present study, we used a minimal medium supplemented with either glucose or one of the aforementioned energy-related metabolites. hMSCs, cultured either in the absence of nutrients or in the presence of glutamine or serine, exhibit similar survival rate with only less than 40% and 10% of hMSCs still viable after 3 and 7 days of exposure to near-anoxia, respectively (Fig. 3B). In contrast, in the presence of either glucose or pyruvate, more than 60% of hMSCs remained viable at day 7 (Fig. 3B). However, cell viability in the presence of pyruvate then drastically decreased at day 14 (7%) while, in the presence of glucose, the cell survival rate remained above 60% after 14 days of exposure to near-anoxia (Fig. 3B).

Taken together, these data demonstrate that glucose and, to a lesser extent, pyruvate appear to be the only exogenous metabolites used by hMSCs to sustain near-anoxia.

Glycolysis is the preferred energy-providing pathway used by hMSCs to ensure their survival in near anoxia

In human cells, glucose, can be obtained either from the extracellular milieu via glucose transporters from the GLUT family or from intracellular glycolytic reserves including glycogen. Glucose is then catabolized either (i) via glycolysis into two molecules of pyruvate generating

two molecules of ATP, or (ii) via the pentose phosphate pathway to generate NADP(H) and specialized products (Fig. 3A). Then, pyruvate is converted either into lactate by lactate dehydrogenase or into acetyl-CoA to enter into the TCA cycle to produce ATP solely in the presence of oxygen (Fig. 3A).

In the present study, the gene expression profiles of metabolic enzymes involved in either the TCA cycle, the pentose phosphate, the glycogenolysis or the glycolysis pathways in hMSCs cultured under near-anoxia for 3 days were assessed. A down-regulation of the gene expression of the enzymes involved in the TCA (Fig. 4A), the pentose phosphate (Fig. 4B) and the glycogenolysis (Fig. 4C) pathways was observed. In contrast, under the same conditions, the expression of the enzymes involved in the glycolysis pathway was up-regulated (Fig. 4D) indicating that glycolysis is the favourite pathway for energy supply when hMSCs are cultured in near-anoxia.

We next sought to confirm that the glycolysis but not the TCA pathway was involved in hMSC survival by blocking these energy-related metabolic pathways using specific inhibitors displayed in red in Figure 3A. To this aim, hMSCs were exposed to near-anoxia in the presence or absence of two TCA inhibitors, specifically either Malonate (Malo; a competitive inhibitor of the succinate which binds to the TCA enzyme succinate dehydrogenase) or Antimycin A (AnA; an indirect TCA inhibitor which block the electron transport chain, thus impeding ATP production) or of two glycolysis inhibitors, specifically either sodium-oxamate (NaOx; a structural analog of pyruvate which inhibits L(+)-lactate dehydrogenase) or 2-Deoxy-D-glucose (2DG; a competitive inhibitor for the production of glucose-6-phosphate from glucose at the phosphoglucosomerase level). In the presence of either Malo or AnA, the hMSC viability was similar to that observed in the minimal medium after 1, 3 and 7 days of culture (Fig. 4E). In contrast, the addition of either 2DG or NaOx induced a drastic decrease in cell viability; in fact, there were no more viable cells after 3 days of culture (Fig. 4E) suggesting a critical role of glycolysis for ensuring hMSCs survival in near-anoxia.

Cells need a constant supply of energy in the form of ATP to keep them alive. To further confirm that glycolysis is the main energy provider-pathway to hMSCs in near anoxia, the glycolysis pathway was blocked using 2DG in hMSCs previously cultured under near anoxia for 24 hours and the ATP content in cells was monitored over 3 hours. Addition of 2DG led to a complete depletion of ATP content within 5 min (Fig. 4F).

Taken together, these data provided strong evidence that hMSCs heavily rely on glycolysis as their predominant energy-related pathway to maintain their ATP content and to ensure their survival under near-anoxia.

Glucose availability does not dictate hMSC glucose consumption in near-anoxia

Since hMSCs heavily rely on glucose through glycolysis to fuel their metabolism under near-anoxia, we next investigated the potential regulation of hMSC glucose consumption by glucose availability. To this aim, we evaluated glucose consumption by hMSCs cultured in the presence of either 0.25, 0.5, 1 or 5 g/L of glucose for 7 days under near-anoxia. Under these conditions, glucose consumption by hMSCs cultured in either low (0.25 - 0.5 g/L) or high (5 g/L) glucose levels were not different throughout the duration of the near-anoxic episode despite a 10- to 20-fold increase in glucose availability (Fig. 5). In contrast, under a physiological glucose level (1 g/L), glucose consumption by the hMSCs was decreased (-50%) when compared to the other cell groups (0.25, 0.5 and 5 g/L glucose; Fig. 5). Taken together, these results suggest that glucose consumption by hMSCs is not regulated by glucose availability albeit the existence of an optimum at 1g/L.

hMSCs do not possess the necessary glycolytic reserves to survive without exogenous glucose under near-anoxia in *in vitro* and *in vivo* conditions

The bioenergetic self-sufficiency of hMSCs is a major concern for their use in TE because hMSCs may have access to a limited exogenous glucose supply upon implantation. To address this issue, we monitored the available exogenous glucose levels in 2D *in vitro* hMSC-cultures. In addition, we evaluated the glycolytic reserves (specifically, intracellular glucose and glycogen contents), and their effect on the ATP levels and cell viability of hMSCs either cultured *in vitro* (in 2D and 3D cultures) or implanted *in vivo* in nude mice.

For the 2D *in vitro* cultures, hMSCs were cultured either in the absence of glucose, or in a low (0.25 g/L) or physiological (1g/L) level of glucose under near anoxia conditions *in vitro*. In the case of hMSCs in the 1 g/L cell-group, only 15% of the available exogenous glucose was consumed throughout the 7-days of exposure to near-anoxia (Fig. 6A). A steady but slow decrease (-25% and -54% after 3-and 7-days of exposure, respectively) without complete exhaustion of the glycolytic reserves of hMSCs was observed (Fig. 6B) along with maintenance of sufficient ATP levels (-53% and -59% after 3- and 7-days, respectively; Fig. 6C) that permitted the hMSC survival in near-anoxia (Fig. 6D). In contrast, hMSCs exposed to low glucose (0.25 g/L) exhibited a rapid and extensive exhaustion of the available exogenous glucose (-48% at day 3 of culture; Fig. 6A) paralleled with exhaustion of their glycolytic reserves (-77% at day 3 of culture; Fig. 6B) and ATP levels (-49% at day 3; Fig.6C). Under this condition, the hMSCs failed to maintain a sufficient ATP level to ensure their survival under near-anoxia for 7 days (Fig. 6C-D). When cultured in the absence of glucose, hMSCs depleted their glycolytic reserves in less than 24 hours (Fig. 6B), their ATP

content within 3 days of culture (Fig. 6C), and massively died (-92%) within the first 3 days of exposure to near anoxia (Fig. 6D).

Similarly to what was observed with the 2D cultures, hMSCs loaded into fibrin hydrogels (3D culture) and cultured in the presence of glucose (1g/L), did not exhaust their glycolytic reserves (Fig. 7A), and maintained a low, but sufficient, ATP level (Fig. 7B). These energy related conditions allowed hMSCs to survive at survival rate of 77% under near-anoxia for 7 days (Fig. 7C). In contrast, in the absence of extracellular glucose, hMSCs loaded in fibrin hydrogels, rapidly consumed (-83%) their glycolytic reserves within the first 24 hours of culture (Fig. 7A), failed to maintain their ATP levels for more than 3 days of culture (Fig. 7B) and died massively (-91%) within the first 3 days of exposure to near-anoxia (Fig. 7C).

For the *in vivo* experiments, hMSCs were loaded in fibrin hydrogels and loaded into Millipore diffusion chambers (to avoid infiltration of host cells in hydrogel constructs), and subcutaneously implanted in nude mice for up to 7 days. In a trend similar to that observed in the *in vitro* data, a rapid decrease (-66%) of hMSC glycolytic reserves was observed during the first 24 hours post-implantation and paralleled a rapid decrease of the ATP content of these hMSCs: specifically, 40% of the ATP stock was lost within 24 hours, and 63% within 3 days; no more ATP was detected at day 7 post-implantation (Fig. 7E). As a result, the implanted hMSCs died massively (-94%) during the first 3 days of implantation (Fig. 7F).

Taken together, these data demonstrate that, as long as a glucose supply is available, hMSCs are able to survive in an oxygen-deprived environment (such as those the hMSCs encountered in our *in vitro*, near-anoxic models or *in vivo* when they were loaded in the diffusion chambers and implanted subcutaneously in nude mice) by maintaining their glycolytic reserves and ATP contents above a threshold value that ensures cell-survival. In the absence of a glucose supply, however, hMSCs experienced an almost immediate exhaustion of their glycolytic reserves and, consequently, depletion of intracellular ATP that ultimately caused their death.

DISCUSSION

Upon implantation, survival and maintenance of functional hMSCs in the 3D environment of TE constructs prior to their vascularization is the most important challenge for developing TE constructs of clinically-relevant volume for regenerative medicine applications. The traditional view maintains that the delay in the neovascularisation of TE constructs post-implantation results in insufficient oxygenation which causes ischemia within those implants and, consequently, leads to cell dysfunction including premature cell death. Our research group challenged this paradigm and established that severe oxygen depletion *per se* is not responsible for the massive hMSC death observed post-implantation. In

fact, hMSCs can withstand exposure to severe, continuous, near-anoxia (*i.e.*, 0.1% oxygen), provided that glucose is available for the duration of the experiments [18]. In the present study, we established that 0.1% oxygen best reflected the *in vivo* post-implantation milieu. Under this condition, and with the exception of glycolysis (which was the main bioenergetic pathway that promoted ATP resources), other energy-related pathways (including the TCA, the pentose phosphate, and the glycogenolysis pathways) were downregulated. Most importantly, we demonstrated for the first time that rapid exhaustion of intracellular energy reserves (specifically, glucose and glycogen) evidenced very low energy reserves within hMSCs and explained the poor hMSC survival observed in near anoxia *in vitro* and *in vivo* after subcutaneous implantation of hMSC-containing constructs in a mouse model.

Cell culture under 0.1% oxygen conditions best reflects the *in vivo* post implantation milieu

Mammalian tissues function in environments where oxygen tension ranges from 2% to 10% [23–25]; for instance, the oxygen tension in the MSC niche in the bone marrow ranges from 2–8% (for review, Mohyeldin *et al.*, 2010; Spencer *et al.*, 2014 [26,27]). Despite its critical role in the ability of hMSCs to support the energy-demanding processes of stem cell homeostasis, survival and ultimately functionality post-transplantation, the oxygen tension to which hMSCs loaded into TE constructs are exposed during the early post-implantation phase *in vivo* remains unknown. In the present study, we determined, for the first time, that hMSCs loaded in TE constructs of limited size (100 μ L – 4mm diameter) experienced oxygen tension of $0.13 \pm 0.06\%$ 24 hours post-implantation. This oxygen tension is lower than the one measured *in vivo* in soft-tissue ischemia in mice [28] and in human tumors [29] where it ranges from 0.3% to 4.2%. A possible explanation for this extremely low oxygen level is that blood supply is totally nonexistent within the hMSC-containing constructs during the immediate post-implantation phase. Whether these findings can be generalized to all types of cell-containing constructs await further measurements of oxygen levels in other TE constructs. On one hand, one must resist the temptation to draw broad conclusions regarding the oxygen tension encountered by hMSCs in the context of TE applications as oxygen delivery to a tissue construct is a function of diffusion, which in turn is controlled by material scaffold porosity and permeability (for review Karande *et al.*, 2004 [30]). On the other hand, the data of the present study are consistent with the 100–200 μ m range-limits for oxygen diffusion in mammalian tissues and it is the authors' belief that the oxygen tensions measured in the present study best reflect the *in vivo* situation experienced by hMSCs located at the core of TE cell-containing constructs with

dimensions bigger than the aforementioned diffusion range-limit of oxygen.

Because it is challenging to determine the accurate oxygen tension that a cell might experience *in vivo*, we attempted to further validate that the 0.1% oxygen tension best reflected the *in vivo* situation by assessing the expression of select hallmarks of hypoxia both *in vivo* in hMSCs dispersed within a fibrin gel and implanted ectopically in nude mice for 3 days and *in vitro* after exposure of hMSCs to oxygen tension ranging from 21% to 0.1%. After implantation, the hMSCs located at the core of the hydrogel constructs expressed the hypoxic markers HIF-1 α and LDH-A (Fig. 1C), and most importantly, exhibited a highly reduced mitochondrial activity (Fig. 1E). In the *in vitro* experiments, 0.1% oxygen was the only oxygen tension tested which both induced expression of hypoxic markers and massively downregulated the mitochondrial activity. These results indicated that the 0.1% oxygen tension best reflected the *in vivo* situation encountered by hMSCs located at the core of TE cell-containing constructs with dimensions bigger than the diffusion range-limit of oxygen.

Long-term hMSC survival depends on the use of glucose via glycolysis

Cells are capable of metabolizing various carbon substrates, including glucose, fatty acids, ketone bodies, and amino acids. In the present study, hMSCs exposed to long-term (14 days) near-anoxia (0.1% O₂) conditions survived only in the presence of exogenous glucose (but not of pyruvate, glutamine or serine); these results confirmed, and extended, previous studies which reported that the presence of glucose enhanced rat [31], sheep [16], and human MSC [18] viability when these cells were exposed to low (0.1 – 1%) oxygen tension. These results are also in line with the observations according to which hypoxia-preconditioning of hMSCs led to decreased glucose consumption, possibly promoting cell retention *in vivo*, since glucose remained available to the cells for longer period of time [32]. Most importantly, the present study provided evidence for the first time that glycolysis (but not pentose phosphate, TCA, and glycogenolysis) is the unique metabolic pathway involved in hMSC survival under near-anoxia (Fig. 4D-F). Interestingly, hMSCs exposed to near anoxia for 7 days of culture survived in the presence of pyruvate in a glucose-deprived milieu. In addition, inhibition of pyruvate conversion into lactate using Sodium Oxamate (NaOx; a L(+)-lactate dehydrogenase inhibitor) strongly reduced hMSC survival (-82%) when cultured under near anoxia in a glucose- and pyruvate-deprived milieu (Fig. 4E). A possible explanation for the beneficial role of pyruvate in hMSC survival is that, under near anoxia, pyruvate is used to produce cofactors, such as NAD(H), which catalyze ATP production through glycolysis [9]; this process is limited by the availability of cofactors such as NAD(H) [33]. By improving ATP production, pyruvate could temporarily enhance hMSC viability in the near-anoxia milieu. Nevertheless, definitive conclusions regarding

the roles of pyruvate, glutamine and serine await studies using a panel of specific inhibitors of these pathways in pertinent animal models.

In addition to glycolysis, autophagy can furnish ATP and energy-related substrate to the cells. Although it was out of the scope of the present study to explore in detail the role of autophagy in hMSCs, we observed that inhibition of autophagy had a deleterious impact on hMSC survival under near-anoxia independently of the presence of exogenous glucose (Supplementary information 1) confirming that maintenance of a high autophagic activity is crucial for hMSC survival under near anoxia [22].

hMSCs fail to adapt their glucose consumption to exogenous glucose availability and have virtually no internal energy reserves

The present study provided evidence that hMSCs failed to survive *in vitro* longer than 3 days of culture under conditions simulating the *in vivo* post-implantation milieu; these results corroborated previous studies by our research group [16,21] and by other researchers [34]. Since glucose availability to cells is limited after implantation of TE cell-containing constructs, we further investigated the causes of hMSC death by monitoring their energy resources, particularly the ATP content as well as the intracellular glucose and glycogen stocks using *in vitro* and *in vivo* models (Fig 5, Fig. 6B-C, Fig. 7B-C and Fig. 7D-E, respectively). *In vitro*, using the 2D cell culture models, we observed (i) that the hMSCs are unable to modulate glucose consumption in response to glucose availability (Fig.5) and (ii) that the successive exhaustion of glycolytic reserves and of the ATP content is responsible for the observed hMSC poor survival in near-anoxia (Fig. 6). In other words, because hMSC autonomy (in terms of energy-related metabolites) is limited in a glucose-deprived environment, an exogenous glucose supply is required to maintain hMSC viability under near anoxia over 3 days. When loaded in 3D hydrogel constructs, the hMSCs displayed similar behaviour than the one observed in the 2D cell culture models with a concomitant exhaustion of the glycolytic reserves (Fig. 7A) and ATP content (Fig. 7B) resulting in massive cell death (Fig. 7C). It is worth to mention that, the kinetics of exhaustion of glycolytic reserves in 2D and 3D cultures present a slight discrepancy albeit a similar overall pattern. In fact, in the absence of exogenous glucose, in 2D, a full exhaustion of glycolytic reserves is observed within a day (Figure 6B) whereas in 3D, glycolytic reserves are still present after one day, albeit massively reduced (-83%; Figure 7A). Nevertheless, these depletions of the glycolytic reserves resulted in a drastic loss of cell viability in both culture conditions at day 3 and day 7 (Figure 6D and 7C).

These *in vitro* results were corroborated by the *in vivo* studies which demonstrated similar decrease in cell viability (Fig. 7F) and ATP content (Fig 7E) within 3 days post-implantation. In addition, a three-fold decrease of

glycogen and glucose stocks per hydrogel constructs was observed *in vivo* within the first day of implantation (Fig. 7F); these energy stocks were not sufficient to ensure cell viability at day 3 and 7. The critical role of glycolysis in hMSC survival was further substantiated by the facts that the addition of 2DG inside the hydrogel construct led to massive cell death (Supplementary information 2); and that supplementation of hydrogel constructs with glucose increased hMSCs survival post-implantation in an ectopic nude mice model (Descheppe *et al.*, 2013 [18]).

A possible explanation for the incomplete exhaustion of glucose and glycogen stocks in the hydrogels implanted *in vivo* is that passive diffusion of glucose from the surrounding tissues may have occurred. Further studies are required to definitively establish this explanation.

Limitations of the present study

A limitation of the *in vitro* models and as well as of the *in vivo* closed system used in the present study is that they exclude the impact of the *in vivo* inflammatory response of the anatomical site and extends of the tissue injury on hMSC survival. Nevertheless, because hMSCs died within 3 days in the closed system (which does not stimulate the cellular aspects of the immune response), it is tempting to speculate a prime role of the rapid depletion for energy reserves in the observed massive cell death post-implantation.

Perspectives for tissue engineering strategies

The findings of the present study have implications for the design of future protocols of preconditioning hMSCs to enhance their *in vivo* survival [35,36]. In fact, the new information regarding the metabolic adaptation of hMSCs under near-anoxia conditions may be exploited in developing delivery systems to slowly release exogenous nutrients (glucose should be the primary choice) to transplanted hMSCs. It is becoming increasingly clear that, when metabolic perturbations are excessively severe or of protracted duration (such as the conditions encountered by hMSCs post-implantation), metabolic checkpoints may initiate either apoptotic or necrotic cell death pathways [37]. Improved understanding of the metabolic checkpoints involved in hMSC survival/death post-implantation may facilitate development of novel pharmacological approaches that selectively either block or stimulate cell death by inducing specific metabolic changes. The results of the present study provide evidence that the metabolic checkpoints involved in monitoring ATP levels might be relevant targets for novel tissue engineering strategies.

CONCLUSIONS

In the present study, we determined, for the first time, that the 0.1% oxygen culture condition best reflected the *in vivo* situation encountered by hMSCs located at

the core of TE hydrogel constructs with dimensions bigger than 200 μm (the diffusion range limit of oxygen). This new scientific information has practical implications because cell energy metabolism is modulated by the oxygen tension (specifically, the TCA pathway is drastically down-regulated in 0.1% but not at 1% O_2 environments) and has been implicated in cell fate decision (for review, see Green and Llambi, 2015 [38]). Most importantly, the present study established that cell energy was produced via glycolysis only and that, under near-anoxia (0.1% O_2) conditions, the cellular energy reserves were exhausted resulting in hMSC death within the first three days post-implantation. In this respect, development of strategies aiming at providing extracellular glucose supplies is an attractive, but yet untapped, alternative to enhance both hMSC viability and functions pertinent to neo-tissue formation.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank Professor R. Bizios and E. Potier for valuable comments regarding this manuscript. We also

acknowledge the financial support from ANR VASTEM, VITABONE and ANR IPSOAT.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

M.A.: Conception and design, collection and assembly of data, data analysis and interpretation, manuscript writing; P.J.: Conception and design, collection and assembly of data, data analysis and interpretation, manuscript writing (Co-first author); D.M.: Conception and design, data analysis and interpretation; L.N.: Provision of study material; O.K.: Provision of study material; D.C.: Provision of study material; B.M.: Provision of study material; L.-A.D.: Data analysis and interpretation; P.H.: Conception and design, data analysis and interpretation, financial support, manuscript writing, final approval of manuscript

DISCLOSURE OF POTENTIAL CONFLICTS OF INTEREST

The authors state no potential conflicts of interest.

REFERENCES

- 1 Caplan A. Mesenchymal stem cells. *J Orthop Res* 1991;9:641–650.
- 2 Owen M, Friedenstein AJ. Stromal stem cells: marrow-derived osteogenic precursors. *Ciba Found Symp* 1988;136:42–60.
- 3 Friedman MS, Long MW, Hankenson KD. Osteogenic differentiation of human mesenchymal stem cells is regulated by bone morphogenetic protein-6. *J Cell Biochem* 2006;98:338–354.
- 4 Logeart-avramoglou D, Ph D, Oudina K, et al. In Vitro and In Vivo Bioluminescent Quantification of Viable Stem Cells in Engineered Constructs 2009;15.
- 5 Manassero M, Paquet J, Descheppe M, et al. Comparison of Survival and Osteogenic Ability of Human Mesenchymal Stem Cells in Orthotopic and Ectopic Sites in Mice. *Tissue Eng Part A* 2016;22:534–544.
- 6 Terrovitis J V., Smith RR, Marbán E. Assessment and optimization of cell engraftment after transplantation into the heart. *Circ Res* 2010;106:479–494.
- 7 Haider HK, Ashraf M. Strategies to promote donor cell survival: Combining preconditioning approach with stem cell transplantation. *J Mol Cell Cardiol* 2008;43:354–366.
- 8 Tögel F, Yang Y, Zhang P, et al. Bioluminescence imaging to monitor the in vivo distribution of administered mesenchymal stem cells in acute kidney injury. *Am J Physiol Renal Physiol* 2008;295:F313–21.
- 9 Lunt SY, Vander Heiden MG. Aerobic Glycolysis: Meeting the Metabolic Requirements of Cell Proliferation. *Annu Rev Cell Dev Biol* 2011;27:441–464.
- 10 Lash GE, Fitzpatrick TE, Graham CH. Effect of hypoxia on cellular adhesion to vitronectin and fibronectin. *Biochem Biophys Res Commun* 2001;287:622–629.
- 11 Grayson WL, Zhao F, Izadpanah R, et al. Effects of Hypoxia on Human Mesenchymal Stem Cell Expansion and Plasticity in 3D Constructs 2006;339:331–339.
- 12 Potier E, Ferreira E, Andriamanalijaona R, et al. Hypoxia affects mesenchymal stromal cell osteogenic differentiation and angiogenic factor expression. *Bone* 2007;40:1078–1087.
- 13 Fehrer C, Brunauer R, Laschober GT, et al. Reduced oxygen tension attenuates differentiation capacity of human mesenchymal stem cells and prolongs their lifespan. *Aging Cell* 2007;6:745–757.
- 14 Thomson RH, Gray LH. The histological structure of some human lung cancers and the possible implications for radiotherapy. *Br J Cancer* 1955;9:339–349.
- 15 Carmeliet P. Mechanisms of angiogenesis and arteriogenesis. *Nat Med* 2000;6:389–395.
- 16 Descheppe M, Oudina K, David B, et al. Survival and function of mesenchymal stem cells (MSCs) depend on glucose to overcome exposure to long-term, severe and continuous hypoxia. *J Cell Mol Med* 2011;15:1505–1514.
- 17 De Meester C, Timmermans AD, Baiteau M, et al. Role of AMP-activated protein kinase in regulating hypoxic survival and proliferation of mesenchymal stem cells. *Cardiovasc Res* 2014;101:20–29.
- 18 Descheppe M, Manassero M, Oudina K, et al. Proangiogenic and pro-survival functions of glucose in human mesenchymal stem cells upon transplantation. *Stem Cells* 2013;31:326–335.
- 19 Gnecci M, Melo LG. Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stem Cells: Isolation, Expansion, Characterization, Viral Transduction, and Production of Conditioned Medium. *Stem Cells Regen Med Methods Protoc* 2009;482:281–294.
- 20 Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods* 1983;65:55–63.
- 21 Becquart P, Cambon-Binder a, Monfolet LE, et al. Ischemia Is the Prime but Not the Only Cause of Human Multipotent Stromal Cell Death in Tissue-Engineered Constructs In Vivo. *Tissue Eng Part A* 2012;18:2084–2094.
- 22 Moys A, Larochette N, Paquet J, et al. Quiescence Preconditioned Human Multipotent Stromal Cells Adopt a Metabolic Profile Favorable for Enhanced Survival under Ischemia. *Stem Cells* 2017;35:181–196.
- 23 Okazaki K, Maltepe E. Oxygen, epigenetics and stem cell fate. *Regen Med* 2006;1:71–83.
- 24 Brahimi-Horn MC, Chiche J, Pouyssegur J. Hypoxia and cancer. *J Mol Med* 2007;83:1301–1307.
- 25 Brahimi-Horn MC, Pouyssegur J. Oxygen, a source of life and stress. *FEBS Lett* 2007;581:3582–3591.
- 26 Mohyeldin A, Garzón-Muñiz T, Quiñones-Hinojosa A. Oxygen in stem cell biology: A critical component of the stem cell niche. *Cell Stem Cell* 2010;7:150–161.
- 27 Spencer JA, Ferraro F, Roussakis E, et al. Direct measurement of local oxygen concentration in the bone marrow of live animals. *Nature* 2014;508:269–273.
- 28 Ceradini DJ, Kulkarni AR, Callaghan MJ, et al. Progenitor cell trafficking is regulated by hypoxic gradients through HIF-1 induction of SDF-1. *Nat Med* 2004;10:858–864.
- 29 McKeown SR. Defining normoxia, physoxia and hypoxia in tumours-implications for treatment response. *Br J Radiol* 2014;87:20130676.

30 Karande TS, Ong JL, Agrawal CM. Diffusion in musculoskeletal tissue engineering scaffolds: design issues related to porosity, permeability, architecture, and nutrient mixing. *Ann Biomed Eng* 2004;32:1728-1743.

31 Mylotte L a, Duffy AM, Murphy M, et al. Metabolic flexibility permits mesenchymal stem cell survival in an ischemic environment. *Stem Cells* 2008;26:1325-1336.

32 Beegle J, Lakatos K, Kalomoiris S, et al. Hypoxic preconditioning of mesenchymal stromal cells induces metabolic changes,

enhances survival, and promotes cell retention in vivo. *Stem Cells* 2013;33:1818-1828.

33 Maldonado EN, Lemasters JJ. ATP/ADP ratio, the missed connection between mitochondria and the Warburg effect. *Mitochondrion* 2014;78-84.

34 Muschler GF, Nakamoto C, Griffith LG. Engineering Principles of Clinical Cell-Based Tissue Engineering. *J Bone Jt Surg* 2004;86-A:1541-1558.

35 Estrada JC, Albo C, Benguria a, et al. Culture of human mesenchymal stem cells at

low oxygen tension improves growth and genetic stability by activating glycolysis. *Cell Death Differ* 2012;19:743-753.

36 Rosová I, Dao M, Capocciá B, et al. Hypoxic preconditioning results in increased motility and improved therapeutic potential of human mesenchymal stem cells. *Stem Cells* 2008;26:2173-2182.

37 Green DR, Galluzzi L, Kroemer G. Metabolic control of cell death. *Science (80-)* 2014;345:1250256-1250256.

38 Green DR, Liambi F. Cell Death Signaling. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2013;7.



See www.StemCells.com for supporting information available online. STEM CELLS; 00:000-000

Figure 1. hMSCs experience a hypoxic milieu post-implantation. (A) Oxygen tension measurements of the subcutaneous environment and at the core of the hydrogel constructs (4 mm diameter) either prior (day 0) or after (day 1 and 3) implantation in nude mice ($n=3$). Anti-HIF-1 α and anti-LDH-A immunostaining of paraffin sections of constructs seeded with 10^6 cells either (B) prior (at day 0) or (C) after (day 3) subcutaneous implantation and excision in nude mice. The stained cells were visualized both in the outer (a-b) and in the inner area (c-d) of the constructs. MTT staining of paraffin sections of constructs seeded with 10^6 cells either (D) prior (at day 0) or (E) after (day 3) subcutaneous implantation and excision in nude mice. The MTT solution was locally injected within the construct 2 hours before the sacrifice of mice and construct excision. Representative of $n=3$. Black scale bar = 200 μ m. Red scale bar = 200 μ m.

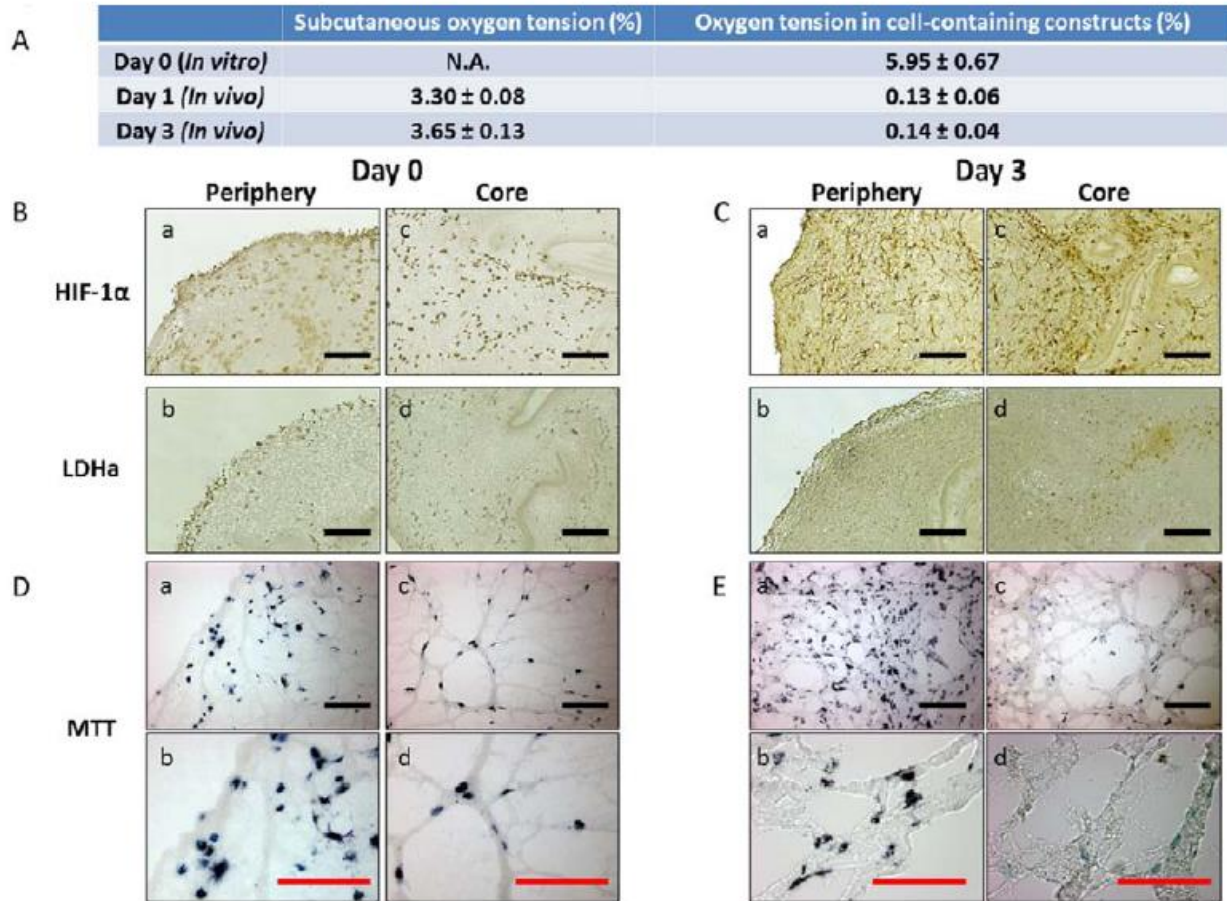


Figure 2. The 0.1% oxygen tension in cell culture conditions best reflects the hypoxic post-implantation milieu experienced by hMSCs *in vivo*. (A) Quantification of the HIF-1 α expression relative to the β -actin expression as a function of oxygen tension using western blot analysis ($n=3$). (B) HIF-1 α bioactivity assessed by monitoring HRE/Luc expression in hMSCs as a function of oxygen tension ($n=3$). (C) Expression of LDH-A in hMSCs cultured under either 0.1, 1, 5 or 21% of oxygen for 3 days; gene expression was normalized first to that of the respective 18S (internal standard), and then to results obtained when the hMSCs were cultured under 21% oxygen. (D) MTT activity of hMSCs exposed to either 0.1, 1, 5, or 21% oxygen for 3 days ($n=3$). Results are expressed as means \pm S.D.; * $p < 0.05$ versus the 0.1% oxygen tension cell group (Mann-Whitney test).

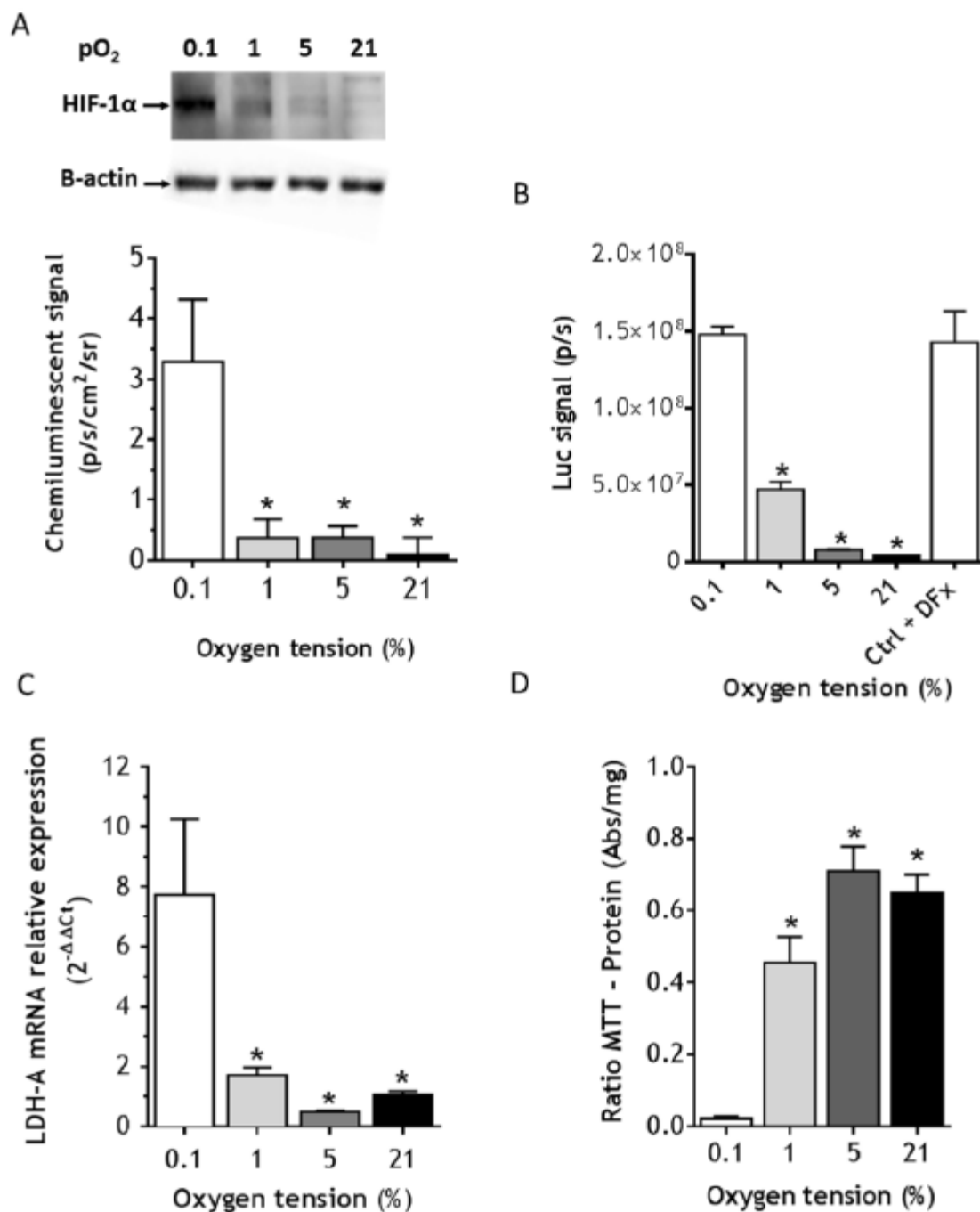


Figure 3. Extracellular glucose is necessary to ensure long-term survival of hMSCs exposed to near-anoxia. (A) Schematic overview of the energy-related pathways (in blue) in cells along with pertinent inhibitors tested in the present study (in red; 2-DeoxyGlucose (2DG), Sodium Oxamate (NaOx), Antimycin A (AnA), Malonate (Malo)). (B) Viability of hMSCs cultured under near-anoxia (0.1% O₂) in a minimal medium supplemented or not with either glutamine (glut), serine (ser), pyruvate (pyr) or glucose (glc) at a final concentration of 5 g/L for up to 14 days (*n*=3). Results are expressed as means ± S.D. * *p*≤0.05 versus the Minimal Medium cell group (Two-way ANOVA followed by Bonferro-ni's post hoc test).

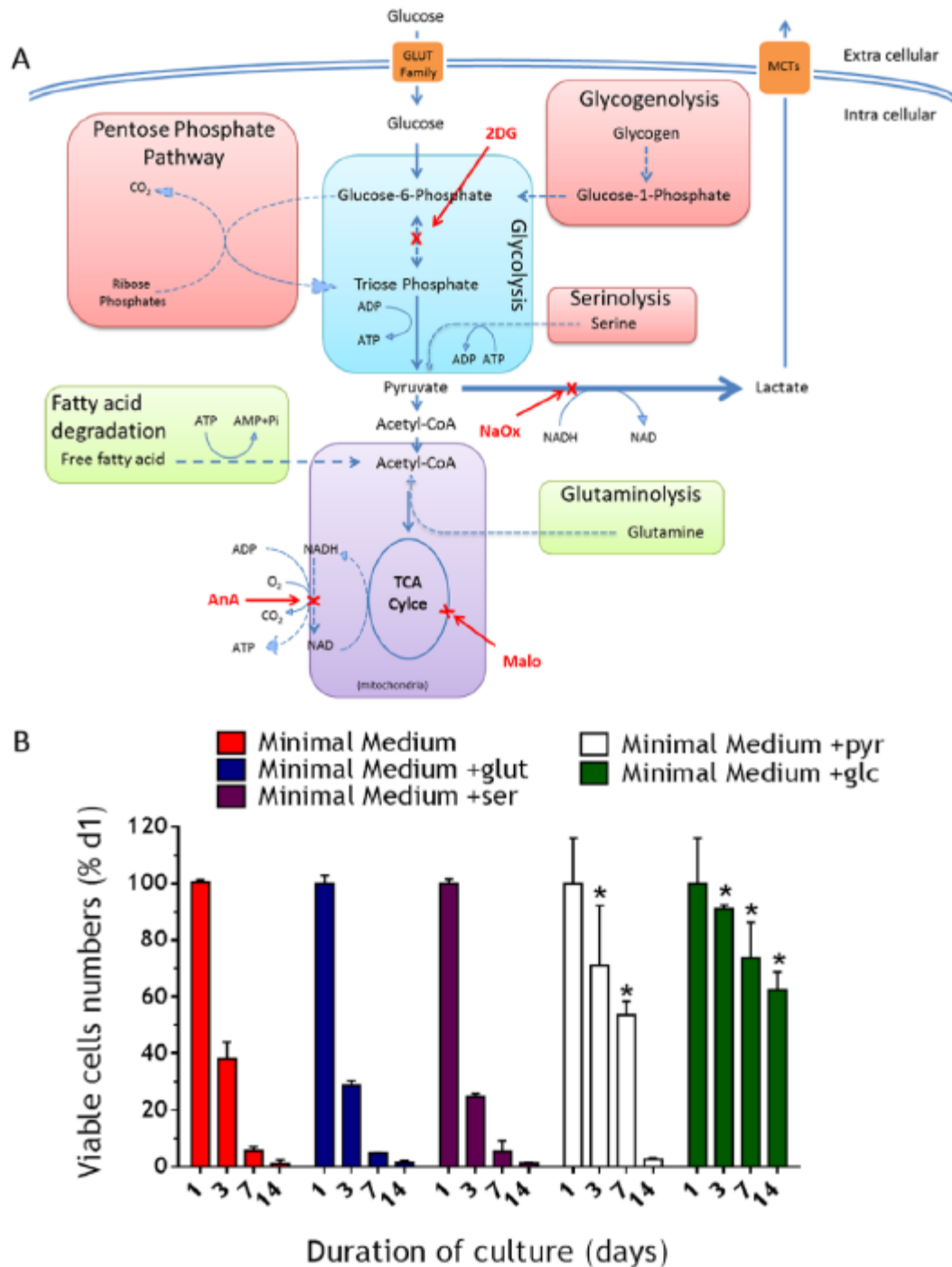
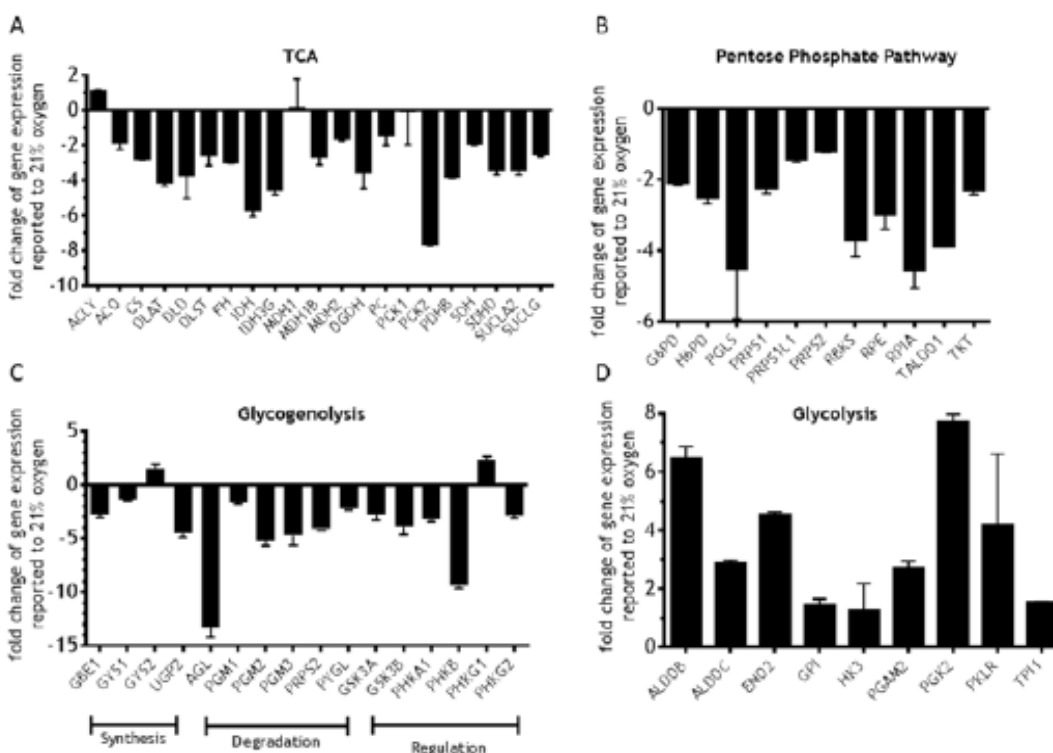


Figure 4. Glycolysis is the preferred energy-providing pathway used by hMSCs to maintain their ATP content and ensure their survival under near-anoxia

Tricarboxylic acid cycle (A), Pentose phosphate (B), Glycogen metabolism (C) and Glycolysis (D) pathway-related gene expressions of hMSCs cultured under near anoxia (0.1% O₂) for 3 days. Gene expression was normalized with respect to expression of the house-keeping genes expression of Beta-2-Microglobulin (B2M), Ribosomal Protein L13a (RPL13A) and Beta-actin (ACTB). Expression levels are presented in the 2^(-ΔΔCT) format relative to those obtained when the hMSCs were maintained under 21% oxygen tension. Values are presented as means ± S.D. from 3 independent experiments. (E) Viability of hMSCs cultured under near-anoxia in a minimal medium (0% FBS, 0 g/L glucose) in the absence or presence of either two TCA inhibitors (Malonate (Malo) or Antimycin A (AnA)) or of two glycolysis inhibitors (Sodium Oxamate (NaOx) or 2-DeoxyGlucose (2DG)) for up to 14 days. Results are expressed as means ± S.D. (n= 6) * p<0.05 versus the Minimal Medium cell group for each time point (Two-way ANOVA followed by Bonferroni's post hoc test). (F) Time course of ATP content in hMSCs per well previously cultured in a minimal medium under near-anoxia for 24 hours and then exposed to 2DG for up to 3 hours. Results are expressed as means ± S.D. (n=3); § p<0.05 versus the near anoxia cell group (Two-way ANOVA followed by Bonferroni's post hoc test).

ATP Citrate Lyase (ACLY), Aconitase (ACO), Citrate Synthase (CS), dihydrolipoamide S-acetyltransferase (DLAT), Dihydrolipoamide Dehydrogenase (DLD), Dihydrolipoamide S-Succinyltransferase (DLST), Fumarate Hydratase (FH), Isocitrate dehydrogenase (IDH, soluble IDH3G), Malate dehydrogenase (MDH2, soluble MDH1, MDH1B), Oxoglutarate (alpha-ketoglutarate) dehydrogenase (OGDH), Pyruvate Carboxylase (PC), Phosphoenolpyruvate Carboxykinase1 and 2 (PCK1, PCK2). Pyruvate dehydrogenase-B (PDHB), succinate dehydrogenase complex D (SDH, SDHD), succinate-CoA ligase A2, -G (SUCLA2, SUCLG). Glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PD), Hexose-6-phosphate dehydrogenase (H6PD), 6-phosphogluconolactonase (PGLS), Phosphoribosyl pyrophosphate synthetase 1, 1-like 1 and 2 (PRPS1; PRPS1L1, PRPS2), Ribokinase (RBKS), Ribulose-5-phosphate -3-epimerase and isomerase A (RBE, RPIA), Transaldolase 1 (TALDO1), Transketolase (TKT) Glucan (1,4-alpha-) branching enzyme 1 (GBE1), Glycogen synthase1 and 2 (muscle GYS1 and liver GSY2), UDP-glucose pyrophosphorylase 2 (UGP2), Amylo-alpha-1, 6-glucosidase, 4-alpha-glucanotransferase (AGL), Phosphoglucomutase 1, 2 and 3 (PGM1, PGM2, PGM3), Phosphorylase, glycogen liver (PYGL), Glycogen synthase kinase 3 alpha and beta (GSK3A, GSK3B), Phosphorylase kinase alpha, beta, gamma 1 and 2 (muscle PHKA, PHKB, muscle PHKG1, testis PHKG2) Aldolase-B and -C (ALDOB, ALDOC), Enolase 2 (ENO2), Glucose-6-Phosphate Isomerase (GPI), Hexokinase 3 (HK3), Phosphoglycerate mutase 2 (muscle PGAM2), Phosphoglycerate kinase 2 (PGK2), Pyruvate kinase, liver and RBC (PKLR), Triosephosphate isomerase 1 (TPI1).



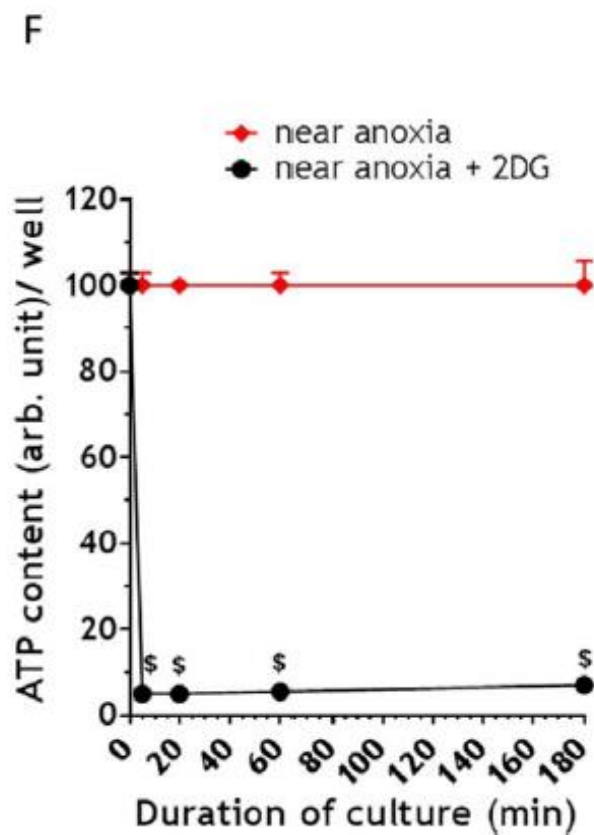
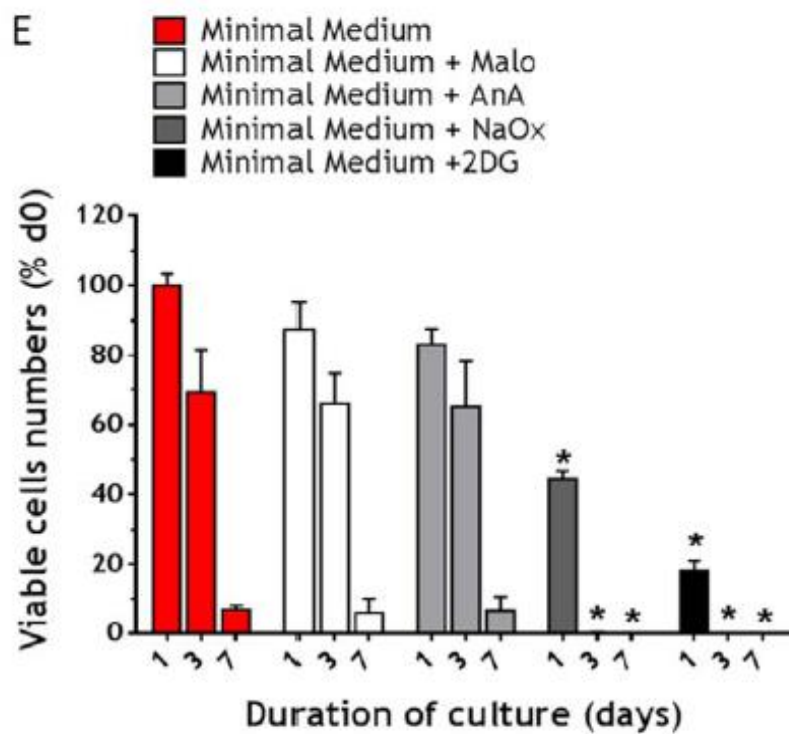


Figure 5. Glucose availability does not impact hMSC glucose consumption in near anoxia. Evaluation of glucose consumption by hMSCs cultured in α MEM (0% FBS) supplemented with either 0.25, 0.5, 1 or 5g/L glucose in near-anoxia (0.1% O₂) for 7 days. Results are expressed as "pmol / day / cell" in means \pm S.D. ($n=3$); * $p \leq 0.05$ versus the 1 g/L cell group (one-way ANOVA followed by Bonferroni's post hoc test).

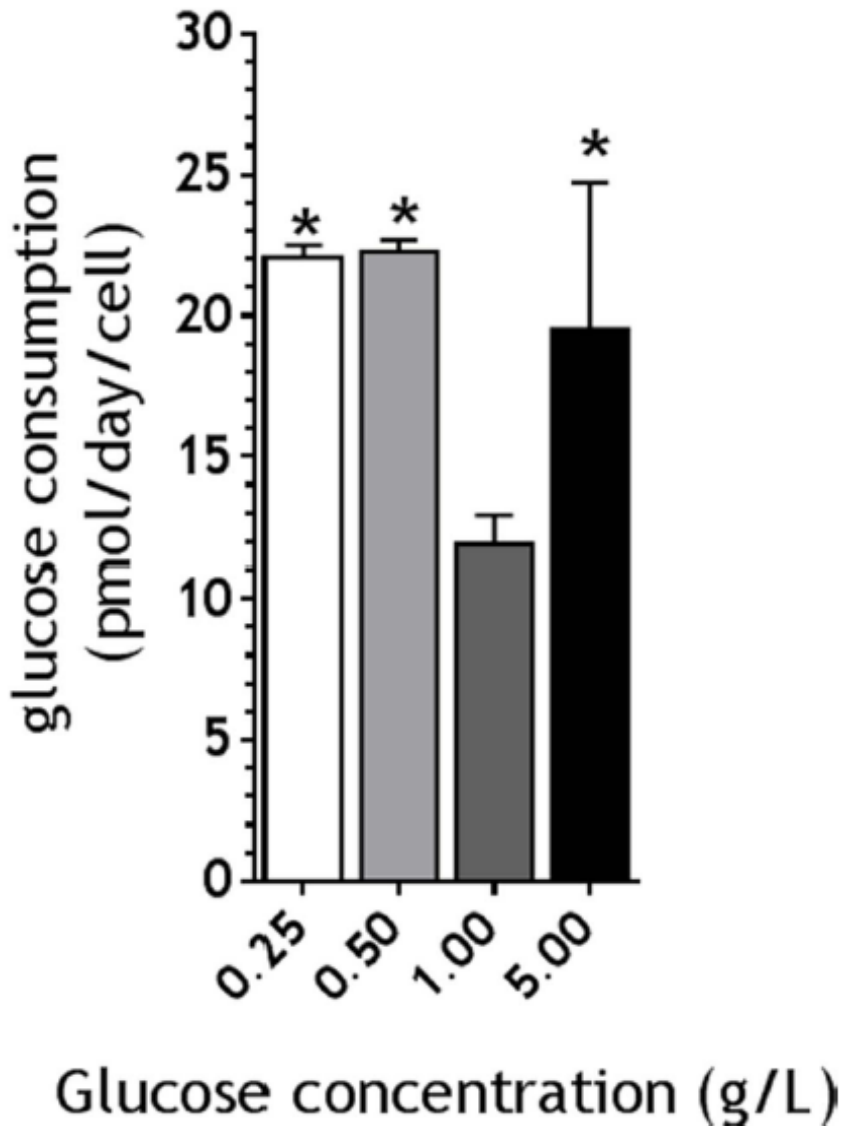


Figure 6. The glycolytic reserves of hMSCs are insufficient to maintain cell viability under near anoxia *in vitro*. Time-courses of (A) exogenous glucose levels in the supernatant media, (B) glycolytic reserves (including both intracellular glycogen and glucose contents) per cell, (C) ATP content per cell and (D) cell viability (expressed as a percentage of the viable cell number obtained at day 0) in hMSCs cultured in α MEM (0% FBS) supplemented or not with either 0.25 or 1 g/L of glucose in near-anoxia (0.1% O₂) for 7 days. Results are expressed as means \pm S.D. ($n=3$); * $p \leq 0.05$ versus the near anoxia cell group; \$ $p \leq 0.05$ versus the near anoxia + glc (1 g/L) cell group (Two-way ANOVA followed by Bonferroni's post hoc test).

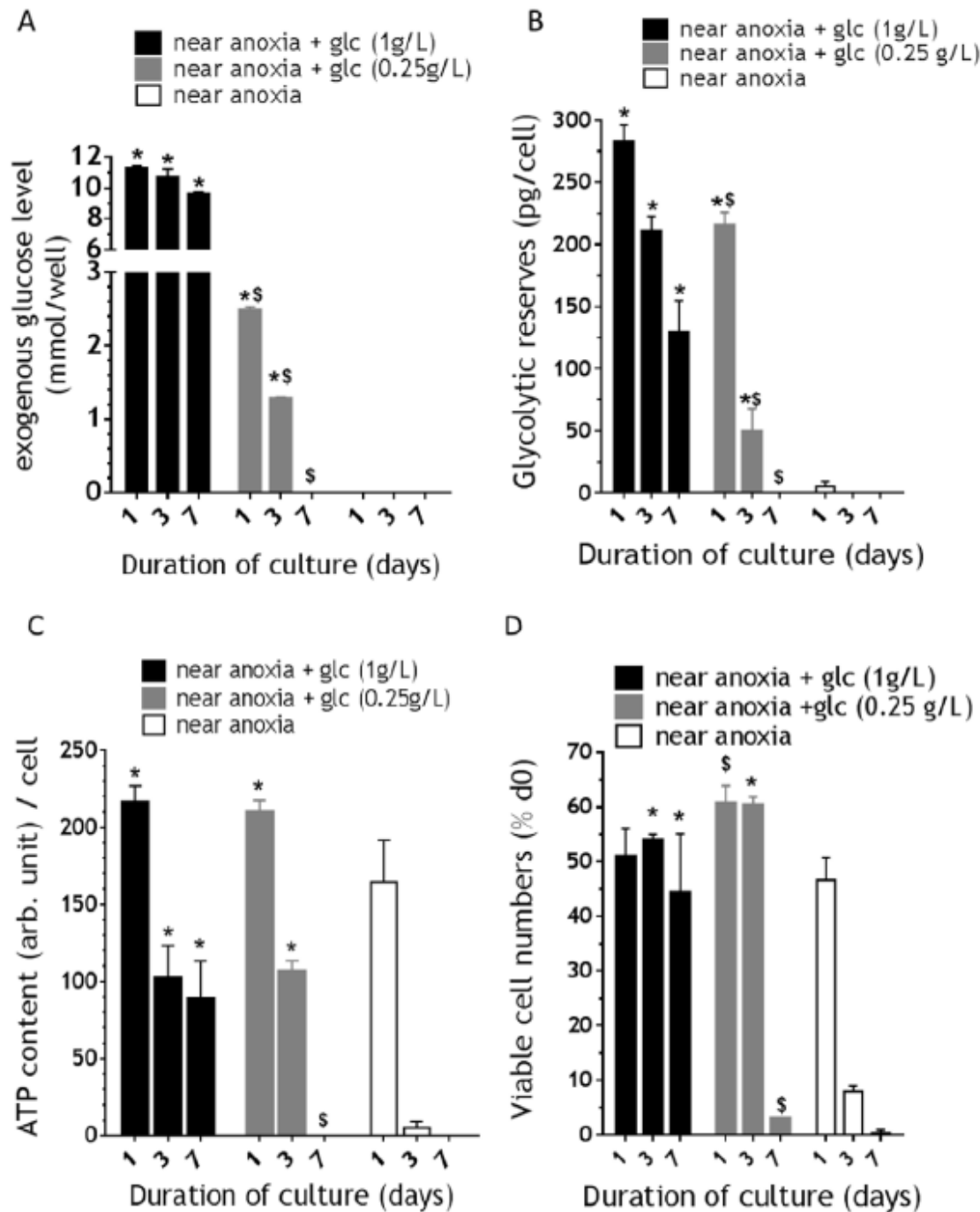
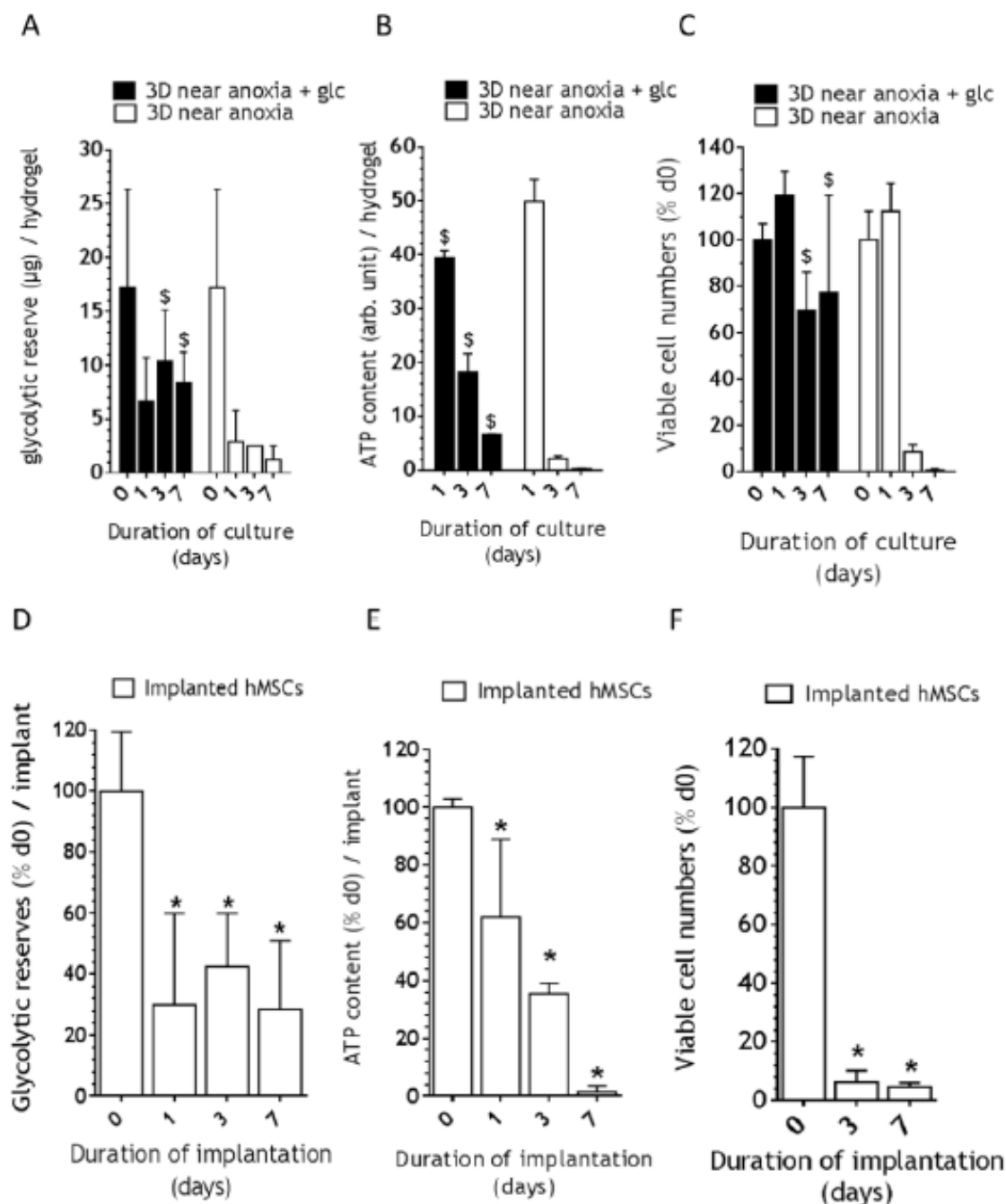


Figure 7. Quick exhaustion of hMSCs energy reserves when loaded within hydrogels explains their rapid death post-implantation. Time-courses of (A) glycolytic reserves, (B) ATP content per hydrogel, and (C) cell viability (expressed as a percentage of the viable cell number obtained in the hydrogel at day 0) of hMSCs loaded within fibrin hydrogels (10^{13} cells in 100 μ l hydrogels) and cultured in α MEM (0% FBS) supplemented or not with 1g/L of glucose in near-anoxia (0.1% O_2) for 7 days. Results are expressed as means \pm S.D. ($n=3$); $\$ p \leq 0.05$ versus the near anoxia cell group (Two-way ANOVA followed by Bonferroni's post hoc test). Time-courses of (D) glycolytic reserves per implant, (E) ATP content per implant, and (F) cell viability (expressed as a percentage of the viable cell number present in the hydrogel at day 0) of hMSCs loaded within fibrin hydrogel ($2 \cdot 10^{13}$ cells in 200 μ l hydrogel) in diffusion chambers and subcutaneously implanted in nude mice for up to 7 days. Results are expressed as means \pm S.D. ($n=3$); $* p \leq 0.05$ versus implanted hMSCs d0 (Mann-Whitney).



CONCLUSION

Dans cette étude, nous avons tout d'abord démontré qu'une pO_2 de 0.1%, encore appelée quasi-anoxie, était la plus représentative du microenvironnement *in vivo* perçu par les hCSMs par rapport aux pO_2 hypoxiques égales à 1% et 5%.

De plus, le glucose semble être le nutriment exclusivement utilisé par les hCSMs pour produire leur énergie sous forme d'ATP en condition quasi-anoxique. Les voies métaboliques alternatives de la glutaminolyse et de la sérinolyse ne sont pas empruntées par les hCSMs dans ces conditions. En effet, en quasi-anoxie, l'ajout de 5g/L de glucose maintient un taux de survie des hCSMs supérieur à 70% après 7 jours et à 60% après 14 jours. Au contraire, les hCSMs maintenues en quasi-anoxie avec 5g/L de glutamine ou de sérine montrent une mortalité supérieure à 90% dès 7 jours. De plus, les hCSMs utilisent exclusivement la glycolyse pour maintenir leur survie en condition quasi-anoxique. En effet, lorsque les hCSMs sont maintenues pendant 3 jours dans ces conditions, l'ensemble des gènes spécifiques de la glycolyse est surexprimé, tandis que la majorité des gènes spécifiques de la chaîne respiratoire, de la voie des pentoses phosphates et de la glycogénolyse sont, quant à eux, sous-régulés. De plus, en condition quasi-anoxique, l'inhibition de la glycolyse par le 2-DeoxyGlucose (2DG) entraîne une mort cellulaire massive et rapide (80% de mortalité cellulaire après 1 jour), confirmant le rôle clé du glucose dans la survie des hCSMs.

Enfin, les CSMs ne semblent pas capables de réduire leur métabolisme énergétique après implantation. En effet, dans ces conditions ischémiques, les hCSMs vident rapidement leurs réserves glycolytiques (stock initialement très limité) en 24 heures, puis leurs réserves d'ATP en 72 heures, corroborant avec la mort cellulaire massive observée dès 3 jours au sein de cet environnement hostile.

L'ensemble de ces éléments renforce le rôle central du glucose dans la stratégie de maintien de la survie et de la fonctionnalité des CSMs après-implantation.

ARTICLE 2

**ENZYME-CONTROLLED, NUTRITIVE HYDROGEL FOR MESENCHYMAL
STEM CELL SURVIVAL AND REGENERATIVE FUNCTIONS**

INTRODUCTION

Comme mentionné dans le chapitre 3 du présent manuscrit ainsi que dans l'étude précédente, l'apport de glucose apparaît comme un facteur clé pour la conception et le développement de stratégies de maintien de la survie des CSMs après implantation (Deschepper et al., 2011 and 2013 ; Moya et al., 2018 ; Mylotte et al., 2008 ; Nuschke et al., 2016).

Cependant, le glucose est une molécule de petite taille (180 g/mol), non chargée et n'ayant pas d'affinité spécifique pour aucun polymère ou matrice. Autrement dit, chargée à l'intérieur d'une matrice, cette molécule est rapidement diffusible. De plus, un stockage important de glucose risque d'entraîner une augmentation de la pression osmotique incompatible avec la survie des CSMs ou pourrait induire une glucotoxicité (pour une concentration supérieure à 10 g/L) (Sharifi et al., 2009). Ainsi, stocker et délivrer continuellement du glucose aux cellules dans une gamme de concentration tolérable, afin de maintenir leur survie après implantation, est un défi d'intérêt majeur.

Pour répondre à ce problème, nous avons développé, en collaboration avec l'Equipe de Recherche sur les Relations Matrice Extracellulaire-Cellule (ERRMECE, Université Cergy-Pontoise), un système de délivrance contrôlée de glucose par réaction enzymatique. Ce système se compose d'un polymère de glucose (amidon) et d'une enzyme (AMG), tous deux encapsulés au sein d'un hydrogel de fibrine. L'AMG hydrolyse spécifiquement les liaisons glucosiques $\alpha(1-4)$ de l'amidon, produisant ainsi du glucose. Ce système est qualifié d'hydrogel nutritif.

Nous avons, dans un premier temps, évalué la quantité de glucose produite à l'intérieur des hydrogels nutritifs (sans cellule) en fonction de la concentration d'amidon et d'AMG. En plus de s'assurer que la réaction enzymatique amidon/AMG libère du glucose au sein de ces hydrogels, cette première étude nous a permis de déterminer une concentration d'amidon et d'AMG produisant du glucose à une concentration située dans les gammes physiologiques.

Les hydrogels ont ensuite étéensemencés par des hCSMs. La survie cellulaire au sein de ces hydrogels nutritifs a été évaluée, tout d'abord *in vitro* en conditions quasi-anoxiques (0.1% pO₂) sans glucose et sans sérum pendant 14 jours, puis *in vivo* après implantation dans un modèle ectopique (sous-cutané) de souris pendant cette même durée. Afin d'élargir l'intérêt de ce système à d'autres domaines de l'ingénierie tissulaire, la survie *in vitro* de ADSCs ainsi que de myoblastes maintenus à l'intérieur des hydrogels nutritifs a été étudiée en conditions quasi-anoxiques pendant 14 jours.

En ingénierie tissulaire, les CSMs sont principalement utilisées pour leur effet paracrin, contribuant notamment à la migration des cellules de l'hôte vers le tissu lésé (propriétés chimiotactiques)

ainsi qu'à la formation de nouveaux vaisseaux sanguins, essentiels au transport d'oxygène et de nutriments (propriétés pro-angiogènes). Nous avons ainsi évalué, *in vitro*, les propriétés chimiotactiques et pro-angiogènes des hCSMs maintenues au sein des hydrogels nutritifs en conditions quasi-anoxiques sans sérum et sans glucose pendant 14 jours. De plus, la capacité du sécrétome des hCSMs à induire la formation de nouveaux vaisseaux sanguins au sein d'un microenvironnement initialement avasculaire a été également évaluée *in vivo*.

LETTER FOR EDITORS

Dear Editorial Board Members,

Enclosed, please find the manuscript "*Enzyme-controlled, nutritive hydrogel for mesenchymal stem cell survival and regenerative functions*", by Cyprien Denoëud et al., which is submitted for your consideration towards publication in Nature Materials. All co-authors have reviewed and agree with the contents of the manuscript. We disclose that, the novel enzyme-controlled, nutritive hydrogels used in the present project, was patented globally (EP14306700; 2014). We certify that the manuscript describes original research and is not under review at any other publication.

During the last decade, use of human mesenchymal stem cells (hMSCs) has emerged as a potential new treatment for several pathological conditions. The massive hMSC death in the post-implantation, avascular microenvironment that is depleted of oxygen and nutrients, however, is a major roadblock to successful regenerative medicine outcomes. Several authors proposed use of oxygen-delivery scaffolds to address this issue. Such studies reported improved cell viability for up to 3 days post-implantation, without enhancement of new blood vessel formation (Cook et al, 2015; Lee et al, 2015).

The present manuscript challenged the current paradigm which assigns a pivotal role to oxygen for ensuring cell survival post-implantation. The research project is based on previous studies by our team which demonstrated that exogenous glucose (and not oxygen) is key to hMSC survival (Deschepper et al., 2011 and 2013; Moya et al., 2018). We now developed, for the first time, an enzyme-controlled nutritive hydrogel with an inbuilt system of glucose delivery. This novel nutritive hydrogel, which contains fibrin, a polymer of glucose (starch), and amyloglucosidase (AMG; an enzyme that releases glucose from starch), successfully provided physiological levels of glucose to fuel hMSCs via glycolysis. hMSCs loaded in these starch/AMG hydrogels exhibited improved cell viability and select paracrine functions for up to 14 days under near-anoxia conditions (0.1% oxygen tension). Most importantly, these nutritive hydrogels enhanced hMSC paracrine functions, especially formation of new blood vessels, when implanted ectopically in an avascular mouse model.

We believe that our findings are of interest to the readers of Nature Materials because they provide, for the first time, a direct *in vitro* and *in vivo* demonstration that an enzyme-controlled nutritive hydrogel system produces glucose at physiological levels to fuel hMSCs, improving their survival and regenerative functions for at least 14 days. The evidence provided by the present research project establishes an entirely new approach for the development of a niche that allows hMSC to resist peri-transplantation graft cell death, an extremely important requirement for new tissue formation.

We hope that the Editorial Board will agree with us, the authors, regarding the present interesting and important study.

Sincerely yours,

Hervé PETITE on behalf of the authors.

Corresponding author: Hervé PETITE at Laboratoire de Bioingénierie et Bioimagerie ostéo-articulaire UMR CNRS 7052, INSERM 1271 (B3OA), Université Paris Diderot, Faculté de médecine Lariboisière-Saint-Louis, Paris, France, herve.petite@univ-paris-diderot.fr, phone number: +33157278538, fax number: +33582246789.

ENZYME-CONTROLLED, NUTRITIVE HYDROGEL FOR MESENCHYMAL STEM CELL SURVIVAL AND REGENERATIVE FUNCTIONS

Denoeud Cyprien¹, Luo Guotian¹, Paquet Joseph¹, Moya Adrien¹, Diallo Ahmad¹, Marinesco Stéphane², Meiller Anne², Becquart Pierre¹, Moussi Hilel¹, Pauthe Emmanuel³, Potier Esther¹, Petite Hervé¹

¹Laboratory of Osteo-Articular Bioengineering and Bioimaging, University of Paris Diderot, Paris, France

²Neuroscience Research Center, AniRA-NeuroChem Platform, University of Lyon 1, Lyon, France

³Biomaterial for Health Group, ERRMECe, University of Cergy-Pontoise, France

ABSTRACT

Mesenchymal stem cells (MSCs) are appealing candidates for regenerative medicine applications. Upon implantation, however, cells encounter an avascular microenvironment depleted of oxygen and nutrients that is responsible for their massive death post-transplantation, a major roadblock to successful clinical therapies. To date, various approaches, including development of oxygen-delivery scaffolds, have been proposed by scientists many authors have proposed oxygen-delivery scaffolds to address this issue. We hereby propose a shift of paradigm for enhancing human MSC (hMSC) survival by designing, developing and testing for the first time an enzyme-controlled, nutritive hydrogel with an inbuilt system of glucose delivery. This novel hydrogel, made of both fibrin, starch (a polymer of glucose), and amyloglucosidase (AMG, an enzyme that releases glucose from starch), provides physiological levels of glucose to fuel MSCs via glycolysis. hMSCs loaded in the novel starch/AMG hydrogels exhibit improved cell viability, and paracrine functions for up to 14 days under near-anoxia conditions. Most importantly, in addition to enhanced MSC viability, these nutritive hydrogels promoted paracrine functions when implanted ectopically in an avascular model.

Keys-words: Tissue engineering, Mesenchymal stem cells, Ischemia, Glucose, Hydrogel, Starch, Amyloglucosidase, Cell survival, Cell paracrine functions.

INTRODUCTION

While there is tremendous excitement regarding the use of mesenchymal stem cell (MSC) therapies for the repair/regeneration of cardiovascular (Martin-Rendon et al., 2008) and osteoarticular (Bruder et al., 1994; 1999; Petite et al., 2000; Yan et al., 2007) tissues, it is essential to temper hype with reality. In fact, the initial “proof of concept” of these therapies has not yet been translated into routine clinical practices. A significant roadblock to these therapies is the occurrence of massive MSC death post-implantation (Logeart-Avramoglou et al., 2010; Giannoni et al., 2010; McGinley et al., 2013). Indeed, the lack of functional vascularization in implanted engineered constructs expose grafted MSCs to the rigors of an ischemic milieu, a prime cause responsible for the observed massive cell death post-implantation (Becquart et al., 2012). Progress from just using combinations of cells and materials to truly integrated and functional tissue constructs requires robust strategies to develop “niches” for MSCs that are supportive of post-implantation survival cell and their functions pertinent to new tissue formation.

Whereas material scaffolds have been optimized to allow cell attachment, to deliver bioactive chemical compounds, and to expose MSCs to specific mechanical and biological stimuli, these scaffolds rely, at best, on their internal architecture to enable diffusion of vital oxygen and nutrients and, thus, provide energy to the cells. This situation is inadequate when considering that (i) cells crucially require extracellular nutrients to fuel their metabolism and provide regenerative responses and that (ii) cells are often implanted in an ischemic environment devoid of oxygen and nutrients.

In an attempt to overcome these issues, we proposed to engineer material scaffolds with an inbuilt system of nutrient supply. Rational engineering of such scaffolds requires thorough understanding of the specific metabolic needs of MSCs exposed to ischemic conditions. To this aim, our research team (Deschepper et al., 2011 and 2013; Moya et al., 2018) and others (Vordermark et al., 2005; Szegezdi et al., 2008; Zhu et al., 2014) explored the respective roles of the two major insults (specifically, glucose deprivation and continuous near-anoxia) associated with ischemia on hMSC viability and functions and demonstrated that hMSCs exposed to severe, continuous near-anoxia, but without glucose shortage, remained viable and maintained both their *in vitro* proliferative ability and, most importantly, their functions pertinent to tissue repair *in vivo*. These findings challenged traditional views according to which lack of oxygen *per se* is responsible for the massive death of MSCs observed upon implantation and provided evidence that these cells can withstand exposure to near-anoxia provided that a glucose supply is available. Taken together, these findings underscore the importance of glucose supply to ensure MSC survival post-implantation and justify development of material scaffolds with an inbuilt system for glucose delivery.

Storing and delivering glucose to the grafted MSCs is a challenge because this water-soluble molecule, at high concentrations, can disturb the osmotic pressure and cause cell lysis. To resolve this matter, and taking inspiration from nature, we have hereby developed an enzyme-controlled-glucose-delivery hydrogel that contains starch, the energy storage polysaccharide in plants, in order to store large amounts of glucose while reducing the associated osmotic pressure. In the present novel system, the starch (which is osmotically inactive) enzymatically delivers glucose molecules by means of embedded amyloglucosidase (AMG). The present study demonstrates for the first time that starch/AMG hydrogels can produce and deliver glucose for *in situ* “fueling” MSCs and, thus, improving their survival and paracrine functions both *in vitro* in near-anoxia conditions and *in vivo* post-implantation.

MATERIALS AND METHODS

CELLS AND CELL CULTURE

Culture of Human Mesenchymal Stem Cells (hMSCs)

hMSCs were isolated from bone marrow obtained as discarded tissue during routine surgery from four adult donors at the Lariboisiere Hospital, Paris, France. The tissues of interest to the present study were collected with the respective patient’s informed consent and in agreement with Lariboisiere Hospital regulations. hMSCs were isolated from each donor’s bone marrow using a procedure adapted from a literature report (Gnecchi *et al.*, 2009), characterized by CD marker expression and differentiation potential, and cultured in Alpha Minimum Essential Medium (α -MEM; PAN Biotech GmbH, Aidenbach, Germany) supplemented with 10% Fetal Bovine Serum (FBS; PAA Laboratories GmbH, Les Mureaux, France) and 1% antibiotic/antimycotic (atb/atm; v/v, PAA Laboratories GmbH, Cörbe, Germany) under standard cell culture conditions, that is, a humidified, 37°C, 5% CO₂, and 95% air environment. When 80-90% confluence was reached, the hMSCs were trypsinized using trypsin-EDTA (Sigma-Aldrich, St Quentin Fallavier, France), and replated at a density of 10,000 cells/cm². hMSCs from the four donors were pooled at an equal ratio at passage 1 and were further expanded up to passage 4 before use in experiments.

Transduction of hMSCs

For the *in vivo* study of hMSC survival, the pooled hMSCs (at passage 2) were transduced with a lentiviral vector encoding for the firefly luciferase and the ZSGreen proteins (pRRLsin-MND-Luc-IRES2-ZS Green-WPRE ; TRANSBIOMED, Bordeaux, France) as previously described (Becquart *et al.*, 2012) and further expanded. Flow cytometry analysis of ZSGreen-positive cells provided evidence that 88% of the

hMSCs were transduced (data not shown). These cells will be referred to as “Luc-ZS Green-hMSCs” thereafter in this paper.

Culture of Human Umbilical Vein Endothelial Cells (HUVECs)

HUVECs (Lonza, Walkersville, USA) were cultured in Endothelial Cell Growth Medium (EBM-2; Lonza, Levallois-Perret, France) supplemented with 5% FBS and 1% ATB/ATM, under standard cell culture conditions. When 80-90% confluence was reached, the HUVECs were trypsinized and replated at a density of 15,000 cells/cm². Cells at passage 4 were used for the *in vitro* experiments.

HYDROGELS

Preparation of wheat starch solutions

Wheat-derived starch solutions were prepared at either 0.2, 1, 2, or 4% (w/v) concentrations in the 10 mM HEPES buffer (pH 7.4), and mixed with another buffer containing 3 M NaCl, 0.4 M CaCl₂ (pH 7.4) (all compounds from Sigma-Aldrich, Lyon, France). The wheat starch powder was completely dissolved by stirring and heating up the solutions at 92°C for 2 hours.

Preparation of cellularized hydrogels

Three types of cellularized hydrogels were prepared: (i) “Glc-free”: glucose-free reservoirs that represents a negative/empty control hydrogel; (ii) “Glc 5.5 mM”: glucose reservoirs loaded with 5.5 mM glucose that represents a standard control hydrogel; and (iii) “Starch/AMG”: fibrin hydrogels loaded with starch and amyloglucosidase (AMG; Sigma-Aldrich, Lyon, France). All types of hydrogel were prepared by mixing 2 solutions (Mix 1 and Mix 2) as described in Table 1. The hMSCs were loaded within the Mix 1 that contained fibrinogen (Merck Chemicals, Fontenay-sous-Bois, France), HEPES buffer and aprotinin (Sigma-Aldrich). Depending of the type of hydrogel prepared, the Mix 2 contained either thrombin (Sigma-Aldrich) and HEPES for the Glc-free hydrogels, or thrombin, HEPES and glucose for the Glc 5.5 mM hydrogels, or thrombin, starch and AMG for the Starch/AMG hydrogels. 100µl hydrogels were loaded with 10⁵ hMSCs for the *in vitro* experiments, while 200µl hydrogels were loaded with 2x10⁵ Luc-ZS Green-hMSCs for the *in vivo* assessment of hMSC survival and 125 µl hydrogels were loaded with 1.25x 10⁵ hMSCs for the *in vivo* assessment of the proangiogenic potential of the hMSC secretome.

100 μ L Hydrogels ^(a)						
Composition	Mix	Glc free	Glc 5.5 mM	Starch	Starch/AMG	Final Concentration
Fibrinogen (50 mg/mL)	1	36 μ L	36 μ L	36 μ L	36 μ L	18 mg/mL
HEPES (10 mM)	1	5 μ L	5 μ L	5 μ L	5 μ L	0.5 mM
Aprotinin (3000 U/mL)	1	3.7 μ L	3.7 μ L	3.7 μ L	3.7 μ L	500 U/mL
hMSCs number	1	10 ⁵ ^(b)	10 ⁵ ^(b)	10 ⁵ ^(b)	10 ⁵ ^(b)	10 ⁶ cells/mL ^(b)
Thrombin (500 U/mL)	2	3.6 μ L	3.6 μ L	3.6 μ L	3.6 μ L	18.6 U/mL
HEPES (10 mM)	2	46.7 μ L		1.7 μ L	NA	5.1 mM
NaCl (3 M) CaCl₂ (0.4 M)	2	5 μ L	5 μ L	NA	NA	NaCl (0.15 M) CaCl₂ (0.02 M)
Glc (2,750 mM)	2	NA		NA	NA	
Wheat Starch (0.2, 1, 2 or 4% (w/v))	2	NA	NA	50 μ L	50 μ L	0.1, 0.5, 1 or 2% (w/v)
AMG (117 mg/mL)	2	NA	NA	NA	1.7 μ L	1.95 mg/mL

Table 1: Composition of the hydrogels used in the present study. The indicated volumes correspond to a 100 μ L hydrogel sample used for the *in vitro* experiments. ^(a) For 125 μ L hydrogels and 200 μ L hydrogels, each volume was increased 1.25- and 2-fold, respectively. ^(b) 2×10^5 Luc-ZS Green-hMSCs were loaded in 200 μ L hydrogels for the *in vivo* assessment of hMSC survival while 1.25×10^6 hMSCs were loaded into 125 μ L hydrogels for the *in vivo* assessment of the proangiogenic potential of hMSC secretome. Glc = Glucose; NA = Not Applicable.

Mix 1 was first deposited on a hydrophobic surface (specifically, a polytetrafluoroethylene (PTFE), disk diameter = 5 mm) and Mix 2 was then added and homogenized within the Mix 1. These hydrogels were maintained at 37°C in a humidified atmosphere for 1 hour. After polymerization, each hydrogel was carefully removed from the PTFE surface, placed in individual wells of 12-wells tissue-culture plates, and immersed in 2 mL serum- and glucose-free α -MEM culture medium before use in either the *in vitro* or *in vivo* experiments.

IN VITRO EXPERIMENTS

Hydrogel-contained glucose quantification without hMSCs

The amount of glucose inside the hydrogels was quantified using a glucose electrode biosensor (NeuroChem platform, University Lyon I, France) placed at the center of the samples. Briefly, the glucose electrode biosensor was composed of platinum previously coated by a glucose-oxidase enzyme. Degradation of glucose by the enzyme produced hydrogen peroxide (H_2O_2). H_2O_2 was then degraded by platinum of the biosensor, producing oxidative current which was directly proportional to glucose concentration (standard curve). The glucose electrode biosensors and pertinent recording methods were adopted from literature reports (Vasilyeva *et al.*, 2011). Exogenous glucose released outside the glucose reservoirs and starch/AMG hydrogels loaded with or without AMG was monitored using a biomedical ARCHITECT C8000 (Abbott Technology) robot.

Hydrogels morphology

The surface of the glucose reservoirs and starch 2%/AMG hydrogels loaded with or without AMG were assessed using environmental scanning electronic microscopy (Philips eSEM FEG/XL-30,). These samples were treated by liquid nitrogen for 30 seconds just before scanning to make the hydrogel external surface visible by the method used. Images of the hydrogel surface were collected and photographed.

Near-anoxia culture conditions

The “ischemic” environment was simulated *in vitro* by culturing the hydrogel-contained hMSCs under both near-anoxia (0.1% O_2) and nutrient (including both serum and glucose) deprivation. Near-anoxia culture conditions were achieved using a well-characterized, finely-controlled, proOx-C-chamber system (C-Chamber, C-374, Biospherix, New-York, USA). The oxygen concentration in this chamber was maintained at 0.1%, with a residual gas mixture composed of 5% CO_2 and balance nitrogen. The temperature of the system was maintained at 37°C for the duration of the experiments. Environmental nutrient deprivation was achieved using a glucose-free α -MEM (PAN Biotech GmbH).

Quantification of viable and apoptotic cells within hydrogels

The viability of hMSCs maintained inside the glucose reservoirs and hydrogels under near-anoxia conditions was evaluated after 1, 7 and 14 days of culture. At the prescribed times, the hydrogels were incubated with both 1 μ g/mL nucleic acid stain Hoechst 33342 (HE; Sigma-Aldrich) and 1 μ g/mL propidium iodide (PI; Sigma-Aldrich) at 37°C for 20 minutes; the hydrogels were then observed and

photographed using a Zeiss confocal microscope (Zeiss LSM 800). Hydrogels were digested and hMSCs were detached from hydrogels using trypsin-EDTA for 20 min, then PBS containing BSA 2% (Sigma-Aldrich) was added to stop the chemical action of trypsin. After centrifugation (at 3,500xg for 5 min) the hMSCs were re-suspended in fresh PBS, and analyzed using an Attune flow cytometer (LifeTechnologies, Saint Aubin, France). Cells which had stained both HE positive and PI negative were identified as “viable cells”, whereas cells which had been stained both HE positive and PI positive were identified as “dead cells”. Cell viability was expressed as the number of viable cells normalized by the respective viable cell number at day 1 of culture. For each hydrogel tested, cell viability at day 1 of culture was determined to be more than 90% of the 10^5 hMSCs seeded at day 0.

Proliferative potential of hydrogel-contained hMSC under near-anoxia

After 14 days under near-anoxia, hMSCs were trypsinized from the starch 2%/AMG hydrogels and transferred back into tissue culture-flask (10^3 cells/cm²) and standard cell culture conditions (*i.e.*, 21% O₂ and further cultured in α -MEM containing 5.5 mM glucose and 10% FBS) for 10 days. The doubling time of these hydrogel-derived hMSCs was determined and compared to the respective result obtained using naive hMSCs, which had been previously cultured under standard cell culture conditions for 14 days.

Preparation of hMSC conditioned media (CM)

The hydrogel-contained hMSCs were maintained under near-anoxia conditions for 14 days. The supernatant cell culture medium was not changed for the duration of the aforementioned cell culture period. At 7 and 14 days of culture, the supernatant cell culture media were collected, centrifuged (at 700xg for 5 min), aliquoted, and kept at -80°C until further use. These media are designated as conditioned media (CM) for the rest of this report.

Assessment of the chemotactic effect of conditioned media

The chemo-attractive potential of CM from hydrogel-contained hMSCs maintained under near-anoxia conditions for either 7 and 14 consecutive days was determined using the Boyden chamber migration assay. Briefly, 600 μ L of each respective CM were added in the bottom well of the Boyden chamber, and 2×10^4 hMSCs cultured in glucose and serum-free α -MEM media were seeded on the top of the 8- μ m-pore-diameter porous membrane (disk diameter = 6.5 mm; Transwell®; WWR International, Fontenay-sous-Bois, France), previously coated with 0.5% gelatin (Sigma-Aldrich). Serum-free α -MEM and α -MEM supplemented with 10% FBS were added in the bottom well as negative and positive controls, respectively.

After 6 hours maintenance under standard cell culture conditions, the cells on the top of the porous membrane were scrapped in order to remove the hMSCs that had not migrated from the original seeding location. These porous membranes were then fixed using paraformaldehyde 11% (Sigma-Aldrich) at room temperature for 30 minutes and stained using an azure eosin methylene blue 0.4% solution (Giemsa; Sigma-Aldrich) for 3 minutes. The hMSCs that had migrated through the porous membrane were photographed using a Keyence VHX-2000F microscope (Courbevoie, France), and counted using commercially *Image J* software (National Institute of Health, Bethesda, USA).

Assessment of released bioactive mediators

The presence of chemotactic and proangiogenic mediators in CM were quantified using Luminex technology (Millipore, Billerica, USA) following the manufacturer's instructions. The levels of 16 mediators, specifically, IL-8, CCL2, MMP9, Chemerin, MIF, CXCL2, CXCL5, CXCL10 (known as chemotactic growth factors) and VEGF-A, VEGF-C, VEGF-D, ANGPT-1, ANGPT-2, ANG, FGF-BASIC, Endostatin (known as proangiogenic growth factors) were evaluated using the MasterPlex QT 1.0 system (MiraiBio, Alameda, USA) and analyzed using Luminex-100 software version 1.7 (Luminex, Austin, USA).

IN VIVO EXPERIMENTS

Ectopic implantation

Ten-week-old female nude mice were obtained from Janvierlabs (Le Genest-Saint-Isle, France). All procedures regarding housing, handling, surgery, and recovery of the animals after surgery were conducted in compliance with the guidelines of the new European Directive 2010/63/EU regarding the protection of animals used for scientific purposes. The surgery protocol used had received approval by the Ethics Committee on Animal Research at the Lariboisiere/Villemin (Paris, France; number S85 / 2014-07-30). Before each surgical procedure, a dose of buprenorphine (Buprecare®; 0.1 mg/kg; Axience, Pautin, France) was administrated subcutaneously in each mouse and the skin was prepared for surgery using application of povidone-iodine (Betadine®, Vetoquinol, Paris, France). Anesthesia was induced by intraperitoneal administration of ketamine (Ketamine1000®; 100 mg/kg weight; Virbac, France) and xylazine (Rompun® 2%; 8 mg/kg animal weight; Bayer HealthCare, Berlin, Germany). Flowing oxygen was delivered using a specific mask for each animal throughout the surgical procedure. Either two (for the assessment of cell proangiogenic potential) or four (for the assessment of cell viability) symmetrical incisions (each 7.5 mm in length) on both sides of the spine were made on the back of each mouse, and subcutaneous pouches were created. Hydrogels were then carefully and randomly inserted into each pouch. Skin closure was accomplished with an interrupted suture pattern using 4.0 polyglactin 910 sutures (Ethicon, Issy-les-Moulineaux, France).

Assessment of cell viability

At prescribed time points during the 14 days of implantations (*i.e.*, on days 1, 7 and 14) the viability of the Luc-ZS Green-hMSCs contained within the implanted hydrogels was monitored non-invasively using a bioluminescence imaging system (Ivis, Lumina II, Caliper Life Sciences, Villebon-sur-Yvette, France) as previously described (Logeart-Avramoglou *et al.*, 2010). For this purpose, the mice were anesthetized by delivery of 3% isoflurane (Iso-Vet®; Piramal HealthCare, Northumberland, UK) in oxygen, and 100 mg/kg D-luciferin was injected intramuscularly in the area of the implant locations. The mice were then placed in a ventral position inside the detection chamber of the bioluminescence system and maintained under anesthesia. Images were taken every 5 minutes during a 1 hour period of time. A region of interest surrounding each implant was manually defined on each image and the photon flux emitted by each construct was quantified using the *Living Image*® 3.2 software (Caliper Life Sciences). For each mouse and time point tested, the highest BioLuminescence Intensity (BLI) signal was retained. The percentage of viable cells post implantation was determined as the photon fluxes measured at each time point tested normalized with the respective BLI signal acquired the day after surgery (*i.e.*, day-1 of data acquisition). On days 7 and 14, the mice (6 animals for each time point) were sacrificed (using an overdose of intracardiac pentobarbital delivery (Dolethal®; Vetoquinol, Paris, France), and the hydrogels were explanted, fixed in 4% paraformaldehyde, and embedded in paraffin. All thus prepared paraffin sections were processed for human beta-2-microglobulin immunodetected (hβ2-MG, a membrane protein that stains human cells), using the Envision+ kit (Dako, Les Ulis, France) and a polyclonal rabbit anti-hβ2-MG (1/1000, Novocastra, Nanterre, France) as the primary antibody as previously described (Becquart *et al.*, 2010).

Assessment of the proangiogenic potential of hMSC-containing hydrogels

Each 125 µL hydrogel (loaded with 1.25×10^6 hMSCs) was encapsulated at the center of a silicone tube (Silicone DIA; 4mm internal diameter, 6 mm external diameter, 16 mm height ; Weber Métaux, France) and between 2 layers (3 mm height) of low-concentrated fibrin (1mg/mL, without aprotinin) gel filled from the top and from the bottom of each silicone tube edges. The fibrin on the edges fully degraded 24 hours after implantation. To visualize the blood vessels formation driven by hMSC-contained hydrogels, the mice were injected with a radio-opaque polymer compound (Microfil®, Flowtech, Carver, MA, USA) at either 14 or 21 days post-implantation. For this purpose, each animal was deeply anesthetized and the skin from the thorax and the rib cage was incised to access the heart. The left ventricle was catheterized using a 20G canula (BD Venflon, Beckson Dickinson Infusion, Sweden) and the right atrium was cut for blood removal. Each animal was first perfused with isotonic saline (50 mL) containing heparin (100 UI/mL) using a pump (at 6 mL/min flow rate) for 6 min to rinse blood from the

vasculature, and then manually perfused with 14 mL of Microfil® (prepared according to the manufacturer's instructions using 6.3 mL of Microfil®, 7 mL of the specific diluent, and 0.7 mL of the specific curing agent). During filling, the pressure of the injection was approximately 2mL/min to force the Microfil® into the capillary networks without extravasation into the surrounding tissue. The perfused euthanized animals were stored at 4 °C overnight to allow polymerization of the Microfil® and then the silicone tubes containing the hydrogels were explanted and fixed in 4% paraformaldehyde overnight. The specimen were then imaged using a Skyscan1172 micro-CT-scanner (Bruker, Evere, Belgium) with voltage 80 kV, current 100 mA, exposure for 85 ms and 0.3 degree rotation step settings, without any filter. The images obtained had 10 µm pixel size. The scanned images were then reconstructed as a stack of slices of each sample using Nrecon software, 16 bits. The volumes of interest (VOI; 2 per sample) were set as cylinders overlapping the internal diameter of the silicone tube (4 mm), between the 1st and the 3rd mm height from the top and from the bottom of the silicone tube edges. Indeed, as some hMSC-containing hydrogels tested partly resorbed after implantation, the aforementioned method allowed to rigorously defining similar volume of interest for each sample. New blood vessel volume was reported as the amount of binarized object-volume measured within the designated volume of interest within the threshold gray values 120-255 on CTan software. Values regarding new blood vessel thickness and numbers were calculated using the aforementioned thresholds.

Statistical analyses

Numerical data were expressed as means ± standard deviation (SD). Statistical analyses were performed using commercially available software (GraphPad 6.0 Software, California Corporation, USA). Each of the *in vitro* experiments was conducted in triplicate and repeated on, at least, three separate occasions. Each of the *in vivo* experiments was conducted using at least 6 samples for each group of hydrogels tested, and repeated on two separate occasions. Data were analyzed statistically using analysis of variance and the Bonferroni post-*hoc* test, and the Mann-Whitney test for parametric and non-parametric tests, respectively. For all analyses, the confidence interval was set at 95% and the significant level at $p < 0.05$.

RESULTS

The starch/AMG hydrogels produce glucose

We first determined whether the starch/AMG hydrogels (Fig. 1a) produce glucose. To this aim, hydrogels were prepared with increasing concentration of starch (from 0.1% to 2% w/v) and 1.95 mg/mL AMG (*i.e.*, standard AMG concentration). Production of glucose inside the hydrogels was then monitored using a glucose microelectrode biosensor placed in the center of each hydrogel tested. In the presence of AMG, the starch hydrogels produced glucose as a function of starch concentration (Fig. 1b). In the closed system used in this study, production of glucose plateaued within 400 to 600 seconds and was maximal ($p < 0.05$) with the highest (2%) starch concentration. Moreover, the initial kinetics (V_i) of the starch/AMG reaction was maximal ($p < 0.05$) with the 2% starch concentration. In contrast, in the absence of AMG, there was no detectable glucose production within the aforementioned time frame (Fig. 1b).

The kinetics of glucose release out of both control hydrogels and the starch 2% hydrogels in the presence or absence of AMG was next investigated for 14 days. To this aim, the hydrogels were immersed into glucose-free and serum-free α -MEM medium and the amount of released glucose in the respective supernatants was monitored. In this open model system, release of glucose from the starch 2%/AMG hydrogels was observed over the entire period of the study; this result suggested that the starch 2%/AMG hydrogels delivered glucose over at least a 14 day-period. Interestingly, in the absence of AMG, a spontaneous glucose release was observed in the starch 2% hydrogels, which plateaued at 7 days; the amount of glucose released from AMG-free starch hydrogels was, however, 1.8 times less than that released from the AMG-containing starch hydrogels ($p < 0.05$; Fig. 1c).

We also explored the production of glucose within the starch 2%/AMG hydrogels as a function of the AMG concentration. In this case, production of glucose inside these hydrogels was linearly proportional with the concentration of AMG ($R^2 = 0.977$ at 180 s) (Fig. 1d).

We also investigated *in vivo* glucose production from the hydrogels of interest to the present study. To this aim, starch 2%/AMG and 2% starch hydrogels were implanted ectopically in a mouse model. At day 7 and 14 post-implantation, the glucose concentrations monitored in the post mortem hydrogels were compared to the ones measured in control hydrogels (glucose-free and 5.5 mM glucose reservoirs). At both time points tested, the glucose concentration was higher inside the starch 2%/AMG hydrogels ($p < 0.05$) compared to results obtained with the starch 2% hydrogels (4.6 and 9.4 fold-increased), glucose-free reservoirs (3.9 and 2.9 fold-increased), and 5.5 mM glucose reservoirs (2.3 and 2.7 fold-increased) (Fig. 1e).

The starch/AMG hydrogels improves the survival of hMSCs in near-anoxia conditions in vitro

We next determined whether the tested starch/AMG hydrogels sustained the viability of hMSCs under near-anoxia conditions. To this aim, hydrogels prepared with increasing concentrations of starch and with (Fig 2a1) or without (Fig 2a2) standard AMG concentration, were loaded with 10^5 hMSCs and maintained in glucose-free and serum-free α -MEM media under near-anoxia conditions. At days 7 and 14, the hydrogels were degraded and the number of viable hMSCs was assessed using flow cytometer (Fig. 2a1, 2a2). At both prescribed time points, maximal survival of hMSCs was achieved in the starch/AMG hydrogels containing the highest (2%) amount of starch ($p < 0.05$). At day 14, the hMSCs survived inside the 2% starch /AMG hydrogels only. Moreover, and compared to results obtained from the starch/AMG hydrogels, the number of viable cells in the starch hydrogels without AMG was drastically reduced at day 7 with almost no viable hMSCs remaining at day 14 for all starch concentrations tested (Fig. 2a1 vs. 2a2). At day 7, the number of viable cells inside the starch/AMG hydrogels was linearly proportional to the initial starch concentration ($R^2 = 0.984$) (Fig. 2b). These results provided evidence of the critical role of AMG in achieving the glucose concentrations required for the long-term survival of hMSCs.

In order to determine whether the glucose released from the hydrogels was responsible for the survival of hMSCs under near-anoxia conditions, 2-Deoxy-D-Glucose (a competitive inhibitor for the production of glucose-6-phosphate from glucose at the phosphoglucosomerase level) was added to the 2%starch /AMG hydrogels, glucose-free, and 5.5 mM glucose reservoirs loaded with 10^5 hMSCs. Addition of the aforementioned inhibitor led to massive death of hMSCs in all conditions tested within 3 days of culture (Fig. 2c). These results provide evidence that glucose is responsible for the survival of hMSCs under the conditions tested. To further investigate the viability of the hMSCs in the starch 2%/AMG hydrogels after 14 days of exposure to near anoxia conditions, hMSCs recovered from the hydrogels using trypsin digestion were seeded onto tissue-culture plates and their proliferative ability was compared to that obtained from naive hMSCs (controls) over 10 days. The cell doubling time of these two populations was similar ($p > 0.05$) (Fig. 2d). Moreover, these two cell populations were indistinguishable in terms of CD marker expression: specifically, both cell populations were positive for CD 73, CD90, CD105 and negative for CD45 (Fig. 2e).

Taken together, these data provided evidence that the starch/AMG hydrogels produced glucose for “fueling” hMSCs thus enhancing their survival in ischemic environmental conditions. Since the most effective hydrogel for enhancing hMSC survival was the starch 2%/AMG one, this concentration was used for the rest of the present study.

The starch 2%/AMG hydrogels are more effective than glucose reservoirs in extending the in vitro survival of hMSCs in near-anoxia conditions

We compared the efficacy of starch 2%/AMG hydrogels to that of glucose reservoirs prepared by loading free 5.5 mM glucose in fibrin hydrogels in order to determine which hydrogel environment enhanced survival of hMSCs in near-anoxia conditions. The hMSCs loaded in the 5.5 mM glucose reservoirs exhibited improved survival when compared to hMSCs loaded in glucose-free reservoirs under near-anoxia conditions at day 7; hardly any viable hMSCs were present in the glucose-free and in the 5.5 mM glucose reservoirs at day 14 (Fig. 3a, 3b). In contrast, the number of viable hMSCs loaded in the starch/AMG hydrogels increased by 5-fold when compared to the cells loaded in glucose reservoirs at day 7 of culture. At day 14, viable hMSCs were only observed in the starch 2%/AMG hydrogels (Fig. 3b).

Overall, these results demonstrate that, compared to results obtained with the glucose reservoirs, the survival of hMSCs in near-anoxia conditions was improved when the cells were dispersed within the starch 2%/AMG hydrogels.

The starch/AMG hydrogels are more effective than glucose reservoirs in enhancing the chemotactic and proangiogenic functions of hMSCs in near-anoxia conditions

Since the chemo-attraction of progenitors (such as MSCs) and endothelial cells are relevant aspects in the success of MSC-based regenerative medicine, we compared the chemotactic potentials of supernatant CM collected from hMSCs seeded into hydrogels of interest of the present study after exposure to near-anoxia conditions for 7 and 14 consecutive days. The respective CM-mediated chemo-attraction of either hMSCs or HUVECs was assessed using the Boyden chamber migration test.

Compared to CM from hMSCs seeded in glucose-free and in 5.5 mM glucose reservoirs, CM from hMSCs seeded in starch 2%/AMG hydrogels promoted significant ($p < 0.05$) increase in the chemotactic potential of hMSCs (9.3- and 2.0-fold increase, respectively, after 7 days; 4.8- and 2.7- fold increase, respectively, after 14 days; Fig. 4a, 4b). Moreover, the concentrations of the chemotactic mediators MCP-1, MIF, MIP-2, ENA 78 and IP-10 were significantly ($p < 0.05$) increased in CM from hMSCs seeded in starch 2%/AMG hydrogels when compared to results obtained using CM from glucose-free and 5.5 mM glucose reservoirs for 14 days (Fig. 4c).

Compared to HUVECs responses to CM from hMSCs seeded in either glucose-free or 5.5 mM glucose reservoirs, the CM from hMSCs seeded in starch 2%/AMG hydrogels promoted a significant ($p < 0.05$) increase in their chemotactic potential towards the HUVECs (4.2- and 2.2-fold increase, respectively after 7 days; 3.7- and 3.7-fold increase, respectively, after 14 days; Fig. 4d, 4e). Moreover, the concentrations of the proangiogenic mediators VEGF-A, VEGF-C, VEGF-D, ANGPT-1, ANGPT-2, ANG and

FGF-BASIC were significantly ($p < 0.05$) increased in the CM from hMSCs seeded in starch 2%/AMG hydrogels compared to results obtained using CM from glucose-free and 5.5 mM glucose reservoirs for 14 days (Fig. 4f). Altogether, these data provided evidence that the starch 2%/AMG hydrogels promoted the *in vitro* chemotactic and proangiogenic functions of hMSCs in near-anoxia conditions.

The starch/AMG hydrogels are more effective than glucose reservoirs to increase the in vivo survival of hMSCs after subcutaneous implantation

To extend the results of the *in vitro* studies (Fig. 3) to the *in vivo* setting, we assessed the potential of starch 2%/AMG in enhancing survival of embedded hMSCs in an ectopic transplantation mouse model, *i.e.*, an avascular model.

Luc-ZSGreen-hMSCs within the starch 2%/AMG hydrogels exhibited significant ($p < 0.005$) increase in BLI compared to the signals obtained with either the glucose-free or the glucose reservoirs (fold increase of 3.4 and 2.8 for day-7, respectively, and fold increase of 2.9 and 1.9 for day-14, respectively) (Fig. 5a, 5b). To validate this trend, the numbers of h β 2-MG-positive cells were counted on histological sections of hydrogels explanted at both day-7 and day-14 post subcutaneous implantation (Fig. 5c). A significant ($p < 0.05$) enhanced number of positive h β 2-MG-cells in the starch 2%/AMG hydrogels was observed when compared to the results obtained from cells in the glucose-free reservoirs (7.3-fold increase at day 7 and 7.2-fold increase at day 14; Fig. 5d).

Taken together, these data provided evidence that the starch 2%/AMG hydrogels enhanced MSC survival after ectopic implantation in mice for up to 14 days.

The starch/AMG hydrogels are more effective than glucose reservoirs in increasing the proangiogenic functions of hMSCs after implantation

The proangiogenic functions of hMSCs were investigated in an ectopic transplantation mouse model. To this aim, hMSCs were loaded into each type of hydrogel of interest of the present study and the volume occupied by new blood vessels adjacent to these gels was quantified after 14 and 21 days (Fig. 6a). The new blood vessels in the vicinity of the starch 2%/AMG hydrogels covered a 2.9- and 4.0-fold increased volume ($p < 0.01$), respectively, compared to results obtained from glucose-free reservoirs at days 14 and 21 post-implantation, and was increased 3.4 and 2.3-fold, respectively, ($p < 0.01$) compared to results obtained from 5.5 mM glucose reservoirs at the aforementioned time points post-

implantation (Fig. 6b, 6c). In contrast, the new blood vessel diameter and blood vessel number in either starch 2%/AMG hydrogels, glucose-free, or glucose-reservoirs was similar (supplementary data).

Overall, these data demonstrate that the starch 2%/AMG hydrogels promoted the proangiogenic function of hMSCs after implantation.

DISCUSSION

Upon implantation, survival and maintenance of functional hMSCs in the 3D environment of tissue engineering constructs is the most critical challenge for developing TE constructs of clinically-relevant volume for regenerative medicine applications. To achieve this important aim, we previously identified that presence of glucose is sufficient to meet cell metabolic requirements in near anoxia and ensure MSC survival upon implantation. Delivering glucose at physiologic level over at least 2 weeks post-implantation is a true challenge, however, because glucose is a small, uncharge and highly water-soluble molecule whose high concentrations can disturb the osmotic pressure and cause cell lysis. To resolve this limitation, we designed and developed a starch/AMG hydrogel that contained amyloglucosidase, an enzyme that enabled to supply sufficient levels of glucose from starch to assure the survival and paracrine functionality of hMSC when transplanted *in vivo*.

The present report provides evidence that starch/AMG hydrogels release glucose as a function of starch and AMG concentrations (Fig. 1b, 1d). Moreover, starch/AMG hydrogels can release glucose for a period of at least 14 days both *in vitro* (Fig. 1c) and *in vivo* (Fig. 1e). A very important result was the finding that the delivered glucose content within the starch/AMG hydrogels was in the physiological range and was significantly ($p < 0.05$) increased compared to levels obtained in the glucose reservoirs (Fig. 1e). An unexpected finding of the present study was, however, that starch hydrogels alone (i.e., without AMG) spontaneously released glucose (Fig. 1c). A possible explanation for this finding is the presence in starch of trace amounts of enzymes that degrade starch. This spontaneous release of glucose from the starch hydrogels, however, was insufficient to enhance MSC survival (Fig. 2a, 2b) further supporting the use of AMG to achieve production of glucose at levels that ensure survival of MSCs post-implantation.

Starch/AMG hydrogels significantly ($p < 0.05$) extended the survival of embedded hMSCs in near anoxia conditions *in vitro*. Specifically, hMSCs loaded into starch/AMG hydrogels exhibited, respectively, a 33- and 80-fold increase in viability when compared to results from glucose-free hydrogels at days 7 and 14, respectively under near-anoxia conditions (Fig. 3b). Another important result was that, loading either

adipose-derived hMSCs or myoblasts in starch/AMG hydrogels also resulted in at least a 13- and 125-fold increase of cell survival compared to results from glucose-free reservoirs in near anoxia at days 7 and 14, respectively (Supplementary Fig. 1a, 1b). Most importantly, the starch/AMG hydrogels outperformed 5.5 mM glucose reservoirs as demonstrated by the observed 5- and 650-fold increase in hMSC survival at day 7 and 14, respectively, when exposed to near anoxia (Fig. 3b). Glycolysis was the main energy-provider pathway to hMSCs loaded into starch/AMG hydrogels under near-anoxia conditions as blocking this pathway using 2-Deoxy-D-glucose resulted in massive cell death within 3 days (Fig. 2c). The positive role of glucose released from starch AMG hydrogels on hMSC survival was further substantiated by the demonstration that hMSCs released from starch/AMG hydrogels after 14 days exposure in near anoxia exhibited similar proliferative ability with naïve MSCs cultured at 21% O₂ (Fig. 2d). These two cell populations were indistinguishable in terms of pertinent CD marker expression (Fig. 2e). Most importantly, after implantation in an ectopic mouse model, hMSCs dispersed into starch/AMG hydrogels exhibited a 3.5- and 2.9- fold increase when compared to glucose-free reservoirs at days 7 and 14 (Fig. 5a, 5b). These data were further confirmed by counting hMSCs on histological sections (Fig. 5c, 5d). Moreover, a 2.8- and 1.7-fold increase in hMSC viability was observed when starch/AMG hydrogels were compared to 5.5 mM glucose reservoirs at days 7 and 14 (Fig. 5a, 5b). Increasing the glucose concentration to 27 mM in the glucose reservoirs did not improve hMSC survival (data not shown). The results of the present study also revealed a 4-fold decrease in hMSC number between day 7 and 14 when these cells were loaded into starch/AMG hydrogels (Fig. 5b). A possible explanation for this outcome is that the activity of AMG decreased between days 7 and 14 post-implantation. This conjecture is reinforced by the observation that the glucose concentration of cell-free starch/AMG hydrogels implanted in an ectopic mouse model decreased of 26% between day 7 and 14 post-implantation (Fig. 1e). Alternatively, the decrease in hMSC number may reflect the occurrence of an inflammatory response that induced hMSC death as demonstrated previously using xenogenic myoblasts in a mouse model (Rinsch et al., 2001). Future studies, including either enzyme immobilization or encapsulation to preserve AMG activity (Helena et al., 2009) or the use of immunosuppressors to decrease the inflammatory response (Rinsch et al., 2001) may be required to discern between these competing hypotheses.

The beneficial effects of hMSCs when used as regenerative medicine “tools” are predominantly due to the multitude of bioactive mediators secreted by these cells upon implantation. For this reason, we investigated whether the increase in hMSC survival led to an increase in hMSC paracrine functions. Indeed, CM from hMSCs loaded into starch/AMG hydrogels and exposed to near-anoxia for 7 and 14 days led to a 2- to 4-fold increase in their chemotactic potential towards hMSCs (Fig. 4a, 4b) and HUVECs (Fig. 4d, 4e) compared to results obtained using the 5.5 mM glucose reservoirs. These data are consistent with the higher concentrations of chemotactic and pro-angiogenic growth factors present in the CM from

starch/AMG hydrogels when compared to pertinent results from the glucose reservoirs (Fig. 4c, 4f). These observations are further substantiated by our *in vivo* findings that revealed a 3.3- and 2.2-fold increase in the volume of peripheral new blood vessel was induced in the starch/AMG hydrogels loaded with hMSCs compared to pertinent results obtained from 5.5 mM glucose reservoirs at 14 and 21 days post-implantation (Fig. 6a, 6b).

Overall, the starch/AMG hydrogels provide a powerful platform for the production of glucose to “fuel” MSCs and improve their survival and paracrine functions post-implantation. Resorption of such systems can be tailored to the targeted regenerative medicine applications by selecting the glucose polymer (e.g., starch *versus* maltodextrins), its biophysical properties, the enzyme (e.g., a single enzyme *versus* a cocktail of starch-degrading enzymes), concentration and delivery mode (Mickova et al., 2012).

CONCLUSION

The massive hMSC death post-implantation, occurring in avascular microenvironments depleted of oxygen and nutrients, is a major roadblock to successful advances of regenerative medicine. Various approaches, including development of oxygen-delivery scaffolds, have been proposed by scientists to address this issue. hMSCs loaded in such systems, however, exhibited improved cell viability for only up to 3 days without enhancing the new blood vessel formation in an avascular model (Cook et al., 2015; Lee et al., 2015). In the present study, we develop for the first time a nutritive hydrogel system which produces glucose at physiological ranges necessary to fuel hMSCs, and thus improve cell survival for at least 14 days under near-anoxia conditions and after implantation in an avascular model. Moreover, the novel starch/AMG hydrogel promotes hMSC paracrine functions, evidenced by increasing new blood vessel formation for at least 21 days after implantation; such outcomes provide nutrients (especially glucose) and oxygen into the avascular post-implantation microenvironment. Looking forward, and given the current wide interest in the use of stem cells for regenerative medicine applications, the novel inbuilt system of glucose delivery has the potential of improved tissue engineering and regenerative methodologies, which enhance cell survival and functionality after implantation.

ACKNOWLEDGMENT

We thank Professor R. Bizios for valuable comments on the manuscript. We also thank the Technologic department of Saint-Louis Hospital for confocal images, the SAPC laboratory of the University of Technology of Compiègne for environmental scanning electronic microscopy images, the Biology and Biochemistry department of Lariboisière Hospital for dosage of glucose, and the CYBIO department of the Cochin Institute for Multiplex analysis. We also acknowledge financial support for this project from ANR VITABONE.

DISCLOSURE OF POTENTIAL CONFLICTS OF INTEREST

PJ, PE and PH disclose that, the novel enzyme-controlled, nutritive hydrogels used in the present project, was patented globally (EP14306700; 2014). The other authors confirmed no potential conflicts of interest.

REFERENCES

- Becquart, P. *et al.* Ischemia is the prime but not the only cause of human multipotent stromal cell death in tissue-engineered constructs in vivo. *Tissue Eng. Part A* 18, 2084–2094 (2012).
- Bruder, S. P., *et al.* Mesenchymal Stem Cells in Osteobiology and Applied Bone Regeneration. *Clinical Orthopaedics & Related Research*. 10001 (1998).
- Bruder, S. P., Fink, D. J. & Caplan, A. I. Mesenchymal stem cells in bone development, bone repair, and skeletal regeneration therapy. *J. Cell. Biochem.* 56, 283–294 (1994).
- CNRS, European Patent Office, EP14306700, TIME Controlled Glucose releasing hydrogel and applications thereof (2015).
- Cook, C. A., Hahn, K. C., Morrissette-McAlmon, J. B. F. & Grayson, W. L. Oxygen delivery from hyperbarically loaded microtanks extends cell viability in anoxic environments. *Biomaterials* 52, 376–384 (2015).
- Deschepper, M. *et al.* Proangiogenic and prosurvival functions of glucose in human mesenchymal stem cells upon transplantation. *Stem Cells* 31, 526–535 (2012).
- Deschepper, M. *et al.* Survival and function of mesenchymal stem cells (MSCs) depend on glucose to overcome exposure to long-term, severe and continuous hypoxia. *Journal of cellular and molecular medicine*. 15, 1505–1514 (2011).
- Giannoni, P. *et al.* Short-Time Survival and Engraftment of Bone Marrow. *Tissue Eng. Part A*. 15, (2009).
- Lee, H. Y., Kim, H. W., Lee, J. H. & Oh, S. H. Controlling oxygen release from hollow microparticles for prolonged cell survival under hypoxic environment. *Biomaterials* 53, 583–591 (2015).
- Logeart-Avramoglou, D. *et al.* In vitro and in vivo bioluminescent quantification of viable stem cells in engineered constructs. *Tissue Eng. Part C. Methods* 16, 447–458 (2010).
- Martin-Rendon, E. *et al.* Autologous bone marrow stem cells to treat acute myocardial infarction: a systematic review. *Eur. Heart J.* 29, 1807–1818 (2008).
- McGinley, L. M. *et al.* Mesenchymal stem cell survival in the infarcted heart is enhanced by lentivirus vector-mediated heat shock protein 27 expression. *Hum. Gene Ther.* 24, 840–851 (2013).
- Mickova, A., *et al.* Core/Shell Nanofibers with Embedded Liposomes as a Drug Delivery System. *Biomacromolecules* 13, 952–962 (2012).
- Moya, A. *et al.* Human Mesenchymal Stem Cell Failure to Adapt to Glucose Shortage and Rapidly Use Intracellular Energy Reserves Through Glycolysis Explains Poor Cell Survival After Implantation. *Stem Cells* 36, 363–376 (2018).
- Mylotte, L. A. *et al.* Metabolic Flexibility Permits Mesenchymal Stem Cell Survival in an Ischemic Environment. *Stem Cells* 26, 1325–1336 (2008).
- Nuschke, A., Rodrigues, M., Wells, A. W., Sylakowski, K. & Wells, A. Mesenchymal stem cells/multipotent stromal cells (MSCs) are glycolytic and thus glucose is a limiting factor of in vitro models of MSC starvation. *Stem Cell Res. Ther.* (2016).
- Petite H, Viateau V, Bensaid W, *et al.* Tissue-engineered bone regeneration. *Nat Biotechnol.* 18: 959-63 (2000).
- Sharifi, A. M., Eslami, H., Larijani, B. & Davoodi, J. Involvement of caspase-8, -9, and -3 in high glucose-induced apoptosis in PC12 cells. *Neurosci. Lett.* 459, 47–51 (2009).

- Szegezdi, E. *et al.* Metabolic Flexibility Permits Mesenchymal Stem Cell Survival in an Ischemic Environment. *Stem Cells* 26, 1325–1336 (2008).
- Vordermark, D. *et al.* Glucose requirement for hypoxic accumulation of hypoxia-inducible factor-1 α (HIF-1 α). *Cancer Lett.* 230, 122–133 (2005).
- Yan, H. & Yu, C. Repair of Full-Thickness Cartilage Defects With Cells of Different Origin in a Rabbit Model. *Arthrosc. - J. Arthrosc. Relat. Surg.* 23, 178–187 (2007).
- Zhu, H., Sun, A., Zou, Y. & Ge, J. Inducible metabolic adaptation promotes mesenchymal stem cell therapy for ischemia: a hypoxia-induced and glycogen-based energy prestorage strategy. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 34, 870–876 (2014).

Fig. 1: The starch/AMG hydrogels produce glucose. (a). Schematic (not to scale) of the components of the novel nutritive hydrogel. hMSCs were encapsulated in fibrin scaffolds. Starch (a polymer of glucose) was hydrolyzed by an AMG enzyme, which produced glucose to fuel hMSCs. (b). Production of glucose in starch hydrogels loaded in either the presence or absence of AMG 1.95 mg/mL, was monitored (using a glucose microelectrode biosensor) during the first 12 minutes ($n=9$). No glucose was monitored in all starch hydrogels without AMG and in glucose-free reservoirs. (c). Release of glucose from either glucose-free reservoirs, 5.5 mM glucose reservoirs, or starch hydrogels in the presence or absence of AMG 1.95 mg/mL. In this case, the glucose reservoirs and hydrogels were immersed into 1 mL glucose and serum-free MEM medium. Glucose released from the glucose reservoirs and from the hydrogels was monitored using biomedical ARCHITECT C8000 for 14 days ($n=6$). No glucose was monitored in media from the glucose-free reservoirs. (d). Production of glucose in starch hydrogels loaded with increasing concentrations of AMG was monitored (using a glucose microelectrode biosensor) during the first 12 minutes ($n=9$). (e). Glucose concentration was monitored inside either glucose-free reservoirs, 5.5 mM glucose reservoirs, or starch hydrogels loaded in the presence or absence of AMG 1.95 mg/mL, after subcutaneous implantation in nude mice for 7 and 14 days ($n=9$). (f). Representative eSEM micrographs of the external architecture of either the glucose-free reservoirs, 5.5 mM glucose reservoirs, or starch hydrogels loaded in the presence or absence of AMG, following treatment with liquid nitrogen for 30 seconds. Scale bars: 200 μm (for eSEM images in the top row), 50 μm (for eSEM images in bottom row). Data are mean \pm standard deviation. Glucose-free reservoirs and starch hydrogels without AMG were used as negative controls. ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$ compared to glucose production results obtained from the starch 2%/AMG hydrogels (Mann-Whitney test). Abbreviations: AMG = amyloglucosidase; Glc = glucose; eSEM = environmental scanning electron graphs.

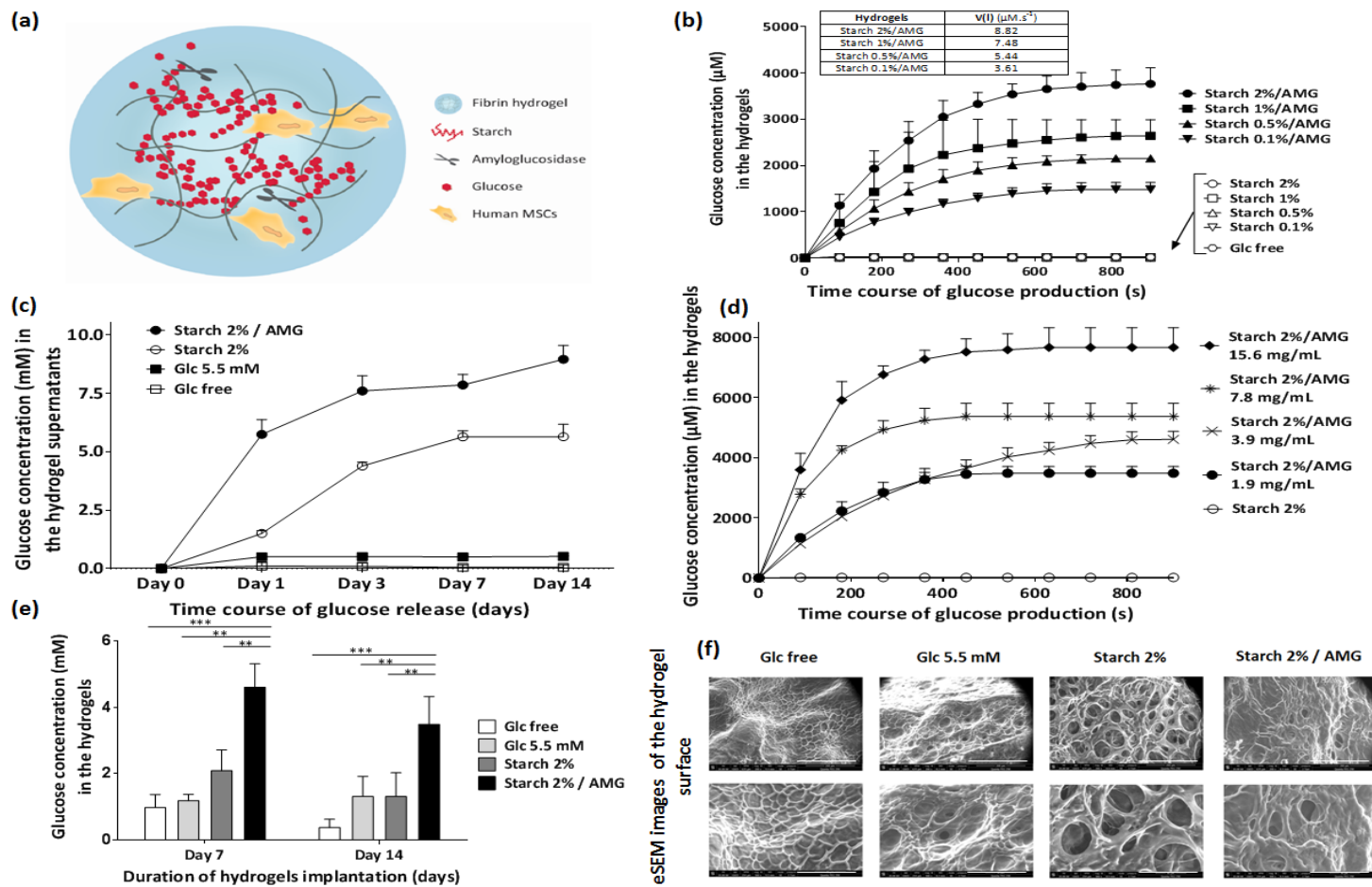


Fig. 2: The starch/AMG hydrogel environment extends survival of MSCs in near-anoxia conditions. (a1 and a2). Viability of hMSCs seeded in either glucose-free reservoirs or starch hydrogels loaded in the presence (a1) or absence (a2) of AMG, after exposure to near-anoxia (0.1% O₂) conditions for 7 and 14 days were analyzed using flow cytometry (*n*=3). **(b).** Linear proportionality relation ($R^2 = 0.984$) between the number of viable cells maintained in the starch/AMG hydrogels under near-anoxia conditions for 7 days as a function of the initial starch concentrations (*n*=3). **(c).** Viability of hMSCs seeded in hydrogels and exposed to near-anoxia conditions in either the presence or absence of 2DG (2-Deoxy-D-Glucose) for 3 days. At that time, the hydrogels were digested and the hMSCs were counted using the Malassez technique and excluding dead hMSCs stained with trypan blue (*n* = 3). **(d).** Doubling time of hMSCs in the starch 2%/AMG hydrogels after exposure to near-anoxia conditions for 14 days (*i.e.*, Starch/AMG anoxic hMSCs), transferred back to standard cell culture conditions for 10 days, and compared to the viability results of hMSCs maintained under standard cell culture conditions (*i.e.*, naive hMSCs) (*n*=6). **(e).** Flow cytometry characterization of hMSCs either maintained in the starch 2%/AMG hydrogels under near-anoxia conditions (purple histogram) or cultured under standard conditions (red histogram) for 14 days. Data are mean \pm standard deviation. hMSCs contained in glucose-free reservoirs and starch hydrogels without AMG were used as negative controls for the results showed in frames (a1, a2 and b). hMSCs contained in glucose-free reservoirs were used as negative controls for frame (c). Naive hMSCs were used as positive controls for frame (d). NS: $p > 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$, compared to cell viability results obtained from cells contained in the starch 2%/AMG hydrogels (Mann-Whitney test). Abbreviations: hMSCs = human mesenchymal stem cells; AMG = amyloglucosidase; Glc = glucose; HE = Hoescht 33342; PI = Propidium Iodide; -2 DG = absence of 2-Deoxy-D-glucose; +2 DG = presence of 2-Deoxy-D-glucose.

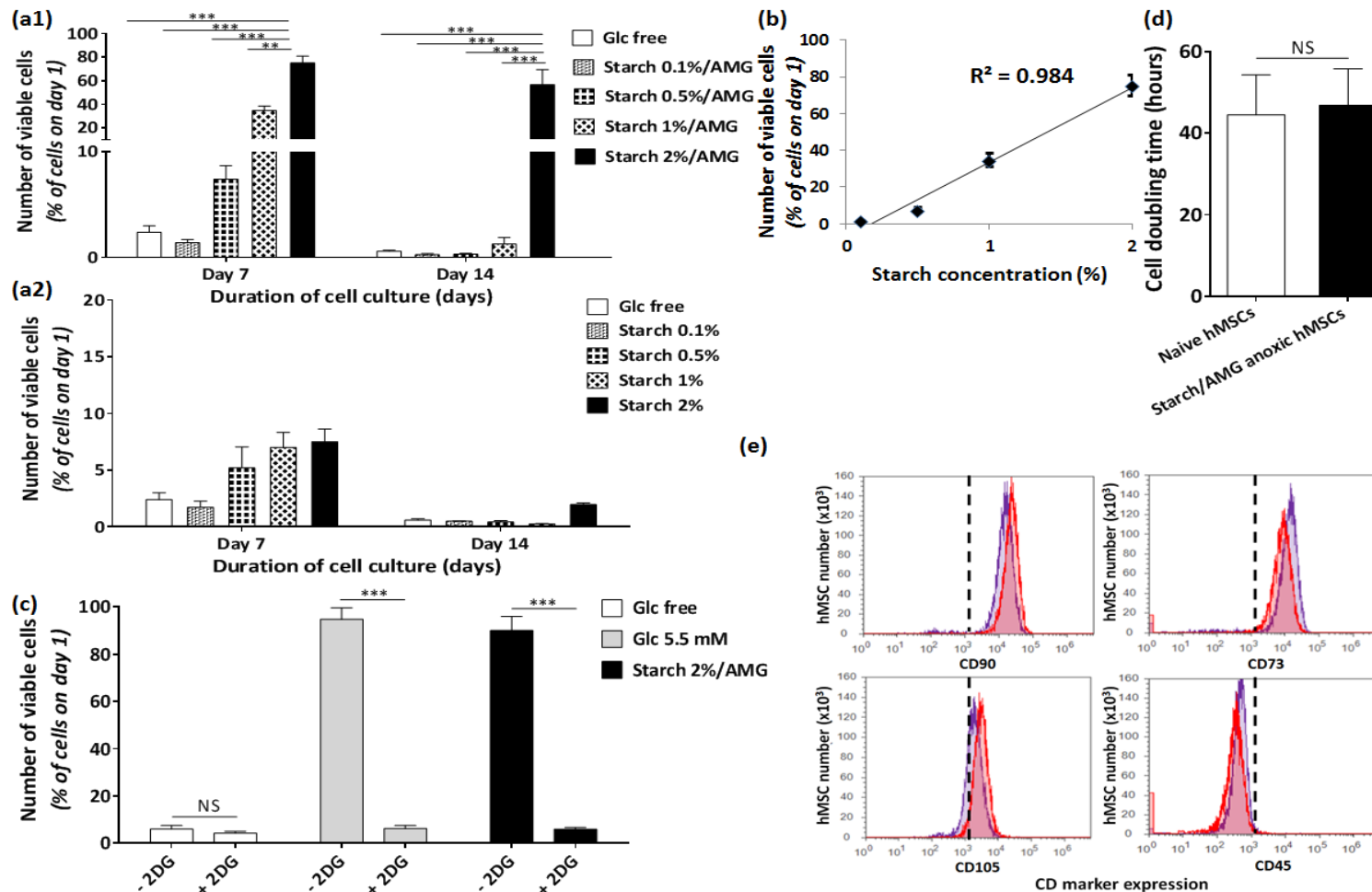


Fig. 3: The starch 2%/AMG hydrogels are more effective than glucose reservoirs in extending the in vitro survival of hMSCs in near-anoxia conditions. (a). Representative confocal images of hMSCs either in glucose-free reservoirs, 5.5 mM glucose reservoirs, or starch 2%/AMG hydrogels after exposure to near-anoxia conditions (0.1% O₂) for 7 and 14 days. These cells were stained with Hoescht 33342 (HE; cell nuclei in blue) and propidium iodide (PI; dead cells in red) stained Scale bar = 20 μm. (*n*=3). **(b).** Viability of hMSCs seeded in either glucose-free reservoirs, 5.5 mM glucose reservoirs, or starch 2%/AMG hydrogels, after exposure to near-anoxia conditions for 7 and 14 days. The cells were stained with HE and PI and analyzed using flow cytometry (*n*=9). Cell viability was expressed as the number of viable cells on days 7 and day 14 normalized by the respective viable cell number at day 1. Data are mean ± standard deviation. hMSCs contained in the glucose-free reservoirs were used as negative controls. **p* < 0.05; ****p* < 0.001 compared to cell viability results obtained from cells in the starch 2%/AMG hydrogels (Mann-Whitney test). Abbreviations: hMSCs = human mesenchymal stem cells; AMG = amyloglucosidase; Glc = glucose; HE = Hoescht 33342; PI = Propidium iodide.

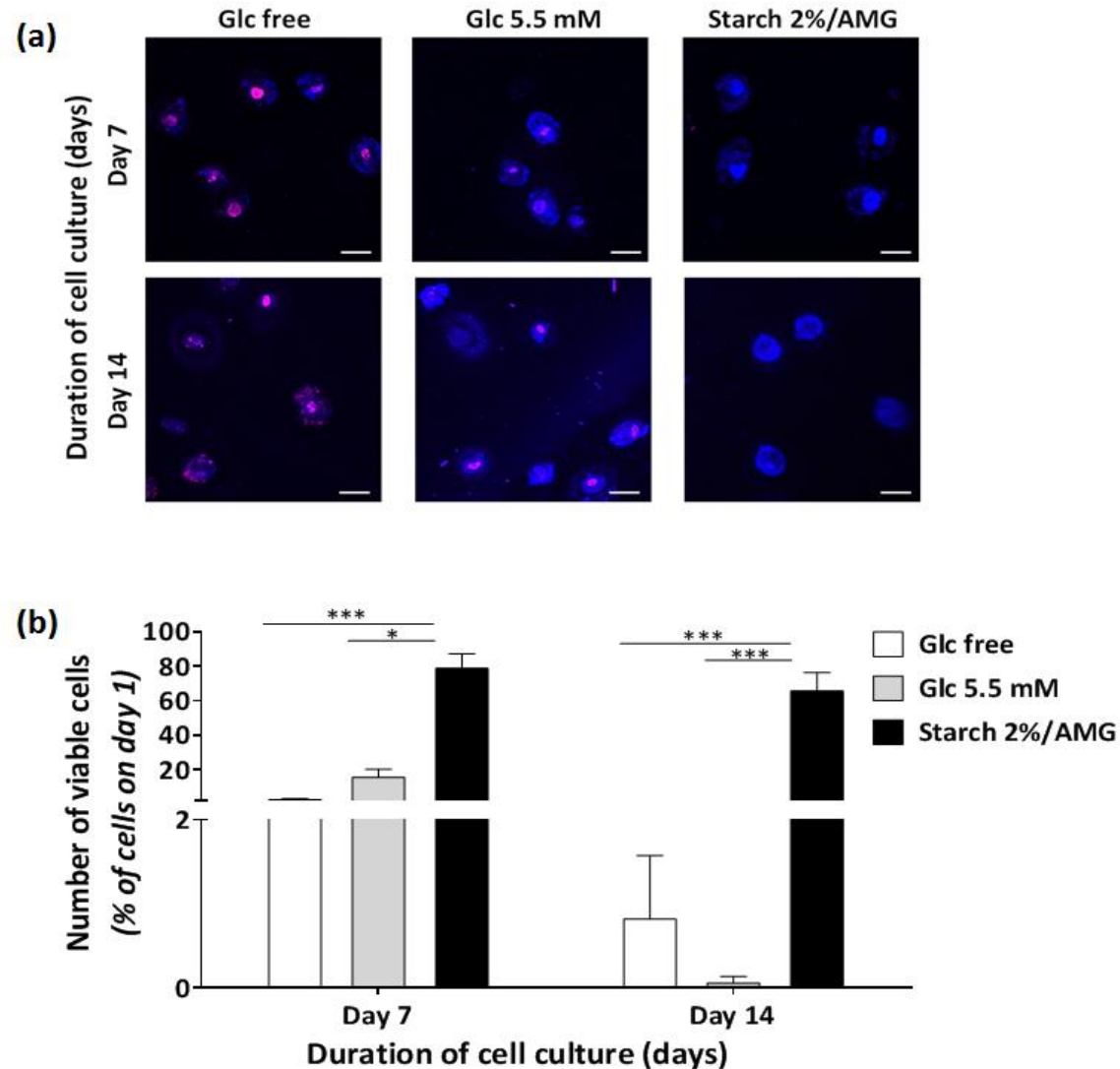


Fig. 4: The starch/AMG hydrogels are more effective than glucose reservoirs in enhancing the chemotactic functions of hMSCs in near-anoxia conditions. (a). Representative light micrographs and (b) quantification of hMSC migration in Boyden chambers in response to conditioned media from hMSCs seeded in either glucose-free reservoirs, 5.5 mM glucose reservoirs, or starch 2%/AMG hydrogels, after exposure to near-anoxia conditions for 7 and 14 days. Scale bar = 500 μ m. ($n=6$). (c) Concentrations of the chemotactic mediators released by hMSCs maintained into either glucose free-reservoirs, 5.5 mM glucose reservoirs, or starch 2%/AMG hydrogels, after exposure to near-anoxia conditions for 14 days. ($n=6$). (d). Representative light micrographs and (e) quantification of HUVEC migration in Boyden chambers in response to conditioned media from hMSCs seeded in either glucose-free reservoirs, 5.5 mM glucose reservoirs, or starch 2%/AMG hydrogels, after exposure to near-anoxia conditions for 7 and 14 days. Scale bar = 500 μ m. ($n=3$). (f) Concentrations of the proangiogenic mediators released by hMSCs maintained into either glucose free-reservoirs, 5.5 mM glucose, or starch 2%/AMG hydrogels, after exposure to near-anoxia conditions for 14 days. ($n=6$). Fresh glucose-free MEM and FBS-free medium was used as negative control. Fresh glucose-free MEM supplemented with 10% FBS medium was used as positive control. Cell migration was expressed as the number of cells which had migrated across the Boyden chamber membrane normalized by the results obtained from the positive control. Data are mean \pm standard deviation. NS: $p > 0.05$; * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$ compared to cell-chemotaxis results obtained from the supernatant CM from starch 2%/AMG hydrogels (Mann-Whitney test). Abbreviations: hMSCs = human mesenchymal stem cells; AMG = amyloglucosidase; Glc = glucose; MEM = minimum essential media; FBS = fetal bovine serum; IL = interleukin; MCP, monocyte chemoattractant protein; MMP = matrix metalloproteinase; MIF = macrophage inhibitory factor; MIP = macrophage inflammatory protein; ENA = epithelial neutrophil activating protein; IP = interferon gamma-induced protein; VEGF = vascular endothelial growth factor; ANGPT = angiopoietin; ANG = angiogenin; FGF-BASIC = basic fibroblast growth factor.

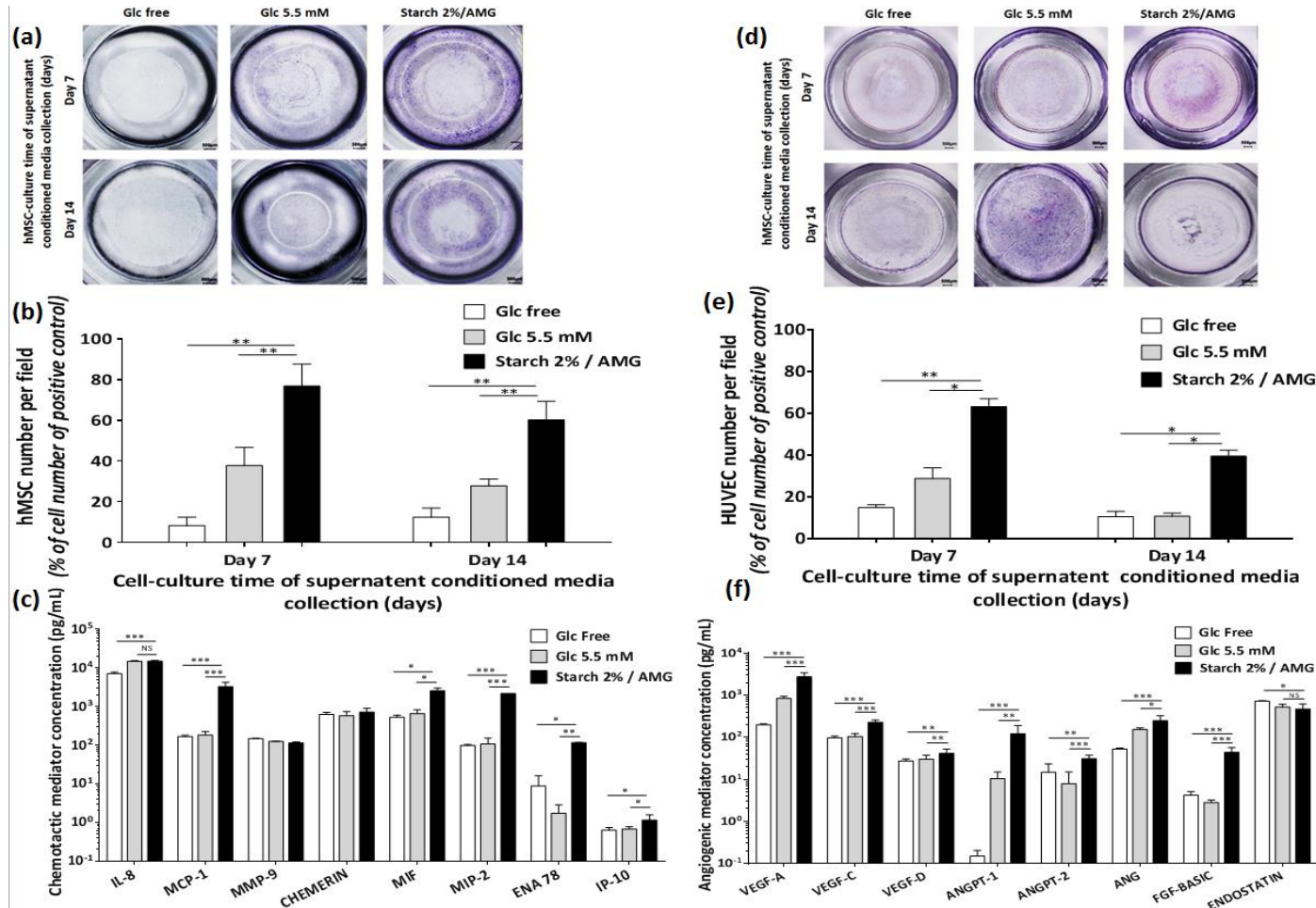


Fig. 5: The starch/AMG hydrogels are more effective than glucose reservoirs in increasing the *in vivo* survival of hMSCs after subcutaneous implantation. (a). Noninvasive, *in vivo* bioluminescence imaging of Luc-ZSGreen-hMSCs seeded in either glucose-free reservoirs, 5.5 mM glucose reservoirs, or starch 2%/AMG hydrogels, after subcutaneous implantation in nude mice for 7, 10 and 14 days ($n=9$). **(a).** Quantification of the bioluminescent signal detected in the hydrogels described in frame (a). The percentage of surviving cells was determined by photon fluxes at each time point tested and normalized to respective results obtained for each implant at day 1 ($n=12$). Data are mean \pm standard deviation. * $p < 0.05$ compared to respective results obtained from the starch 2%/AMG hydrogels (Mann-Whitney test). **(c).** Representative immunohistology results and **(d)** quantification of viable Luc-ZSGreen-hMSCs seeded in either glucose-free reservoirs or starch 2%/AMG hydrogels after 7 and 14 days of subcutaneous implantation in nude mice. Stain: β 2-microglobulin. Scale bar = 500 μ m. ($n=3$). Data are mean \pm standard deviation. Luc-ZS Green-hMSCs containing glucose-free reservoirs were used as negative control. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$ compared to respective results obtained from the starch 2%/AMG hydrogels. The numerical data were analyzed using a One-way ANOVA followed by Bonferroni's post hoc test. Abbreviations: Luc-ZS Green-hMSCs = human mesenchymal stem cells transduced using a lentiviral vector encoding for the firefly luciferase and the ZSGreen proteins; AMG = amylogucosidase; Glc = glucose; BLI = bioluminescence intensity.

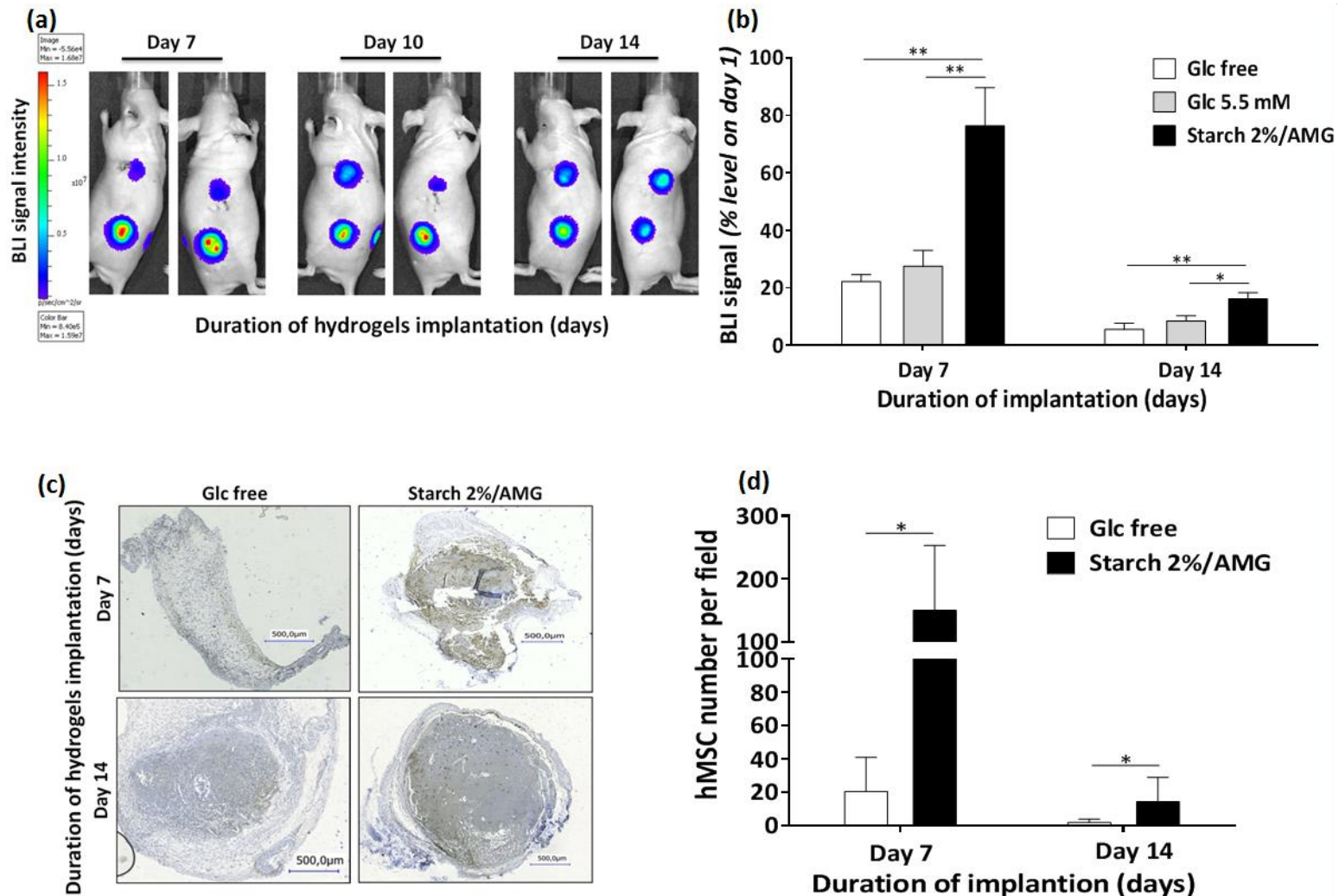
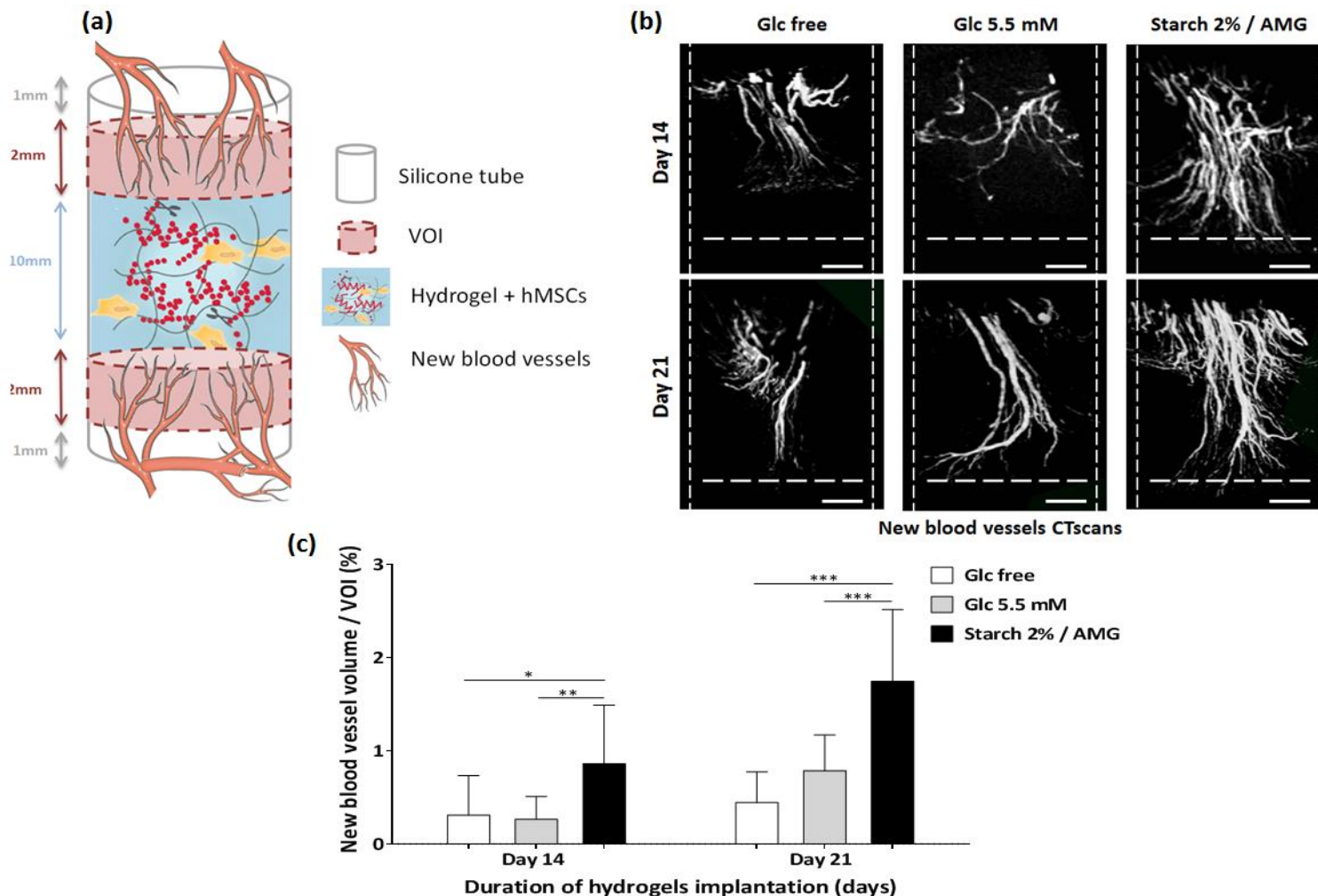
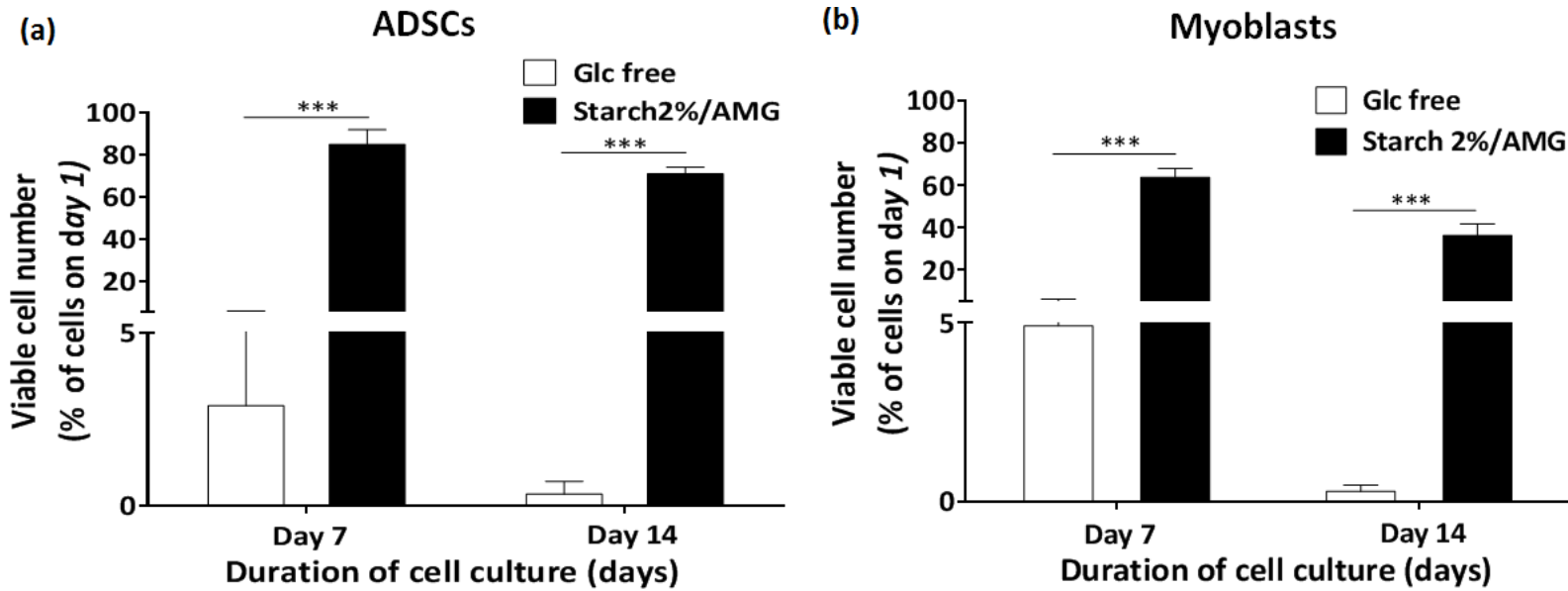


Fig. 6: The starch/AMG hydrogels are more effective than glucose reservoirs in increasing the *in vivo* proangiogenic functions of hMSCs after subcutaneous implantation. (a): Schematic (not to scale) of the model designed to assess the proangiogenic potential of hMSC-containing hydrogels. Hydrogels were loaded with 1.25×10^6 hMSCs and encapsulated at the center of a silicone tube. After 14 and 21 days implantation in an ectopic mouse model, new blood vessels were quantified into the volumes of interest (VOI; 2 per samples), defined as cylinders overlapping the silicone tube, between the 1st and the 3rd mm height from the top and from the bottom of the silicone tube edges. (b) and (c): Micro-CT vasculature analysis in the vicinity of either glucose-free reservoirs, 5.5 mM glucose reservoirs, or starch 2%/AMG hydrogels after 14 and 21 days of ectopic implantation in mice. (b). Representative 3D reconstructions (using CT-Vox software) of the new blood vessels into the VOIs defined in the vicinity of either glucose-free reservoirs, 5.5 mM glucose reservoirs or starch 2%/AMG hydrogels after subcutaneous implantation in nude mice for 14 and 21 days. All glucose reservoirs and hydrogels had been loaded with 1.25×10^6 hMSCs and encapsulated into a silicone tube. After 14 and 21 days of ectopic implantation, Microfil® (a radiopaque polymer) was perfused and the samples were scanned using *in vitro* μ CT (Skyscan 1772). Vertical dotted lines represent the silicone tube sides; horizontal dotted lines represent the top of the hydrogel. Scale bar = 500 μ m. ($n=16$). (c). New blood vessel volume was reported as percentage (%) of the VOI which was analyzed using CTAn software. ($n=16$). * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$ compared to respective results obtained from the starch 2%/AMG hydrogels. The numerical data were analyzed using a One-way ANOVA followed by Bonferroni's post hoc test. Abbreviations: hMSCs = human mesenchymal stem cells; AMG = amyloglucosidase; Glc = glucose; VOI = volume of interest.



Supp. Fig. 1: The starch 2%/AMG hydrogels are more effective than glucose-free reservoirs in extending the *in vitro* survival of ADSCs and myoblasts in near-anoxia conditions. (a). Viability of ADSCs and (b) myoblasts seeded in either glucose-free reservoirs or starch 2%/AMG hydrogels after exposure to near-anoxia conditions (0.1% O₂) for 7 and 14 days. At the prescribed time points, the cells were stained with HE (cell nuclear in blue) and PI (dead cell in red), and analyzed using flow cytometry (*n*=3). Cell viability was expressed as the number of viable cells normalized by the respective viable cell number at day 1. Data are mean ± standard deviation. ADSCs contained in glucose-free reservoirs were used as negative controls for (a). Myoblasts contained in glucose-free reservoirs were used as negative controls for (b). *** *p* < 0.001 compared to the respective results obtained from the starch 2%/AMG hydrogels. The numerical data were analyzed using a One-way ANOVA followed by Bonferroni's post hoc test. Abbreviations: ADSCs = adipose-derived stem cells; AMG = Amyloglucosidase; HE = Hoescht 33342; PI = propidium iodide.



Supp. Tab. 1: The diameters and numbers of the new blood vessels in starch 2%/AMG hydrogels, glucose-free reservoirs, and glucose-reservoirs were similar after implantation in ectopic mouse model. New blood vessel numbers and diameters were analyzed using CTAn into volumes of interest defined into either glucose-free reservoirs, 5.5 mM glucose reservoirs, or starch 2%/AMG hydrogels ($n=16$). NS: $p > 0.05$ compared to respective results obtained from the starch 2%/AMG hydrogels. The numerical data were analyzed using a One-way ANOVA followed by Bonferroni's post hoc test. Abbreviations: hMSCs = human mesenchymal stem cells; AMG = amyloglucosidase; Glc = glucose; NS = not significant.

Type of hydrogel	New blood vessel Numbers (mm^{-1})			New blood vessel Diameter (μm)		
	Glc Free	Glc 5.5mM	Starch 2%/AMG	Glc Free	Glc 5.5mM	Starch 2%/AMG
DAY 14	0.85 \pm 0.59	0.59 \pm 0.38	0.98 (NS) \pm 0.82	36 \pm 21	33 \pm 12	45 (NS) \pm 14
DAY 21	0.141 \pm 0.72	0.161 \pm 0.56	0.199 (NS) \pm 0.62	57 \pm 17	54 \pm 12	51 (NS) \pm 16

CONCLUSION

Dans cette étude, nous avons développé pour la première fois un hydrogel nutritif, constitué d'un polymère de glucose (amidon ; 2%), d'une enzyme (AMG ; 1.95 mg/mL) et de fibrine (18 mg/mL), afin de produire du glucose à des concentrations physiologiques (4 mM). La production de glucose dans cet hydrogel nutritif est modulable en fonction de la concentration d'amidon et d'enzyme.

Nous avons ensuite démontré que l'hydrogel nutritif permettait de maintenir la survie des hCSMs pendant 14 jours *in vitro* au sein d'un environnement quasi-anoxique (0.1% pO₂) privé de glucose et de sérum, ainsi qu'après implantation *in vivo* en sous-cutané chez la souris. En effet, après 14 jours en condition quasi-anoxique sans glucose et sans sérum au sein de l'hydrogel nutritif, le taux de survie des hCSMs restait supérieur à 60% et était augmenté de plus de 65 fois par rapport au taux de survie des hCSMs maintenues dans ces conditions à l'intérieur des hydrogels de fibrine seule et des hydrogels de glucose libre à 5.5 mM. De plus, après 14 jours d'implantation en site sous-cutané chez la souris, les hCSMs maintenues au sein des hydrogels nutritifs présentaient un taux de survie 3 fois supérieur à celui des hCSMs maintenues dans les hydrogels de fibrine seule et des hydrogels de glucose libre à 5.5 mM.

Dans ces conditions *in vitro* de quasi-anoxie sans glucose et sans sérum, nous avons également mis en évidence que les hCSMs utilisaient principalement la glycolyse anaérobie pour maintenir leur survie, confirmant ainsi les résultats mentionnés dans la revue présentée dans l'introduction (Salazar-Noratto et al., soumis à publication, 2019) ainsi que dans l'étude détaillée précédemment (Moya et al., 2017). De plus, les hCSMs maintenues pendant 14 jours dans l'hydrogel nutritif en quasi-anoxie sans glucose et sans sérum conservaient également une capacité de prolifération identique à celle des hCSMs cultivées pendant cette même période en conditions standards.

En ingénierie tissulaire, la survie seule des CSMs n'est pas suffisante pour réparer un tissu ou organe lésé. En effet, les propriétés paracrines de ces cellules apportent une contribution majeure dans cette fonction réparatrice. Nous avons démontré que l'hydrogel nutritif permettait également de promouvoir les potentiels chimiotactiques et pro-angiogènes des hCSMs au sein d'un environnement *in vitro* quasi-anoxique privé de glucose et de sérum, ainsi qu'après implantation sous-cutanée chez la souris. En effet, les milieux conditionnés par les hCSMs maintenues dans les hydrogels nutritifs pendant 7 et 14 jours en quasi-anoxie sans glucose et sans sérum entraînaient une augmentation de la migration de hCSMs fraîches et de cellules HUVECs, comparés aux milieux conditionnés par les hCSMs maintenues dans les hydrogels de fibrine seule et les hydrogels de glucose libre à 5.5 mM. Cette amélioration peut s'expliquer par des concentrations supérieures de facteurs de croissance chimiotactiques (MCP-1, MIF, MIP-2, RANTES, IP-10) et pro-angiogènes (VEGF-A, VEGF-C, VEGF-D, ANGPT-1, ANGPT-2, ANG, FGF-BASIC).

De plus, l'augmentation du volume total de nouveaux vaisseaux sanguins quantifiés en périphérie des hydrogels nutritifs contenant des hCSMs après 14 et 21 jours d'implantation *in vivo* en site sous cutané chez la souris corroborent les résultats décrits précédemment.

En augmentant la survie et la fonctionnalité des hCSMs après implantation, l'hydrogel nutritif, composé d'amidon et d'AMG, apparait comme une stratégie d'intérêt pour améliorer les résultats thérapeutiques des produits à base de CSMs en ingénierie tissulaire.

DISCUSSION

La présente discussion vise à apporter une interprétation scientifique des résultats obtenus au cours du projet de doctorat, mais également à débattre de leur caractère innovant, de leurs limites ainsi que de leurs applications au regard des objectifs de l'étude. Les descriptions de ces résultats sont consultables dans les parties « Results » et « Discussion » des articles 1 et 2.

1. La mort cellulaire post-implantation : un défi scientifique en ingénierie tissulaire

Les CSMs apparaissent comme des candidates de choix en ingénierie tissulaire. En plus de posséder des propriétés de prolifération et de différenciation, ces cellules souches adultes multipotentes présentent également des fonctions chimiotactiques et pro-angiogènes, via la sécrétion de facteurs biologiques, faisant d'elles des acteurs majeurs pour la réparation de tissus ou d'organes lésés. Elles sont accessibles chez le patient, en particulier celles dérivées de la moelle osseuse ou du tissu adipeux. C'est pourquoi les CSMs font, en 2019, l'objet de plus de 47 000 publications scientifiques¹ (<https://pubmed.gov>) ainsi que 878 essais cliniques² (<https://clinicaltrials.gov>).

Cependant, l'un des problèmes majeurs de l'ingénierie tissulaire reste aujourd'hui la mort massive de ces cellules dès les premiers jours après implantation, réduisant considérablement leur efficacité thérapeutique (Logeart-Avramoglou et al., 2010 ; Giannoni et al., 2010 ; McGinley et al., 2013 ; Li et al., 2016). Bien que l'origine de cette mort massive des CSMs soit multifactorielle, l'environnement ischémique auquel les cellules sont confrontées une fois implantées, semble être l'une des causes principales (Becquart et al., 2012). De plus, cet environnement ischémique, réduit considérablement la fonctionnalité des cellules survivantes, ces dernières devant utiliser exclusivement leur énergie pour survivre et non pour réparer le tissu lésé.

De récentes études menées au laboratoire B3OA et par d'autres équipes de recherche ont mis en évidence que le facteur limitant la survie cellulaire au sein de l'environnement ischémique était, non pas l'absence d'oxygène, mais l'absence de glucose (Deschepper et al., 2011 and 2013 ; Moya et al., 2018 ; Mylotte et al., 2008 ; Nuschke et al., 2016). En effet, l'absence d'oxygène ne conduit pas les CSMs vers une mort cellulaire mais à l'inverse, un défaut de glucose, conduit inévitablement ces cellules vers une mort massive en conditions quasi-anoxiques *in vitro* (0,1% pO₂) dès le troisième jour (Deschepper *et al.*, 2013 ; Moya et al., 2018). De plus, un apport de glucose permet de maintenir la survie *in vitro* des CSMs pendant 21 jours en conditions quasi-anoxiques et pendant 14 jours après implantation en modèle ectopique (sous-cutané) (Deschepper *et al.*, 2013).

^{1,2} Mots clés : « mesenchymal stem cells » OR « mesenchymal stromal cells ».

L'objectif de ce projet de doctorat était (i) de mieux comprendre le métabolisme énergétique emprunté par le glucose au sein des CSMs après implantation (article 1, figures 1, 3, 4 et 6), puis (ii) de développer et d'évaluer une stratégie basée sur l'apport continu de glucose afin d'améliorer la survie ainsi que la fonctionnalité des CSMs post-implantation (article 2).

Afin de parvenir à ces objectifs, il a été nécessaire dans un premier temps de mettre au point un modèle d'ischémie permettant de refléter au mieux *in vitro* les changements métaboliques subis par les CSMs dans l'environnement ischémique post-implantation.

2. Définir un modèle d'ischémie *in vitro* approprié

L'environnement ischémique est caractérisé par (i) une diminution des apports en oxygène, (ii) une déplétion en nutriments, (iii) une accumulation des déchets métaboliques et, (iv) une hypercapnie locale (Russ et al, 2007). Cependant, les modèles d'ischémie utilisés dans les expérimentations *in vitro* ne rassemblent pas l'ensemble des caractéristiques ischémiques mentionnées (Prabhakaran et al., 2004 ; Zhu et al., 2006).

2.1 Mimer la pO₂ à laquelle les CSMs sont confrontées post-implantation

La pO₂ choisie pour le modèle d'ischémie *in vitro* doit refléter la pO₂ à laquelle les CSMs sont exposées post-implantation. La plupart des études axées autour de l'impact de l'ischémie sur le métabolisme des CSMs utilise des modèles *in vitro* avec une pO₂ comprise entre 1 et 10% (Mylotte et al., 2008 ; Rosova et al., 2008 ; Nusckle et al., 2016 ; Beegle et al., 2015). Cependant, la pO₂ mesurée au niveau de la moelle osseuse non ischémisée, réservoir naturel des CSMs, est comprise entre 0.5 et 4% (Chow et al., 2001; Hung et al., 2007). En d'autres termes, les pO₂ utilisées dans ces modèles sont plus proches de l'environnement physioxique des CSMs plutôt que d'un environnement lésé ischémique.

Afin d'obtenir des conditions reflétant au mieux la situation *in vivo*, nous avons mesuré la pO₂ au centre d'hydrogels cellularisés et implantés en ectopique. Cette pO₂ était de 0.1% dès le premier jour post-implantation (article 1, figure 1). A cette valeur de pO₂, les hCSMs subissaient des changements métaboliques identiques à ceux observés après leur implantation *in vivo* en site ectopique. En effet, les niveaux d'expression d'HIF-1 α , de LDH-A et l'activité mitochondriale des hCSMs maintenues en conditions *in vitro* sans glucose et sans sérum étaient identiques à ceux des hCSMs implantées dans les hydrogels en modèle ectopique (article 1, figures 1 et 2). De plus, la cinétique de consommation d'ATP intracellulaire des hCSMs était parallèle dans les deux conditions ; les hCSMs consommaient leurs réserves d'ATP en 3 jours (article 1, figures 5, 6 et 7 ; Deschepper et al., 2013). Enfin, la cinétique de survie cellulaire était

également similaire dans ces deux conditions ; les hCSMs présentaient un taux de survie d'environ 50% après 3 jours, puis inférieur à 20% après 7 jours (article 1, figures 6 et 7 ; Deschepper et al., 2013).

En conclusion, une pO_2 de 0.1% induit *in vitro* les changements métaboliques subis par les CSMs post-implantation. Nous avons donc retenu cette pO_2 de 0.1% dans la suite des études *in vitro* menées au cours de ce projet de doctorat (articles 1 et 2).

2.2 Induire la déplétion en nutriments

En conditions de culture *in vitro* standards (i.e. 21% pO_2), la majorité des cellules animales sont cultivées en présence de milieux synthétiques de base, aussi appelés milieux essentiels minimum (MEM), contenant des sels minéraux, vitamines, acides aminés (glutamine notamment) ainsi que du glucose à une concentration physiologique supérieure ou égale à 1 g/L (Arora, 2013). Toutefois, en conditions ischémiques, l'apport de nutriments est fortement limité (Russ et al., 2007). Afin d'induire au mieux le stress subi par les cellules au cours de la déplétion en nutriments, il nous fallait tout d'abord identifier les nutriments essentiels affectant la survie des CSMs, puis mimer au mieux la cinétique de déplétion en nutriments.

2.2.1 Identifier les nutriments essentiels affectant la survie des CSMs

Dans nos études, le glucose est apparu comme un nutriment essentiel utilisé par les CSMs pour produire leur énergie dans l'environnement ischémique et maintenir ainsi leur survie cellulaire. En effet, la présence de glucose permettait de maintenir la survie *in vitro* des hCSMs pendant 21 jours en conditions quasi-anoxiques, et également pendant 14 jours après implantation en modèle ectopique (Deschepper *et al.*, 2013). Par cet apport de glucose, les réserves glycolytiques et d'ATP intracellulaire restaient maintenues dans ces deux modèles (article 1, figures 6 et 7). Au contraire, l'absence de glucose était accompagnée d'une chute brutale des réserves glycolytiques et d'ATP au sein des hCSMs, entraînant leur mort massive après 3 jours en conditions quasi-anoxiques *in vitro* ainsi qu'en modèle ectopique (article 1, figures 6 et 7 ; article 2, figures 3 et 5 ; Deschepper *et al.*, 2013).

En conditions de culture standard, plusieurs types de cellules animales, telles que les hépatocytes, les cellules pancréatiques ou encore les astrocytes, peuvent également utiliser les acides aminés, notamment la glutamine (via la glutaminolyse) ou parfois la sérine (via la sérinolyse) pour produire leur énergie (Berl and Clark, 1969 ; McKeehan, 1986). Cependant, ces voies métaboliques alternatives ne sont pas empruntées par les CSMs en conditions quasi-anoxiques *in vitro*. En effet, les hCSMs maintenues dans ces conditions avec un apport en glutamine (5 g/L) ou en sérine (5 g/L) présentent un taux de survie

inférieur à 10% après 7 jours ; ce taux de survie est identique à celui des hCSMs maintenues dans ces conditions sans apport d'acides aminés (article 1, figure 3).

Ainsi, le glucose apparaît comme le nutriment clé utilisé par les CSMs pour maintenir leur survie au sein d'un environnement ischémique.

2.2.2 Mimer les conséquences de la déplétion en nutriments

Le choix de dépleter le milieu de culture des CSMs en glucose a été réalisé afin de refléter au mieux le microenvironnement après implantation, au sein duquel il est fort peu probable que le glucose puisse être accessible en quantité suffisante aux cellules.

Afin de déterminer si les CSMs exposées à une absence graduelle de glucose en quasi-anoxie étaient capables de mettre en place un phénomène d'adaptation métabolique, les hCSMs ont été cultivées à 0, 1 et 5 g/L de glucose pendant 14 jours sans changement de milieu. Dans ces conditions, les cellules étaient exposées à (i) une déplétion abrupte en glucose, entraînant une chute de la quantité d'ATP intracellulaire entre 3 et 7 jours, ou (ii) une déplétion graduelle en glucose, engendrant une disparition du glucose après 7 jours de culture puis provoquant une chute de la quantité d'ATP intracellulaire entre 7 et 14 jours (Deschepper et al., 2013). La survie cellulaire diminuait brutalement après, respectivement, 3 et 7 jours. En d'autres termes, il n'y avait pas d'adaptation métabolique des hCSMs lorsqu'elles étaient exposées à une déplétion graduelle en glucose, mais plutôt un décalage au niveau de la cinétique de survie. Il est à noter que la cinétique de survie *in vitro* des hCSMs exposées à une déplétion abrupte en glucose était très similaire à celle observée en modèle ectopique (article 2, figure 5).

L'ensemble de ces résultats montre qu'une déplétion totale en glucose reflète *in vitro* les changements métaboliques subis par les CSMs dans l'environnement ischémique post-implantation. Ainsi, au sein de notre modèle d'ischémie *in vitro*, nous avons fait le choix de dépleter totalement les milieux de culture des hCSMs en glucose (articles 1 et 2).

2.3 Mimer l'accumulation des déchets métaboliques

En conditions ischémiques, les CSMs réorientent leur métabolisme énergétique exclusivement vers la glycolyse, entraînant ainsi une libération de lactate (Salazar-Norato et al., soumis à *Stem Cells*, 2019). Or, dans cet environnement, les cellules ne disposent d'aucun système de recyclage ni d'évacuation de leurs déchets métaboliques, engendrant ainsi l'accumulation locale du lactate (Tracey et al., 2004) et, par voie de conséquence, une acidification locale (Rose et al., 1995). Dans le modèle

proposé, une accumulation progressive de lactate au sein des milieux extracellulaires de hCSMs est observée dès 3 jours de culture en conditions quasi-anoxiques *in vitro* sans renouvellement des milieux (Deschepper et al., 2013). A l'inverse, aucune accumulation de lactate n'a été observée dans ces conditions lorsque les milieux de culture étaient régulièrement renouvelés (data not shown).

La cinétique de production et d'accumulation du lactate après implantation des CSMs dépend entre autre de (i) la densité cellulaire, (ii) la diffusion du lactate hors de l'implant, qui dépend de l'architecture de celui-ci, et (iii) la composition chimique de l'implant (Aubert et al., 2005). Ces facteurs n'étant pas universels, les concentrations de lactate (données non disponibles dans la littérature) devraient être mesurées *in vivo* à l'aide de biosenseurs afin de mimer au mieux ces conditions au sein d'un modèle *in vitro*. Des études relatives à cet axe sont en cours au sein du laboratoire B3OA.

En conclusion, l'absence de renouvellement des milieux de culture permet d'induire l'accumulation des déchets métaboliques ayant lieu dans un environnement ischémique post-implantation, sans toutefois mimer fidèlement la cinétique d'accumulation du lactate *in vivo*.

2.4 Caractéristiques et limites du modèle d'ischémie *in vitro* retenu

Notre modèle d'ischémie *in vitro* a été défini par une pO_2 quasi-anoxique (0,1%) contrôlée et continue, en maintenant les cellules au sein de chambres hermétiques hypoxiques. Nous avons démontré que cette pO_2 induit *in vitro* les changements métaboliques subis par les CSMs au sein de l'environnement ischémique post-implantation. L'absence de renouvellement des milieux de culture au sein du modèle induit l'accumulation des déchets métaboliques, sans toutefois miner fidèlement la cinétique d'accumulation du lactate *in vivo*.

Plusieurs études *in vivo* sur les mammifères ont rapporté la présence d'hypercapnie (accumulation du CO_2) au sein de nombreux organes tels que le cerveau, le cœur et le rein (Katz et al., 1999 ; Sanchez-Ramos et al., 2000). Très peu d'études intègrent ce facteur au sein des modèles ischémiques *in vitro*. Dans notre modèle, nous avons pris en compte l'accumulation du lactate en tant que principal déchet métabolique cellulaire, mais n'avons pas suivi l'éventuelle hypercapnie. Afin d'optimiser ce modèle, la mesure de la pCO_2 dans les milieux de culture extracellulaire devra être envisagée.

En plus de l'ischémie, les cellules implantées sont exposées à une réponse inflammatoire. Le modèle d'ischémie *in vitro* retenu exclut également cette réponse inflammatoire pouvant être engendrée par l'hôte suite à l'implantation ectopique. Afin de prendre en compte l'impact d'une éventuelle réaction

inflammatoire sur les résultats des études, une co-culture des hCSMs avec des cellules de l'immunité, telles que macrophages, neutrophiles ou cellules dendritiques, devra être effectuée (Gong et al., 2016).

Bien que notre modèle d'ischémie *in vitro* ne reflète pas l'ensemble des caractéristiques d'un environnement post-implantation, il s'avère prédictible pour la phase immédiate post-implantation, de par la cinétique de survie des CSMs semblable à celle observée en modèle ectopique. Ce modèle a donc été utilisé pour l'ensemble des études *in vitro* menées dans ce projet de doctorat (articles 1 et 2).

3. La glycolyse : moteur essentiel dans le maintien de la survie des CSMs post-implantation

Afin de fournir une quantité d'énergie suffisante pour leur fonctionnement, les CSMs exploitent principalement deux voies cataboliques en conditions physioxiques: la glycolyse et le cycle de l'acide citrique couplé à la chaîne respiratoire (Shyh-Chang and Ng, 2017 ; Chen *et al.*, 2008). Toutefois, ce scénario est altéré lorsque les cellules sont confrontées à un environnement ischémique.

Tout d'abord, les CSMs exposées à une quasi-anoxie n'exploitent pas la chaîne respiratoire. En effet, les hCSMs maintenues *in vitro* à une pO_2 de 0,1% répriment l'expression au niveau ARNm des gènes impliqués dans cette voie catabolique (article 1, figure 3). De même, les hCSMs dont l'activité de la chaîne respiratoire est inhibée par l'ajout de malonate ou d'antimycine-A, survivent de façon identique aux hCSMs contrôles (article 1, figure 4).

Confrontées à l'environnement anoxique, les CSMs utilisent la glycolyse comme métabolisme énergétique principal afin d'assurer le maintien de leur survie. Tout d'abord, les hCSMs maintenues *in vitro* à une pO_2 de 0,1% surexpriment au niveau ARNm les gènes impliqués dans la glycolyse. De plus, l'inhibition de cette voie par le 2-DeoxyGlucose (2DG, inhibiteur compétitif du glucose dans la production du glucose-6-phosphate dès la 1^{ère} étape de la glycolyse) entraîne une mortalité cellulaire supérieure à 80% dès le premier jour au sein du modèle d'ischémie *in vitro*, alors que la totalité des hCSMs étaient encore viables à cette période en absence de 2DG (article 1, figure 4). Cette observation est également confirmée lorsque les hCSMs étaientensemencées dans les hydrogels nutritifs puis exposées à une anoxie *in vitro* ou implantées en modèle ectopique en présence ou absence d'inhibiteurs de la glycolyse (article 2, figure 2C). De plus, l'ajout de 2DG entraînait un arrêt immédiat dans la production d'ATP intracellulaire (article 1, figure 4).

Ainsi, la glycolyse représente la voie catabolique majeure empruntée par les CSMs post-implantation pour maintenir la survie cellulaire.

4. L'hydrogel nutritif : une stratégie d'intérêt en ingénierie tissulaire

4.1 Améliorer la survie cellulaire en environnement ischémique

L'hydrogel nutritif, constitué d'amidon/AMG, permet d'améliorer la survie des hCSMs au sein du modèle ischémique *in vitro* ainsi que post-implantation. En effet, alors que les hCSMs ensemencées dans les hydrogels dépourvus d'amidon/AMG meurent massivement en moins de 3 jours, les hCSMs ensemencées dans les hydrogels contenant l'amidon/AMG montrent un taux de survie supérieur à 70% après 7 et 14 jours en conditions quasi-anoxiques (article 2, figure 2 et 3). De plus, après 14 jours en modèle ectopique, les hCSMs ensemencées dans les hydrogels d'amidon/AMG présentent un taux de survie 3 fois supérieur à celui des hCSMs dans les hydrogels dépourvus d'amidon/AMG (article 2, figure 5).

La mort cellulaire massive post-implantation n'est pas un problème exclusif aux CSMs, mais concerne un grand nombre de types cellulaires utilisés en ingénierie tissulaire, tels que les hépatocytes (Vacanti et al., 1988), chondrocytes (Judas et al., 2007), cardiomyocytes (Reinecke and Murry, 2002 ; Laflamme et al., 2007), ou encore myoblastes (Beilharz et al., 1996). Afin d'élargir l'intérêt de l'application de l'hydrogel nutritif d'amidon/AMG pour l'ingénierie tissulaire, la survie *in vitro* d'ADSCs ainsi que de myoblastes, ensemencés à l'intérieur des hydrogels nutritifs et maintenus en conditions quasi-anoxiques, a été étudiée. Les ADSCs et myoblastes présentent, respectivement, un taux de survie supérieur à 70% et 50% après 14 jours au sein des hydrogels d'amidon/AMG maintenus en quasi-anoxie (article 2, supplementary data). A l'inverse, dans les hydrogels dépourvus d'amidon/AMG, plus de 90% de ces cellules meurent avant 7 jours en quasi-anoxie (article 2, supplementary data). Ces observations obtenues *in vitro* restent encore à confirmer au sein d'un modèle ectopique puis orthotopique.

Dans le cas présent, l'hydrogel nutritif représente une stratégie d'intérêt pour améliorer la survie de cellules, dont le métabolisme énergétique post-implantation est étroitement dépendant du glucose et de la glycolyse. On ne peut cependant pas exclure à ce stade que la survie ou la fonctionnalité de ces cellules ne requièrent pas la présence d'autres nutriments pour obtenir une survie et une fonctionnalité optimale. De plus, d'autres types cellulaires peuvent avoir des besoins nutritifs différents (Mylotte et al., 2008). Pour ces raisons, il nous semble indispensable de mieux caractériser, pour chaque type cellulaire envisagé, les besoins nutritifs, à l'aide (i) d'études transcriptomiques de gènes spécifiques impliqués dans les différentes voies métaboliques et (ii) d'inhibiteurs spécifiques de voies métaboliques, afin de développer des hydrogels spécifiques en fonction des besoins nutritifs des cellules utilisées.

4.2 Améliorer le potentiel paracrin des CSMs en environnement ischémique

Faire survivre les CSMs en environnement ischémique est une condition nécessaire mais pas suffisante pour optimiser la fonctionnalité cellulaire en ingénierie tissulaire. En effet, les CSMs doivent non seulement être capables de survivre mais également de participer activement au processus de réparation du tissu et organe lésé, en contribuant notamment à la migration des cellules de l'hôte (potentiel chimiotactique) ainsi qu'à la formation de nouveaux vaisseaux sanguins (potentiel pro-angiogène) post-implantation (Mishima et al., 2008 ; Boomsma et al., 2012).

4.2.1 Impact sur le sécrétome

La formation de nouveaux vaisseaux sanguins, permettant l'apport d'oxygène et surtout de glucose au niveau du site d'implantation, est un élément clé pour réduire l'ischémie locale et réparer le tissu lésé (Carano and Filvaroff, 2003). En 14 jours, les hydrogels nutritifs d'amidon/AMG (ensemencés avec des hCSMs) montrent une colonisation par les nouveaux vaisseaux sanguins, 3.3 et 2.9 fois supérieure à celle évaluée autour des hydrogels chargés en glucose ou dépourvus en glucose, respectivement (article 2, figure 6). La cinétique de formation de ces nouveaux vaisseaux sanguins a d'ailleurs été évaluée à 122 $\mu\text{m}/\text{jour}$ autour des hydrogels d'amidon/AMG, soit 2.2 fois supérieure à la cinétique mesurée autour des deux autres groupes d'hydrogels (data not shown).

De plus, après avoir été maintenues pendant 14 jours dans les hydrogels d'amidon/AMG au sein du modèle d'ischémie *in vitro*, les hCSMs sécrétaient des facteurs de croissance pro-angiogènes (VEGF-A, VEGF-C, VEGF-D, ANGPT-1, ANGPT-2, ANG et FGF-basic) et chimiotactiques (IL-8, MCP-1, MIF, ENA-78, MIP-2, et IP-10) en quantités 3 à 24 fois supérieures par rapport aux hCSMs maintenues dans les hydrogels chargés en glucose exogène ou dépourvus en glucose (article 2, figure 4). Ces résultats corroborent ceux obtenus dans l'étude de Paquet et al., démontrant qu'en présence de glucose au sein d'un environnement quasi-anoxique *in vitro*, les hCSMs conservent leur potentiel de sécrétion de facteurs de croissance pro-angiogènes et chimiotactiques ; au contraire, ces cellules n'étaient plus capables de sécréter ces facteurs de croissance dans ces conditions en absence de glucose (Paquet et al., 2016).

L'hydrogel nutritif représente ainsi une stratégie d'intérêt pour améliorer le potentiel paracrin des CSMs post-implantation. A posteriori, cette stratégie pourrait être étudiée avec d'autres types cellulaires, utilisés notamment en ingénierie tissulaire pour leurs propriétés paracrines.

4.2.2 Limites de l'étude

Le potentiel pro-angiogène du secrétome des hCSMs maintenues dans les hydrogels nutritifs au sein du modèle d'ischémie pourrait être davantage étudié *in vitro*. Pour cela, des cellules HUVECs seront cultivées sur du Matrigel® (membrane basale efficace pour la différenciation des cellules épithéliales) en présence des milieux conditionnés obtenus à partir des hCSMs maintenues au sein des hydrogels d'amidon/AMG dans le modèle d'ischémie *in vitro* après 7 et 14 jours. La longueur cumulée des pseudotubes formés à partir des cellules HUVECs sera quantifiée après 24 heures de culture, puis comparée à celle obtenue après culture des HUVECs en présence des milieux conditionnés obtenus à partir des hCSMs maintenues dans les hydrogels dépourvus d'amidon/AMG, comme décrit dans l'étude de Ribot (Ribot et al., 2017).

L'impact du glucose sur les propriétés d'immunomodulation des CSMs n'a pas été étudié. Pour cela, les hCSMs seront cultivées *in vitro* avec des concentrations croissantes de glucose pendant 7 et 14 jours. Les concentrations de cytokines sécrétées par les hCSMs dans les milieux de culture, tels que le TGF, HGF ou encore SDF-1, seront quantifiées (Ménard and Tarte, 2011 ; Wang et al, 2014).

Les études menées autour de la fonctionnalité des hCSMs se sont limitées à leurs fonctions paracrines. Le potentiel de différenciation de ces cellules n'a pas été abordé. Pour approfondir cet axe, il sera envisagé d'étudier la différenciation des hCSMs vers les voies ostéogénique (Jaiswal et al., 1997), chondrogénique (Yoo et al., 1998 ; Murphy et al., 1998) et adipogénique (Fink and Zackar, 2012), ayant été au préalableensemencées dans les hydrogels nutritifs maintenus au sein du modèle ischémique *in vitro* à des temps définis, puis de comparer les résultats de différenciation avec des hCSMs ayant été cultivées sur la même durée en conditions standards.

5. Applications et optimisation de l'hydrogel nutritif

Bien que l'hydrogel nutritif d'amidon/AMG développé dans ce projet de doctorat permette d'améliorer la survie et la fonctionnalité des CSMs jusqu'à 14 jours, à la fois dans le modèle ischémique *in vitro* et post-implantation, l'amidon utilisé dans ce dispositif innovant ne se résorbe pas intégralement à la fin de l'étude. En effet, maintenus pendant 21 jours dans le modèle d'ischémie *in vitro*, les hydrogels d'amidon/AMG présentaient macroscopiquement une résorption par rapport à leur taille initiale, mais contenaient toujours une structure blanchâtre réminiscente de l'amidon et de taille importante. De plus, après 21 jours d'implantation en modèle ectopique, la composante amidon de l'hydrogel était toujours présente sur les coupes histologiques après coloration au lugol, pouvant empêcher le processus de réparation tissulaire (article 2, figure 5).

5.1 Application vers des hydrogels semi ou non résorbables

L'absence de résorption totale de l'hydrogel nutritif lui confère un avantage dans la perspective de réparation d'un tissu lésé sans remplacement, tels que le comblement de rides profondes, dans lequel l'hydrogel pourrait être ensemencé par des CSMs engagées vers un phénotype adipocytaire afin de mimer une autogreffe grasseuse. Dans ce contexte de comblement de tissus mous, les produits utilisés sont souvent (i) semi ou non résorbables, (ii) facilement injectables, (iii) non immunogènes et (vi) biomécaniquement proches du tissu à combler (Solomon et al., 2012).

L'hydrogel nutritif étant constitué à plus de 95% d'eau, il présente une structure molle, malléable et relativement élastique. D'un point de vue biomécanique, un biomatériau est généralement caractérisé par ses propriétés principales : rigidité, dureté, ténacité et limite d'élasticité (Tillier, 2013). Ces propriétés n'ont pas été évaluées sur l'hydrogel nutritif et devront être quantifiées à l'avenir afin de les comparer à celles des tissus à combler.

L'utilisation et les applications de l'hydrogel nutritif en tant qu'agent injectable semi-résorbable mériteraient ainsi des recherches plus approfondies dans la perspective de comblement de tissus mous.

5.2 Application vers des hydrogels résorbables

Alternativement, dans le contexte d'un comblement tissulaire avec remplacement, la vitesse de résorption des hydrogels nutritifs doit être optimisée afin que ceux-ci se dégradent progressivement jusqu'à une résorption totale, au profit du tissu nouvellement formé.

Afin de répondre à ce défi technique, la suite du présent projet de doctorat sera de développer une gamme d'hydrogels dont la vitesse de résorption sera modulable. Pour cela, trois axes principaux seront étudiés : (i) le choix d'alternatives à l'amidon de blé comme source de glucose, (ii) le maintien de l'enzyme à l'intérieur de l'hydrogel et (iii) la préservation de l'activité enzymatique au sein de l'hydrogel.

5.2.1 Choix du polymère de glucose et alternatives

D'un point de vue chimique, et comme décrit dans le chapitre 3 (cf. 3.5), l'amidon est un mélange de deux homopolymères : (i) l'amylose, longue chaîne linéaire de glucoses reliés entre eux par des liaisons glycosidiques $\alpha(1-4)$ (Buléon et al., 1998) et (ii) l'amylopectine, chaînes de glucoses ramifiées sur la chaîne linéaire via des liaisons glycosidiques $\alpha(1-6)$ (Perez et al., 1988). Le ratio amylose/amylopectine dépend de l'origine végétale de l'amidon : amidon de blé (30/70) ; amidon de maïs (25/75) ; amidon de pomme de terre (20/80) ; amidon de riz (2/98) (Hood et al., 1982 ; Jane et al., 1992 ; Seguchi et al., 1994 ;

Hegenbart et al., 1996). La viscosité de l'amidon dépend directement de la proportion d'amylopectine par rapport à l'amylose : plus le ratio amylose/amylopectine diminue, plus la viscosité de l'amidon augmente et, par conséquent, le polymère de glucose devient de plus en plus difficile à homogénéiser (Hegenbart et al., 1996). A concentration identique en amidon, une meilleure homogénéisation de l'amidon de blé dans les hydrogels de fibrine était observée par rapport aux sources précédentes d'amidon (data not shown). De plus, le glucose était libéré sur un temps plus long à travers les hydrogels d'amidon de blé/AMG par rapport aux hydrogels d'amidon de maïs/AMG, d'amidon de pomme de terre/AMG et d'amidon de riz/AMG (data not shown), suggérant une production de glucose à plus long terme à l'intérieur des hydrogels contenant l'amidon de blé. Pour ces raisons, le polymère de glucose retenu dans l'ensemble de ce projet a été l'amidon de blé.

L'AMG hydrolyse successivement les liaisons glycosidiques $\alpha(1-4)$ de l'amidon à partir des extrémités non réductrices (Pazur et al., 1959), mais n'est pas, ou très peu, capable d'hydrolyser les liaisons glycosidiques $\alpha(1-6)$ (Batey, 1982). L'AMG, utilisée dans ce projet comme enzyme exclusive, n'est donc pas capable d'hydrolyser la totalité de l'amidon, ce qui explique l'absence de résorption totale du polymère de glucose dans l'hydrogel nutritif. Ce taux de résorption pourrait d'ailleurs être quantifié *in vitro* par pesée du poids sec de l'hydrogel d'amidon/AMG à différents temps et en comparaison avec la masse initiale de l'hydrogel.

L'utilisation d'un nouveau polymère de glucose de type maltodextrine, c'est-à-dire d'un amidon préalablement hydrolysé sur les liaisons glycosidiques $\alpha(1-6)$, est actuellement en cours d'étude. En effet, la maltodextrine, polymère de glucose linéaire, devrait à terme être entièrement dégradée par l'AMG. Une collaboration scientifique avec la société agro-alimentaire ROQUETTE FRERES, pionnier dans le domaine de la transformation de l'amidon et de ses dérivés, a été récemment contractualisée afin de poursuivre le projet dans cette perspective.

5.2.2 Limiter la diffusion de l'AMG hors de l'hydrogel

Au sein des hydrogels nutritifs, le maintien de l'AMG, nécessaire à la production du glucose, est indispensable pour améliorer la survie cellulaire au sein des hydrogels dans les conditions ischémiques. Or, l'AMG est une enzyme de petite taille (10 nm de diamètre) rapidement diffusible à travers une matrice (Fogarty et al., 1983).

D'après la théorie de Stokes-Einstein, le coefficient de diffusion d'un soluté est inversement proportionnel à la viscosité de son solvant (Einstein, 1905 ; Sutherland, 1906). En d'autres termes, plus le solvant est visqueux, plus la diffusion du soluté hors du solvant est ralentie. En appliquant cette théorie à

l'hydrogel nutritif, la diffusion de l'AMG hors de l'hydrogel serait ralentie lorsque la viscosité (donc la concentration) d'amidon augmente. D'après l'étude de Boisselier, plus de 80% de la quantité initiale d'AMG était diffusée hors des hydrogels sans amidon après une heure, puis l'enzyme était totalement diffusée après 6 heures (Boisselier, 2016). A travers les hydrogels d'amidon 2%, la diffusion de l'AMG était fortement ralentie. En effet, seulement 55% de la quantité initiale d'AMG était diffusée hors de ces hydrogels après 6 heures ; cette diffusion semblait être stabilisée après cette période (Boisselier, 2016). Ainsi, de par son effet viscogène, l'amidon permettrait de ralentir la diffusion de l'AMG hors des hydrogels nutritifs.

Afin de maintenir l'AMG plus longtemps dans l'hydrogel nutritif, l'utilisation de systèmes innovants pour la délivrance de l'enzyme devra être étudiée. Par exemple, Mickova et al. ont démontré que l'encapsulation de facteurs de croissance (TGF β , IGF1 et β FGF) au sein de liposomes intégrés à une matrice de nanofibres de polyalcool de vinyle / polycaprolactone permettait de ralentir leur diffusion de 10 jours par rapport à ces mêmes facteurs de croissance non encapsulés (Mickova et al., 2012). Un autre système de délivrance enzymatique pouvant également être utilisé dans l'objectif de limiter la diffusion de l'AMG hors de l'hydrogel nutritif sera explicité au prochain paragraphe.

5.2.3 Préserver l'activité enzymatique dans l'hydrogel

L'AMG doit rester active au cours du temps pour produire en continu le glucose dans l'hydrogel. Toutefois, d'après les études de Boisselier, le temps de demi-vie de l'AMG maintenue *in vitro* à 37°C dans une solution tampon (Hepès) est de 7 jours (Boisselier, 2016). Après 14 jours dans ces conditions, l'activité résiduelle de l'AMG n'était plus que de 25% (Boisselier, 2016). L'activité de l'AMG décroît donc au cours du temps dans les hydrogels nutritifs. L'observation d'une diminution de 26% de la quantité de glucose dans l'hydrogel d'amidon/AMG non cellularisé entre le 7^{ème} et le 14^{ème} jour d'implantation pourrait également aller dans ce sens (article 2, figure 1). Une limite de notre étude est l'absence de la mesure de l'activité de l'AMG au sein de l'hydrogel cellularisé après implantation. Cette mesure nous paraît indispensable pour pouvoir conclure quant à la nécessité de mettre en œuvre des méthodes de délivrance et de protection de l'activité AMG plus sophistiquées.

Si l'activité de l'AMG s'avérait insuffisante pour assurer une production de glucose permettant la survie des CSMs ainsi que l'expression de leurs fonctions paracrines sur un temps suffisant, l'encapsulation de l'AMG dans des nanoparticules permettrait de protéger l'enzyme, limitant ainsi la perte de son activité au cours du temps. Ainsi, dans la suite de ce projet, l'AMG sera encapsulée dans des nanoparticules composées de poly(lactique-co-glycolique) (PLGA), polymère biodégradable, biocompatible et approuvé par la Food and Drug Administration (FDA) (Danhier et al., 2012). Ces

nanoparticules contenant l'AMG pourraient être synthétisées via la technique de double émulsion par le laboratoire ERMECE (Université Cergy-Pontoise) (Solbrig and Saltzman, 2006 ; Boisselier, 2016).

Des traitements chimiques ou physiques pourraient également permettre à l'AMG d'être plus résistante face aux facteurs extérieurs. Une étude menée par Tyagi et Gupta a par exemple montré que le traitement de l'AMG avec l'acide polyamique (1 mg/mL) permettait de prolonger son activité par rapport à une AMG non traitée, lorsque celle-ci est confrontée à des températures comprises entre 37°C et 120°C (Tyagi and Gupta, 1993).

5.3 Injectabilité

Le produit de comblement doit être facilement injectable, c'est-à-dire qu'il doit présenter une force de poussée inférieure à 25 N à travers une seringue de petit diamètre (supérieur à 20 G) (Affolter et al., 2013). Cette propriété permet de limiter la douleur liée à l'injection chez les patients. La viscosité importante de la fibrine rend l'hydrogel nutritif difficilement injectable à travers une seringue de petit diamètre ; la force de poussée de l'hydrogel s'élève à 33 N à travers une seringue 22 G (Boisselier et al., 2016). Afin de pallier cette difficulté, Boisselier a proposé d'utiliser une seringue double corps dont le premier compartiment contenait amidon et thrombine et le second fibrinogène et AMG. Dans ces conditions, la force de poussée était inférieure à 3 N à travers une seringue 22 G et l'hydrogel nutritif s'avérait facilement injectable (Boisselier, 2016).

5.4 Biocompatibilité de l'hydrogel nutritif

Les études *in vivo* autour de l'hydrogel nutritif ayant été effectuées sur le modèle de souris immunodéprimée, l'aspect immunogène du dispositif (constitué entre autre d'amidon, de fibrine, d'AMG et d'aprotinine), n'a pas été évalué au cours de ce projet. Cette propriété importante devra être étudiée à l'avenir (Mendes et al., 2001 ; Torres et al., 2011).

L'amidon, constituant majoritaire de l'hydrogel nutritif, ne devrait théoriquement pas entraîner de réaction inflammatoire. Ce polymère de glucose d'origine végétale a déjà fait la preuve de biocompatibilité *in vitro* et post-implantation. En effet, le taux de viabilité, le temps de doublement ainsi que la morphologie de CSMs cultivées pendant 7 jours en présence d'amidon (0.8 g) étaient semblables à ceux des CSMs cultivées en conditions standards (Meskinfam et al., 2011). Aucun signe macroscopique d'infection ni d'inflammation n'a été observé autour de particules d'amidon implantées en ectopique chez le rat (non immunodéprimé) pendant 8 jours. De plus, aucun macrophage n'a été détecté autour des particules d'amidon sur les coupes histologiques (Beilvert et al., 2013).

La fibrine, responsable du réseau tridimensionnel de l'hydrogel, favorise l'adhérence et la prolifération *in vitro* de nombreux types cellulaires (Zhao et al., 2008 ; Janmey et al., 2009), dont les CSMs (Bensaïd et al., 2003). De plus, la preuve de biocompatibilité de la fibrine a été démontrée post-implantation, notamment en modèle ectopique chez le chien (Terasaka et al., 2005), ainsi qu'en en modèle orthotopique chez le rat (US005631011A, 1997). La fibrine est d'ailleurs utilisée en clinique comme colle chirurgicale (par exemple Tissucol®, Quixil® ou Biocol® ; Nizamaldi and Samson, 2012).

D'après des études *in vitro* menées au laboratoire B3OA, la concentration d'aprotinine (500 U/mL) utilisée dans l'hydrogel nutritif n'affecte pas la viabilité *in vitro* des CSMs (data not shown). Aucune étude ne porte sur l'impact de cette enzyme sur la viabilité des CSMs. De plus, nous n'avons également, à l'heure actuelle, aucune donnée concernant la biocompatibilité de l'AMG sur les CSMs ni sur d'autres types cellulaires. Une évaluation de l'impact de la concentration d'AMG sur la viabilité cellulaire devra être réalisée.

CONCLUSION

Ce projet de doctorat avait pour objectifs (i) de mieux comprendre le métabolisme énergétique emprunté par le glucose au sein des CSMs après implantation, puis (ii) de développer et évaluer une stratégie basée sur l'apport continu de glucose pour améliorer la survie et la fonctionnalité des CSMs post-implantation. Afin de répondre à ce problème, deux études ont été menées.

La première étude visait à comprendre davantage le métabolisme énergétique emprunté par le glucose au sein des CSMs après implantation.

Au sein de cet environnement, les CSMs produisent leur énergie sous forme d'ATP exclusivement via la glycolyse à partir d'un unique substrat, le glucose. Or, le glucose manque dans cet environnement ischémique et les CSMs possèdent des réserves glycolytiques très limitées qu'elles vident en 24 heures, puis consomment la totalité de leurs réserves d'ATP en 3 jours, entraînant une mort cellulaire massive et rapide. Par ailleurs, nous avons également démontré que les conditions quasi-anoxiques (0.1% pO₂) associées à l'absence de glucose reflètent au mieux *in vitro* le microenvironnement d'implantation *in vivo*.

Basée sur ces résultats ainsi que sur d'autres études préalables du laboratoire renforçant le rôle clé du glucose dans la stratégie de maintien de la survie des CSMs après-implantation, **la seconde étude consistait à développer puis à évaluer une stratégie basée sur l'apport continu de glucose pour améliorer la survie et la fonctionnalité des CSMs post-implantation.**

Nous avons, pour la première fois, apporté la preuve de concept qu'un hydrogel nutritif, composé d'un système de polymère de glucose (amidon) et d'une enzyme (amyloglucosidase), permet d'améliorer la survie de CSMs pendant 14 jours, à la fois au sein d'un modèle ischémique *in vitro* et post-implantation dans un modèle ectopique. De plus, ce dispositif innovant permet d'améliorer les fonctions paracrines des CSMs, augmentant notamment la néovascularisation jusqu'à 21 jours après implantation.

En augmentant la survie ainsi que la fonctionnalité des CSMs après implantation grâce à un apport continu en glucose, l'hydrogel nutritif composé d'amidon et d'AMG apparaît comme une stratégie d'intérêt pour améliorer les résultats thérapeutiques des produits à base de CSMs, et plus généralement de cellules souches, utilisés en ingénierie tissulaire.

RÉFÉRENCES

- Affolter, K. E., Schmidt, R. L., Matynia, A. P., Adler, D. G. & Factor, R. E. Needle size has only a limited effect on outcomes in EUS-guided fine needle aspiration: A systematic review and meta-analysis. *Dig. Dis. Sci.* 58, 1026–1034 (2013).
- Amsel, S., Maniatis, A., Tavassoli, M. & Crosby, W. H. The significance of intramedullary cancellous bone formation in the repair of bone marrow tissue. *Anat. Rec.* 164, 101–111 (1969).
- Arora, M. Cell Culture Media: A Review. *Mater. Methods* 3, 1–29 (2013).
- Aubert, A., Costalat, R., Magistretti, P. J., Pellerin, L. Brain lactate kinetics: Modeling evidence for neuronal lactate uptake upon activation. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 102, 16448–16453 (2005).
- Batey, I. L. Starch Analysis Using Thermostable alpha-Amylases. *Starch/Starke* 34, 125–128 (1982).
- Becquart, P. *et al.* Ischemia is the prime but not the only cause of human multipotent stromal cell death in tissue-engineered constructs in vivo. *Tissue Eng. Part A* 18, 2084–2094 (2012).
- Beegle, J. *et al.* Hypoxic preconditioning of mesenchymal stromal cells induces metabolic changes, enhances survival, and promotes cell retention in vivo. *Stem Cells* (2015).
- Beilharz, M. & Grounds, M. Rapid Death of Injected Myoblasts in Myoblast. *Muscle & nerve.* 853–860 (1996).
- Beilvert, A., Chaubet, F., Chaunier, L., Guilois, S., Pavon-djavid, G., Letourneur, D., Meddahi-Pellé, A., Lourdin, D. Shape-memory starch for resorbable biomedical devices. *Carbohydrate Polymers*, 99, 242–248 (2014).
- Benita, Y. *et al.* An integrative genomics approach identifies Hypoxia Inducible Factor-1 (HIF-1)-target genes that form the core response to hypoxia. *Nucleic Acids Res.* 37, 4587–4602 (2009).
- Bensaïd, W. *et al.* A biodegradable fibrin scaffold for mesenchymal stem cell transplantation. *Biomaterials* 24, 2497–2502 (2003).
- Berl, S., Clark DD. *Handbook of neurochemistry, Chemical and cellular architecture* (1969)
- Boisselier, J. Mise en oeuvre d'un système de confinement et de délivrance moléculaire pour la production *in situ* de glucose au sein d'un hydrogel conçu pour l'ingénierie tissulaire. Doctorat. (2016)
- Boomsma, R. A. & Geenen, D. L. Mesenchymal stem cells secrete multiple cytokines that promote angiogenesis and have contrasting effects on chemotaxis and apoptosis. *PLoS One* 7, 2–9 (2012).
- Boutilier, R. G. Mechanisms of cell survival in hypoxia and hypothermia. *J. Exp. Biol.* 204, 3171–3181 (2001).
- Braun, D. *et al.* Hypoxia in the thymus : role of oxygen tension in thymocyte survival. 27710, 1467–1477 (2002).
- Bruder, S. P., *et al.* Mesenchymal Stem Cells in Osteobiology and Applied Bone Regeneration. *Clinical Orthopaedics & Related Research.* 10001 (1998).
- Bruder, S. P., Fink, D. J. & Caplan, A. I. Mesenchymal stem cells in bone development, bone repair, and skeletal regeneration therapy. *J. Cell. Biochem.* 56, 283–294 (1994).
- Buléon A., Colonna P., Planhot V. & Ball S. Starch granules: Structure and biosynthesis. *Int. J. Biol. Macromol.* 23, 85–112 (1998).
- Caplan, A. Mesenchymal stem cells. *Journal of orthopaedic research : official publication of the Orthopaedic Research Society*, 9(5), pp.641–50 (1991).
- Carano, R. A. D. & Filvaroff, E. H. Angiogenesis and bone repair. *Drug Discov. Today* 8, 980–9 (2003).

- Carrancio, S. *et al.* Optimization of mesenchymal stem cell expansion procedures by cell separation and culture conditions modification. *Exp. Hematol.* 36, 1014–1021 (2008).
- Catelas, I. *et al.* Human Mesenchymal Stem Cell Proliferation and Osteogenic Differentiation in Fibrin Gels in Vitro. *Tissue Eng.* 12, 2385–2396 (2006).
- Chamberlain, G., Fox, J., Ashton, B., Middleton, J. Concise Review: Mesenchymal Stem Cells: Their Phenotype, Differentiation Capacity, Immunological Features, and Potential for Homing. *Stem Cells* 25, 2739–2749 (2007).
- Chandel, N.S. Navigating Metabolism, *Cold Spring Harbor* (2015).
- Charbord, P. Bone marrow mesenchymal stem cells: historical overview and concepts. *Human gene therapy*, 21(9), pp.1045–56 (2010).
- Cheung, T. H. & Rando, T. A. Molecular regulation of stem cell quiescence. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* (2013).
- Chirani, N., Yahia, L. H., Gritsch, L., Motta, F. L. & Natta, C. G. History and Applications of Hydrogels (Abstract). *J. Biomed. Sci.* 4, 1–23 (2015).
- Chow, D. C., Wenning, L. A., Miller, W. M. & Papoutsakis, E. T. Modeling pO₂ distributions in the bone marrow hematopoietic compartment. II. Modified Kroghian models. *Biophys. J.* 81, 685–696 (2001).
- CNRS, European Patent Office, EP14306700, TIME Controlled Glucose releasing hydrogel and applications thereof (2015).
- Cook, C. A., Hahn, K. C., Morrissette-McAlmon, J. B. F. & Grayson, W. L. Oxygen delivery from hyperbarically loaded microtanks extends cell viability in anoxic environments. *Biomaterials* 52, 376–384 (2015).
- Danhier, F. *et al.* PLGA-based nanoparticles: An overview of biomedical applications. *J. Control. Release* 161, 505–522 (2012).
- Das, R., Jahr, H., van Osch, G. J. V. M. & Farrell, E. The Role of Hypoxia in Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stem Cells: Considerations for Regenerative Medicine Approaches. *Tissue Eng. Part B Rev.* 16, 159–168 (2010).
- Degano, I. R. *et al.* Bioluminescence imaging of calvarial bone repair using bone marrow and adipose tissue-derived mesenchymal stem cells. *Biomaterials* 29, 427–437 (2008).
- Deschepper M. Contribution à la compréhension et à la prévention de la mort des cellules souches mésenchymateuses après implantation en site ischémique. Doctorat (2011)
- Deschepper, M. *et al.* Proangiogenic and prosurvival functions of glucose in human mesenchymal stem cells upon transplantation. *Stem Cells* 31, 526–535 (2013).
- Deschepper, M. *et al.* Survival and function of mesenchymal stem cells (MSCs) depend on glucose to overcome exposure to long-term, severe and continuous hypoxia. *Journal of cellular and molecular medicine.* 15, 1505–1514 (2011).
- Dominici, M. *et al.* Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy* 8, 315–7 (2006).
- Druecke, D. *et al.* Neovascularization of poly(ether ester) block-copolymer scaffolds in vivo: Long-term investigations using intravital fluorescent microscopy. *J. Biomed. Mater. Res. - Part A* 68, 10–18 (2004).
- Eyrich, D. *et al.* Long-term stable fibrin gels for cartilage engineering. *Biomaterials* 28, 55–65 (2007).

- Fang BJ, Liao LM, Yang SG, Liu YH, Zhao CH. [Flk1+ mesenchymal stem cells ameliorate carbon tetrachloride-induced liver fibrosis in mice]. *Sheng Wu Gong Cheng Xue Bao*, 21(3):396-401 (2004).
- Fiedler, J., Brill, C., Blum, W. F. & Brenner, R. E. IGF-I and IGF-II stimulate directed cell migration of bone-marrow-derived human mesenchymal progenitor cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 345, 1177–1183 (2006).
- Fogarty, W. M. & Benson, C. P. Applied Microbiology and Biotechnology Purification and Properties of a Thermophilic Amyloglucosidase from *Aspergillus niger*. *Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* 271–278 (1983).
- Folkman J, Hochberg M. Self-regulation of growth in three dimensions. *J Exp Med.* 138: 745-53 (1973).
- Folmes, C. D. L., Dzeja, P. P., Nelson, T. J. & Terzic, A. Metabolic plasticity in stem cell homeostasis and differentiation. *Cell Stem Cell* 11, 596–606 (2012).
- Friedenstein, A. J., Petrakova, K. V, Kurolesova, A. I. & Frolova, G. P. Heterotopic of bone marrow. Analysis of precursor cells for osteogenic and hematopoietic tissues. *Transplantation* 6, 230–247 (1968).
- Friedenstein, A.J., Chailakhjan, R.K. & Lalykina, K.S. The development of fibroblast colonies in monolayer cultures of guinea-pig bone marrow and spleen cells. *Cell and tissue kinetics*, 3(4), 393–403 (1970).
- Galperin, A., Long, T. J. & Ratner, B. D. Acrylamide-Based Scaffolds with Controlled Porosity for Tissue Engineering Applications. *Synthesis (Stuttg)*. 2583–2592 (2010).
- Geuze, R. E. *et al.* Luciferase Labeling for Multipotent Stromal Cell Tracking in Spinal Fusion Versus Ectopic Bone Tissue Engineering in Mice and Rats. *Tissue Eng. Part A* 16, 3343–3351 (2010).
- Giannoni, P. *et al.* Short-Time Survival and Engraftment of Bone Marrow. *Tissue Eng. Part A.* 15, (2009).
- Gong, L., Zhao, Y., Zhang, Y. & Ruan, Z. The Macrophage Polarization Regulates MSC Osteoblast Differentiation in vitro. *Ann. Clin. Lab. Sci.* 46, 65–71 (2016).
- Gothié, E., Pouysségur, J. HIF-1 : régulateur central de l’hypoxie. *Médecine/Science*, 18 : 70-8 (2002).
- Griffith, C. K. *et al.* Diffusion Limits of an in Vitro Thick Prevascularized Tissue. *Tissue Eng.* 11, (2005).
- Guillemot, F. *et al.* Design of new titanium alloys for orthopaedic applications. *Med. Biol. Eng. Comput.* 42, 137–141 (2006).
- Hammouda, G. A., Abd El Rahman, G. M., Abou Golayel, M. K. & Galhoom, R. A. Chondrogenic differentiation of cultured rat mesenchymal stem cells from bone marrow. *Egypt. J. Histol.* 34, 772–779 (2011).
- Hantgan, R. R. & Hermans, J. Assembly of Fibrin. *Assembly* 254, 11272–11281 (1979).
- Harris, R. A. & Harper, E. T. Glycolytic Pathway. *eLS* 1–8 (2015).
- Hegenbart S. Understanding starch functionality. *Food Product Design.* 5(10): 23-24, 26, 29-30, 32, 34 (1996).
- Hemphill, J.C., Morabito, D., Farrant, M. & Manley, G.T. Brain tissue oxygen monitoring in intracerebral hemorrhage. *Neurocrit Care* 3, 260–270 (2005).

- Hindupur K., et al. The Opposing Actions of Target of Rapamycin Growth Control. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 7, 1–20 (2015).
- Holland, S. K., Kennan, R. P., Schaub, M. M., Angelo, M. J. D. & Gore, J. C. Imaging Oxygen Tension in Liver and Spleen by ¹⁹F NMR. *Magnetic Resonance in Medicine* 29, 446–458 (2007)
- Horwitz, E. M. et al. Clarification of the nomenclature for MSC: The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy* 7, 393–395 (2005).
- Hu, X. et al. Transplantation of hypoxia-preconditioned mesenchymal stem cells improves infarcted heart function via enhanced survival of implanted cells and angiogenesis. *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.* 135, 799–808 (2008).
- Huang, W.-H. et al. Hypoxic mesenchymal stem cells engraft and ameliorate limb ischaemia in allogeneic recipients. *Cardiovasc. Res.* 101, 266–276 (2014).
- Hung, S. C. et al. Short-term exposure of multipotent stromal cells to low oxygen increases their expression of CX3CR1 and CXCR4 and their engraftment in vivo. *PLoS One* 2, (2007).
- Ivanovic, Z. Hypoxia or in situ normoxia: The stem cell paradigm. *J. Cell. Physiol.* 219, 271–275 (2009).
- Jaiswal, N., Haynesworth, S. E., Caplan, A. I. & Bruder, S. P. Osteogenic differentiation of purified, culture-expanded human mesenchymal stem cells in vitro. *J. Cell. Biochem.* 64, 295–312 (1997).
- Jane, J.L. & Chen, J.F. Effect of amylose molecular size and amylopectin branch chain length on paste properties of starch. *Cereal Chemistry.* 69, 60 – 65 (1992).
- Janmey, P. A., Winer, J. P. & Weisel, J. W. Fibrin gels and their clinical and bioengineering applications. *J. R. Soc. Interface* 6, 1–10 (2009).
- Jeevanantham, V. et al. Adult Bone Marrow Cell Therapy Improves Survival and Induces Long-Term Improvement in Cardiac Parameters : A Systematic Review and Meta-Analysis (2012).
- Jockenhoevel, S. et al. Fibrin gel and advantages of a new scaffold in cardiovascular. *European Journal of Cardio-thoracic Surgery* 19, 424–430 (2008).
- Judas, F., Rosa, S., Teixeira, L., Lopes, C. & Ferreira Mendes, A. Chondrocyte Viability in Fresh and Frozen Large Human Osteochondral Allografts: Effect of Cryoprotective Agents. *Transplant. Proc.* 39, 2531–2534 (2007).
- Jungermann, K. & Kietzmann, T. Role of oxygen in the zonation of carbohydrate metabolism and gene expression in liver. *Kidney Int.* 51, 402–412 (1997).
- Kaigler, D., Wang, Z., Horger, K., Mooney, D. J. & Krebsbach, P. H. VEGF scaffolds enhance angiogenesis and bone regeneration in irradiated osseous defects. *J. Bone Miner. Res.* 21, 735–744 (2006).
- Katz AJ, Llull R, Hedrick MH, Futrell JW. Emerging approaches to the tissue engineering of fat. *Clin Plast Surg.* 26(4):587-603 (1999).
- Kehat, I. et al. Human embryonic stem cells can differentiate into myocytes with structural and functional properties of cardiomyocytes. *J. Clin. Invest.* 108, 407–414 (2001).
- Kim, T. T. & Dyck, J. R. B. Is AMPK the savior of the failing heart ? *Trends Endocrinol. Metab.* 26, 40–48 (2015).
- Kimelman-Bleich, N. et al. The use of a synthetic oxygen carrier-enriched hydrogel to enhance mesenchymal stem cell-based bone formation in vivo. *Biomaterials* 30, 4639–4648 (2009).
- Kinnaird, T. et al. Marrow-Derived Stromal Cells Express Genes Encoding a Broad Spectrum of Arteriogenic Cytokines and Promote In Vitro and In Vivo Arteriogenesis Through Paracrine Mechanisms. *Circ. Res.* 94, 678–685 (2004).

- Kostelansky, M. S. *et al.* Calcium-Binding Site β_2 , Adjacent to the 'b' Polymerization Site, Modulates Lateral Aggregation of Protofibrils during Fibrin Polymerization. *Biochemistry* 43, 2475–2483 (2004).
- Laflamme, M. A. *et al.* Cardiomyocytes derived from human embryonic stem cells in pro-survival factors enhance function of infarcted rat hearts. *Nat. Biotechnol.* 25, 1015–1024 (2007).
- Larue, L. A Portrait of AKT Kinases: Human Cancer and Animal Models Depict a Family with Strong Individualities. *Cancer and Biology therapy*, 3, 268-75 (2004).
- Laschke, M. W. & Menger, M. D. Vascularization in tissue engineering: Angiogenesis versus inosculation. *Eur. Surg. Res.* 48, 85–92 (2012).
- Lasso, J. M. *et al.* Improving flap survival by transplantation of a VEGF-secreting endothelised scaffold during distal pedicle flap creation. *J. Plast. Reconstr. Aesthetic Surg.* 60, 279–286 (2007).
- Lee, H. Y., Kim, H. W., Lee, J. H. & Oh, S. H. Controlling oxygen release from hollow microparticles for prolonged cell survival under hypoxic environment. *Biomaterials* 53, 583–591 (2015).
- Lee, J. H., Yoon, Y. M. & Lee, S. H. Hypoxic Preconditioning Promotes the Bioactivities of Mesenchymal Stem Cells via the HIF-1 α -GRP78-Akt Axis. *Int. J. Mol. Sci.* 18, (2017).
- Leninger *et al.*, *Principles of biochemistry*, 5th edition (2008).
- Li, B., Davidson, J. M. & Guelcher, S. A. The effect of the local delivery of platelet-derived growth factor from reactive two-component polyurethane scaffolds on the healing in rat skin excisional wounds. *Biomaterials* 30, 3486–3494 (2009).
- Liss, M., *et al.* Injection of low and iso-osmolar contrast medium decreases oxygen tension in the renal medulla. *Biophysics*, 53, 698–702 (1998).
- Little, D. G., Ramachandran, M. & Schindeler, A. The anabolic and catabolic responses in bone repair. *J. Bone Joint Surg. Br.* 89–B, 425–433 (2007).
- Lloyd, S. G., Wang, P., Zeng, H. & Chatham, J. C. Impact of low-flow ischemia on substrate oxidation and glycolysis in the isolated perfused rat heart. *Am. J. Physiol. Circ. Physiol.* 287, H351–H362 (2004).
- Logeart-Avramoglou, D. *et al.* In vitro and in vivo bioluminescent quantification of viable stem cells in engineered constructs. *Tissue Eng. Part C. Methods* 16, 447–458 (2010).
- Loozen, L. D., Wegman, F., Öner, F. C., Dhert, W. J. A. & Alblas, J. Porous bioprinted constructs in BMP-2 non-viral gene therapy for bone tissue engineering. *J. Mater. Chem. B* 1, 6619–6626 (2013).
- López-Barneo, J., Ortega-Sáenz, P., Pardal, R., Pascual, A. & Piruat, J. I. Carotid body oxygen sensing. *Eur. Respir. J.* 32, 1386–1398 (2008).
- Lovett, M., Lee, K., Edwards, A. & Kaplan, D. L. Vascularization Strategies for Tissue Engineering. *Tissue Eng. Part B Rev.* 15, 353–370 (2009).
- Lunde, K. *et al.* Intracoronary Injection of Mononuclear Bone Marrow Cells in Acute Myocardial Infarction, *New England Journal.* 1199–1209 (2006).
- Lunt, S. Y. & Vander Heiden, M. G. Aerobic Glycolysis: Meeting the Metabolic Requirements of Cell Proliferation. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 27, 441–464 (2011).
- Macklin, P. *et al.* Mathematical Biology Multiscale modelling and nonlinear simulation of vascular tumour growth. *J. Math. Biol.* 765–798 (2009).
- Madden, L. R. *et al.* Proangiogenic scaffolds as functional templates for cardiac tissue engineering. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 107, 15211–15216 (2010).

- Manassero, M. *et al.* Comparison of Survival and Osteogenic Ability of Human Mesenchymal Stem Cells in Orthotopic and Ectopic Sites in Mice. *Tissue Eng. Part A* 22, 534–544 (2016).
- Martin-Rendon, E. *et al.* Autologous bone marrow stem cells to treat acute myocardial infarction: a systematic review. *Eur. Heart J.* 29, 1807–1818 (2008).
- Massaad-Massade. Hypoxie, HIF1- α et récepteurs aux œstrogènes. *91(9)*, 677–683 (2004).
- McGinley, L. M. *et al.* Mesenchymal stem cell survival in the infarcted heart is enhanced by lentivirus vector-mediated heat shock protein 27 expression. *Hum. Gene Ther.* 24, 840–851 (2013).
- McKeehan, W. L. Glutaminolysis in Animal Cells. *Carbohydr. Metab. Cult. Cells* 111–150 (1986).
- Ménard, C. & Tarte, K. Immunosuppression et cellules souches mésenchymateuses. *Médecine/Sciences* 27, 269–274 (2011).
- Mendes, SD., *et al.* Biocompatibility testing of novel starch-based materials with potential application in orthopaedic surgery: A preliminary study. *Biomater.* 22 (14), 2057–2064. (2001).
- Meskinfam, M., Sadjadi, M. A. S., Jazdarreh, H., & Zare, K. Biocompatibility evaluation of nano hydroxyapatite-starch biocomposites. *Journal of Biomedical Nanotechnology*, 7(3), 455–459 (2011).
- Mickova, A., *et al.* Core/Shell Nanofibers with Embedded Liposomes as a Drug Delivery System. *Biomacromolecules* 13, 952–962 (2012).
- Mik, E.G., van Leeuwen, T.G., Raat, N.J. & Ince, C. Quantitative determination of localized tissue oxygen concentration in vivo by twophoton excitation phosphorescence lifetime measurements. *J Appl Physiol* 97, 1962–1969 (2004).
- Mishima, Y. & Lotz, M. Chemotaxis of Human Articular Chondrocytes and Mesenchymal Stem Cells. *J. Orthop. Res.* 26, 1407–1412 (2008).
- Morrison, S. J., Prowse, K. R., Ho, P. Weissman, I. L. Telomerase activity in hematopoietic cells is associated with self-renewal potential. *Immunity* 5, 207–216 (1996).
- Moya, A. *et al.* Human Mesenchymal Stem Cell Failure to Adapt to Glucose Shortage and Rapidly Use Intracellular Energy Reserves Through Glycolysis Explains Poor Cell Survival After Implantation. *Stem Cells* 36, 363–376 (2018).
- Murphy, J. M., *et al.* Chondrogenic differentiation of cultured rat. *15. 4*, 1998 (1998).
- Mylotte, L. A. *et al.* Metabolic Flexibility Permits Mesenchymal Stem Cell Survival in an Ischemic Environment. *Stem Cells* 26, 1325–1336 (2008).
- Nizamaldin, Y., & Samson, J. Hémostase locale en Chirurgie orale. 2ème partie : efficacité de la colle de fibrine. *Médecine Buccale Chirurgie Buccale*, 18(3), 193–210 (2012).
- Nuschke, A., Rodrigues, M., Wells, A. W., Sylakowski, K. & Wells, A. Mesenchymal stem cells/multipotent stromal cells (MSCs) are glycolytic and thus glucose is a limiting factor of in vitro models of MSC starvation. *Stem Cell Res. Ther.* (2016).
- Orr, F. W., Adamson, I. Y. R. & Young, L. Promotion of Pulmonary Metastasis in Mice by Bleomycin-induced Endothelial Injury. *Cancer Research.* 46, 891–897 (1986).
- Owen, M., Friedenstein, A. J. Stromal stem cells: marrow-derived osteogenic precursors. *Ciba Found. Symp.* 136, 42–60 (1988).
- Papenburg, B. J. *et al.* One-step fabrication of porous micropatterned scaffolds to control cell behavior. *Biomaterials* 28, 1998–2009 (2007).
- Paquet, J. *et al.* Oxygen Tension Regulates Human Mesenchymal Stem Cell Paracrine Functions. *Stem Cells Transl. Med.* 4, 1–13 (2015).

- PAZUR, J. H. & ANDO, T. The action of an amyloglucosidase of *Aspergillus niger* on starch and malto-oligosaccharides. *J. Biol. Chem.* 234, 1966–70 (1959).
- Pérez, S. & Bertoft, E. The molecular structures of starch components and their contribution to the architecture of starch granules: A comprehensive review. *Starch/Starke* 62, 389–420 (2010).
- Petite H, Viateau V, Bensaid W, et al. Tissue-engineered bone regeneration. *Nat Biotechnol.* 18: 959-63 (2000).
- Pittenger, M. F. *et al.* Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science.* 284, 143–147 (1999).
- Prabhakaran, K., Sampson, D. A. & Hoehner, J. C. Neuroblastoma survival and death: An in vitro model of hypoxia and metabolic stress. *J. Surg. Res.* 116, 288–296 (2004).
- Qu, D. *et al.* Angiogenesis and osteogenesis enhanced by bFGF ex vivo gene therapy for bone tissue engineering in reconstruction of calvarial defects. *J. Biomed. Mater. Res. Part A* 96 A, 543–551 (2011).
- Quarto, R., Mastrogiacomo, M., Cancedda, R. *N Engl J Med*, Vol. 344, No. 5 (2001).
- Ramos, V. *et al.* Improvement of Porous β -TCP Scaffolds with rhBMP-2 Chitosan Carrier Film for Bone Tissue Application. *Tissue Eng. Part A* 14, 1305–1319 (2008).
- Reinecke, H. & Murry, C. E. Taking the death toll after cardiomyocyte grafting: A reminder of the importance of quantitative biology. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 34, 251–253 (2002).
- Reinhardt, R. L., Jahagirdar, B. N., Lisberg, A., Blackstad, M., Ortiz-Gonzalez, X. R., Verfaillie, C. M., Largaespada, D. A. Pluripotency of mesenchymal stem cells derived from adult marrow. *Nature*, 447 (7146), 880–881 (2007).
- Ribot, J. *et al.* Type 2 diabetes alters mesenchymal stem cell secretome composition and angiogenic properties. *J. Cell. Mol. Med.* 21, 349–363 (2017).
- Rochat, A., Kobayashi, K. & Barrandon, Y. Location of stem cells of human hair follicles by clonal analysis. *Cell* 76, 1063–1073 (1994).
- Rose, U. M., Abrahamse, S. L., Jansen, J. W. C. M., Bindels, R. J. M. & van Os, C. H. Cellular acidification occurs during anoxia in cultured, but not in freshly isolated, rabbit proximal tubular cells. *Pflügers Arch. Eur. J. Physiol.* 429, 722–728 (1995).
- Rosová, I., Dao, M., Capoccia, B., Link, D., Nolta, J. A. Hypoxic Preconditioning Results in Increased Motility and Improved Therapeutic Potential of Human Mesenchymal Stem Cells. *Stem Cells* 26, 2173–2182 (2008).
- Roth, SM. Why Does Lactic Acid Build Up in Muscles? And Why Does It Cause Soreness? *Scientific American* (2006).
- Roy, A. K. *et al.* Oxygen Sensing by Primary Cardiac Fibroblasts. 264–271 (2003).
- Russ, A. L., Haberstroh, K. M. & Rundell, A. E. Experimental strategies to improve in vitro models of renal ischemia. *Exp. Mol. Pathol.* 83, 143–159 (2007).
- Sakaida, I. *et al.* Transplantation of bone marrow cells reduces CCl₄-induced liver fibrosis in mice. *Hepatology* 40, 1304–1311 (2004).
- Salazar-Norato, G. *et al.* Understanding and leveraging cell metabolism to enhance mesenchymal stem cell transplantation survival in tissue engineering and regenerative medicine applications. *Stem Cells*, under revisions (2019).
- Sanchez-Ramos, J. *et al.* Adult bone marrow stromal cells differentiate into neural cells in vitro. *Exp. Neurol.* 164, 247–256 (2000).

- Santos, M. I. & Reis, R. L. Vascularization in bone tissue engineering: Physiology, current strategies, major hurdles and future challenges. *Macromol. Biosci.* 10, 12–27 (2010).
- Schechner, J. S. *et al.* In vivo formation of complex microvessels lined by human endothelial cells in an immunodeficient mouse. *PNAS*, 97, 9191–9196 (2000).
- Seguchi M, Higasa T, and Mori T. *Cereals Chem.*, 71:636 (1994).
- Sharifi, A. M., Eslami, H., Larijani, B. & Davoodi, J. Involvement of caspase-8, -9, and -3 in high glucose-induced apoptosis in PC12 cells. *Neurosci. Lett.* 459, 47–51 (2009).
- Shyh-Chang, N. & Ng, H. H. The metabolic programming of stem cells. *Genes Dev.* 31, 336–346 (2017).
- Simon, M. C. & Keith, B. The role of oxygen availability in embryonic development and stem cell function. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 9, 285–296 (2008).
- Skuk, D., Paradis, M., Goulet, M., & Tremblay, J. P. Ischemic central necrosis in pockets of transplanted myoblasts in nonhuman primates: Implications for cell-transplantation strategies. *Transplantation*, 84(10), 1307–1315 (2007).
- Slack, J. M. W. Stem cells in epithelial tissues. *Science.* 287, 1431–1433 (2000).
- Snyder, E. Y. *et al.* Engraftable human neural stem cells respond to development cues, replace neurons, and express foreign genes. *Nat. Biotechnol.* 16, 1033–1039 (1998).
- Solbrig, C. M., Cody, V. & Saltzman, W. M. Polymer Nanoparticles for Immunotherapy from Encapsulated Tumor-Associated Antigens and Whole Tumor Cells. *Mol. Pharmaceutic.* 4, 47–57 (2006).
- Solomon, P., Sklar, M. & Facial, R. Z. Facial soft tissue augmentation with Artecoll[®] : in 153 patients. *Can J Plast Surg.* 20, 28–32 (2012).
- Stegen, S. *et al.* HIF-1alpha Promotes Glutamine-Mediated Redox Homeostasis and Glycogen-Dependent Bioenergetics to Support Postimplantation Bone Cell Survival. *Cell Metab.* 23, 265–279 (2016).
- Suhaimi, H., Wang, S., Thornton, T. & Das, D. B. On glucose diffusivity of tissue engineering membranes and scaffolds. *Chem. Eng. Sci.* 126, 244–256 (2015).
- Sutherland, R. M. *et al.* Oxygenation and Differentiation in Multicellular Spheroids of Human Colon Carcinoma. *Cancer Res.* 46, 5320–5329 (1986).
- Sylvester, KG., Longaker MT. Stem cells: review and update. *Arch Surg.* 139(1):93-9 (2004).
- Szegezdi, E. *et al.* Metabolic Flexibility Permits Mesenchymal Stem Cell Survival in an Ischemic Environment. *Stem Cells* 26, 1325–1336 (2008).
- Terasaka, S., Iwasaki, Y., Shinya, N., & Uchida, T. Fibrin glue and polyglycolic acid nonwoven fabric as a biocompatible dural substitute. *Neurosurgery*, 58, 134–139 (2006).
- Thioredoxin, E. & Lemaster, D. M. Structural Determinants of the Catalytic Reactivity of the Buried Cysteine of. 2960, 14876–14881 (1996).
- Tillier, Y. De la caractérisation mécanique du comportement des matériaux à la modélisation biomécanique par éléments finis ; Applications à la simulation chirurgicale et au développement de dispositifs médicaux, HDR. HAL Id : tel-008. (2013).
- Tögel, F., Yang, Y., Zhang, P., Hu, Z. & Westenfelder, C. Bioluminescence imaging to monitor the in vivo distribution of administered mesenchymal stem cells in acute kidney injury. *Am. J. Physiol. Physiol.* 295, F315–F321 (2008).
- Tohyama, S. *et al.* Glutamine Oxidation Is Indispensable for Survival of Human Pluripotent Stem Cells. *Cell Metab.* 23, 663–674 (2016).

- Toma, C., Wagner, W. R., Bowry, S., Schwartz, A. & Villanueva, F. Fate Of Culture-Expanded Mesenchymal Stem Cells in The Microvasculature. *Circ. Res.* 104, 398–402 (2008).
- Torres, F. G., Troncoso, O. P., Grande, C. G. & Díaz, D. A. Biocompatibility of starch-based films from starch of Andean crops for biomedical applications. *Mater. Sci. Eng. C* 31, 1737–1740 (2011).
- Tracey, W. R. *et al.* Cardioprotective effects of ingliforib, a novel glycogen phosphorylase inhibitor. *Am. J. Physiol. Circ. Physiol.* 286, H1177–H1184 (2004).
- Tribst, A. A. L., Augusto, P. E. D. & Cristianini, M. Multi-pass high pressure homogenization of commercial enzymes: Effect on the activities of glucose oxidase, neutral protease and amyloglucosidase at different temperatures. *Innov. Food Sci. Emerg. Technol.* 18, 83–88 (2013).
- Tropel, P., Platet, N., Platel, J. C., Noel, D., Albrieux, M., Benabid, A. L., and Berger, F. Functional neuronal differentiation of bone marrow-derived mesenchymal stem cells. *Stem Cells* 24, 2868–2876 (2006).
- Tuan, S. *et al.* Adult mesenchymal stem cells and cell-based. *Arthritis Res. Ther.* 5, (2002).
- Tyagi, R., & Gupta, M,N. Noncovalent and reversible immobilization of chemically modified amyloglucosidase and beta-glucosidase on DEAE-cellulose. *Process Biochemistry*, 29, 443-448 (1993).
- United State Patent US005631011A, Tissue treatment composition comprising fibrin or fibrinogen and biodegradable and biocompatible polymer (1997).
- Vacanti, J. P. *et al.* Selective cell transplantation using bioabsorbable artificial polymers as matrices. *J. Pediatr. Surg.* 23, 3–9 (1988).
- Vacanti, J. P., Langer, R. Tissue engineering: the design and fabrication of living replacement devices for surgical reconstruction and transplantation. *Lancet (London, England)* 354 Suppl 1, S132-4 (1999).
- Vacanti, J. P., Bonnassar, L., Vacanti, M., Shufflebarger, J. Replacement of an avulsed phalanx with tissue-engineered bone, *N Engl J Med*, Vol. 344, No. 20 (2001).
- Valcourt, J. R. *et al.* Staying alive: metabolic adaptations to quiescence. *Cell Cycle* 11, 1680–1696 (2012).
- Van Griensven, M., Lemoine, C. Stratégies de réparation en orthopédie à l'aide des cellules souches épithéliales et mésenchymateuses. *Médecine de la Reproduction, Gynécologie Endocrinologie* 11, 63–70 (2009).
- Van Poll, D., Parekkadan, B., Borel Rinkes, I. H. M., Tilles, A. W. & Yarmush, M. L. Mesenchymal Stem Cell Therapy for Protection and Repair of Injured Vital Organs. *Cell. Mol. Bioeng.* 1, 42–50 (2008).
- Van Stroe-Biezen, S. A. M., Everaerts, F. M., Janssen, L. J. J., Tacke, R. A. Diffusion coefficients of oxygen, hydrogen peroxide and glucose in a hydrogel. *Anal. Chim. Acta* **273**, 553–560 (1993).
- Vemuri, M. C., Chase, L. G. & Rao, M. S. Mesenchymal stem cell assays and applications. *Methods Mol. Biol.* 698, 3–8 (2011).
- Villedieu, C. Rôle de la SIRT3 et de la déacétylation des protéines mitochondriales dans la cardioprotection : effet du vieillissement. Doctorat (2018).
- Vordermark, D. *et al.* Glucose requirement for hypoxic accumulation of hypoxia-inducible factor-1 α (HIF-1 α). *Cancer Lett.* 230, 122–133 (2005).
- Wakitani, S. *et al.* Autologous bone marrow stromal cell transplantation for repair of full-thickness articular cartilage defects in human patellae: two case reports. *Cell Transplant.* 13, 595–600 (2004).

- Wang Y, Chen X, Cao W, Shi Y. Plasticity of mesenchymal stem cells in immunomodulation: pathological and therapeutic implications. *Nat Immunol.* 15(11):1009-16 (2014).
- Ward, P. S. & Thompson, C. B. Metabolic Reprogramming: A Cancer Hallmark Even Warburg Did Not Anticipate. *Cancer Cell* 21, 297–308 (2012).
- WENGER, R. H. Cellular adaptation to hypoxia: O₂ -sensing protein hydroxylases, hypoxia-inducible transcription factors, and O₂ regulated gene expression. *FASEB J.* 16, 1151–1162 (2002).
- Wenger, R. H., Stiehl, D. P. & Camenisch, G. Integration of Oxygen Signaling at the Consensus HRE. *Sci. Signal.* 2005, re12-re12 (2005).
- Wild, J. M. *et al.* 3D volume-localized pO₂ measurement in the human lung with 3He MRI. *Magn. Reson. Med.* 53, 1055–1064 (2005).
- Williams, D. F. On the nature of biomaterials. *Biomaterials* 30, 5897–5909 (2009).
- Williams, D. F. The Biomaterials Conundrum in Tissue Engineering. *Tissue Eng. Part A* 20, 1129–1131 (2014b).
- Williams, D. F. There is no such thing as a biocompatible material. *Biomaterials* 35, 10009–10014 (2014a).
- Williams, K. J., Cowen, R. L. & Stratford, I. J. Hypoxia and oxidative stress in breast cancer Tumour hypoxia – therapeutic considerations. *Breast Cancer Res.* 3, 1–5 (2001).
- Wuertz, K., Godburn, K., Neidlinger-Wilke, C., Urban, J., Iatridis, JC. Behavior of mesenchymal stem cells in the chemical microenvironment of the intervertebral disc. *Spine.* 33(17):1843-9 (2008).
- Xu, C., Police, S., Rao, N., Carpenter, M.K. Characterization and enrichment of cardio- myocytes derived from human embryonic stem cells. *Circ. Res.* 91, 501–508 (2002).
- Yan, H. & Yu, C. Repair of Full-Thickness Cartilage Defects With Cells of Different Origin in a Rabbit Model. *Arthrosc. - J. Arthrosc. Relat. Surg.* 23, 178–187 (2007).
- Yang, SH. *Et al.* Chitosan/poly(vinyl alcohol) blending hydrogel coating improves the surface characteristics of segmented polyurethane urethral catheters. *J. Biomed. Mater. Res. B. Appl. Biomater.* 83, 340–344 (2007).
- Yu, J. S. L. & Cui, W. Proliferation, survival and metabolism : the role of PI3K / AKT / mTOR signalling in pluripotency and cell fate determination. 1, 3050–3060 (2016).
- Zarem, HA. The microcirculatory events within full-thickness skin allografts (homografts) in mice. *Surgery* 66, 392-7 (1969).
- Zhang, M. *et al.* SDF-1 expression by mesenchymal stem cells results in trophic support of cardiac myocytes after myocardial infarction. *FASEB J.* 21, 3197–3207 (2007).
- Zhao, H. *et al.* Fabrication and physical and biological properties of fibrin gel derived from human plasma. *Biomed. Mater.* 3, (2008).
- Zhu, H., Sun, A., Zou, Y. & Ge, J. Inducible metabolic adaptation promotes mesenchymal stem cell therapy for ischemia: a hypoxia-induced and glycogen-based energy prestorage strategy. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 34, 870–876 (2014).
- Zhu, W., Chen, J., Cong, X., Hu, S. & Chen, X. Hypoxia and Serum Deprivation-Induced Apoptosis in Mesenchymal Stem Cells. *Stem Cells* 24, 416–425 (2006).

ANNEXES

ARTICLE 3

Injectable Allograft Enhances Vertical Bone Augmentation in Rat Calvarium

Résumé JFBTM 2019

Titre

EVALUATION DU POTENTIEL OSTEOCONDUCTEUR D'UNE MATRICE OSSEUSE ALLOGENIQUE PARTIELLEMENT DEMINERALISEE DANS DES DEFAUTS DE DIFFERENTES TAILLES AU NIVEAU DE LA CALVARIA DE RAT

Auteurs

Diallo Ahmad Moustapha^{1,3}, Denoed Cyprien¹, Hanane El-Hafci¹, Hervé Petite¹, Morad Bensidhoum¹, Fani Anagnostou^{1,2}

Affiliations

1. Laboratoire Biologie, Bioingénierie et Bioimagerie Ostéo-Articulaires (B3OA) CNRS UMR 7052, INSERM U 1271, Paris, France
2. UFR Odontologie Garancière, Université Paris Diderot, Paris, FRANCE
3. Service de Parodontologie, Département d'Odontologie, Université Cheikh Anta Diop, Dakar, Sénégal

Résumé

Objectif : Des matrices osseuses allogéniques déminéralisées sont utilisés pour restaurer des défauts osseux mais leur potentiel ostéoformateur est variable. Une nouvelle formulation d'une matrice osseuse partiellement déminéralisée (MOPD) BioBank® issue d'os spongieux humain viro-inactivé a été mise au point. Elle est sous forme injectable permettant une mise en place du matériau facile et l'obtention d'un contact intime entre l'implant et les berges du défaut. L'objectif de cette étude était d'évaluer le potentiel ostéoconducteur de la MOPD dans la réparation de défauts osseux de calvaria de rat et son efficacité par rapport à la taille du défaut.

Matériel et méthodes : Pour cette étude 24 rats mâles WISTAR âgés de 12 semaines et répartis en 4 groupes de 6 animaux ont été utilisés. Des défauts osseux circulaires de 8-, 6- et 4 mm de diamètre ont été réalisés sur la calvaria. Les défauts de 8 mm sont soit laissés vides (groupe i) soit comblés avec la MOPD (groupe ii). Les défauts de 6- et 4 mm réalisés sur le même rat sont soit laissés vides (groupe iii) soit comblés avec la MOPD (groupe vi). La réparation des défauts a été suivie par micro-CT in vivo. Des acquisitions ont été effectuées à J0, J15, J30, J45 et J60. Après la mise à mort des animaux, les explants ont été fixés et traités en histologie non décalcifiée, puis des analyses histologiques et histomorphométriques ont été effectuées.

Résultats : L'analyse micro-CT a montré une augmentation de la radio-opacité de J0 à J60 dans les défauts de 4- et 6 mm non comblés ainsi que dans les défauts de 4-, 6-, et 8 mm de diamètre comblés avec la MOPD. Dans les défauts de 8- et de 6 mm de diamètre comblés avec la MOPD, le volume de radio-opacité à J30 et J60 était significativement supérieur ($P < 0,05$) à celui observé dans les défauts laissés vides. Dans les défauts comblés, l'os néoformé était présent autour et entre les particules de MOPD. De plus, dans les défauts de 8- et 6 mm comblés, la néoformation osseuse était respectivement 16 fois ($p < 0,001$) et 1,57 fois ($P < 0,05$) supérieure à celle des défauts laissés vides. Dans les défauts de 4 mm, la néoformation osseuse était quantitativement équivalente entre les défauts comblés avec la MOPD ou laissés vides.

Conclusion : La MOPD testée présente un potentiel ostéoconducteur intéressant pour des défauts de diamètre supérieur ou égale à 6mm.

Mots clés

- régénération osseuse; défaut osseux de calvaria de rat, matrice osseuse déminéralisée

EVALUATION DU POTENTIEL OSTEOCONDUCTEUR D'UNE MATRICE OSSEUSE ALLOGENIQUE PARTIELLEMENT DEMINERALISEE DANS DES DEFAUTS DE DIFFERENTES TAILLES AU NIVEAU DE LA CALVARIA DE RAT

DIALLO Ahmad^{1,3}, DENOEUDE C¹, EL-HAFICI H¹, BENOIST HM³, PETITE H¹, BENSIDHOUM M¹, ANAGNOSTOU F^{1,2}

1. Laboratoire B30A (Biologie, Bioingénierie et Biométrie Ostéo-Articulaire), CNRS, UMR 7052, INSERM, Paris, France
2. UFR d'Odontologie Garçonnienne, Université Paris Diderot, France
3. Département d'Odontologie, Service de Parodontologie, Université Cheikh Anta Diop de Dakar, SENEGAL

ahmadmdiallo@gmail.com

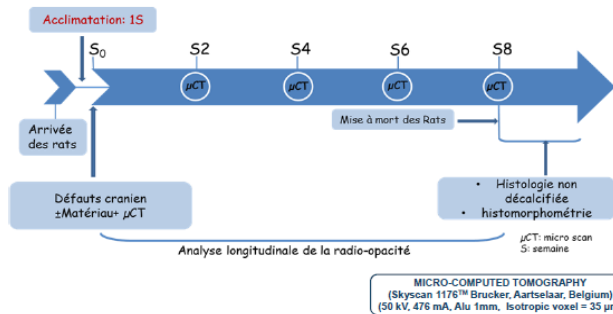
Contexte: Des matrices osseuses allogéniques déminéralisées sont utilisés pour restaurer des défauts osseux mais leur potentiel ostéoformateur est variable. Une nouvelle formulation d'une matrice osseuse partiellement déminéralisée (MOPD) BioBank® issue d'os spongieux humain viro-inactivé a été mise au point. Elle est sous forme injectable permettant une mise en place du matériau facile et l'obtention d'un contact intime entre l'implant et les berges du défaut.

Objectif: Evaluer le potentiel ostéoconducteur de la MOPD dans la réparation de défauts osseux de calvaria de rat et son efficacité par rapport à la taille du défaut.

Méthodes:

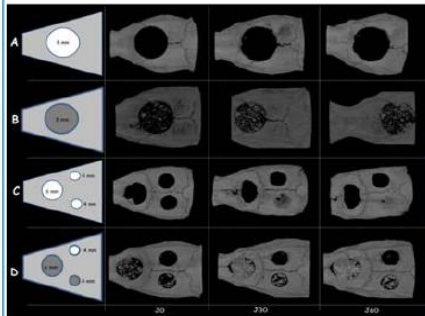
- MOPD mélangée avec de l'eau déionisée selon les instructions de BioBank®
- 24 rats Wistar, mâles, âgés de 12 semaines
- Défauts crâniens bicorticaux de taille critique (8 mm de diamètre) laissés vides (n=6) ou comblés avec la MOPD (n=6).
- Défauts crâniens bicorticaux de taille subcritique (6 et 4 mm de diamètre) laissés vides (n=6) ou comblés avec la MOPD (n=6).
- Etude radiologique (micro scan) et histologique

Schéma de l'étude

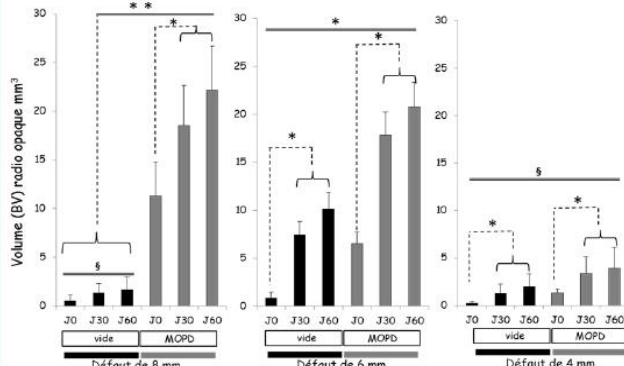


Résultats

Suivi in vivo par micro-CT de la cicatrisation osseuse entre J0 et J60

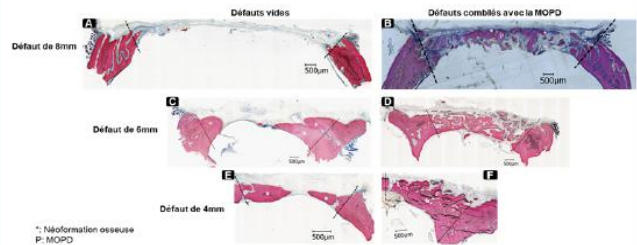


Représentations schématiques des défauts et images d'acquisition du scanner à J0, J30 et J60 des défauts de 8, 6 et 4 mm de diamètre laissés vides (A et C) ou comblés avec la MOPD (B et D).
A: pas d'augmentation significative de la radio opacité entre J0 et J60 ($p > 0,05$).
B, C, D: augmentation significative de la radio opacité entre J0, J30 et J60 traduisant une néoformation osseuse ($p < 0,05$).



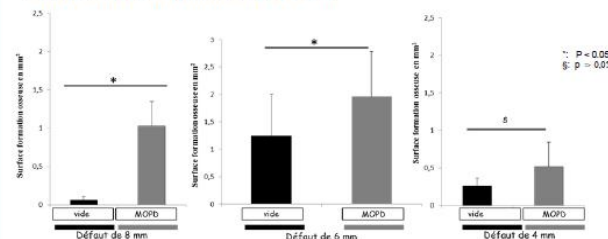
Analyse quantitative 3D de la radio opacité dans les défauts osseux
Augmentation significative ($P < 0,05$) de la radio-opacité dans tous les défauts pour chaque groupe entre J0 et J60 à l'exception du groupe défauts de 8 mm laissés vides ($p < 0,05$). Dans les défauts de 8 et 6 mm on note une augmentation significative de cette radio opacité en faveur des groupes comblés avec la MOPD.

Observations histologiques: néoformation osseuse dans les défauts de calvaria à J60.



(A) Défaut de 8mm vide: formation osseuse (*) essentiellement observée sur les bords du défaut. (C, E) Défauts de 6 et 4mm vides: formation osseuse au niveau des bords du défaut et à distance de ceux-ci.
(B, D, F) Défauts de 8, 6 et 4mm comblés avec la MOPD: formation osseuse (*) observée entre et autour des particules de MOPD (p).

Analyse histomorphométrique à J60



Défauts de 8 et 6mm: formation osseuse significativement plus importante dans les défauts comblés avec la MOPD comparée aux défauts vides ($p < 0,05$).
Défauts de 4mm: néoformation osseuse quantitativement équivalente entre les défauts comblés avec la MOPD ou laissés vides.

Conclusion: la MOPD testée montre un potentiel ostéoconducteur et présente un intérêt pour la réparation des défauts de diamètre supérieur ou égale à 6mm.

Remerciements



B30A (Biologie, Bioingénierie et Biométrie Ostéo-Articulaire) CNRS UMR7052: 10 avenue de Verdun, 75010 Paris, France / www.b2oa.eu

MOTS CLES: régénération osseuse, substitut osseux, défauts de calvaria de rat.

ARTICLE 4

**EXPERIMENTAL TYPE 2 DIABETES IMPACTS DIFFERENTLY SELECT
FUNCTIONS OF BONE MARROW MESENCHYMAL STROMAL CELLS**

EXPERIMENTAL TYPE 2 DIABETES IMPACTS DIFFERENTLY SELECT FUNCTIONS OF BONE MARROW MESENCHYMAL STROMAL CELLS

**JONATHAN RIBOT¹, CYPRIEN DENOEU¹, GUILHEM FRESCALINE¹, CELINE CORDIER¹, MORAD
BENSIDHOUM¹, HERVE PETITE¹, FANI ANAGNOSTOU^{1,2}**

1 Laboratory of Bioingénierie et Biomécanique Ostéo-articulaires-UMR CNRS 7052 Paris 7-Denis Diderot University,
Paris, France.

2 Department of Periodontology, Service of Odontology, –Pitié Salpêtrière Hospital, et Hôtel-Dieu Hospital AP-HP,
Paris 7-Denis Diderot University, U.F.R. of Odontology, Paris, France.

Running Title: BMMSCs functions are impacted in type 2 diabetes.

Key Words: MSCs, diabetes type 2, differentiation

Corresponding author : Dr. FANI ANAGNOSTOU

Laboratoire de Bioingénierie et Bioimagerie Ostéo-Articulaire

Faculté de Médecine Site Villemin 10 avenue de Verdun

75010 Cedex Paris France

Tél. : 01 57 27 85 61 Fax : 01 57 27 85 70

E-mail : fani.anagnostou@univ-paris-diderot.fr

ABSTRACT

Bone marrow mesenchymal stromal cells (BMMSCs) have been considered as a potential therapeutic tool for cell therapy in diabetes-associated secondary complications. T2DM changes the bone marrow environment but its effects on BMMSCs characteristics remain unclear. The present study aimed at investigating select functions and differentiation of BMMSCs harvested from a T2DM microenvironment as potential candidates for regenerative medicine applications. BMMSCs were harvested from Zucker Diabetic Fatty rats (ZDF ; an obese T2DM model) and its littermate Zucker LEAN (ZL ; control). The BMMSCs derived from ZDF animals were fewer, with limited clonogenicity (by 2-fold; $p<0.05$), proliferation (by 50%; $p<0.001$) and migration capability (by 25% ; $p<0.05$) and increased apoptosis rate (by 2.5-fold ; $p<0.001$), than their ZL counterparts. Moreover, in response to adipogenic mediators in the culture medium, the ZDF-BMMSCs exhibited enhanced adipogenic differentiation (by 2-fold ; $p<0.05$) possibly due to having been primed to undergo such differentiation *in vivo*, prior to cell isolation ; in contrast, their potential to differentiate into the osteoblast phenotype remained unchanged. The BMMSCs derived from ZDF animals expressed differentially angiogenic genes, specifically 10 genes were upregulated and 11 genes were downregulated. Under the experimental conditions used in the present study these cells did not undergo endothelial differentiation *in vitro* and exhibited impaired vascular formation *in vivo*.

INTRODUCTION

Type 2 Diabetes mellitus (T2DM) has reached epidemic proportions worldwide. This disease is caused by a combination of genetic and non-genetic factors that result in insulin resistance, insulin deficiency and hyperglycaemia and lead to complications in several organs. In addition to macro and micro vascular complications (cardiovascular diseases, retinopathy, neuropathy, and nephropathy), as well as prolonged/incomplete wound healing, (Sidaway 2015), T2DM is associated with increased risk of osteopenia, osteoporosis, bone fragility (Schwartz 2015) and impaired bone healing (Retzepi, Lewis et al. 2010). These disorders involve several, mechanisms, such as increased content of advanced glycation end-products, modified bone turnover, changes on the cell content the of bone marrow (Piccinin and Khan 2014), and affects differentiation of osteogenic cells. Specifically, in the bone marrow, T2DM induces vascular endothelial cell dysfunction (Spinetti, Cordella et al. 2013), increases adiposity (Paccou, Hardouin et al. 2015), and reduces osteoblastogenesis. Since BMMSCs can differentiate into osteoblasts, it is possible that the T2DM-associated bone disorders involve altered BMMSCs functions.

BMMSCs are a unique type of adult stem cells. These cells are believed to give rise to endothelial cells and mesenchymal progenitor cells such as adipocytes and osteoblasts. BMMSCs home to sites of injuries and contribute to tissue repair (Dong, Chen et al. 2008, Wagner, Kean et al. 2009). In addition, BMMSCs have exhibited high proliferation, differentiate into various cells types, including fibroblasts, osteoblasts, chondrocytes, adipocytes, and vascular endothelial cells (Pittenger, Mackay et al. 1999, Tremain, Korkko et al. 2001, Jiang, Jahagirdar et al. 2002), and exert paracrine effects by releasing growth factors and cytokines. BMMSCs play a key role in osteogenesis and angiogenesis. The phenotype of these cells is strongly determined by their “milieu”, for example, the T1DM specific environment of high glucose, inflammation, and hypoxia conditions, and Reactive Oxygen Species (ROS) production has deleterious effects on the functionality of BMMSCs (Hung, Pochampally et al. 2007) (Stolzing, Sellers et al. 2010) (Hamann, Goettsch et al. 2011) (Silva, Sampaio et al. 2015) . In the case of the obese T2DM, however, the data on BMMSCs phenotypic and functional properties are conflicting and less complete (Madhira, Challa et al. 2012). Moreover, due to their multipotency and ability to secrete angiogenic factors, cytokines, and immunomodulatory substances, BMMSCs are an attractive cell source for tissue engineering applications and regenerative medicine application (Zorina, Subbotin et al. 2003, Aali, Mirzamohammadi et al. 2014, Davey, Patil et al. 2014, Napoli, Strollo et al. 2014). Use of BMMSCs to treat T2DM secondary complications is of particular interest but the alterations of functions of BMMSCs in systemic pathologies could hinder the use of these cells (Davey, Patil et al. 2014). The T2DM milieu is an important consideration in preparing BMMSCs from diabetic donors and predicting their function after implantation but relatively little is known about the consequences of T2DM on BMMSCs characteristics.

The present study focused on select functions and on differentiation potential of BMMSCs harvested from a T2DM microenvironment and regarded as candidates for regenerative medicine applications. For this purpose, BMMSCs from Zucker Diabetic Fatty (ZDF) (Lepr^{fa/fa}) rat (an obese T2DM-well documented model) and from (their age-matched littermate the Zucker Lean control (ZL) (Lepr^{fa/+}/Lepr^{+/+}) rats were used (Etgen and Oldham 2000).

MATERIALS AND METHODS

Animal model

Adult, 8-week-old male, Swiss nude mice, and adult 12 to 13-week-old male, obese Zucker fa/fa rats (ZDF) and their lean fa/+ litter-mates (ZL) were purchased from Charles River (L'Arbresle, France). The animals were housed, operated, and euthanized using procedures in accordance with the European Community Standards on the Care and Use of Laboratory Animals. The experimental procedures were approved by the Ethics Committee of the Paris-Diderot University.

Diabetic condition in rats was determined on the day of sacrifice. Venous blood was collected and the glycemic state was evaluated using glucometer technique (Roche Diagnostics, France). Glucose concentrations in the collected plasma and fructosamine were determined using commercially available kits from Roche Diagnostics (Roche Diagnostics, France) and following the manufacturer's instructions.

Isolation of rat bone marrow derived mesenchymal stem cells (BMMSCs)

Isolation and characterization of BMMSCs obtained from obese Zucker Diabetic Fatty (ZDF) rats and from Zucker Lean litter-mates (ZL), used as controls in the present study, were performed as described previously (Frescaline, Boudierlique et al. 2012). The femurs and tibias from each rat were cleaned of connective tissues and their respective epiphyses removed to allow insertion of a 23-gauge needle connected to syringe containing serum-free α MEM. Mononuclear cells in the harvested marrow were then homogenized in complete medium composed of alpha-Modified Eagle's Medium (α MEM) (Invitrogen, Cergy Pontoise, France) supplemented with 10% (v/v) fetal calf serum and 1% (v/v) antibiotic/antimycotic (ATB/ATM) solution (PAA Laboratories GmbH, Pasching, Austria). The isolated cells from ZL and ZDF rats were seeded separately at the density of 5×10^5 cells/cm² on tissue culture polystyrene flask and cultured at 37°C in a humidified 5% CO₂ / 95% air environment. After 2 days of culture, the supernatant media (containing non-adherent cells) was discarded. Fibroblastic colonies (CFU-F) appeared at day 5 of culture and were all pooled at day 12 (cell passage 1). For amplification of the ZL

and ZDF BMMSCs populations, the cells at a subconfluent stage (after 3 days of culture) were trypsinized, using a trypsin 0.005%, EDTA solution, and were seeded at 10×10^3 cells/cm². The supernatant media were changed twice a week. BMMSCs (passage 2-3) were used for all the experiments in the present study. BMMSCs were assessed for stromal origin by fluorescence-activated cell sorting (using the CD29 (clone Hmb1-1, eBioscience), the CD45 (clone OX1, eBioscience) and the CD90 marker (clone HIS51, Life Technology) and differentiation into the osteogenic and adipogenic lineages.

Fibroblastic Colony-Forming Unit (CFU-F) Assay

Harvesting from the bone marrow, mononuclear cells were seeded at 5×10^5 cells/cm² in individual wells of 6-well tissue culture plates. The supernatant culture medium (containing non-adherent cells) was discarded and the adherent cells were cultured for fourteen days. At that time, these cells were rinsed with PBS and stained *in situ* using the May-Grünwald Giemsa protocol. The stained cells in each well were photographed using a Nikon Eclipse TE 2000U inverted microscope. Each colony considered was measuring more than two mm (which contain more than fifty adherent fibroblastoid cells); smaller clusters of cells were excluded from further analysis. The shape of each colony was visualized, and the respective surface area automatically marked, using the NIS-Elements BR 2.30 computer image analysis system (Nikon Instruments Inc., Melville, NY). For each condition tested, the colony forming efficiency (CFE) was calculated as the total number of CFU-F per well reported to 10^6 cells seeded.

Cell Proliferation

ZDF- and ZL-BMMSCs in α MEM containing 10% FBS were each seeded at the density of 3×10^3 cells/cm² in individual wells of 12-well culture plates. Following cell adhesion, BMMSCs proliferation was determined every day for up to 7 consecutive days by counting cells present in each well using a Malassez chamber.

In addition, DNA of cells was marked by Hoescht - Propidium Iodide (Sigma-Aldrich), and viable cells were counted everyday using flow cytometry analysis (Attune, Life technology) (data not shown).

Apoptosis

BMMSCs derived from ZL and ZDF rats were exposed in serum-free medium for 48 hours. The percentage of apoptotic cells (defined as double positive to annexine-PI staining) was determined using flow cytometry analysis for 3 independent wells per condition and in 2 independent experiments.

Cell Migration

Cell migration was determined using commercially-available 24-well Boyden chambers whose two compartments were separated with porous polycarbonate membranes with 8- μ m-diameter pores (Corning Costar, Cambridge, MA, USA). Briefly, ZDF and ZL cells (75×10^3 cells/ 100 μ l) in α MEM without FCS (migration medium) were loaded in the upper chamber of the transwells. The bottom chamber of the Boyden system contained 0.6 mL of migration medium with 10% FCS. The cell migration experiments were conducted in a humidified, 37°C, 5% CO₂/95% air environment overnight. The cells that had traversed, but still adhered on the other side of the membrane were fixed in 4% paraformaldehyde then stained *in situ* using the May Grunwald-Giemsa stain. At that time each membrane was excised, mounted on glass slide-, visualized using light microscopy, and photographed. The cells present on four randomly-chosen, separate areas per membrane were counted *in situ*. The numbers of migrated cells were considered evidence for the extent of cell migration under the different conditions tested.

Cell adhesion

BMMSCs from ZDF and ZL rats were each seeded at $8,5 \cdot 10^3$ cells/cm² in individual wells of 12-well culture plates (TPP, Switzerland) in α MEM containing 10% FBS. After 15, 30, 45, 60, 90, 120, 180 and 240 minutes, supernatant media was removed. Adherent cells were fixed with methanol-PBS (1/1) solution (Prolabo) and stained with Giemsa solution (Sigma-Aldrich). 6 random surface areas per wells were photographed under microscope (Keyence VHX100, Japan). Adherent cells were counted using the data processing software *Image J* (National Institute of Health, US).

Reactive Oxygen Species (ROS) release

BMMSCs from ZDF and ZL rats were each seeded at 1×10^3 cells/cm² in individual wells of 96-well culture plates (TPP, Switzerland) in α MEM containing 10% FBS. After 12 hours, cells were rinsed and incubated for 1 hour with 100 μ L of 2'7' diacetate dichlorofluoresceine 5 μ M (DCFH-DA, Thermo Fischer Scientific). Oxidative stress was induced by adding 50 μ L of tert-butyl peroxide 400 μ M (Luperox®, Sigma – Aldrich) in each well. Absorbance ($\lambda = 485$ nm) was followed every 5 minutes into 40 minutes using spectrophotometer (TECAN Infinite® 200 PRO Series, LVTS INSERM - UMR 1148, Hopital Bichat, France). Absorbance is directly correlated with ROS release from ZDF and ZL-BMMSCs.

Osteogenic differentiation

BMMSCs in complete medium (CM : α MEM with 10% FBS and 1% of atb/atm) were seeded at 10×10^3 cells/cm² in individual wells of 12-well cell culture plates and cultured under standard cell culture conditions until they reached 80% confluency. At that time, the supernatant media were replaced by either complete medium (CM) or osteogenic-induction medium from Lonza (Lonza France, Levallois). The supernatant media were changed every 2 days of culture. Osteogenic differentiation was determined by monitoring expression of select osteogenic markers, specifically, Runx2, Col1I and Osterix, using quantitative Polymerase Chain Reaction and by the presence of calcium-containing mineral deposits in the extracellular matrix of the cultured BMMSCs, using Alizarin Red staining and ALP activity.

Adipogenic differentiation

BMMSCs from each group of animals tested in the present study were seeded at 10×10^3 cells/cm² in individual wells of 12-well cell culture plates and cultured under standard cell culture conditions in complete medium (CM) until they reached 90% confluency. The supernatant media of these cultures were replaced by either complete medium or adipogenic-induction-medium, i.e., α MEM supplemented with 10% FBS (v/v), 100 ng/mL biotin, 250 nM dexamethasone, 0.5 mM isobutyl methylxanthine, 60 μ M indomethacin, and 10 μ g/mL insulin (all chemicals were from Sigma-Aldrich). These supernatant media were replaced every 2 days of cell culture. Adipogenic differentiation was determined by monitoring expression of select adipogenic markers, specifically, Pparg, AdipoQ and fabp4, using quantitative Polymerase Chain Reaction and by formation of intracellular lipid droplets, detected using Oil Red-O staining.

Angiogenic differentiation

BMMSCs were seeded at 10×10^3 cells/cm² in individual wells of 12-well cell culture plates and cultured under standard cell culture conditions for 24 hours. At that time, the supernatant media were replaced by either complete medium or angiogenic-induction medium composed of α MEM, 2% FBS (v/v) and VEGF (50 ng/ml) (all chemicals were from Sigma-Aldrich). The BMMSCs were cultured under those conditions for 14 consecutive days. The supernatants media were changed every 2 days of culture. Angiogenic differentiation was determined by monitoring expression of select angiogenic markers, specifically Vegf, Fgf2, Hif1 and Hif2, and using quantitative Polymerase Chain Reaction and by the formation of tubular structures upon culturing on Matrigel for 24 hours.

RNA extraction, reverse transcription, and quantitative polymerase chain reaction (qRT-PCR)

Expression of select osteogenic and adipogenic markers by BMMSCs cultured in either adipogenic, osteogenic or angiogenic medium, were determined using total RNA which was extracted from BMMSCs treated with Trizol reagent (Life Technologies) according to the manufacturer's protocol. The RNA integrity and purity/concentration were checked using spectrophotometry (Nanodrop 1000, Labtech, Palaiseau, France). Random-primed cDNA was synthesized from 1 µg of total RNA using the SuperScript™ II RT Kit (Invitrogen). Equal volumes of cDNA were used to program amplifications through real-time polymerase chain reactions (RT-PCR). qRT-PCR was performed using an iCycler thermocycling apparatus (MyiQ™ Single-Color Real-Time PCR; Bio-Rad Laboratories, Marnes-la-Coquette, France) in the presence of TaqMan Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems) and the following specific primers : for osteogenic differentiation: Runt-related transcription factor 2 (Runx2), Collagen 1 (coll1) and Osterix. For adipogenic differentiation: Peroxisome proliferator-activated receptor gamma (Pparg), Adiponectin (AdipoQ) and fatty acid binding protein 4 (Fabp4). For Angiogenic differentiation: Vascular endothelial growth factor (Vegf), Basic fibroblast growth factor (Fgf2) and Hypoxia-inducible factors 1 and 2 (Hif1 and 2). The housekeeping gene 18S (kits TaqMan®, Applied Biosystems Inc., Courtaboeuf, France) was used. A more complete analysis of angiogenic factors involved was determined with a multiplex containing 84 angiogenic related genes (the rat angiogenesis RT² Profiler PCR Array; Qiagen). After activation of DNA polymerase at 95 °C for 10 min, cDNA was amplified by performing 40 two-step PCR cycles: a 15 second denaturation step at 95 °C, followed by a 60 second annealing and an extension step at 60°C. Each sample was run in triplicate. Data were analyzed using MyiQ™ Software (Bio-Rad Laboratories, Marnes-la-Coquette, France). Quantitation of gene expression was performed using the comparative threshold cycle method ($\Delta\Delta C_t$).

Matrigel plug assay

BMMSCs from either ZL or ZDF rats (10^6 cells in 500 µl of ice-cold matrigel) subcutaneously into the flank of 8-week-old Swiss nude mice. After 14 days, the mice were euthanized with dolethal (vétoquinol) and each matrigel implant was excised, placed in 500 µl RIPA buffer, and was processed using a Retsch MM 300 tissue lyser at 30 pulses/min for 2 min. The hemoglobin content in each excised implant was determined using a commercially available assay (Hemoglobin Colorimetric Assay kit; Cayman).

Statistical analyses

Each experiment of the present study was performed in triplicates and repeated at three separate times. Numerical data are reported as mean \pm standard error of the mean (SEM). For time-dependent experiments, ANOVA tests (analysis of variance) for unpaired two-tailed samples were used for statistical analysis of the experimental data and were compared to the respective controls. For time-independent experiments, Student's t-tests for unpaired two-tailed samples were used for statistical analysis of the experimental data and were compared to the respective controls. P values less than 0.05 were considered statistically significant.

RESULTS

Characteristics of diabetic rats

The body weight of the 14 week-old ZDF rats used in the present study was significantly ($p < 0.001$) higher than that of ZL animals at the same time points (13 weeks). Compared to the ZL, the ZDF rats had significantly ($p < 0.05$) increased mean serum glucose and fructosamine levels (2 and 1.5-fold, respectively).

T2DM affects the number, clonogenicity, proliferation and apoptosis of BMMSCs

Formation of CFU-Fs was significantly ($p < 0.05$) lower (by 2-fold) in BMMSCs harvested from diabetic than from non-diabetic rats (Figure 1A). Moreover, the average colony size formed by diabetic BMMSCs was lower (by 20%) compared to that of the cells from non-diabetic animals (Figure 1A). The number of mononuclear cells in the bone marrow of diabetic (ZDF) animals was lower than in control (by 30%; $p < 0.05$) (Figure 1B). No difference between the ZL and ZDF BMMSCs membrane phenotype is observed with the 3 surface markers tested (CD29+, CD90+ and CD45) ($p > 0.05$) (data not shown). Finally, after 7 days of culture under standard conditions the proliferation of BMMSCs from ZDF rats was significantly ($p < 0.001$) less than that of the BMMSCs from the ZL animals (Figure 1C).

T2DM affects BMMSCs apoptosis, migration, adhesion and ROS production

BMMSCs apoptosis were assessed using flow cytometry and cells which had been cultured in serum-free medium for 2 days and then double-labeled with annexin+/PI. BMMSCs from ZDF rats exhibited a significantly ($p < 0.001$) higher level of apoptosis (by 2-fold) than that of ZL animals (Figure 2A).

These results provide evidence that compared to BMMSCs from diabetic animals; the cells from the non-diabetic animals are more sensitive to serum-deprivation and in terms of their chemotactic capability, BMMSCs from ZDF rats exhibited significantly ($p < 0.001$) lower migration (by 25%) than cells from the ZL control animals (Figure 2B). It's important to note that after exposure to an oxidative agent (400 μ m of tert-butyl peroxide), ZDF-BMMSCs exhibited a different production of ROS on a short term basis ($p < 0.05$) than that the ZL-BMMSCs (Figure 2D).

Finally BMMSCs harvested from ZDF rats exhibited significantly ($p < 0.01$) less adhesion (by 45%) than BMMSCs from control animals after 2 hours of culture in complete medium (Figure 2C).

T2DM modulates the adipogenic differentiation of BMMSCs

The potential of ZDF and ZL-BMMSCs to undergo adipogenic differentiation was assessed by culturing these cells in adipogenic medium for a 14-and 21-day period. Under these conditions, BMMSC from ZDF rats contained a significantly ($p < 0.05$) higher, number of triglyceride droplets than that observed in the BMMSCs from the ZL animals (Figure 3A and B). In addition, analysis of select adipogenic markers revealed upregulation of Pparg (by 10-fold), AdipoQ (by 6-fold) and Fabp4 (by 8-fold) in ZDF-BMMSCs (Figure 3C).

T2DM does not modulate the osteogenic differentiation of BMMSCs

As evidenced by calcium and alizarin red staining (Figure 2 B) after 21 days of cell culture, the potential of ZL-and ZDF-BMMSCs for osteogenic differentiation was similar. The transcription factors Runx2, Col11 and Osterix were also similarly expressed in BMMSCs from the ZL and ZDF animals after 14 day of culture (figure 4C).

BMMSCs from animals with T2DM induce less angiogenesis upon transplantation in nude mice

BMMSCs from both ZL and ZDF rats did not differentiate into cells of the angiogenic lineage (Figure 5A and 5 B). Furthermore BMMSCs did not form tubular structure when cultured on Matrigel for 24 hours in contrast to HUVEC cells (positive control) (figure 5A). The level of expression of select angiogenic markers, VEGF, FGF2, HIF1 and HIF2 were not statistically different after exposure to angiogenic medium from both ZL and ZDF cells (Figure 5B).

Upon transplantation of the ZL and ZDF-BMMSCs contained in Matrigel plugs in the flank of nude mice, the ZDF-BMMSCs induced less angiogenesis than the ZL-BMMSCs. This result is illustrated by the

explanted plugs in Figure 5 C : the plug containing ZDF-BMMSCs is rather transparent, but seems reddish (due to the presence of red blood cells) when containing ZL-BMMSCs . The presence of hemoglobin correlates these results: plugs containing ZL-BMMSCs exhibited twice as much angiogenesis than plugs with ZDF-BMMSCs (Figure 5C; $p < 0.001$). Moreover, among a multiplex of 84 genes tested, several angiogenic mediators were upregulated in ZDF-BMMSCs. It should be noted that this difference in gene expression did not affect differentiation of these cells into the endothelial lineage (Figure 5A). Specifically, 10 genes were upregulated and 11 under-regulated in ZDF-BMMSCs (Figure 5D).

DISCUSSION

Due to their plasticity and differentiation potential to form multiple cell types *in vitro* and *in vivo*, bone marrow mesenchymal stromal cells (BMMSCs) have been considered as a potential cell therapy in diabetes-associated macro- and micro-vascular secondary complications (Davey, Patil et al. 2014). However, and despite the emerging evidence of changes in the cellular makeup of the diabetic bone marrow (Piccinin and Khan 2014), relatively little is known about the consequences on BMMSCs characteristics, in the case of T2DM. We report here that BMMSCs harvested from a T2DM bone marrow microenvironment are dysfunctional and may have a reduced capacity to repair tissue; BMMSCs were obtained from ZDF rat at 13 weeks, representing early diabetic conditions ; their ZL littermates were used as healthy controls. The results obtained in the present study provided evidence that, compared to the control cells, the BMMSCs derived from ZDF animals were fewer, with limited clonogenicity, proliferation and migration abilities, and increased apoptosis rate. Moreover, ZDF-BMMSCs had an enhanced ability to undergo adipogenic differentiation in response to adipogenic factors in the culture medium, possibly due to being primed to undergo such differentiation *in vivo*, prior to cell isolation. Most importantly, our findings provide evidence that T2DM BMMSCs remained impaired when cultured *ex vivo* under normoglycemic conditions and/or placed in a “healthy” microenvironment and raises questions for their use for autologous stem cell therapy in diabetic individuals.

ZDF rats which have a mutation of the leptin gene receptor were chosen because they display a well-defined T2DM model (Etgen and Oldham 2000, Liu, Tzeng et al. 2007, Reinwald, Peterson et al. 2009). These animals develop obesity, insulin resistance, hyperglycaemia and exhibit secondary complications of diabetes including skeletal (Prisby, Swift et al. 2008) and bone vasculature (Stabley, Prisby et al. 2015) similar to the preclinical/clinical features of T2DM observed in humans.

The data of the present study provided evidence that BMMSCs isolated from T2DM animals were fewer than those from control animals ; these results are consistent with other reports regarding T2DM (db/db) mouse (Shin and Peterson 2013). Since alteration of the marrow stem cell environment in diabetes may cause cellular changes (Spinetti, Cordella et al. 2013), the reduced number of BMMSCs harvested in the present study may be attributable to depletion of resident stem/progenitor cells in the bone marrow of the diabetic animals.

Although T2DM-BMMSCs could be obtained and expanded successfully *in vitro* under standard cell culture conditions, their clonogenicity and proliferation rate were significantly decreased, compared to results obtained with ZL-BMMSCs. Similar results had been reported regarding BMMSCs harvested from models with experimental diabetes induced with streptozotocin (a relevant model of T1DM in various species) (Stolzing, Sellers et al. 2010, Zhao, Xia et al. 2013, Kim, Kang et al. 2014, Silva, Sampaio et al. 2015). Furthermore, the proliferation of BMMSCs was also decreased when these cells were cultured on high glucose conditions -in vitro model mimicking the diabetic microenvironment (Zhang, Liu et al. 2015). Moreover, the observed increasing apoptosis in T2DM-BMMSCs is consistent with previous reports in T1DM-BMMSCs (Ko, Coimbra et al. 2015, Silva, Sampaio et al. 2015, Wajid, Naseem et al. 2015) and in *in vitro* studies under high glucose concentrations (Zhang, Liu et al. 2015).

The changes in T2DM-BMMSCs functions observed in the present study were closely associated with the onset of hyperinsulinemia and hyperglycaemia. Those may have direct adverse effects on bone cells (Prisby, Swift et al. 2008). Although the model may be different, the associated pathologies observed in diabetes type 2 is also found in diabetes type 1 but it is still unclear that mesenchymal stem cells from both models respond similarly in the conditions of the diabetic milieu. In fact, the lasting modification of different types of cells under diabetic milieu is due to epigenetic modification and it has been studied in both models of type 1 and 2 diabetes (Pirola, Balcerczyk et al. 2010) (Zhong and Kowluru 2010, Zhong and Kowluru 2011, Tewari, Zhong et al. 2012, Zhong and Kowluru 2013).

Compared to ZL-BMMSCs, BMMSCs harvested from ZDF animals exhibited enhanced adipogenic differentiation in response to pro-adipogenic additives in the culture medium. Similar results were reported for WNIN/GR-Ob mutant rats (Madhira, Challa et al. 2012). The Madhira et al. study reported less than 20% increase in adipocyte formation from the mutant rats. We report a 2-fold increase in adipocytes formation in ZDF-BMMSC versus ZL-BMMSCs, those differences are probably due to the protocol we used (for example, a cell differentiation period of 14 (Madhira et al.) versus 21 days (present study). Also, a study by Botolin et al. performed on the tibias of streptozotocin-induced diabetic BALB/c mice reported overexpression of the adipogenic markers PPARG, resistin and aP2, associated with an

increase in bone marrow adiposity. Several team reported that in this type I diabetes model, genes related to the adipogenic differentiation, specifically Pparg, Irs1 and Irs2, are upregulated in MSC (Stolzing, Sellers et al. 2010, Silva, Sampaio et al. 2015). It is entirely possible that cells from both the T1DM and T2DM models suffer similar modifications concerning their adipogenic potential when exposed to the harsh environment of diabetes. It is unknown either if the hyperglycemic plasma or the depositions of AGEs are to blame but it is clear that those cells undergo lasting changes that persist even after their removal from the diabetic milieu.

The results regarding osteogenic differentiation of the ZL-and ZDF-BMMSCs obtained in the present study are in agreement with literature reports. In streptozotocin-induced diabetic BALB/c mouse it has been shown that osteocalcin (a marker of late-stage osteoblast differentiation) mRNA and serum levels were decreased. Osteoblast number as well as Runx2 and ALP mRNA levels remained unchanged (Botolin, Faugere et al. 2005) but the osteogenic priming of the mesenchymal stem cells was clearly impaired (Silva, Sampaio et al. 2015). These results are also in agreement with another report that collagen synthesis by human osteoblasts is reduced in the presence of diabetic serum (Brenner et al. 1992). Taken together, these results provide evidence of selection of adipogenesis versus osteoblastogenesis in type I diabetes models and impairment of the final stages of osteoblast maturation and function. A result that we also report in this work using a type 2 diabetes model.

Some studies reported MSC differentiation into endothelial cells (Wang and Zou 2014, Dan, Velot et al. 2015). However, it is still unclear whether MSC have the intrinsic potential to fully differentiate into angiogenic cells. The BMMSCs from both ZDF and ZL rats tested in the present study did not differentiate into endothelial cells. This is possibly due to difference in methodology as we used cells after 2 to 3 passages which assure a more homogeneous population of cells devoid of progenitors that might be able to go to the angiogenic lineage.

After *in vivo* implantation, the ZDF-BMMSCs cells distributed in matrigel plugs were far less angiogenic than the ZL-BMMSCs cells. We could argue that their paracrine capability were not equivalent and that ZL-BMMSCs secrete more angiogenic factors than the ZDF-BMMSCs but our previous work indicates that the secretome of ZDF-BMMSCs promotes angiogenesis compared to the ZL-BMMSCs due to the release of different growth factors such as IGF-1. For these reasons, the reduced proliferation and enhanced apoptosis coupled with a general fragility of those cells might render them unable to cope with the harsh environment accompanying transplantation, thus making them less efficient in promoting angiogenesis. In fact another study reported that diabetic BMMSCs were ineffective to improve hindlimb ischemia; in addition, the capillary density and angiogenic gene expression in the ischemic limbs was lower than in the non-diabetic control. According to this report, diabetic MSCs from diabetic animals

present defective proliferation and angiogenic potential and are ineffective for repairing hindlimb ischemia (Yan, Tie et al. 2013). Other reports shows that autologous transplantation of adipose-derived MSCs minimized pathological alterations, reduced oxidative damage, and suppressed the renal expression of pro-inflammatory cytokines in a rodent STZ model of diabetic nephropathy (Zhang, Ye et al. 2013). Another study reported that administration of murine diabetic BMMSCs inhibited angiogenesis but promoted wound healing in diabetic mice (Stepanovic, Awad et al. 2003) . So the reports are confusing and paradoxical and the use of diabetic BMMSCs in wound healing is still up for debate.

The exact mechanisms underlying the impaired biological characteristics of T2DM-BMMSCs remain unknown. In the present study, BMMSCs harvested from animals with early diabetic conditions remained impaired after multiple cell divisions *ex vivo* under normoglycemic conditions and/or after transplantation in “a non-diabetic’ microenvironment. These results corroborate previous reports that diabetic stimuli, particularly hyperglycemia, induce heritable changes of genes, in many cells such as endothelial, vascular smooth muscle, retinal and cardiac cells (Reddy, Zhang et al. 2014). It’s vastly known that hyperglycemia predisposes an individual to complications and create epigenetic modifications leading to a phenomenon called “metabolic memory” (Chalmers and Cooper 2008, Pirola, Balcerczyk et al. 2010). We believe, therefore, that BMMSCs retain a metabolic memory characteristic of the T2DM.

In conclusion the present study provided evidence that BMMSCs from T2DM rats were fewer and exhibited impaired functionality *ex vivo* and/or after their transplantation in a “healthy” environment. Elucidating the molecular signal pathways involved in these differences would help development of therapeutic modalities which are needed to correct the impaired BMMSCs of diabetic patients. Moreover, the data of the present study draw attention to the fact that diabetic BMMSCs undergoes changes which are susceptible to make them dysfunctional *in situ* and limit their therapeutic potential post- transplantation even under early T2DM conditions. Since functional impairment may depend on the stage of T2DM, further research is needed to establish the T2DM status-specific pathogenic characteristics of BMMSCs in osteogenesis and angiogenesis in order to optimize their use in clinical applications.

AUTHOR CONTRIBUTION

J.R, C.D, G.F and C.C. conducted the experiments, analyzed the data and wrote the manuscript. F.A. directed the study, contributed to writing the discussion and wrote manuscript. H.P. contributed to the discussion of the results and also reviewed/edited the manuscript.

ACKNOWLEDGEMENTS

This study was supported by the « Ministère de la recherche » (2011/47), « Fondation Française pour la Recherche Médicale » (FRM) (FDT20140930864), the « Fondation de l'Avenir » (ET3-694), and the Institut Français pour la Recherche Odontologique (IFRO). We thank Doctor G. Pavon-Djavid for ROS release experiments.

CONFLICT OF INTERESTS

The authors declare that they have no conflict of interest.

REFERENCES

- Aali, E., S. Mirzamohammadi, H. Ghaznavi, Z. Madjd, B. Larijani, S. Rayegan and A. M. Sharifi (2014). "A comparative study of mesenchymal stem cell transplantation with its paracrine effect on control of hyperglycemia in type 1 diabetic rats." *J Diabetes Metab Disord* **13**(1): 76.
- Botolin, S., M. C. Faugere, H. Malluche, M. Orth, R. Meyer and L. R. McCabe (2005). "Increased bone adiposity and peroxisomal proliferator-activated receptor-gamma2 expression in type I diabetic mice." *Endocrinology* **146**(8): 3622-3631.
- Chalmers, J. and M. E. Cooper (2008). "UKPDS and the legacy effect." *N Engl J Med* **359**(15): 1618-1620.
- Dan, P., E. Velot, V. Decot and P. Menu (2015). "The role of mechanical stimuli in the vascular differentiation of mesenchymal stem cells." *J Cell Sci* **128**(14): 2415-2422.
- Davey, G. C., S. B. Patil, A. O'Loughlin and T. O'Brien (2014). "Mesenchymal stem cell-based treatment for microvascular and secondary complications of diabetes mellitus." *Front Endocrinol (Lausanne)* **5**: 86.
- Dong, Q. Y., L. Chen, G. Q. Gao, L. Wang, J. Song, B. Chen, Y. X. Xu and L. Sun (2008). "Allogeneic diabetic mesenchymal stem cells transplantation in streptozotocin-induced diabetic rat." *Clin Invest Med* **31**(6): E328-337.
- Etgen, G. J. and B. A. Oldham (2000). "Profiling of Zucker diabetic fatty rats in their progression to the overt diabetic state." *Metabolism* **49**(5): 684-688.

- Ferrer-Lorente, R., M. T. Bejar and L. Badimon (2014). "Notch signaling pathway activation in normal and hyperglycemic rats differs in the stem cells of visceral and subcutaneous adipose tissue." *Stem Cells Dev* **23**(24): 3034-3048.
- Frescaline, G., T. Boudelique, M. B. Huynh, D. Papy-Garcia, J. Courty and P. Albanese (2012). "Glycosaminoglycans mimetics potentiate the clonogenicity, proliferation, migration and differentiation properties of rat mesenchymal stem cells." *Stem Cell Res* **8**(2): 180-192.
- Hamann, C., C. Goettsch, J. Mettelsiefen, V. Henkenjohann, M. Rauner, U. Hempel, R. Bernhardt, N. Fratzi-Zelman, P. Roschger, S. Rammelt, K. P. Gunther and L. C. Hofbauer (2011). "Delayed bone regeneration and low bone mass in a rat model of insulin-resistant type 2 diabetes mellitus is due to impaired osteoblast function." *Am J Physiol Endocrinol Metab* **301**(6): E1220-1228.
- Hung, S. C., R. R. Pochampally, S. C. Chen, S. C. Hsu and D. J. Prockop (2007). "Angiogenic effects of human multipotent stromal cell conditioned medium activate the PI3K-Akt pathway in hypoxic endothelial cells to inhibit apoptosis, increase survival, and stimulate angiogenesis." *Stem Cells* **25**(9): 2363-2370.
- Jiang, Y., B. N. Jahagirdar, R. L. Reinhardt, R. E. Schwartz, C. D. Keene, X. R. Ortiz-Gonzalez, M. Reyes, T. Lenvik, T. Lund, M. Blackstad, J. Du, S. Aldrich, A. Lisberg, W. C. Low, D. A. Largaespada and C. M. Verfaillie (2002). "Pluripotency of mesenchymal stem cells derived from adult marrow." *Nature* **418**(6893): 41-49.
- Kim, Y. S., H. J. Kang, M. H. Hong, W. S. Kang, N. Choe, H. Kook, M. H. Jeong and Y. Ahn (2014). "Angiopoietin-like 4 is involved in the poor angiogenic potential of high glucose-insulted bone marrow stem cells." *Korean Circ J* **44**(3): 177-183.
- Ko, K. I., L. S. Coimbra, C. Tian, J. Alblowi, R. A. Kayal, T. A. Einhorn, L. C. Gerstenfeld, R. J. Pignolo and D. T. Graves (2015). "Diabetes reduces mesenchymal stem cells in fracture healing through a TNFalpha-mediated mechanism." *Diabetologia* **58**(3): 633-642.
- Liu, I. M., T. F. Tzeng, S. S. Liou and T. W. Lan (2007). "Improvement of insulin sensitivity in obese Zucker rats by myricetin extracted from *Abelmoschus moschatus*." *Planta Med* **73**(10): 1054-1060.
- Madhira, S. L., S. S. Challa, M. Chalasani, G. Nappanveethl, R. R. Bhonde, R. Ajumeera and V. Venkatesan (2012). "Promise(s) of mesenchymal stem cells as an in vitro model system to depict pre-diabetic/diabetic milieu in WNIN/GR-Ob mutant rats." *PLoS One* **7**(10): e48061.
- Napoli, N., R. Strollo, A. Paladini, S. I. Briganti, P. Pozzilli and S. Epstein (2014). "The alliance of mesenchymal stem cells, bone, and diabetes." *Int J Endocrinol* **2014**: 690783.
- Paccou, J., P. Hardouin, A. Cotten, G. Penel and B. Cortet (2015). "The Role of Bone Marrow Fat in Skeletal Health: Usefulness and Perspectives for Clinicians." *J Clin Endocrinol Metab* **100**(10): 3613-3621.
- Piccinin, M. A. and Z. A. Khan (2014). "Pathophysiological role of enhanced bone marrow adipogenesis in diabetic complications." *Adipocyte* **3**(4): 263-272.
- Pirola, L., A. Balcerczyk, J. Okabe and A. El-Osta (2010). "Epigenetic phenomena linked to diabetic complications." *Nat Rev Endocrinol* **6**(12): 665-675.
- Pittenger, M. F., A. M. Mackay, S. C. Beck, R. K. Jaiswal, R. Douglas, J. D. Mosca, M. A. Moorman, D. W. Simonetti, S. Craig and D. R. Marshak (1999). "Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells." *Science* **284**(5411): 143-147.

- Prisby, R. D., J. M. Swift, S. A. Bloomfield, H. A. Hogan and M. D. Delp (2008). "Altered bone mass, geometry and mechanical properties during the development and progression of type 2 diabetes in the Zucker diabetic fatty rat." J Endocrinol **199**(3): 379-388.
- Reddy, M. A., E. Zhang and R. Natarajan (2014). "Epigenetic mechanisms in diabetic complications and metabolic memory." Diabetologia.
- Reinwald, S., R. G. Peterson, M. R. Allen and D. B. Burr (2009). "Skeletal changes associated with the onset of type 2 diabetes in the ZDF and ZSD rodent models." Am J Physiol Endocrinol Metab **296**(4): E765-774.
- Retzepi, M., M. P. Lewis and N. Donos (2010). "Effect of diabetes and metabolic control on de novo bone formation following guided bone regeneration." Clin Oral Implants Res **21**(1): 71-79.
- Schwartz, A. V. (2015). "Marrow fat and bone: review of clinical findings." Front Endocrinol (Lausanne) **6**: 40.
- Shin, L. and D. A. Peterson (2013). "Human mesenchymal stem cell grafts enhance normal and impaired wound healing by recruiting existing endogenous tissue stem/progenitor cells." Stem Cells Transl Med **2**(1): 33-42.
- Sidaway, P. (2015). "Diabetes: Epigenetic changes lead to impaired wound healing in patients with T2DM." Nat Rev Endocrinol **11**(2): 65.
- Silva, J. C., P. Sampaio, M. H. Fernandes and P. S. Gomes (2015). "The Osteogenic Priming of Mesenchymal Stem Cells is Impaired in Experimental Diabetes." J Cell Biochem **116**(8): 1658-1667.
- Spinetti, G., D. Cordella, O. Fortunato, E. Sangalli, S. Losa, A. Gotti, F. Carnelli, F. Rosa, S. Riboldi, F. Sessa, E. Avolio, A. P. Beltrami, C. Emanuelli and P. Madeddu (2013). "Global remodeling of the vascular stem cell niche in bone marrow of diabetic patients: implication of the microRNA-155/FOXO3a signaling pathway." Circ Res **112**(3): 510-522.
- Stabley, J. N., R. D. Prisby, B. J. Behnke and M. D. Delp (2015). "Type 2 diabetes alters bone and marrow blood flow and vascular control mechanisms in the ZDF rat." J Endocrinol **225**(1): 47-58.
- Stepanovic, V., O. Awad, C. Jiao, M. Dunnwald and G. C. Schatteman (2003). "Leprdb diabetic mouse bone marrow cells inhibit skin wound vascularization but promote wound healing." Circ Res **92**(11): 1247-1253.
- Stolzing, A., D. Sellers, O. Llewelyn and A. Scutt (2010). "Diabetes induced changes in rat mesenchymal stem cells." Cells Tissues Organs **191**(6): 453-465.
- Tewari, S., Q. Zhong, J. M. Santos and R. A. Kowluru (2012). "Mitochondria DNA replication and DNA methylation in the metabolic memory associated with continued progression of diabetic retinopathy." Invest Ophthalmol Vis Sci **53**(8): 4881-4888.
- Tremain, N., J. Korkko, D. Ibberson, G. C. Kopen, C. DiGirolamo and D. G. Phinney (2001). "MicroSAGE analysis of 2,353 expressed genes in a single cell-derived colony of undifferentiated human mesenchymal stem cells reveals mRNAs of multiple cell lineages." Stem Cells **19**(5): 408-418.
- Wagner, J., T. Kean, R. Young, J. E. Dennis and A. I. Caplan (2009). "Optimizing mesenchymal stem cell-based therapeutics." Curr Opin Biotechnol **20**(5): 531-536.
- Wajid, N., R. Naseem, S. S. Anwar, S. J. Awan, M. Ali, S. Javed and F. Ali (2015). "The effect of gestational diabetes on proliferation capacity and viability of human umbilical cord-derived stromal cells." Cell Tissue Bank **16**(3): 389-397.

- Wang, M. and Z. Zou (2014). "Multiple mechanisms of SDF-1 promoting VEGF-induced endothelial differentiation of mesenchymal stem cells." Int J Cardiol **177**(3): 1098-1099.
- Yan, J., G. Tie, T. Y. Xu, K. Cecchini and L. M. Messina (2013). "Mesenchymal stem cells as a treatment for peripheral arterial disease: current status and potential impact of type II diabetes on their therapeutic efficacy." Stem Cell Rev **9**(3): 360-372.
- Zhang, B., N. Liu, H. Shi, H. Wu, Y. Gao, H. He, B. Gu and H. Liu (2015). "High glucose microenvironments inhibit the proliferation and migration of bone mesenchymal stem cells by activating GSK3beta." J Bone Miner Metab.
- Zhang, Y., C. Ye, G. Wang, Y. Gao, K. Tan, Z. Zhuo, Z. Liu, H. Xia, D. Yang and P. Li (2013). "Kidney-targeted transplantation of mesenchymal stem cells by ultrasound-targeted microbubble destruction promotes kidney repair in diabetic nephropathy rats." Biomed Res Int **2013**: 526367.
- Zhao, Q. S., N. Xia, N. Zhao, M. Li, C. L. Bi, Q. Zhu, G. F. Qiao and Z. F. Cheng (2013). "Localization of human mesenchymal stem cells from umbilical cord blood and their role in repair of diabetic foot ulcers in rats." Int J Biol Sci **10**(1): 80-89.
- Zhong, Q. and R. A. Kowluru (2010). "Role of histone acetylation in the development of diabetic retinopathy and the metabolic memory phenomenon." J Cell Biochem **110**(6): 1306-1313.
- Zhong, Q. and R. A. Kowluru (2011). "Epigenetic changes in mitochondrial superoxide dismutase in the retina and the development of diabetic retinopathy." Diabetes **60**(4): 1304-1313.
- Zhong, Q. and R. A. Kowluru (2013). "Epigenetic modification of Sod2 in the development of diabetic retinopathy and in the metabolic memory: role of histone methylation." Invest Ophthalmol Vis Sci **54**(1): 244-250.
- Zorina, T. D., V. M. Subbotin, S. Bertera, A. M. Alexander, C. Haluszczak, B. Gambrell, R. Bottino, A. J. Styche and M. Trucco (2003). "Recovery of the endogenous beta cell function in the NOD model of autoimmune diabetes." Stem Cells **21**(4): 377-388.

Figure 1. T2DM affects number, clonogenicity and proliferation of cultured BMMSCs. (A) Formation of CFU-Fs was assayed using bone marrow mononuclear cells from diabetic (ZDF) and non-diabetic (ZL) rats cultured in complete medium. Representative image of CFU-F colonies, the Colony Forming Efficiency (CFE) and the average area of each colony are shown in the Figure 1A. **(B)** The number of mononuclear cells present in the bone marrow was counted after isolation of BMMSCs from two tibias and two femurs per rat (n=3). **(C)** The number of the ZDF-BMMSCs in α MEM containing 10% FBS exhibited lower proliferation over a 7 day period of culture. Values are mean \pm SEM. The data are from 3 independent wells per condition in 3 independent experiments (n=9). * p<0.05; ** p<0.01; *** p<0.001.

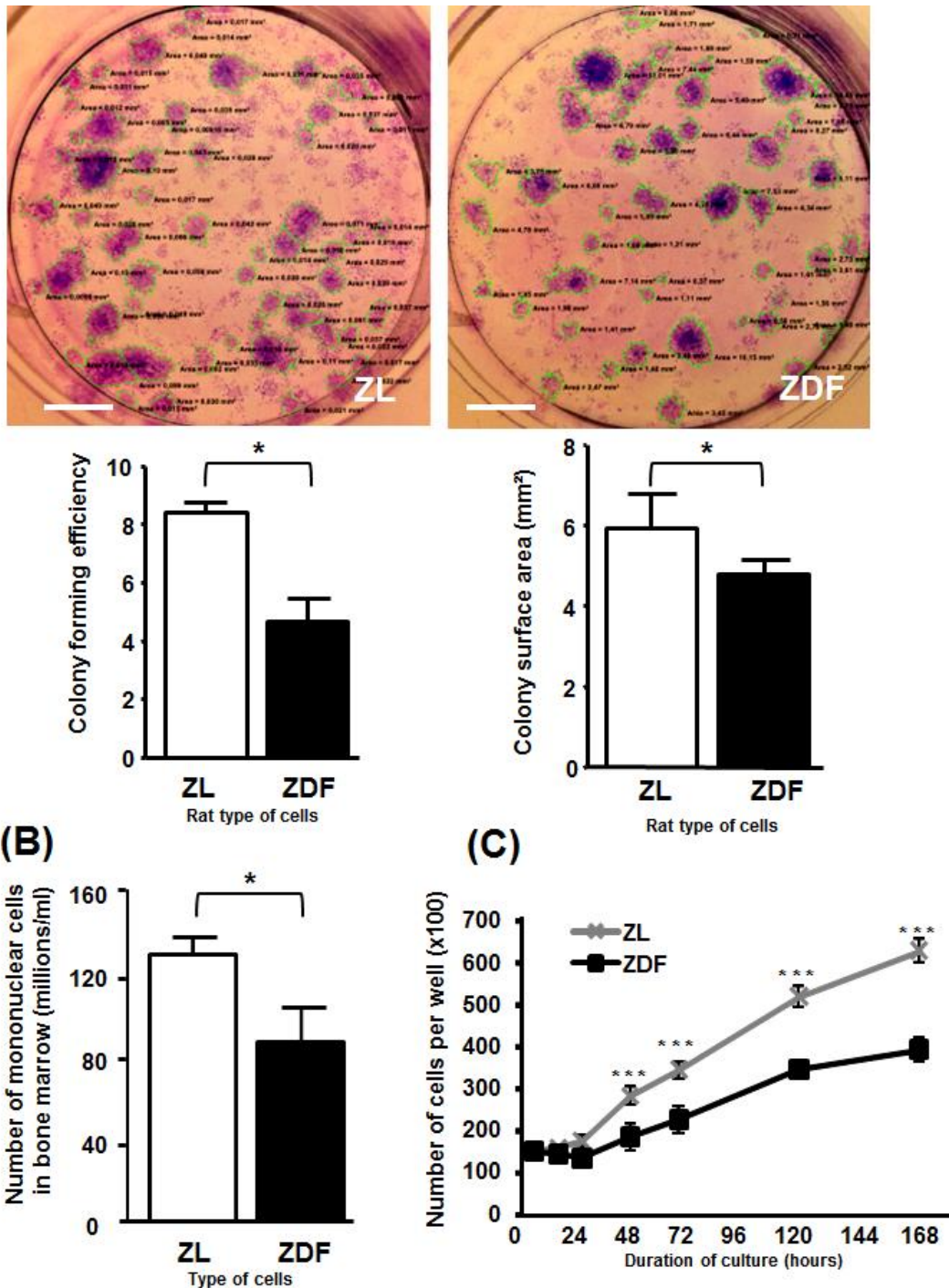


Figure 2. Impacted apoptosis, migration, adhesion and Reactive Oxygen Species (ROS) production of ZDF-BMMSCs. (A) Flow cytometry analysis of apoptosis using cultured under serum free condition for 48 hours and staining with annexine-PI. **(B)** Cell migration was determined using commercially-available 24-well Boyden chambers, cells present on four randomly-chosen, separate areas per membrane were counted *in situ*. **(C)** BMMSCs from ZDF and ZL rats were each seeded in 12-well culture plates, fixed with methanol-PBS solution and stained with Giemsa solution. Adherent cells were counted using the data processing software *Image J*. **(D)** Oxidative stress was induced by adding tert-butyl peroxide then Absorbance ($\lambda = 485\text{nm}$) was followed every 5 minutes into 40 minutes using spectrophotometer. Values are mean \pm SEM. The data are from 3 independent wells per condition in 3 independent experiments (n=9). * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$.

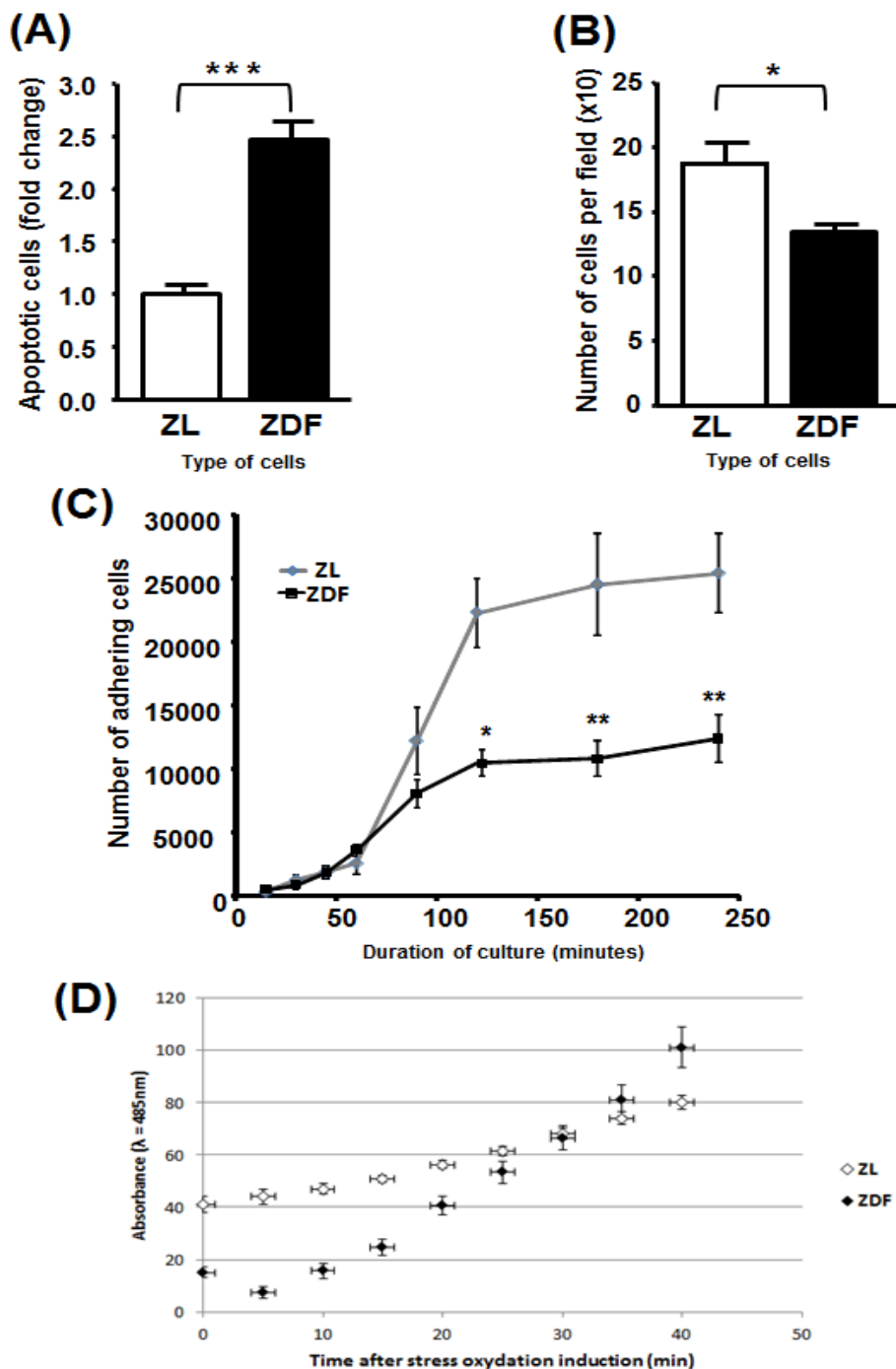


Figure 3. Enhanced adipogenic differentiation of the ZDF-BMMSCs. (A) Light microphotograph of 21 days BMMSC from ZDF and ZL rats were cultured in adipogenic-induction medium. (B) Oil red-O droplets in BMMSCs after 14 and 21 days of culture measured with spectrophotometer. (C) Levels of the Pparg, AdipoQ and Fabp4 genes in the BMMSCs measured with qPCR. Values are mean \pm SEM. The data are from 3 independent wells per condition in 3 independent experiments (n=9). * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$.

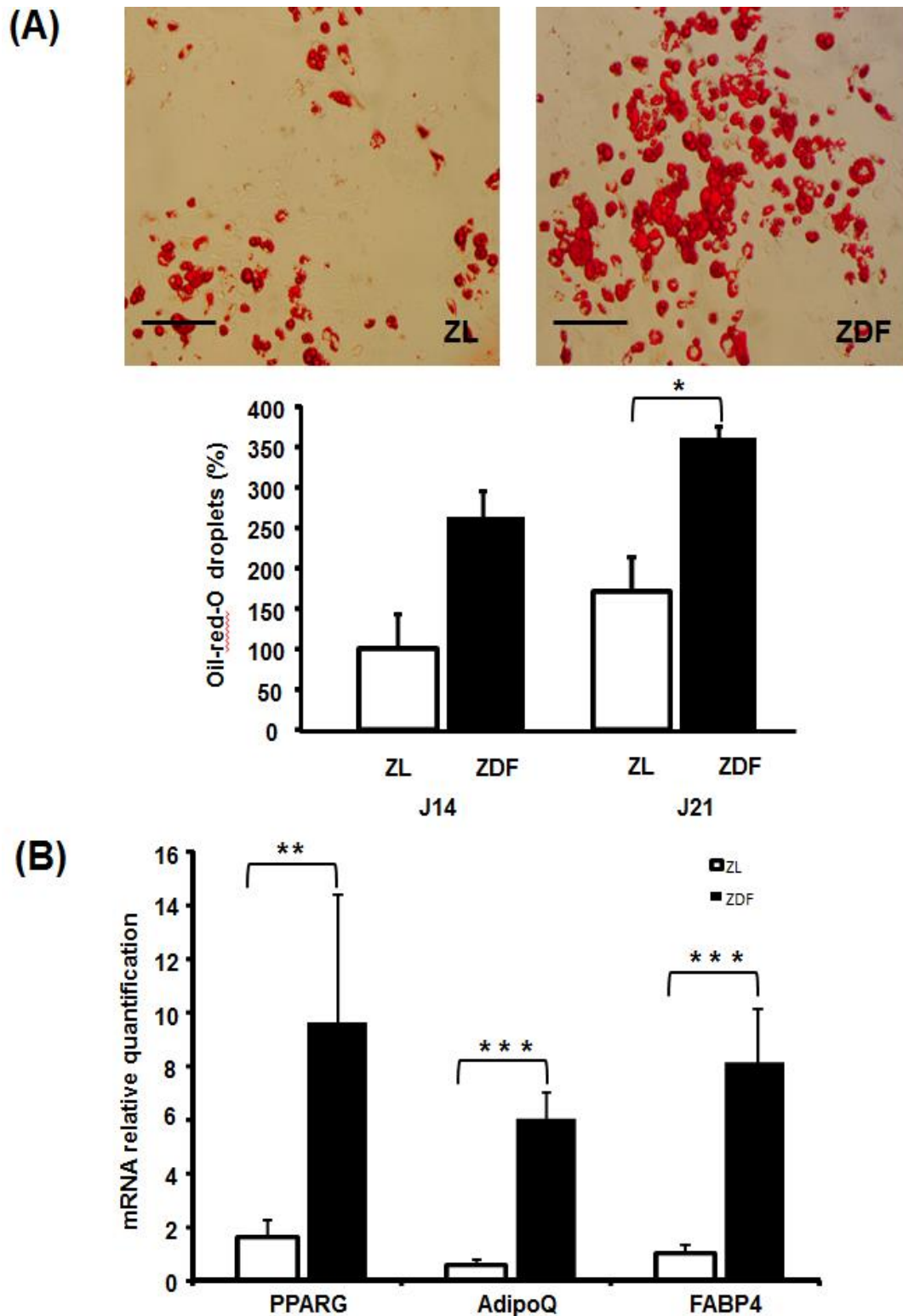


Figure 4. No difference in osteogenic differentiation from both ZDF and ZL-BMMSCs. BMMSC from ZDF and ZL rats were submitted to an osteogenic induction medium **(A)** Photograph of Alizarin red staining, after 21 days of culture in osteogenic media. **(B)** Dosage of alizarin red staining by spectrophotometry. Values are mean \pm SEM calculated from 3 independent wells per condition in 3 independent experiments (n=9) (*p<0.05; **p<0.01; ***p<0.001).

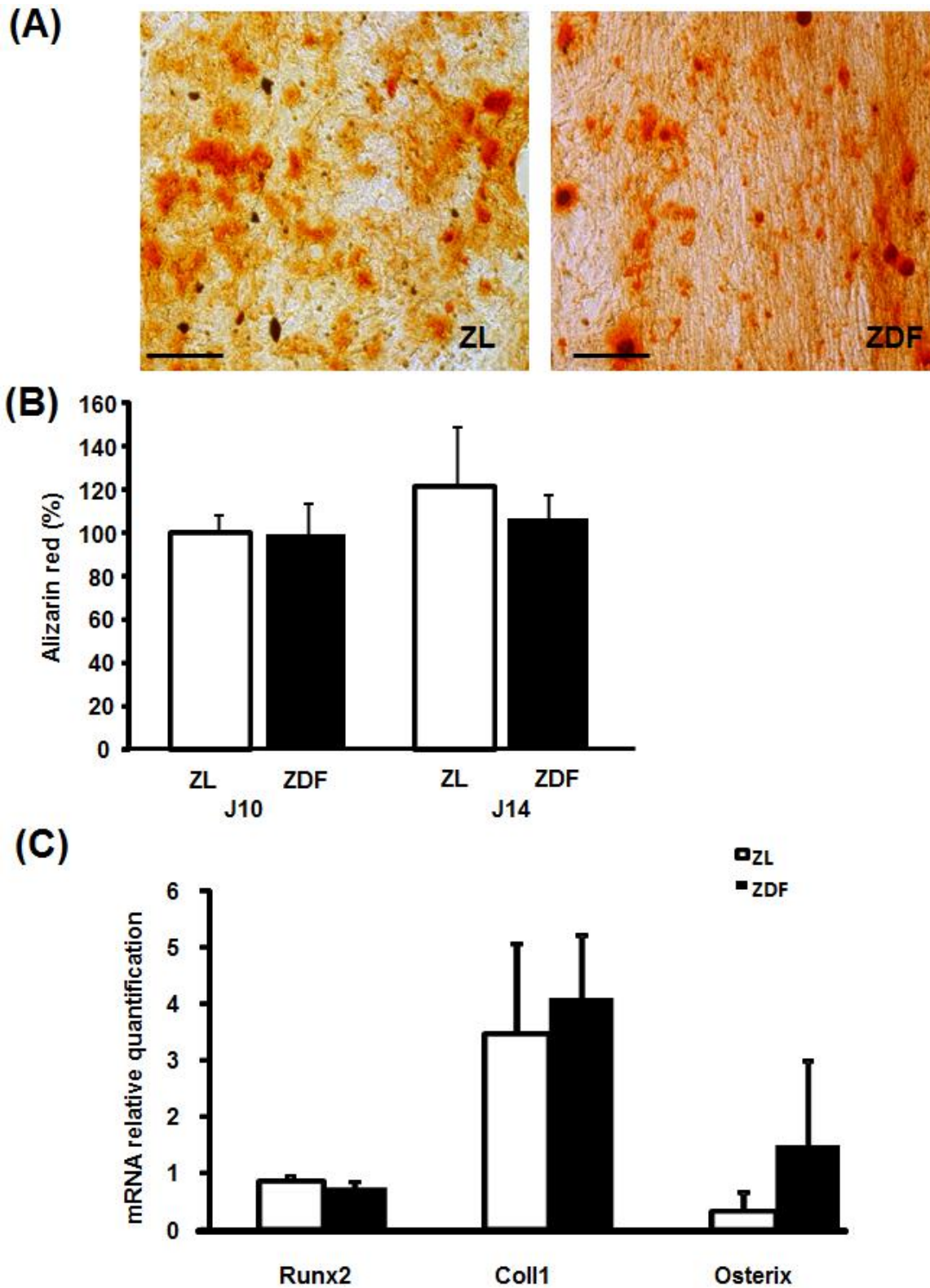
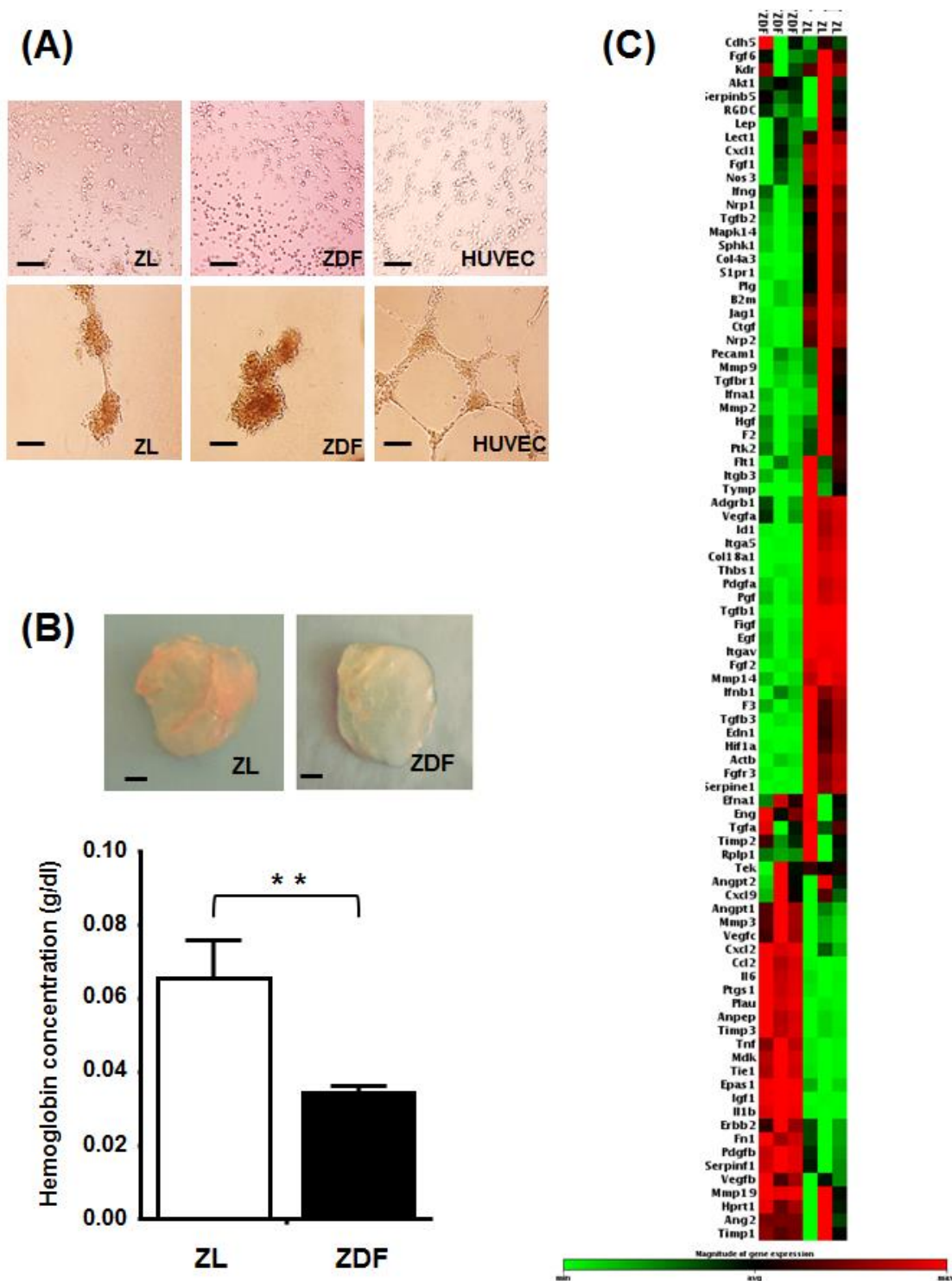


Figure 5. ZDF and ZL-BMMSCs do not have endothelial differentiation potential but ZL-BMMSCs are more angiogenesis inducing than their ZDF counterpart. (A) Light micrographs in an angiogenic induction medium of ZL, ZDF-BMMSCs and HUVECs cultured on matrigel for 24 hours. **(B)** Select angiogenic genes related growth factors after ZL and ZDF-BMMSCs were exposed to angiogenic medium for a 14 and 21 days period. **(C)** Light micrograph of matrigel plugs after 14 days after implantation (upper panel) and hemoglobin presence in the matrigel plugs after 14 days after implantation in nude mice (lower panel) **(D)** Array of angiogenic genes upregulated in the ZDF-BMMSCs compared to their ZL counterpart. Values are mean \pm SEM. The data are from 3 independent wells per condition in 3 independent experiments (n=9). *p<0.05; **p<0.01; ***p<0.001.



COMPTE-RENDUS SCIENTIFIQUES

ARTICLE - PREMIER AUTEUR

Denoeud, C., Luo, G., Paquet, J., Moya, A., Diallo, A., Marinesco, S., Meiller, A., Becquart, P., Moussi, H., Pauthe, E., Potier, E., Petite, H. Enzyme controlled, nutritive hydrogel for mesenchymal stem cell survival and regenerative functions. Rédaction achevée de l'article. Article soumis très prochainement à **Nature Materials**.

ARTICLES - COLLABORATION

Salazar-Noratto, G., Luo, G., **Denoeud, C.**, Padrona, M., Bensedhoum M., Bizios, R., Potier, E., Logeart-Avramoglou, D., Petite, H., Understanding and leveraging cell metabolism to enhance mesenchymal stem cell transplantation survival in tissue engineering and regenerative medicine applications. Article soumis à **Stem Cells**, le 10 Avril 2019.

Contribution : rédaction du tableau, co-rédaction du chapitre « MSC Metabolism », co-montage du schéma, relecture et corrections de la version finale, recherches et résumés bibliographiques.

Diallo, A., **Denoeud, C.**, El-Hafci, H., Pauthe, E., Petite, H., Bensedhoum, M., Anagnostou, F., Injectable Allograft Enhances Vertical Bone Augmentation in Rat Calvarium. Article en cours/fin de rédaction.

Contribution : mise en place des protocoles, réalisation des expérimentations, analyses des résultats et co-rédaction des parties « Materials & Methods » et « Results ».

Ribot, J., **Denoeud, C.**, Frescaline, G., Cordier, C., Bensedhoum, M., Petite, H., Anagnostou, F., Experimental type 2 diabetes impairs differently functional properties of bone marrow mesenchymal stromal cells. Rédaction achevée de l'article. Rédaction achevée de l'article. Article soumis prochainement à **Journal of Cellular and Molecular Medicine**.

Contribution : mise en place des protocoles, réalisation des expérimentations et analyses des résultats (pour les figures 1C, 2C-D, 4B-C), co-rédaction des parties « Materials & Methods » et « Results » (pour toutes les figures), relecture et corrections de la version finale.

Moya, A., Paquet J., Deschepper M., Larochette N., Oudina K., **Denoeud C.**, Bensedhoum M., Logeart-Avramoglou D., Petite H., Human mesenchymal stem cell failure to adapt to glucose shortage and rapidly use intracellular energy reserves through glycolysis explains poor cell survival after implantation, **Stem Cells**, Vol. 36, p363 – 376, 2018.

Contribution : mise en place des protocoles, réalisation des expérimentations, analyses des résultats et co-rédaction de la partie « Results » (pour les figures 1A, 3B, 4F, 6A-B-C-D), relecture et corrections de la version finale.

Dinis, T. M., Elia, R., Vidal, G., Dermigny, Q., **Denoeud, C.**, Kaplan, D. L., Egles, C., Marin, F., 3D multi-channel bi-functionalized silk electrospun conduits for peripheral nerve regeneration, **Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials**, Vol. 41, p43-55, 2015.

Contribution : mise en place des protocoles, co-réalisation des expérimentations et co-analyses des résultats (pour les figures 5A-B-C, 6A-B-C-D).

CONFÉRENCES - PREMIER AUTEUR

Denoeud, C., Luo, G., Paquet, J., Moya, A., Diallo, A., Marinesco, S., Meiller, A., Moussi, H., Becquart, P., Pauthe, E., Potier, E., Petite, H., Enzyme controlled, nutritive hydrogel for mesenchymal stem cell survival and regenerative functions, **Conférence orale présentée au congrès international du Tissue Engineering International & Regenerative Medicine (TERMIS), Rhodes (Grèce),** Mai 2019.

Denoeud, C., Paquet, J., Boisselier, J., Becquart, P., Moya, A., Diallo, A., Barbosa, M., Marinesco, S., Meiller, A., Lefebvre, E., Larreta-Garde, V., Pauthe, E., Potier, E., Petite, H., Enzyme controlled starch-based hydrogel for mesenchymal stem cell survival and paracrine functions, **Poster présenté au congrès international de l'Orthopaedic Research Society (ORS), Austin (Etats-Unis),** Février 2019.

Denoeud, C., Paquet, J., Boisselier, J., Becquart, P., Moya, A., Diallo, A., Barbosa, M., Marinesco, S., Meiller, A., Lefebvre, E., Larreta-Garde, V., Pauthe, E., Potier, E., Petite, H., Enzyme controlled starch-based hydrogel for mesenchymal stem cell survival and paracrine functions, **Poster présenté au congrès Européen du pôle de médecine régénératrice (BIOREGATE), Nantes,** Décembre 2018.

Denoeud, C., Paquet, J., Boisselier, J., Becquart, P., Moya, A., Diallo, A., Barbosa, M., Marinesco, S., Meiller, A., Lefebvre, E., Larreta-Garde, V., Pauthe, E., Potier, E., Petite, H., Glucose delivery system based-hydrogel composite scaffold for enhancing MSC survival and functionality, **Conférence orale présentée aux Journées de l'École Doctorale "Hématologie-Oncologie-Biothérapies (HOB)", Paris,** Mai 2018.

Denoeud, C., Paquet, J., Boisselier, J., Becquart, P., Moya, A., Diallo, A., Barbosa, M., Marinesco, S., Meiller, A., Lefebvre, E., Larreta-Garde, V., Pauthe, E., Potier, E., Petite, H., Glucose delivery system based-hydrogel composite scaffold for enhancing MSC survival and functionality, **Conférence orale présentée aux Journées Françaises de Biologie des Tissus Minéralisés (JFBTM), Monaco,** Mars 2018.

Denoeud, C., Paquet, J., Boisselier, J., Becquart, P., Barbosa, M., Lefebvre, E., Larreta-Garde, V., Pauthe, E., Petite, H., Glucose delivery system based-hydrogel composite scaffold for enhancing MSC survival and functionality, **Poster présenté à la réunion annuelle de l'Alliance pour les Sciences de la Vie et de la Santé (AVIESAN), Lyon,** Nov. 2017.

Denoeud, C., "Lutte contre le crime par négligence vis à vis des cellules souches mésenchymateuses post-implantation", **Conférence orale présentée au concours "Ma thèse en 180 secondes", Paris,** Mars 2017.

CONFÉRENCES - COLLABORATION

Diallo, A., **Denoeud, C.**, El-Kafci, H., Pauthe, E., Petite, H., Bensidhoum, M., Anagnostou, Evaluation du potentiel ostéoconducteur d'une matrice osseuse allogénique partiellement déminéralisée dans des défauts de différentes tailles au niveau de la calvaria de rat, **Poster présenté aux Journées Françaises de Biologie des Tissus Minéralisés (JFBTM), Boulogne-sur-Mer,** Juin 2019.

Diallo, A., **Denoeud, C.**, El-Kafci, H., Pauthe, E., Petite, H., Bensidhoum, M., Anagnostou, Injectable allograft enhances vertical bone augmentation in rat calvarium, **Poster présenté au congrès de l'Internal Association for Dental Research (IADR), Londres,** Juillet 2018.

Lopes, M., Bensidhoum, M., **Denoed, C.**, Petite, H., Pereira, M., Anagnostou, F., A new generation of bio-inspired mouldable bone-guidance membrane, **Poster présenté au congrès de l'European Association for Cranio-Maxillo-Facial Surgery (EACMF), Londres, Sept. 2016.**

PRIX

1^{er} prix pour conférence orale, catégorie Biomatériaux | Congrès national des Journées Françaises des Tissus Minéralisés (JFBTM), Monaco, 2018

1^{er} prix pour conférence orale, catégorie Recherche Translationnelle | Concours Ma thèse en 180 secondes, Faculté de Médecine Bichat, Paris, 2017

ENCADREMENT D'ÉTUDIANTS

Hilel MOUSSI, étudiante Master 2, encadrée de Janvier 2016 à Juillet 2016 (6 mois) pour l'obtention du Master « Biomatériaux pour la Santé » de l'Université Cergy-Pontoise. Projet intitulé « Etude de la survie et de la fonctionnalité des cellules souches mésenchymateuses en condition d'hypoxie dans un hydrogel nutritif ».

Chloé GUILLAS, étudiante Master 1, encadrée de Janvier 2017 à Mars 2017 (2 mois) pour l'obtention de la première année de Master « Biomatériaux pour la Santé » de l'Université Cergy-Pontoise. Projet intitulé « Etude de la production de glucose à l'intérieur d'hydrogels nutritifs ».

Alexandre WATIGNY, élève-ingénieur, encadré de Juin à Août 2017 (2 mois) pour la validation du Coursus Master en Ingénierie (CMI) de l'Université Cergy-Pontoise. Projet intitulé « Etude du relargage de glucose à partir d'hydrogels nutritifs pour des applications en bioingénierie ».

CONTRIBUTION ENVERS LE LABORATOIRE B30A

Contrat de collaboration industrielle avec la société ROQUETTE FRÈRES (Lestrem) pour l'optimisation de l'hydrogel nutritif.

Mise en place d'une station à base d'un micro-capteur enzymatique pour le dosage du glucose à l'intérieur de biomatériaux. Rédaction des procédures d'utilisation et formation des nouveaux utilisateurs. Technique importée depuis la plateforme NeuroChem de l'Université Lyon I.

Animateur des réunions hebdomadaires du laboratoire (1 an).

Délégué des étudiants Master et des doctorants (2 ans).

